



HAL
open science

Le potentiel thérapeutique des vésicules extracellulaires hémostatiques pour le traitement ciblé des hémorragies intracérébrales : de la production à grande échelle aux tests dans des modèles pré-cliniques

Fanny Potzeha

► **To cite this version:**

Fanny Potzeha. Le potentiel thérapeutique des vésicules extracellulaires hémostatiques pour le traitement ciblé des hémorragies intracérébrales : de la production à grande échelle aux tests dans des modèles pré-cliniques. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC422 . tel-03934805

HAL Id: tel-03934805

<https://theses.hal.science/tel-03934805>

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Le potentiel thérapeutique des vésicules extracellulaires hémostatiques pour le traitement ciblé des hémorragies intracérébrales : de la production à grande échelle aux tests dans des modèles pré-cliniques

Présentée et soutenue par
FANNY POTZEHA

Thèse à caractère confidentiel soutenue le 14/12/2021
devant le jury composé de

MME CHARLOTTE CORDONNIER	Professeur des universités PraticienHosp, Université de Lille	Rapporteur du jury
M. ROMARIC LACROIX	Professeur des universités PraticienHosp, Aix-Marseille Université	Rapporteur du jury
MME AMANDA K. ANDRIOLA SILVA	Chargée de recherche, Université Paris 7 Paris Diderot	Membre du jury
MME SARA MARTINEZ DE LIZARRONDO	Chargée de recherche, Université Caen Normandie	Membre du jury
MME ANNE-CLÉMENCE VION	Chargée de recherche, Université de Nantes	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp, Université Caen Normandie	Président du jury
M. THOMAS GABEREL	Professeur des universités PraticienHosp, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par **THOMAS GABEREL**, Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



La science pour la santé
From science to health

AVANT-PROPOS

L'AVC est la première cause de morbidité et la deuxième cause de mortalité dans le monde. Il existe deux formes d'AVC : ischémiques (80%) et hémorragiques (20%). L'AVC hémorragique est causé par l'extravasation du sang au travers des artères cérébrales et implique des phénomènes physiopathologiques spécifiques à la présence de sang au sein du parenchyme. Il n'y a actuellement pas de traitement disponible pour la plupart des AVC hémorragiques, en dehors des soins de support et l'hospitalisation en unité neurovasculaire. L'objectif principal de ce travail est de développer une nouvelle stratégie thérapeutique pour les AVC hémorragiques, basée sur l'utilisation de vésicules extracellulaires pro-coagulantes pour stopper le saignement.

L'introduction de ce manuscrit est organisée en plusieurs parties portant successivement sur les AVC hémorragiques et leur prise en charge diagnostique et thérapeutique, l'hémostase et les agents hémostatiques, les vésicules extracellulaires et l'activation endothéliale. Cette organisation est le reflet du raisonnement qui nous a conduit à proposer les vésicules extracellulaires comme traitement des AVC hémorragiques.

En effet, c'est d'abord la connaissance de la pathologie humaine et de sa prise en charge qui permet d'identifier des problématiques et d'évaluer la pertinence des solutions que l'on propose. Par exemple, dans le contexte de l'utilisation d'agents hémostatiques : est-ce pertinent de vouloir stopper le saignement ? L'intérêt de cette stratégie thérapeutique implique effectivement plusieurs éléments. Tout d'abord, *est-ce que le volume de l'hémorragie est un élément clé du pronostic neurologique ?* Si oui, limiter au maximum l'expansion de l'hématome apparaît comme une stratégie intéressante. Ou encore, *les patients saignent-t-ils toujours activement lors qu'ils arrivent à l'hôpital ?* Si non, il serait nécessaire de développer une stratégie thérapeutique utilisable en préhospitalier. Cela signifierait donc de développer une thérapie qui pourrait être utilisée avant que le diagnostic soit fait, et qui n'aurait pas d'effet délétère si la cause des symptômes n'est pas hémorragique mais ischémique, par exemple. *Est-il possible d'identifier les patients qui saignent activement ?* Si un traitement a beaucoup d'effets secondaires, il convient d'être capable d'identifier les patients les plus susceptibles de bénéficier de son effet hémostatique pour cibler son utilisation.

Imaginons une situation où un traitement hémostatique est associé à 30% d'effets secondaires graves : son utilisation est acceptable si 100% des patients présentent un saignement actif et vont donc bénéficier de son action hémostatique, alors qu'elle l'est beaucoup moins si seulement 10% des patients traités saignent activement, car la balance bénéfique/risque sera nécessairement défavorable. Le type d'agent hémostatique à développer est donc différent entre ces deux situations. La connaissance précise de ces éléments cliniques est donc primordiale pour trouver un traitement efficace, pertinent et intégrable dans la prise en charge des patients. C'est pour cela que la première partie de l'introduction est essentiellement clinique et traite du diagnostic, de la prise en charge et du pronostic des patients atteints d'un AVC hémorragique.

Ensuite, l'hémostase et le mécanisme d'action des traitements hémostatiques sont abordés. Si le système hémostatique était parfait, il maintiendrait en permanence une balance idéale entre thrombose et saignement. En cas de saignement intracrânien, l'hémostase se ferait de manière rapide et efficace, stoppant le saignement et prévenant la survenue d'atteinte neurologique irréversible. En cas de rupture de plaque d'athérome, le système hémostatique limiterait la formation de thrombus pour éviter une occlusion de l'artère ou l'embolisation du thrombus en développement. Malheureusement, ce n'est pas toujours le cas et cela laisse une place aux stratégies ciblant l'hémostase : les agents anti-coagulants ou anti-agrégants pour les patients à risque de thrombose et agents hémostatiques pour les patients qui saignent activement. Alors que les traitements anti-coagulants et anti-agrégants sont très largement utilisés en clinique, ce n'est pas le cas des agents hémostatiques qui n'ont que de rares indications (acide tranexamique principalement). Cela s'explique essentiellement par le fait que même en conditions de saignement actif, l'administration d'un traitement hémostatique n'est pas sans risque. Lors des essais sur le facteur VII activé, un agent pro-coagulant, la survenue de complications artérielles thrombotiques contrebalançaient ses effets bénéfiques sur le saignement. Un agent hémostatique parfait doit donc favoriser l'hémostase là où cela est nécessaire, mais ne pas entraîner de thrombose incontrôlée. Ce n'est que par la connaissance fine des mécanismes moléculaires et cellulaires de l'hémostase que cela est possible.

Idéalement, il faudrait donc un agent hémostatique capable de s'accumuler en regard du site de saignement. De manière intéressante, des études précédentes ont démontré que c'est justement le comportement des vésicules extracellulaires dans l'organisme. Ces vésicules faites de fragments de membrane qui peuvent être sécrétés par toutes les cellules de l'organisme joueraient effectivement un rôle clé dans la formation (et la destruction) des caillots sanguins.

Nous avons émis l'hypothèse que nous pourrions utiliser ce système afin de stopper les saignements lors des AVC hémorragiques, en injectant de grandes quantités de vésicules pro-coagulantes exogènes. Les caractéristiques des protéines présentes à la surface de certaines vésicules permettent, en effet, à la fois de les cibler vers le site du saignement et de promouvoir la coagulation et l'hémostase. Ces mécanismes d'adhésion en regard des lésions vasculaires seront présentés dans la partie de l'introduction sur l'activation endothéliale.

Le cœur de ce manuscrit est la présentation d'une étude originale sur le développement de vésicules extracellulaires provenant de monocytes, qui présentent plusieurs des caractéristiques attendues d'un agent hémostatique idéal.

Enfin, la dernière partie du manuscrit est une discussion sur les limites de cette stratégie et les différents obstacles qu'il faudra surmonter pour une utilisation clinique.

SOMMAIRE

Introduction.....	
A. L'accident vasculaire cérébral.....	1
I. Définition et incidence.....	1
II. L'accident vasculaire cérébral hémorragique.....	2
1. Définition.....	2
2. Topologie.....	2
III. L'hémorragie intracrânienne spontanée.....	3
1. Définition et épidémiologie.....	3
2. Facteurs de risque principaux modifiables et non modifiables.....	4
3. Autres facteurs de risque.....	6
4. Étiologies de l'hémorragie intracérébrale.....	7
5. Autres étiologies.....	9
IV. Physiopathologie de l'hémorragie intracérébrale.....	10
1. Mécanismes.....	10
V. Présentations cliniques.....	20
1. Apparition et progression.....	20
2. Signes neurologiques et localisation de l'hémorragie intracérébrale.....	21
VI. Prise en charge diagnostique initiale.....	22
1. Évaluation initiale.....	24
2. Biologie et examens électrophysiologiques.....	24
3. Imagerie initiale.....	25
a) Scanner cérébral.....	26
b) Imagerie par résonance magnétique cérébrale.....	26
c) Prédire l'expansion de l'hémorragie.....	27
d) <i>Spot sign</i> sur l'angio-TDM.....	27
4. Imagerie de suivi et étiologique.....	29
VII. Traitements et pronostic.....	32
1. Gestion pré-hospitalière.....	32
2. Admission à l'unité de soins intensifs ou unité neurovasculaire (UNV).....	32
3. Prise en charge du saignement aigu.....	32

a.	Autres stratégies hémostatiques non recommandées	35
b.	Gestion de la pression artérielle.....	37
c.	Traitement neurochirurgical	40
4.	Pronostic précoce.....	44
a.	Les taux de mortalité	44
b.	Les facteurs de risque de mauvais résultats	45
VIII.	Pronostic à long terme.....	45
IX.	Modèles expérimentaux pré-cliniques d'hémorragie intracérébrale spontanée	47
1.	Modèle d'hémorragie intracérébrale par injection stéréotaxique de sang.....	47
2.	Modèle d'hémorragie intracérébrale par injection stéréotaxique de collagénase.....	47
3.	Suivi comportemental	49
B.	L'hémostase.....	50
I.	Définition.....	50
II.	L'hémostase primaire	52
III.	L'hémostase secondaire	53
IV.	La fibrinolyse.....	57
V.	Types d'agents hémostatiques.....	60
1.	Les agents hémostatiques locaux administrés par voie topique.....	60
a.	Agents hémostatiques zéolite minérale.....	60
b.	Agents à base de chitosan	60
c.	Agents hémostatiques biologiquement actifs	61
d.	Anti-fibrinolytiques	62
e.	Agents absorbables	63
f.	Albumine et glutaraldéhyde	64
2.	Agents hémostatiques à base de micro- et nanoparticules administrées par voie systémique	64
C.	Les vésicules extracellulaires	73
I.	Définition et historique	73
II.	Classification et biogenèse	74
III.	Composition des VE.....	75
IV.	Rôles biologiques des VE.....	78
V.	Rôles pathologiques des VE	80
VI.	Les VE en tant que <i>drug carriers</i>	87

1.	Développement.....	87
b.	La caractérisation comme prérequis pour les études de sécurité et d'efficacité.....	89
c.	Capacités de ciblage et clairance.....	91
d.	Réponses immunitaires et toxicité potentielle.....	93
e.	Translation clinique.....	95
D.	L'activation endothéliale.....	103
I.	L'endothélium vasculaire.....	103
II.	Hétérogénéité des cellules endothéliales.....	105
1.	Hétérogénéité des cellules endothéliales au sein et entre les tissus.....	105
2.	Régulation environnementale et génétique du phénotype des cellules endothéliales.....	106
III.	Le rôle de l'endothélium dans la coagulation.....	106
1.	Les mécanismes anti-coagulants.....	107
2.	Les mécanismes pro-coagulants.....	108
IV.	Perturbation des cellules endothéliales et lésion vasculaire.....	111
1.	Le stress oxydatif.....	112
2.	Le « <i>shear stress</i> ».....	112
V.	Interaction entre les cellules endothéliales et les cellules sanguines.....	115
1.	Interactions des plaquettes et des leucocytes avec la paroi vasculaire.....	115
2.	Adhésion des leucocytes et des plaquettes durant l'inflammation.....	116
3.	Outils d'imagerie utilisant des particules ciblant les cellules endothéliales activées au niveau cérébral.....	121
4.	Applications de l'IRM moléculaire sur la neuro-inflammation.....	122
	Projet de thèse.....	125
	Résultats.....	128
	Discussion.....	178
	Conclusion générale.....	197
	Autres travaux.....	199
	Bibliographie.....	221

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Illustrations d'un AVC ischémique et d'un AVC hémorragique.....	1
Figure 2 : Représentation schématique des différents sous-types d'hémorragies cérébrales....	3
Figure 3 : Représentation schématique des différents mécanismes physiopathologiques entrant en jeu lors de la phase secondaire de dommages après HIC.....	10
Figure 4 : Processus physiopathologiques de l'hémorragie intracérébrale.....	11
Figure 5 : Représentation schématique des trois phases du débit sanguin cérébral et des modifications du métabolisme dans phases aiguë, subaiguë et chronique après hémorragie intracérébrale	15
Figure 6 : Représentation schématique des différentes cytokines pro- et anti-inflammatoires impliquées dans les mécanismes de dommages secondaires après HIC	17
Figure 7 : Évolution dans le temps des modifications neurologiques de l'hémorragie intracérébrale.....	20
Figure 8 : Caractéristiques cliniques et de neuro-imagerie de l'HIC associées à des causes sous-jacentes.....	23
Figure 9 : TDM et IRM des hémorragies intracérébrales hyperaiguës. Des TDM et IRM ont été obtenues moins de 6 heures après l'apparition des symptômes chez un patient présentant une HIC aiguë spontanée.....	25
Figure 10 : Le « spot sign ». Patient présentant un spot sign, démontrant une extravasation de produit de contraste et prédisant une expansion de l'hématome.	28
Figure 11 : Résultats initiaux d'imagerie pouvant suggérer une cause sous-jacente spécifique.	30
Figure 12 : Agents d'inversion des anticoagulants oraux directs pour les hémorragies mettant la vie en danger (risque imminent de décès par hémorragie).	35
Figure 13 : Principaux essais cliniques en recrutement, en cours, complétés ou terminés sur l'HIC.....	43
Figure 14 : Échelle de Rankin modifiée.....	44
Figure 15 : Représentation schématique du modèle d'HIC par l'injection stéréotaxique de collagénase chez le rongeur.....	48
Figure 16 : Représentation schématique de l'hémostase lors d'une lésion vasculaire et ses trois étapes interdépendantes ; l'hémostase primaire, l'hémostase secondaire et la fibrinolyse.....	51

Figure 17 : Représentation schématique de la première étape de l'hémostase : l'hémostase primaire.....	53
Figure 18 : Schématisation de la cascade d'activation de la voie extrinsèque de la coagulation. La présence de FT lors d'une lésion vasculaire génère de la fibrine stabilisée.....	54
Figure 19 : Schématisation de la cascade d'activation de la voie intrinsèque de la coagulation.....	55
Figure 20 : Représentation schématique de la cascade de coagulation et de ses inhibiteurs. .	56
Figure 21 : <i>Agents hémostatiques traditionnels administrés par voie locale ou systémique</i>	68
Figure 22 : <i>Micro- et nanoparticules hémostatiques administrées par voie systémique</i>	69
Figure 23 : Classification des vésicules extracellulaires basée sur leur origine cellulaire ou leur fonction biologique ou en fonction de leur biogénèse.....	74
Figure 24 : Représentation schématique de la composition membranaire des VE dérivées de cellules.....	77
Figure 25 : Rôle des VE dans le maintien d'un état physiologique et dans la pathogenèse de la maladie.....	79
Figure 26 : Le rôle des VE dans le cancer.....	83
Figure 27 : Accumulation de facteur tissulaire dans le thrombus artériel en développement..	85
Figure 28 : Vue d'ensemble des avantages et des limites des méthodes d'isolement des VE les plus courantes.....	88
Figure 29 : Caractéristiques de chaque mode de détection des microvésicules.....	90
Figure 30 : Synthèse des recommandations MISEV définies en 2018	91
Figure 31 : Illustration de la diaphonie cellulaire induite par les VE, des mécanismes de clairance et des réponses immunitaires.....	92
Figure 32 : Les VE peuvent être regroupées sur la base de l'origine de leurs constituants dans des VE natives, des VE provenant de cellules (génétiquement) modifiées, des VE post-modifiées ou liposomes inspirés de VE.....	96
Figure 33 : Organigramme illustrant des considérations importantes pour le développement de thérapies à base de VE	101
Figure 34 : Rôle des cellules endothéliales au cours de processus pathologiques.....	111
Figure 35 : La post-confluence affecte l'organisation de l'actine dans les réponses des cellules endothéliales au shear stress	113

Figure 36 : Étapes de la transmigration leucocytaire : implication des molécules d'adhésion endothéliales.....	116
Figure 37 : Les différentes caractéristiques des sélectines.....	117
Figure 38 : Représentation schématique de la relation entre la sévérité de l'activation endothéliale et les changements de signal induits par MPIOs à l'IRM (signal voids).....	123
Figure 39 : Génération de thrombine induite par des VE dérivées de plaquettes, des VE dérivées de globules rouges et des VE dérivées de monocytes en présence ou en absence d'un inhibiteur de trypsine.....	182
Figure 40 : Nouvelle méthode d'immobilisation et de caractérisation des VE.....	183
Figure 41 : Images représentatives de résultats préliminaires obtenus par immunohistologie et microscopie biphotonique.....	186
Figure 42 : Généralisation de la biodistribution des VE chez les animaux receveurs dans le temps après une administration intraveineuse à partir de 36 études ex vivo des organes prélevés	188
Figure 43 : Généralisation des VE détectables dans la circulation sanguine dans le temps après l'administration intraveineuse.....	189
Figure 44 : Représentation schématique des avancées technologiques vers la production à grande échelle de vésicules extracellulaires issues de différentes sources cellulaires.....	193

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAC	angiopathie amyloïde cérébrale
ACB	anévrismes de Charcot-Bouchard
AINS	anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIT	accident vasculaire transitoire
AOD	anti-coagulants oraux directs
APC	<i>activated protein C</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATACH-2	<i>antihypertensive treatment of acute cerebral hemorrhage-2</i>
AT-III	antithrombine-III
AVC	accident vasculaire cérébral
BHE	barrière hémato-encéphalique
Ca ²⁺	calcium
CCR5	récepteur à C-C chimiokine de type 5
CE	cellules endothéliales
CMBs	<i>cerebral microbleeds</i>
CSM	cellules souches mésenchymateuses
DFSD	pansement sec de colle de fibrine
DLS	diffusion de lumière dynamique
DSC	débit sanguin cérébral
DWI	<i>diffusion weighted-imaging</i>

ECG	électrocardiogramme
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERm	échelle de Rankin modifiée
ESCRT	<i>endosomal sorting complexes required for transport</i>
EVACUATE	<i>ultra-early, minimally invasive intracerebral hemorrhage evacuation versus standard treatment</i>
FAS-L	FAS-ligand
FAST	<i>recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage</i>
FC	<i>flow cytometry</i>
FDA	<i>food and drug administration</i>
FIVHeMA	<i>intraventricular fibrinolysis versus external ventricular drainage alone in aneurysmal subarachnoid hemorrhage</i>
FT	facteur tissulaire
FVIIar	facteur VII activé recombinant
GAG	glycosaminoglycane
GPIb	<i>glycoprotein Ib</i>
GPIb- α	<i>glycoprotein Ib-α</i>
GRE	écho de gradient
HBPM	héparine de bas poids moléculaire
HIC	hémorragie intracrânienne
HIV	hémorragie intraventriculaire
HO-1	hème-oxygène-1

HSA	hémorragie sous-arachnoïdienne
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
Ig	Immunoglobuline
IL	interleukines
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
INTERACT2	<i>intensive blood pressure reduction in acute cerebral hemorrhage 2</i>
IRM	imagerie par résonance magnétique
ISEV	<i>International Society of Extracellular Vesicles</i>
KH	kininogène de haut poids moléculaire
LCR	liquide céphalo-rachidien
LPS	lipopolysaccharide
Lu-ECAM-1	<i>lung endothelial cell adhesion molecule-1</i>
Mad-CAM-1	<i>mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEC	matrice extracellulaire
MFGE8	<i>milk fat globule-EGF factor 8 protein</i>
miARN	micro acide ribonucléique
MISEV	<i>minimal information for studies of extracellular vesicles</i>
MISTIE II et III	<i>safety and efficacy of minimally invasive surgery plus alteplase in intracerebral hemorrhage evacuation</i>
MMP	métalloprotéase matricielle
MPIO	<i>microparticle iron oxide</i>
mRS	<i>modified Rankin scale</i>
NK	<i>natural killer</i>

NTA	<i>nanoparticle trafficking analysis</i>
OMS	organisation mondiale de la santé
OR	<i>odds ratio</i>
PA	pression artérielle
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAI-2	<i>plasminogen activator inhibitor-2</i>
PAR	<i>protease activated receptor</i>
PAS	pression artérielle systolique
PATCH	<i>platelet transfusion versus standard care after acute stroke due to spontaneous cerebral hemorrhage associated with antiplatelet therapy</i>
PDCD6IP	<i>programmed cell death 6 interacting protein</i>
PDGF- β	<i>platelet derived growth factor subunit-β</i>
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PEG	polyéthylène glycol
PFC	plasma frais congelé
PIC	pression intracrânienne
PIG	prostaglandine
PrP	protéines prions
PS	phosphatidylsérine
PSGL-1	<i>P-selectine glycoprotein ligand-1</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SNC	système nerveux central
SO	stress oxydatif

STICH I et II	<i>surgical treatment for intraventricular hemorrhage and hydrocephalus after spontaneous intracerebral hemorrhage</i>
SVCR	syndrome de vasoconstriction cérébrale réversible
SWITCH	<i>swiss trial of decompressive craniectomy versus best medical treatment of spontaneous supratentorial intracerebral hemorrhage</i>
TDM	tomodensitométrie
TFPI	<i>tissue factor pathway inhibitor</i>
TGF- β	<i>tumor growth factor-β</i>
TICH-2	<i>tranexamic acid for hyperacute primary intracerebral hemorrhage-2</i>
TLR-4	<i>toll like receptor-4</i>
TM	thrombomoduline
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
TSG101	<i>tumor susceptibility 101</i>
TSPAN29	<i>tetraspanin 29</i>
UNV	unité neurovasculaire
uPA	urokinase
USI	unité de soins intensifs
VCAM-1	<i>circulating vascular cell adhesion molecule-1</i>
VE	vésicule extracellulaire
VIH-1	<i>virus de l'immunodéficience humaine-1</i>
VPP	vasculopathie perforante profonde
vWF	<i>von Willebrand Factor</i>
4F PCC	concentré de complexe pro-thrombotique à 4 facteurs

INTRODUCTION

A. L'accident vasculaire cérébral

I. Définition et incidence

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est une pathologie du système neuro-vasculaire et est caractérisé par un déficit neurologique focal de survenue brutale, causé par une lésion du tissu cérébral. L'AVC touche, chaque année, 17 millions de personnes dans le monde (d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)). Il s'agit d'une affection grave responsable de près de 5.5 millions de décès chaque année dans le monde (10.2% du nombre de décès globaux) et qui représente la première cause de handicap acquis chez l'adulte (Owens Johnson *et al.*, 2019).

Annuellement en France, plus de 150 000 personnes sont victimes d'un AVC et environ 40 000 personnes perdent la vie. Un rapport remis au ministre de la Santé en 2009 indique qu'un quart des nouveaux cas survenus concerne des personnes de moins de 65 ans, la moitié des personnes de 65 à 84 ans et le quart restant des personnes de plus de 85 ans.

Deux formes distinctes de la pathologie existent et se manifestent par des symptômes cliniques semblables. Dans 85% des cas, les AVC sont de type ischémique et sont causés par une diminution du débit sanguin cérébral (DSC) entraînant une souffrance du parenchyme. Les 15 autres pourcents des AVC sont représentés par la forme hémorragique et sont causés par l'extravasation du sang au travers des artères cérébrales et impliquent des phénomènes physiopathologiques spécifiques à la présence de sang au sein du parenchyme (Figure 1).

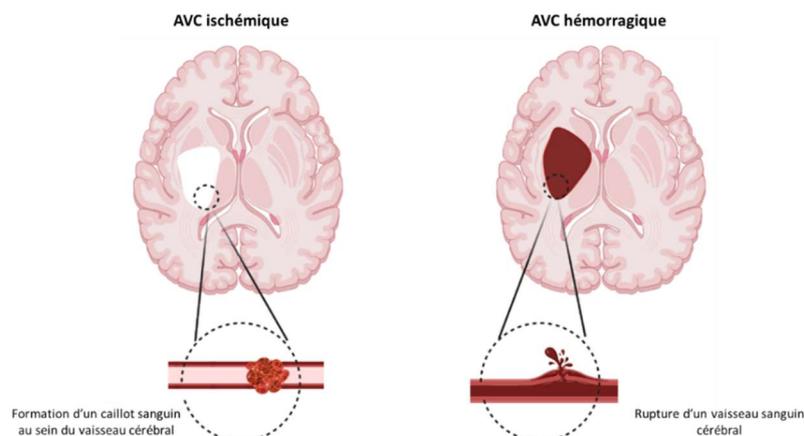


Figure 1 : Illustrations d'un AVC ischémique et d'un AVC hémorragique (modifié d'après la Fondation des maladies du cœur et de l'AVC du Canada).

II. L'accident vasculaire cérébral hémorragique

1. Définition

L'AVC hémorragique fait suite à la rupture d'un vaisseau cérébral entraînant un saignement intracrânien (Goldberg, Raabe and Bervini, 2018). L'hématome intracrânien ainsi constitué va être responsable d'un effet de masse sur le parenchyme cérébral adjacent et d'une toxicité liée à la présence de produits sanguins au contact des structures cérébrales. L'AVC hémorragique, dont l'issue est fatale dans plus de 30% des cas, représente 5 à 20% des cas d'AVC (15.6% en 2016), et son incidence varie selon l'âge et les régions géographiques (Owens Johnson *et al.*, 2019).

2. Topologie

On distingue différents types d'AVC hémorragiques selon leur topologie (Figure 2):

Les hémorragies sous-durales, extra-durales ou épidurales, qui sont le résultat de l'épanchement du sang soit entre les méninges, la dure-mère et l'arachnoïde, soit entre la dure-mère et l'os du crâne et représentent 2% des hémorragies (Uppar *et al.*, 2021) ; elles sont fréquemment post-traumatiques ;

Les hémorragies sous-arachnoïdiennes, causées dans 85% des cas par un anévrisme, résultent de la rupture d'un vaisseau entre la pie-mère et l'arachnoïde (Macdonald and Schweizer, 2017) et représentent 5% des AVC ;

Les hémorragies intraventriculaires où l'hématome se situe dans un ou plusieurs ventricules cérébraux. Elles font le plus souvent suite à une hémorragie sous-arachnoïdienne ou intraparenchymateuse qui s'étend aux ventricules (Carpenter *et al.*, 2021) ;

Les hémorragies intraparenchymateuses résultant de la rupture d'une artériole distale, sont le plus souvent causées par une pathologie hypertensive et/ou une angiopathie amyloïde (Qureshi, Mendelow and Hanley, 2009) et représentent 15-20% des AVC. Ce type d'hémorragie sera celui auquel nous nous intéresserons plus particulièrement dans ce manuscrit.

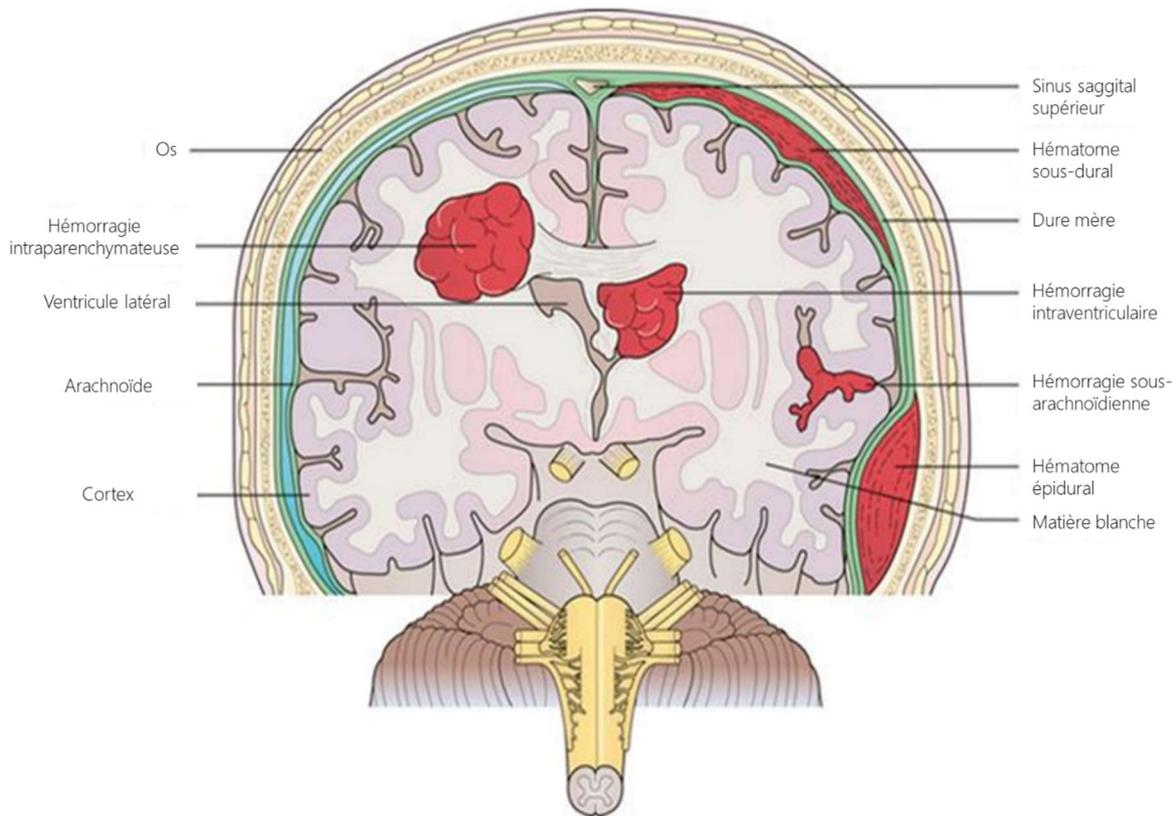


Figure 2 : Représentation schématique des différents sous-types d'hémorragies cérébrales (Macdonald et al., 2017).

III. L'hémorragie intracrânienne spontanée

1. Définition et épidémiologie

L'hémorragie intracrânienne spontanée (HIC) représente un saignement direct intraparenchymateux, généralement dû à une rupture des artéριοles ou des petites artères du cerveau.

L'HIC spontanée (atraumatique) est la cause d'environ 15% de tous les AVC dans le monde (Steiner *et al.*, 2014; Feigin *et al.*, 2016). Son incidence globale varie de 12 à 31 pour 100 000 personnes selon l'origine ethnique (Gebel and Broderick, 2000; Flaherty *et al.*, 2005; Labovitz *et al.*, 2005; Sacco *et al.*, 2009; Charlotte Jj van Asch *et al.*, 2010; Poon, Fonville and Salman, 2014). Cette incidence augmente avec l'âge, doublant tous les 10 ans après 35 ans (Broderick *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 2012).

L'incidence la plus élevée d'hémorragie cérébrale a été observée en Asie et en Afrique subsaharienne australe, tandis que l'incidence la plus faible a été observée en Amérique du Nord, en Europe occidentale, en Amérique Latine et en Océanie. Le taux plus élevé d'HIC dans certaines régions est principalement attribuable à un excès d'HIC dans les régions cérébrales profondes où l'hypertension est le principal facteur de risque (Flaherty *et al.*, 2005). Les données sur l'association du sexe avec l'incidence de l'HIC ne sont pas concluantes (Gokhale, Caplan and James, 2015). Une méta-analyse parue en 2010 n'a montré aucune différence significative dans l'incidence entre les patients masculins et féminins (Charlotte Jj van Asch *et al.*, 2010), tandis qu'une revue systématique de 2009 a révélé que l'incidence de l'HIC était plus élevée chez les hommes (Appelros, Stegmayr and Terént, 2009).

Une revue systématique de 2013 a révélé que les conséquences des hémorragies cérébrales (principalement les HIC mais aussi les hémorragies sous-arachnoïdiennes) étaient supérieures à celui de l'AVC ischémique en termes de décès et d'handicap, même si l'incidence des AVC ischémiques était plus de deux fois plus élevée (Krishnamurthi *et al.*, 2014).

2. Facteurs de risque principaux modifiables et non modifiables

Les principaux facteurs de risque de l'HIC spontanée comprennent l'âge avancé, l'hypertension et l'utilisation de traitement anti-thrombotique (anti-plaquettaire et anti-coagulant).

- *Âge*

Le risque d'HIC augmente avec l'âge. Une méta-analyse de plus de 8 100 patients atteints d'HIC a évalué l'incidence de l'HIC liée à l'âge sur une période de 28 ans (Charlotte Jj van Asch *et al.*, 2010). En gardant le groupe âgé de 45 à 54 ans comme groupe de référence, le rapport d'incidence est passé de 0.10 (incidence à 95% 0.06-0.14) pour les moins de 45 ans jusqu'à 9.6 (incidence à 95% 6.6-13.9) pour les patients de plus de 85 ans.

- *Hypertension*

En plus d'être l'étiologie la plus courante de l'HIC spontanée, l'hypertension est le facteur de risque le plus important dans le développement de l'HIC (Woo *et al.*, 2002, 2004; Feldmann *et al.*, 2005; Zia *et al.*, 2007; Poon, Fonville and Salman, 2014). L'hypertension fait plus que doubler le risque d'HIC (Ariesen *et al.*, 2003; Sturgeon *et al.*, 2007; O'Donnell *et al.*, 2010; Martini *et al.*, 2012).

La contribution relative de l'hypertension peut être plus importante pour l'HIC profonde que pour l'HIC lobaire (Jackson and Sudlow, 2006; Zia *et al.*, 2007; O'Donnell *et al.*, 2010; Martini *et al.*, 2012). Dans une méta-analyse qui a regroupé les données de 28 études, l'hypertension était deux fois plus fréquente chez les patients atteints d'HIC profonde par rapport aux patients atteints d'HIC lobaire (rapport de cotes [OR] 2.1, IC à 95% 1.82-2.42). Dans les données d'un sous-ensemble de trois études de la méta-analyse réunissant plus de critères méthodologiques rigoureux, l'association de l'hypertension à l'HIC profonde est restée significative ([OR] 1.5, IC à 95% 1.09-2.07). Dans certaines études, l'hypertension s'est aussi avérée être un facteur de risque d'HIC dans l'établissement d'autres étiologies sous-jacentes de l'HIC (par exemple, l'angiopathie amyloïde cérébrale ou l'HIC associée aux anti-thrombotiques) (Ritter *et al.*, 2005; Arima *et al.*, 2010; Toyoda *et al.*, 2010).

- *Médicaments anti-thrombotiques*

La prise d'un traitement anti-coagulant, en particulier la warfarine, est associée à un risque accru d'HIC, alors que le risque d'HIC avec une monothérapie anti-plaquettaire apparaît comme minime.

- *Warfarine (anti-vitamine K)*

L'anticoagulation avec la warfarine augmente de 2 à 5 fois le risque d'HIC, en fonction de l'intensité de l'anticoagulation (Hald *et al.*, 2021). En plus d'un risque accru d'HIC, des preuves rétrospectives suggèrent que le traitement à la warfarine avec un ratio normalisé international (INR) supérieur à 3 est un facteur de risque pour un plus large volume d'hémorragie ainsi que de moins bons résultats cliniques après HIC.

- *Anti-coagulants oraux directs*

Le risque d'HIC est inférieur d'environ 30 à 60% avec les anti-coagulants oraux directs (AOD : dabigatran, apixaban, edoxaban, rivaroxaban) qu'avec la warfarine chez les patients atteints de fibrillation auriculaire non valvulaire, même en cas de thérapie à la warfarine bien contrôlée (López-López *et al.*, 2017). La prescription de plus en plus répandue des AOD en remplacement des anti-vitamines K devraient ainsi participer à diminuer l'incidence des HIC.

- *Agents thrombolytiques*

Le risque d'HIC associé aux médicaments thrombolytiques tels que l'altéplase ou le tenecteplase varie selon la posologie et les indications. A titre d'exemple, le taux d'HIC était de 1.3 % dans un essai de patients recevant une thrombolyse pour un infarctus du myocarde et d'environ 6% pour des patients traités aux thrombolytiques et atteints d'AVC ischémique aigu ([Gore et al., 1991](#)), [National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group](#)).

- *Agents anti-plaquettaires*

Il existe probablement une légère augmentation absolue du risque d'HIC primaire associée à l'aspirine ou à un agent anti-plaquettaire en monothérapie, sur la base de méta-analyses d'essais cliniques randomisés ([He et al., 1998](#); [Hart et al., 2000](#); [Hald et al., 2021](#)), bien que d'autres études cas-témoins n'aient pas retrouvé ce risque accru ([Thrift et al., 1996](#); [Garcia-Rodriguez et al., 2013](#)). La double thérapie anti-plaquettaire confère probablement un risque plus élevé par rapport à la monothérapie. Dans un essai portant sur plus de 7 500 patients atteints de fibrillation auriculaire pour lesquels un traitement à la warfarine a été considéré comme inadapté, le traitement anti-plaquettaire par aspirine supplémenté de clopidogrel a augmenté par deux le risque d'HIC par rapport à l'aspirine seule (0.4% contre 0.2%) ([ACTIVE Investigators](#)). Cependant, dans un autre essai clinique randomisé portant sur plus de 4 800 adultes ayant subi un AVC mineur ou un accident ischémique transitoire (AIT), le traitement à court terme (90 jours) avec clopidogrel + aspirine n'a pas augmenté le risque d'HIC par rapport à l'aspirine seule ([Johnston et al., 2018](#)).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ne semblent pas augmenter le risque d'HIC ([You et al., 1999](#); [Johnsen et al., 2003](#); [Choi et al., 2008](#)), malgré leur capacité à inhiber la cyclo-oxygénase de type I et donc à présenter un effet anti-plaquettaire.

3. Autres facteurs de risque

- Obésité et inactivité ([Pezzini et al., 2013](#)) ;
- Consommation élevée d'alcool ([Larsson et al., 2016](#); [Chen et al., 2017](#)) ;
- Race et origine ethnique ([Sturgeon et al., 2007](#); [Howard et al., 2013](#)) ;

- Abaissement du cholestérol et des lipoprotéines de basse densité (Hackam *et al.*, 2011; McKinney and Kostis, 2012; Woo *et al.*, 2013; Gaist *et al.*, 2017; Ziff *et al.*, 2019; Ribe *et al.*, 2020) ;
- Variation génétique (Martini *et al.*, 2012; Devan *et al.*, 2013) ;
- Maladies vasculaires des petits vaisseaux (Seiffge, Meinel, *et al.*, 2021; Seiffge, Wilson, *et al.*, 2021) ;
- Usage du tabac (Kurth *et al.*, 2003);
- Consommation de stimulants (Lee *et al.*, 2013) ;
- Infections (Behrouz *et al.*, 2016), le virus de l'hépatite C (Karibe *et al.*, 2001; Tseng *et al.*, 2015; K.-Y. Li *et al.*, 2021).

Il existe également d'autres facteurs de risque moins certains que nous n'énumérons pas en détails tels que les maladies rénales chroniques, le diabète, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine ou les migraines (Bos *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 2011; Hackam and Mrkobrada, 2012; Ovbiagele *et al.*, 2013; Sacco *et al.*, 2013; Boulanger *et al.*, 2016).

4. Étiologies de l'hémorragie intracérébrale

Il existe plusieurs conditions pathologiques sous-jacentes associées à l'HIC ; la vasculopathie hypertensive, l'angiopathie amyloïde et la malformation vasculaire rompue sont les plus communes (Beslow *et al.*, 2010; Cordonnier *et al.*, 2018).

- *Vasculopathie hypertensive*

Des hémorragies hypertensives surviennent sur le territoire des artères pénétrantes qui bifurquent des principales artères intracérébrales. Ces petites artères pénétrantes peuvent être particulièrement sensibles aux effets de l'hypertension, car elles sont directement exposées à la pression du vaisseau parental beaucoup plus grand, sans la protection d'une précédente diminution progressive du calibre du vaisseau (Garcia and Ho, 1992). Les vaisseaux sanguins qui provoquent une hémorragie hypertensive sont généralement les mêmes que ceux affectés par la maladie occlusive hypertensive et la vasculopathie diabétique, qui provoquent des AVC ischémiques lacunaires.

On pense aussi que la vasculopathie hypertensive joue un rôle dans le développement de la maladie des petits vaisseaux de la substance blanche (leucoaraïose), qui peut expliquer l'association entre la maladie de la substance blanche et le risque d'HIC (Folsom *et al.*, 2012).

L'examen anatomopathologique des vaisseaux sanguins chez les patients souffrant d'hypertension chronique et chez ceux atteints d'HIC a conduit à une théorie sur comment l'hémorragie hypertensive se produit. Les vaisseaux sanguins pénétrants des patients atteints d'hypertension chronique développent une hyperplasie intimale avec hyalinose dans la paroi du vaisseau ; cela prédispose à une nécrose focale, provoquant des blessures de la paroi du vaisseau. Du fait des altérations du tissu à la suite de l'hémorragie et aux artéfacts liés aux méthodes de fixation et de coloration, il est souvent difficile d'identifier la lésion primaire sur les coupes histologiques *post-mortem*. Dans ce contexte, plusieurs hypothèses sur les modifications artérielles « pré-rupture » ont été formulées, tels que les micro-anévrysmes de Charcot-Bouchard (Magaki *et al.*, 2021), sans qu'il ne soit possible de mesurer précisément leur prévalence ni d'affirmer définitivement leur existence.

Les micro-saignements ou *microbleeds* sont des marqueurs de micro-angiopathie à tendance hémorragique qui peuvent être retrouvés sur l'imagerie des patients atteints d'HIC due à une vasculopathie hypertensive. Les séquences pondérées T2* à écho de gradient (GRE) de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) peuvent permettre de détecter les micro-saignements en tant que foyers ponctuels composés de dépôts d'hémosidérine représentant une micro-hémorragie cérébrale cliniquement silencieuse (Offenbacher *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 2013). La distribution anatomique des micro-hémorragies varie selon leur étiologie, avec des micro-hémorragies hypertensives apparaissant dans les noyaux gris centraux, le thalamus, le pont et les noyaux cérébelleux contrairement aux micro-hémorragies liées à l'AAC, qui se trouvent dans les régions lobaires superficielles des hémisphères cérébraux. Cette répartition régionale est cohérente avec la localisation habituelle de l'HIC dans ces conditions.

- *L'angiopathie amyloïde cérébrale*

L'AAC est caractérisée par des dépôts de peptide β -amyloïde dans les vaisseaux sanguins de petite à moyenne taille du cerveau et les leptoméniges. L'AAC est une cause importante d'HIC lobaire primaire chez les personnes âgées.

En plus de l'hémorragie intracérébrale, l'AAC peut présenter des symptômes neurologiques transitoires, une leuco-encéphalopathie inflammatoire, contribuant à une déficience cognitive, ou des micro-saignements accidentels ou une hémosidérose à l'IRM. Cela affaiblit la structure de la paroi vasculaire et les rend sujettes aux saignements. L'AAC se manifeste généralement avec une hémorragie lobaire spontanée. La présence de micro-saignements restreints à la région lobaire est associée à l'AAC également. De plus, une prévalence accrue de dépôts d'hémosidérine corticale a été mise en évidence chez ces patients (sidérose corticale superficielle).

5. Autres étiologies

Plusieurs autres étiologies sous-jacentes moins courantes de l'HIC non traumatique comprennent :

- Les malformations artérioveineuses et autres malformations vasculaires ;
- La thrombose veineuse cérébrale ;
- L'infarctissement hémorragique ;
- Le syndrome de vasoconstriction cérébrale réversible (SVCR) ;
- Les tumeurs métastatiques ou primaires ;
- L'infection du système nerveux central (SNC) ;
- Les anévrismes intracrâniens mycotiques ;
- La maladie de Moyamoya ;
- La vascularite cérébrale ;
- Le syndrome d'hyperperfusion cérébrale ;
- La drépanocytose ;
- Les troubles de la coagulation.

IV. Physiopathologie de l'hémorragie intracérébrale

1. Mécanismes

Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la lésion cérébrale après une HIC sont très complexes et relativement mal connus. De nombreuses équipes de recherche pré-cliniques et cliniques ont tenté, depuis quelques années, d'accéder à de nouvelles thérapies ciblant différents éléments de la physiopathologie de l'HIC, sans qu'aucun ne soit utilisé en pratique clinique actuellement (Figure 3).

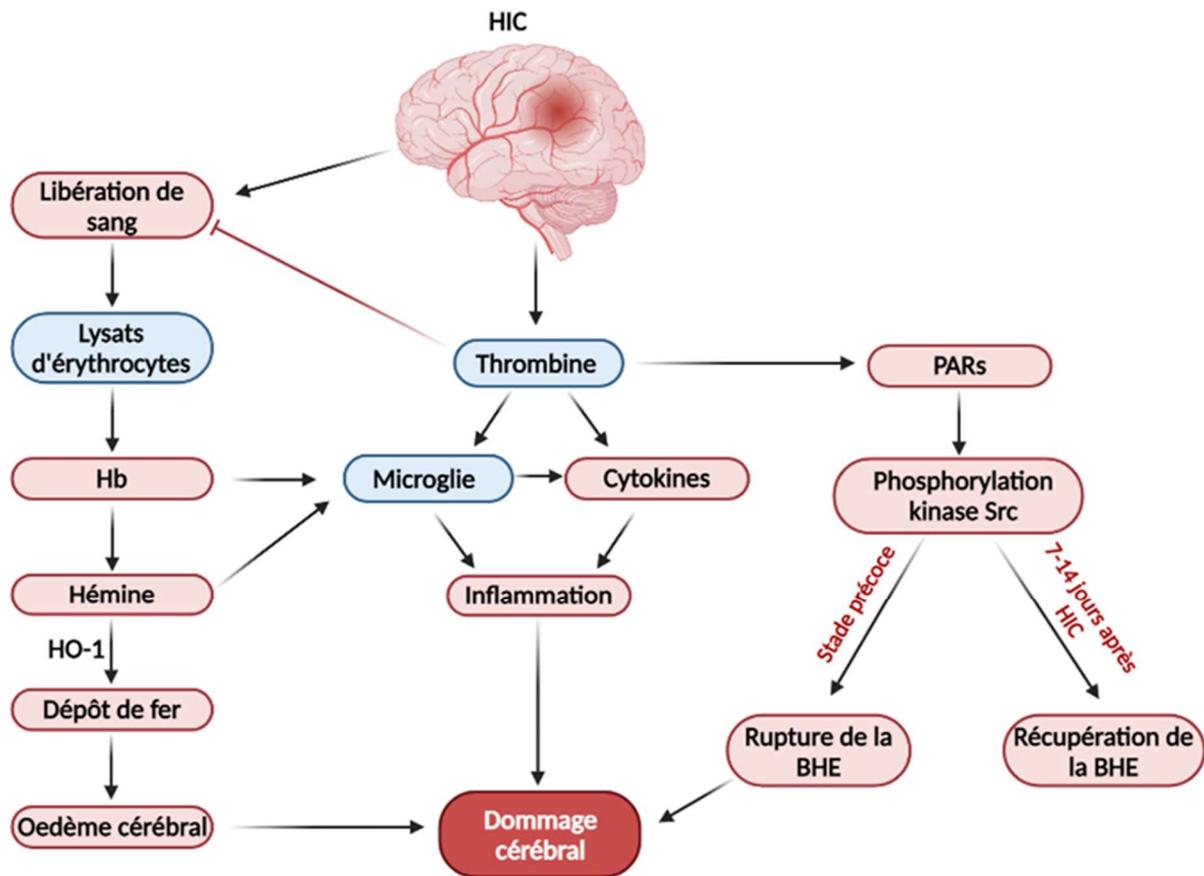


Figure 3 : Représentation schématique des différents mécanismes physiopathologiques entrant en jeu lors de la phase secondaire de dommages après HIC (Adapté de (Shao, Tu and Shao, 2019)).

a. Mécanismes généraux et histoire naturelle

La lésion mécanique primaire du parenchyme cérébral se produit *via* l'expansion initiale rapide de l'hématome puis par la survenue d'un œdème réactionnel autour de l'hématome. Le volume de l'hématome et l'œdème contribuent tous deux à l'effet de masse et à l'augmentation de la pression intracrânienne (PIC), qui, à son tour, peut entraîner des déficits neurologiques, altérer la perfusion du parenchyme cérébral, provoquer des lésions ischémiques et, dans les grandes HIC, entraîner un engagement cérébral et le décès (Xu *et al.*, 1993). Plus tardivement, des dommages secondaires surviennent et impliquent des processus excitotoxiques et inflammatoires que nous allons détailler (Figure 4).

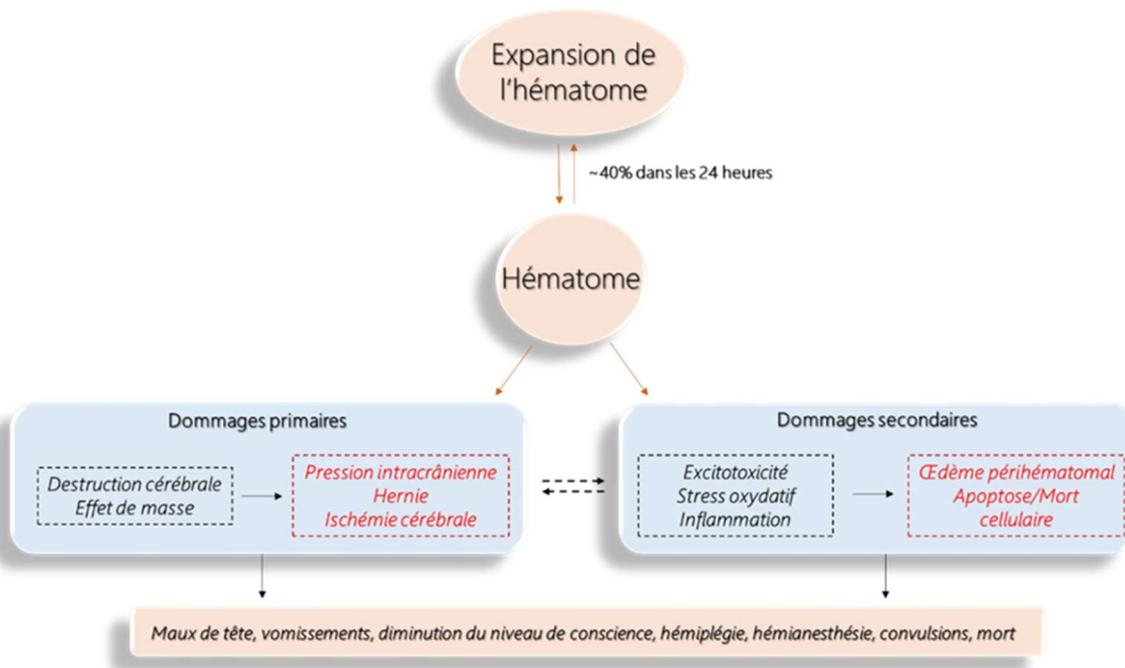


Figure 4 : Processus physiopathologiques de l'hémorragie intracérébrale (adapté de (Zhao *et al.*, 2020).

Lorsqu'il survient, l'élargissement de l'hémorragie est associé à une détérioration neurologique, le développement d'une augmentation de la PIC et d'un plus mauvais pronostic. Dans la plupart des cas, la majeure partie de l'expansion de l'hématome se produit dans les premières heures suivant le début de l'HIC (Brott *et al.*, 1997; Mayer and Rincon, 2005; Mayer *et al.*, 2008).

L'œdème périhématomal est fréquent dans l'HIC et est lié à un effet de masse de l'hématome, aux phénomènes ischémiques concomitants et à l'accumulation de facteurs cytotoxiques autour de l'hématome (Venkatasubramanian *et al.*, 2011).

L'œdème est présent sur le scanner ou l'IRM initial (réalisé à l'arrivée à l'hôpital) chez au moins la moitié des patients et progresse ensuite, atteignant son volume maximum 7 à 12 jours après le début de l'HIC ; l'expansion la plus rapide se produit dans les 48 premières heures (Staykov *et al.*, 2011; Venkatasubramanian *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). Le volume de l'hémorragie, un taux d'hématocrite plus élevé à l'admission et les troubles de la coagulation semblent être corrélés avec le volume maximal de l'œdème.

Les données de l'IRM de perfusion et de diffusion offrent des indices sur les mécanismes en œuvre dans la région péri-hématomale. Aux phases aiguë et subaiguë, elle présente classiquement une perfusion retardée et un coefficient apparent de diffusion augmenté avec parfois des zones présentant une diffusion restreinte, suggérant la présence d'un œdème à la fois vasogénique et cytotoxique (Olivot *et al.*, 2010). Des hyper-intensités IRM sur l'imagerie pondérée en diffusion (DWI) peuvent aussi être observées dans l'HIC. Dans certains cas, la diffusion restreinte adjacente à l'hématome aigu peut être due à une distorsion du champ magnétique des produits sanguins paramagnétiques (Silvera *et al.*, 2005). Cependant, les lésions ischémiques aiguës non contiguës à l'hémorragie peuvent également être identifiées sur DWI ce qui suggère la présence d'un authentique œdème cytotoxique, possiblement d'origine ischémique (Auriel *et al.*, 2012; Garg *et al.*, 2012; Menon *et al.*, 2012). Des modifications aiguës de la pression artérielle avec altération de l'autorégulation cérébrale chez les patients atteints d'HIC peuvent contribuer à l'ischémie péri-hématomale (Oeinck *et al.*, 2013).

Une vasculopathie hypertensive sous-jacente ou une AAC peuvent aussi affecter cette autorégulation chez certains patients. L'augmentation de la PIC et la réduction qui en résulte de la perfusion cérébrale peut également jouer un rôle ; ce phénomène pourrait être exacerbé par la diminution de la pression artérielle. L'impact de la diminution iatrogène de la pression artérielle à la phase aiguë de l'HIC sera discuté plus tard dans ce manuscrit.

Dans une méta-analyse de 2019 sur 11 études et 1 910 patients atteints d'HIC, la prévalence des lésions de diffusion était d'environ 20% et ne différait pas entre l'HIC liée à la vasculopathie hypertensive ou l'HIC liée à l'AAC (Boulanger *et al.*, 2019). Le mécanisme à l'origine de ce phénomène, l'implication de ces résultats pour les lésions cérébrales cliniques et le pronostic ne sont pas encore définis (Prabhakaran and Naidech, 2012).

Une étude avec imagerie de suivi a identifié de nouvelles lésions ischémiques au-delà de la période d'HIC aiguë, sans que l'on puisse expliquer précisément la physiopathologie de ces lésions (Boulanger *et al.*, 2019).

Concernant la rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) due à la réponse inflammatoire de l'HIC, elle peut être identifiée de façon qualitative par la prise de contraste du tissu cérébral sur l'imagerie. Chez les patients atteints d'HIC aiguë et subaiguë, une prise de contraste peut être notée dans la zone péri-hématomale au scanner et à l'IRM (Murai *et al.*, 1998; Ali *et al.*, 2013). Une étude IRM a décrit un motif de zones ponctuées de prises de contraste dans les zones sulcales à la fois contiguës et éloignées de l'hémorragie, ce qui suggère que l'HIC aiguë peut être associée à un processus inflammatoire plus diffus conduisant à une dégradation généralisée de l'intégrité de la BHE (Kidwell *et al.*, 2011).

b. Dommages primaires : la croissance de l'hématome

Dans l'HIC, le volume de l'hématome peut croître au cours du temps. En effet, la croissance de l'hématome survient dans les 6 heures après rupture du vaisseau cérébral et peut s'étendre jusqu'à 24 heures. L'HIC semble débiter par la rupture d'un seul vaisseau, qui donne lieu à un premier hématome (FISHER, 1971). Suite à la rupture d'un premier vaisseau, la force mécanique appliquée sur les vaisseaux environnants peut aussi provoquer leur rupture et favoriser la croissance de l'hématome. Malgré les facteurs de risque bien connus, la pathogenèse de l'HIC n'est pas précisément connue, et le site de saignement a rarement été démontré histologiquement en raison de la difficulté de l'examen des tissus détruits par l'hémorragie ainsi que le saignement secondaire causé par la rupture des artères environnantes (Miller Fisher, 2003; Rosenblum, 2003).

Dans l'hypertension, on pense que l'hémorragie est due une élévation de la pression artérielle, induite par les modifications dégénératives des artéioles pénétrantes conduisant à la rupture (Qureshi, Mendelow and Hanley, 2009).

Cependant, une polémique existe concernant la nature précise de la dégénération qui demeure incertaine, bien qu'elle ait été attribuée à une nécrose fibrinoïde, avec dépôt de protéines plasmatiques telles que la fibrine dans la paroi artériolaire avec dégénérescence associée des cellules musculaires lisses et des anévrismes de Charcot-Bouchard (ACB) (Qureshi *et al.*, 2001; Lammie, 2002; Miller Fisher, 2003; Rosenblum, 2003; Qureshi, Mendelow and Hanley, 2009).

Les ACB, aussi appelés micro-anévrismes, sont de petits anévrismes qui naissent des artéριοles mesurant généralement moins de 300 µm de diamètre (FISHER, 1971). Ils étaient les premiers décrits par Charcot et Bouchard en 1868 comme une cause de l'hémorragie hypertensive lors de leur rupture (FISHER, 1971). Depuis leur description il y a plus de 100 ans, il y eut des controverses quant à leur existence même, leur prévalence et leur importance en tant que cause de l'HIC (Rosenblum, 2003; Wijdicks, 2021).

Durant la croissance de l'hématome, le flux sanguin cérébral régional subit des modifications que l'on peut organiser en trois phases (Figure 5):

- La première phase, dite d'**hibernation**, apparaît durant les 48 premières heures. Durant cette phase, une chute du DSC est observée dans les hémisphères ipsi- et controlatéraux (plus marquée dans la région péri-hématomale).
- La seconde phase, dite de **reperfusion**, se manifeste entre 48 heures et 14 jours et est caractérisée par une combinaison de zones d'hypo- et d'hyper-perfusions dans la région péri-hématomale.
- La dernière phase, dite de **normalisation**, survient plus de 14 jours après l'apparition des symptômes et se caractérise par une restauration d'un DSC normal (Powers *et al.*, 2001; Sook Kim-Han *et al.*, 2006; Alqadri and Qureshi, 2012).

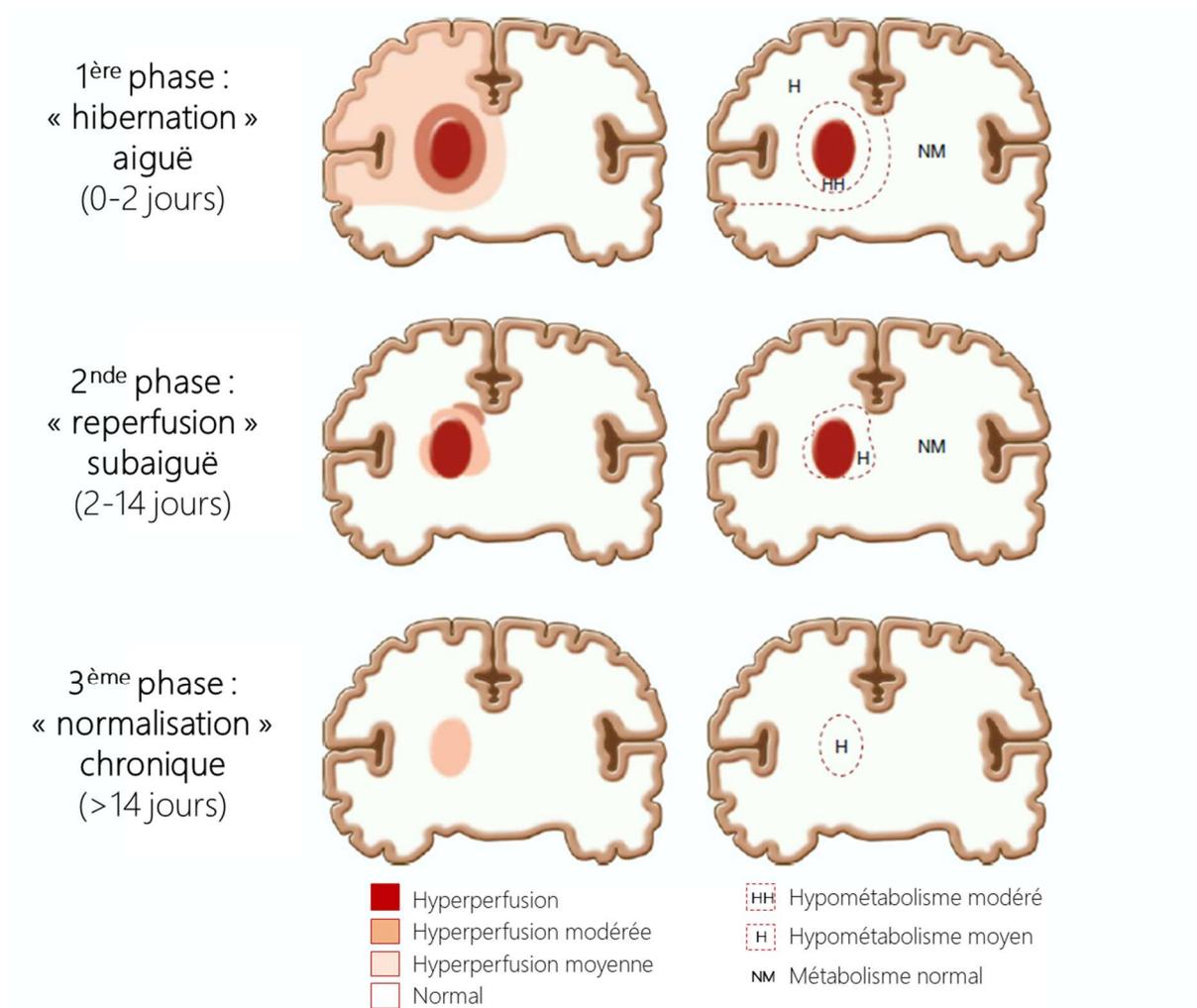


Figure 5 : Représentation schématique des trois phases du débit sanguin cérébral et des modifications du métabolisme dans phases aiguë, subaiguë et chronique après hémorragie intracérébrale (Adapté de (Alqadri and Qureshi, 2012)).

L'impact de ces modifications du DSC dans les régions péri-hématomales reste mal connu. Il est couramment admis qu'une hypo-perfusion sévère peut être responsable d'un infarctissement du tissu. On a longtemps pensé que l'élévation de la pression artérielle systémique observée chez les patients permettait de maintenir une perfusion satisfaisante dans ces régions et qu'elle devait donc être, au moins partiellement, tolérée à la phase aiguë. Cependant, les essais cliniques avec des objectifs tensionnels bas visant à réduire la croissance de l'hématome (voir ci-dessous), n'ont pas montré d'aggravation de déficit neurologique.

On peut ainsi émettre les hypothèses que soit l'hypo-perfusion n'est pas suffisamment sévère ou étendue pour que les phénomènes ischémiques aient un impact significatif sur le pronostic des patients, soit la diminution de la pression artérielle systémique n'a pas d'impact significatif sur la perfusion de la région péri-hématomale. Ces questions restent actuellement en suspens dans la littérature.

c. Dommages secondaires : inflammation et autres mécanismes

Des dommages retardés interviennent également dans la physiopathologie de l'HIC. Ils regroupent différents mécanismes essentiellement inflammatoires. Il a été suggéré par les équipes de Wan et de Koh que ces mécanismes inflammatoires secondaires à la présence de sang dans le parenchyme cérébral sont étroitement liés à l'activation de la microglie et des macrophages (Wan *et al.*, 2016; Koh *et al.*, 2018). Dans des conditions physiologiques, la microglie va contrôler son environnement et maintenir la stabilité des neurones, de la BHE et de la matrice extracellulaire. Lorsqu'une hémorragie se manifeste, la microglie s'active très rapidement et va libérer un grand nombre de facteurs inflammatoires induisant ainsi une cascade inflammatoire qui va entraîner des changements pathologiques tels que des lésions de la BHE, l'œdème, la mort cellulaire *etc* (Bhatia *et al.*, 2016).

L'équipe de Xiong a mis en évidence que l'activation de la microglie engendrait deux types de macrophages : macrophages de type M1 (microglie classique) et macrophages de type M2 (microglie activée) (Xiong, Liu and Yang, 2016). Au cours de la phase précoce de l'HIC, la microglie va être activée par différents produits sanguins et va présenter une polarisation de type « M1 ». Ces cellules microgliales (ou macrophages infiltrés) expriment un grand nombre de récepteurs de type *Toll-like receptor 4* (TLR4) et l'hème oxygénase 1 (HO-1) pour éliminer l'hématome, mais ils produisent aussi des médiateurs pro-inflammatoires [interleukines (IL)-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 et le facteur de nécrose tumorale (TNF)], des produits ferriques et des métabolites oxydants qui vont aggraver la lésion cérébrale (Varnum and Ikezu, 2012; Scott *et al.*, 2018). Les macrophages de type M2, quant à eux, peuvent améliorer la récupération cérébrale en sécrétant de l'IL-10, le CD36 et le facteur de croissance de type β (TGF- β) pour éliminer les débris cellulaires et diminuer l'inflammation (Pan *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019) (Figure 6).

Ainsi, l'équipe de Min et collaborateurs a démontré que les macrophages infiltrant le cerveau de souris après HIC étaient polarisés vers le phénotype M2 par les cellules gliales du cerveau et contribuaient ainsi à la récupération de la lésion après HIC (Min *et al.*, 2016). En conséquence, cela suggère qu'il serait bénéfique d'inhiber le phénotype M1 et promouvoir le phénotype M2 pour la récupération cérébrale après HIC.

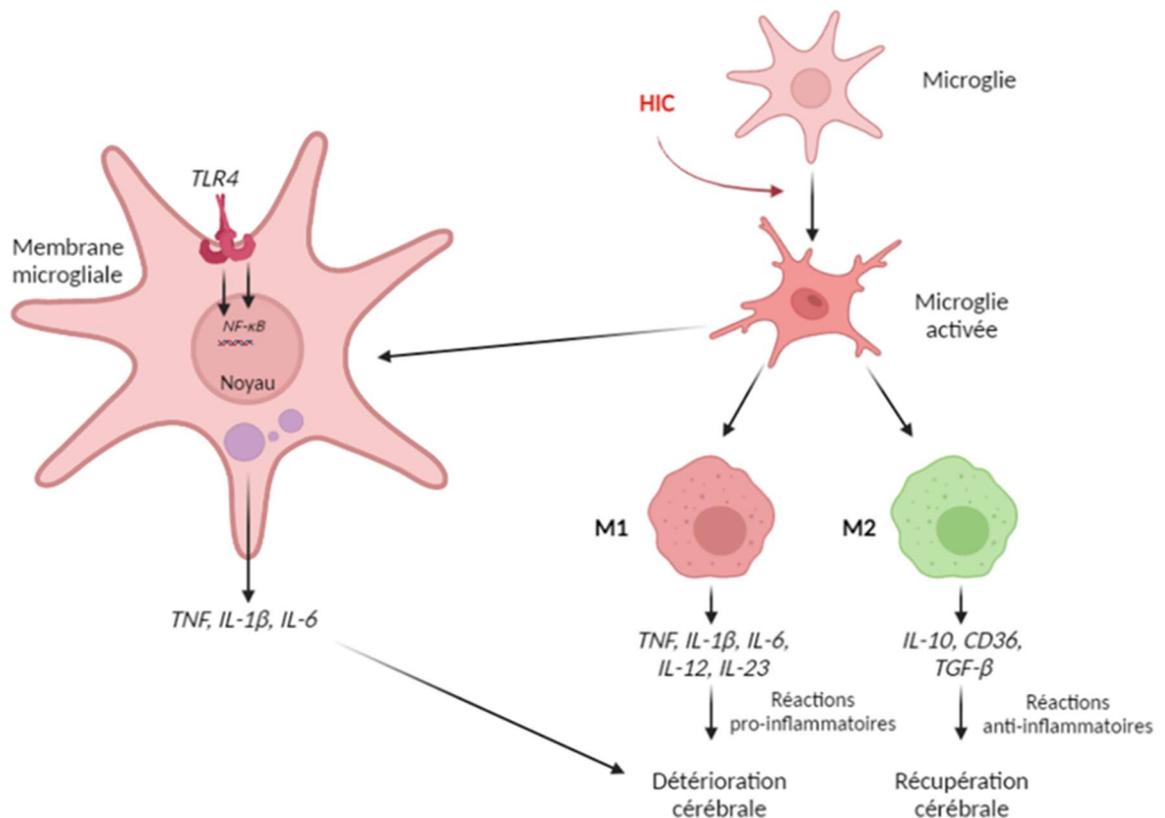


Figure 6 : Représentation schématique des différentes cytokines pro- et anti-inflammatoires impliquées dans les mécanismes de dommages secondaires après HIC (adapté de (Shao, Tu and Shao, 2019)).

Au cours de cette phase de dommages secondaires, plusieurs autres mécanismes incluant le stress oxydatif, la cytotoxicité des lysats d'érythrocytes et la neurotoxicité de la thrombine entrent en jeu.

- *Le stress oxydatif*

Le stress oxydatif (SO) commence à être reconnu comme un facteur contribuant à la lésion cérébrale secondaire à la suite d'une HIC.

Il s'agit d'un processus durant lequel survient une surproduction de radicaux libres, principalement des *reactive oxygen species* (ROS) et qui est impliqué dans différents stades de la réponse physiopathologique durant l'HIC (Aronowski and Zhao, 2011). Dans des conditions physiologiques, l'organisme agit avec un système de « piégeage » des ROS pour maintenir un équilibre. Toutefois, lorsque les ROS sont surproduits ou que la clairance est affaiblie, il peut en résulter des dommages ou la mort cellulaires (Duan *et al.*, 2016). Enfin, au cours de la réponse inflammatoire suite à l'HIC, l'activation des neutrophiles qui infiltrent le cerveau entraîne une éclosion de la production de ROS et d'oxyde nitrique qui aboutit à une oxydation excessive induisant alors de nombreux dommages cérébraux (Bai, Liu and Wang, 2020).

- *La cytotoxicité des lysats d'érythrocytes*

De plus en plus de preuves suggèrent que l'hémoglobine et la libération de fer provenant de l'hématome sont également contributrices des dommages cérébraux induits par l'HIC (Zhang *et al.*, 2017). Suite à une HIC, un grand nombre de globules rouges contenant de fort taux d'hémoglobine sont libérés dans le parenchyme cérébral, et sont dégradés 24 heures plus tard, entraînant la désintégration de l'hémoglobine en hémine et en fer (Wagner *et al.*, 2003). Des études ont révélé que l'infusion d'hémoglobine et d'hémine peut favoriser la réponse inflammatoire des lésions cérébrales (Lara *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018). Également, Fernandez-Mendivil et collaborateurs ont mis évidence que la suraccumulation de fer peut nuire à l'environnement cérébral (Fernández-Mendivil *et al.*, 2021). En effet, l'enzyme nécessaire à l'élimination de l'hémine, HO-1, va être surexprimée après une HIC ce qui va exacerber les lésions cérébrales en accentuant l'activation microgliale (Fernández-Mendivil *et al.*, 2021).

- *La neurotoxicité de la thrombine*

La thrombine est l'élément clé de la cascade de coagulation (qui sera décrit plus en détails ultérieurement) et est générée immédiatement au sein du parenchyme cérébral après une HIC (Krenzlin, Frenz, *et al.*, 2020). Cependant, des études ont démontré que la thrombine peut aussi participer aux dommages induits par l'HIC.

De manière intéressante, l'effet délétère ou protecteur de la thrombine dépend de sa concentration (Zhu *et al.*, 2019).

La thrombine peut avoir des effets neuro-protecteurs dans la substance blanche lors de lésions ischémiques à de très faibles concentrations, tandis que l'injection cérébrale directe de thrombine provoque une inflammation et un œdème cérébral (Ohyama *et al.*, 2001; Xi, Reiser and Keep, 2002).

Les effets de la thrombine peuvent être directs, comme le clivage du fibrinogène en fibrine, ou médiés par des récepteurs. Par exemple, l'activation de la voie de la protéine kinase mitogène p44/42 activée, est dépendante de la famille des récepteurs de la protéase activés (*Protease-Activated Receptors* ou PARs): PAR-1, PAR-2, PAR-3 et PAR-4. En particulier, l'activation de PAR-1 par la thrombine est étroitement liée à des lésions cérébrales après HIC (Jingxia *et al.*, 2004). Également, plus récemment, il a été démontré que la thrombine active PAR-2 à de très forte concentrations (Heuberger *et al.*, 2019).

La thrombine peut aussi activer la voie kinase Src, qui contribuerait à la perturbation de la BHE et à la formation d'œdème *via* les PARs au stade précoce de l'HIC (Liu *et al.*, 2010). À un stade plus tardif, c'est-à-dire entre 7 et 14 jours après l'HIC, l'activation de cette kinase Src par la thrombine *via* les PARs va, au contraire, induire une récupération de la BHE (Liu *et al.*, 2010).

Une étude plus récente a démontré pour la première fois que le système local de la thrombine cérébrale est activé après une HIC et que cette activation est indépendante de la présence de constituants sanguins (Krenzlin, Gresser, *et al.*, 2020). Ainsi, ils ont démontré que les dommages neuronaux sont induits par l'expression endogène de la thrombine et conduisent à un pronostic clinique défavorable (Krenzlin, Gresser, *et al.*, 2020).

Tous ces processus induits par la thrombine suggèrent qu'il est essentiel de bloquer ses effets neurotoxiques, sans inhiber son effet hémostatique nécessaire à la prévention de l'expansion de l'hématome.

V. Présentations cliniques

1. Apparition et progression

Dans la plupart des circonstances, l'apparition de l'HIC survient au cours d'une activité de routine. En revanche, certaines hémorragies hypertensives surviennent lors d'un effort ou d'une activité émotionnelle intense. Les symptômes et signes neurologiques peuvent être progressifs en quelques minutes à quelques heures (Figure 7), contrairement à l'infarctus cérébral et à l'hémorragie sous-arachnoïdienne, où les symptômes et signes neurologiques sont souvent complets dès le début des symptômes. Cependant, certains patients atteints de larges HIC sont comateux lors de la première évaluation à l'arrivée au service des urgences. Des maux de tête, des vomissements et une diminution du niveau de conscience peuvent se développer si l'hémorragie est large.

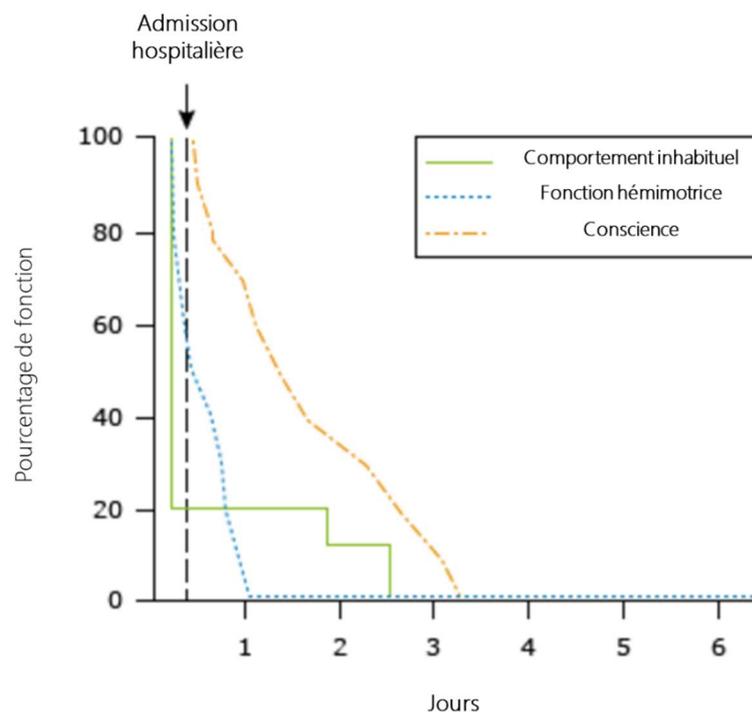


Figure 7 : Évolution dans le temps des modifications neurologiques de l'hémorragie intracérébrale. Représentation schématique du pourcentage de la fonction motrice des patients à l'admission hospitalière. Les courbes représentent un comportement inhabituel (ligne continue), une fonction hémimotrice (ligne pointillée bleue) et une fonction de conscience (ligne pointillée orange) chez un patient présentant une hémorragie intracérébrale.

Ce mélange de symptômes est généralement absent lors de la survenue de petites hémorragies. Des maux de tête et des vomissements surviennent chez environ la moitié des patients atteints d'HIC. La céphalée peut être due à une traction sur les fibres douloureuses méningées, une augmentation de la PIC, ou au sang dans le liquide céphalo-rachidien ; il est plus fréquent avec les hémorragies cérébelleuses et lobaires. Les patients peuvent se plaindre d'une raideur de la nuque et avoir un syndrome méningé s'il y a du sang sous arachnoïdien.

La stupeur ou le coma attribués à l'HIC sont souvent un signe inquiétant. Les exceptions incluent les patients avec des hémorragies thalamiques avec atteinte du système d'activation réticulaire qui peuvent récupérer après la résorption du sang aigu et ceux qui souffrent d'hydrocéphalie aiguë qui pourraient s'améliorer si elle est traitée avec un drain ventriculaire externe. Les patients peuvent aussi présenter une stupeur ou un coma dus à des causes réversibles telles que les troubles métaboliques aigus ou des convulsions.

2. Signes neurologiques et localisation de l'hémorragie intracérébrale

Les signes neurologiques varient en fonction de la localisation de l'hémorragie. Dans une étude, le saignement impliquait le putamen dans environ 35% des cas, les lobes cérébraux dans 30%, le cervelet dans 16%, le thalamus dans 15% et le pont dans 5 à 12% ([Stroke pathophysiology, diagnosis, and management, Barnett HJ, Mohr JP, Stein BM \(Eds\), Churchill Livingstone, Philadelphia 1998](#)).

Dans l'essai clinique qui a suivi la réduction de la pression artérielle intensive dans l'hémorragie intracérébrale aiguë (INTERACT2) de plus de 2 000 sujets avec confirmation d'hypertension et d'HIC par imagerie, la fréquence des structures cérébrales affectées était la suivante ([Delcourt et al., 2017](#)) :

- putamen/globus pallidus – 56%
- membre postérieur de la capsule interne – 46%
- membre antérieur de la capsule interne – 5%
- Thalamus – 31%
- Capsule externe – 27%
- Lobe – 14%
- Cervelet ou tronc cérébral – 7%
- Tête caudée – 2%
- Une extension intraventriculaire de l'HIC a été identifiée chez 29% des patients de cette étude.

VI. Prise en charge diagnostique initiale

L'HIC est une urgence neurologique et médicale car elle est associée à un risque élevé de saignement continu, une détérioration neurologique progressive, une invalidité permanente et le décès (Hemphill *et al.*, 2015a; Dastur and Yu, 2017).

Au fur et à mesure que l'évaluation diagnostique progresse, les patients atteints d'HIC peuvent aussi avoir besoin d'interventions, incluant éventuellement une intubation et une ventilation mécanique, une réversion de l'anti-coagulation, le contrôle de la pression artérielle, la surveillance et le traitement de la pression intracrânienne, et la prise en compte de la nécessité d'une dérivation ventriculaire ou éventuellement d'une évacuation chirurgicale de l'hématome (Figure 8).

Spécification de la caractéristique de l'HIC	Caractéristique de la cause sous-jacente	Autres caractéristiques associées	Causes sous-jacentes alternatives
Emplacement des noyaux gris centraux ou du tronc cérébral	Vasculopathie perforante profonde (VPP)	<ul style="list-style-type: none"> - CMBS dans les noyaux gris centraux, thalamus, ponts, noyaux cérébelleux - Lésions sous-corticales de la substance blanche à l'IRM - Infarctus ischémiques du territoire perforant profond - Antécédents cliniques de diabète sucré 	
Emplacement lobaire	Angiopathie amyloïde cérébrale (AAC)	<ul style="list-style-type: none"> - CMBS corticaux, sous-corticaux - Sidérose superficielle convexe - Antécédents cliniques de troubles cognitifs 	Vasculopathie perforante profonde (VPP)
Hémorragie intraventriculaire	Malformations artérioveineuses	<ul style="list-style-type: none"> - Vides d'écoulement à l'intérieur ou à côté de l'HIC - Calcification à l'intérieur ou à côté de l'HIC 	Vasculopathie perforante profonde (VPP) Malformation caverneuse
Petite HIC avec calcification adjacente	Malformations caverneuses	<ul style="list-style-type: none"> - Hyperintensité de l'image pondérée en T2 au centre de l'IRM - Bord périphérique de l'hypointensité de l'image en écho de gradient pondérée en T2* à l'IRM 	Vasculopathie perforante profonde (VPP)
Hémorragie sous-arachnoïdienne – citernes basales	Anévrisme cérébral rompu	<ul style="list-style-type: none"> - HSA prédomine sur les surfaces basales - Antécédents cliniques de céphalées en coup de tonnerre 	Hémorragie périmésencéphalique HSA non anévrysmale
Hémorragie sous-arachnoïdienne – convexité	Syndrome de vasoconstriction cérébrale réversible	<ul style="list-style-type: none"> - HIC hémisphérique ou corticale - Antécédents cliniques de céphalées en coup de tonnerre 	Trauma, AAC, thrombose veineuse cérébrale, malformation artérioveineuse
Infarctus aigus simultanés	Endocardite infectieuse ou vasculite cérébrale	<ul style="list-style-type: none"> - CMBS, anévrysmes microtiques, signes systémiques/cutanés d'embolie, nouveau souffle au cœur - Rétrécissement segmentaire multifocal en imagerie - Antécédents cliniques de nouvelles céphalées persistantes, troubles cognitifs progressifs ou autres troubles neurologiques 	Vasculopathie perforante profonde (VPP) ou AAC
Cédème proéminent	Thrombose du sinus cérébral, tumeur primaire/métastasique, transformation hémorragique de l'infarctus	<ul style="list-style-type: none"> - L'œdème/l'hémorragie s'étend à la surface corticale - Vide de flux veineux - Antécédents cliniques de convulsions ou de maux de tête progressifs - Lésions multifocales - Amélioration du contraste - Un œdème cytotoxique apparaît dans la distribution du territoire artériel 	
Vides de flux	Moyamoya	<ul style="list-style-type: none"> - Ganglions de la base ou localisation hémisphérique - Rétrécissement bilatéral de la carotide interne 	Malformation artérioveineuse

Figure 8 : Caractéristiques cliniques et de neuro-imagerie de l'HIC associées à des causes sous-jacentes.

HIC : hémorragie intracérébrale ; VPP : vasculopathie perforante profonde ; AAC : angiopathie amyloïde cérébrale ; HSA : hémorragie sous-arachnoïdienne ; CMBS : micro-saignements cérébraux ; IRM : imagerie par résonance magnétique.

1. Évaluation initiale

La suspicion clinique d'HIC est basée sur des caractéristiques telles que l'apparition aiguë d'une aggravation progressive des symptômes et une augmentation du déficit neurologique, en particulier si elle est accompagnée de maux de tête sévères, de vomissements, d'hypertension sévère et d'une diminution du niveau de conscience ou d'un coma. Cependant, la distinction entre l'HIC et l'ischémie ne peut être faite que sur la seule base des caractéristiques cliniques (Hemphill *et al.*, 2015a). Surtout, le mal de tête peut être absent dans certains cas d'HIC. La neuro-imagerie avec tomodensitométrie (TDM) ou l'IRM sont donc obligatoires pour confirmer le diagnostic d'HIC et pour exclure l'AVC ischémique (Hemphill *et al.*, 2015a).

2. Biologie et examens électrophysiologiques

Une évaluation de routine en laboratoire pour évaluer les causes sous-jacentes ou les risques associés chez les patients atteints d'HIC comprennent (Hemphill *et al.*, 2015a) :

- Formule sanguine complète, électrolytes, azote uréique du sang ;
- Créatine et glucose ;
- Temps de Quick (avec INR) et temps de thromboplastine partiellement activé pour tous les patients ;
- Temps de coagulation de la thrombine pour les patients prenant directement des anticoagulants oraux ;
- Troponine cardiaque spécifique ;
- Écran toxicologique pour détecter la cocaïne et d'autres drogues sympathomimétiques ;
- Analyses d'urine ;
- Test de grossesse chez une femme en âge de procréer.

Un électrocardiogramme (ECG) obtenu au départ peut aider à identifier les patients atteints d'HIC et une dysfonction cardiaque co-existante (Loggini *et al.*, 2021; Wittstock *et al.*, 2021). Un ECG répété est aussi généralement obtenu avec un échocardiogramme pour les personnes souffrant d'insuffisance cardiaque ou d'instabilité hémodynamique. Un électroencéphalogramme est réservé aux patients souffrant de convulsions ou à encéphalopathie non expliquée par la localisation ou la taille de l'HIC.

3. Imagerie initiale

La TDM (ou scanner) ou l'IRM sont considérées comme les premiers choix d'options d'imagerie pour le diagnostic et l'évaluation en urgence de l'HIC (**Figure 9**) (Ovbiagele *et al.*, 2013). Les déficits cliniques à l'examen neurologique peuvent être corrélés avec des régions cérébrales touchées visibles au scanner ou à l'IRM. L'imagerie aiguë fournit également des informations sur l'extension dans le système ventriculaire, la présence d'œdème, la présence d'un engagement et sur l'étiologie sous-jacente. La gravité de l'HIC peut être évaluée en calculant le volume de l'hémorragie.

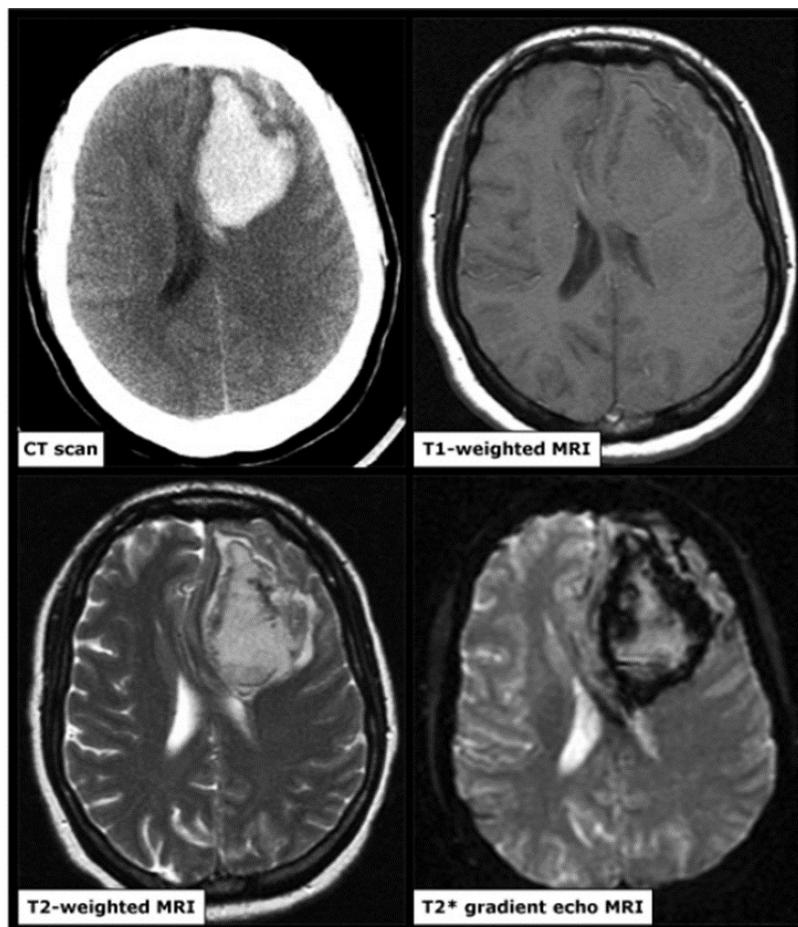


Figure 9 : TDM et IRM des hémorragies intracérébrales hyperaiguës. Des TDM et IRM ont été obtenues moins de 6 heures après l'apparition des symptômes chez un patient présentant une HIC aiguë spontanée.

Le scanner CT montre une hémorragie hyperdense principalement dans le lobe frontal gauche. En IRM, la partie centrale de l'hématome est isointense comparativement au parenchyme cérébral sur l'image pondérée en T1 et hyperintense sur les images pondérées en T2 et en GRE T2*, ce qui correspond à une hémorragie contenant de l'oxyhémoglobine. Sur les images en GRE T2 et T2*, la périphérie de l'hémorragie est en hyposignal, en accord avec une désoxygénation plus rapide aux frontières. Sur l'image pondérée en T2, le tissu adjacent et entourant l'hématome est hyperintense, compatible avec un œdème vasogénique.

a) Scanner cérébral

Le scanner cérébral sans contraste ou TDM identifie avec précision la présence de l'HIC aiguë, la distinguant de l'AVC ischémique. Du sang hyperaigu apparaîtra hyperdense sauf dans de rares cas d'anémie sévère où elle peut apparaître isodense. Au fil des semaines, le sang d'une hémorragie aiguë deviendra généralement isodense et peut avoir une apparence d'anneau. Chroniquement, le sang est hypodense. L'angioscanner permet parfois d'identifier une cause vasculaire sous-jacente à l'HIC (Josser E. Delgado Almandoz *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2011). La TDM sans contraste et l'angio-TDM peuvent aussi fournir des informations supplémentaires concernant l'expansion hémorragique (Phan *et al.*, 2019) (voir ci-dessous).

b) Imagerie par résonance magnétique cérébrale

L'IRM est aussi sensible que la TDM pour la détection d'HIC aiguë. L'HIC aiguë peut être diagnostiquée par IRM avec une sensibilité allant jusqu'à 100% et une excellente précision (Fiebach *et al.*, 2004). Dans l'hémorragie et l'évaluation IRM précoce (HEME), 200 patients présentant des symptômes focaux d'AVC ont été évalués par IRM comprenant des séquences GRE et DWI dans les 6 heures suivant l'apparition des symptômes suivies d'un scanner (Kidwell, 2004). L'IRM et la TDM étaient équivalentes pour la détection de l'HIC aiguë, et l'IRM était significativement plus précise que la TDM pour la détection d'HIC chronique. En revanche, l'IRM est contre-indiquée chez les patients porteurs de certains implants métalliques (Rixe *et al.*, 2009). En outre, l'IRM n'est pas aussi facilement disponible en cas d'urgence que la TDM et les protocoles conventionnels prennent plus de temps que les protocoles TDM. L'IRM et le scanner peuvent tous deux fournir des informations sur l'âge de l'HIC.

L'apparence du sang intracérébral sur les images IRM varie avec le temps en fonction des propriétés paramagnétiques des différents stades de l'hémoglobine et du type de séquence réalisée (Thulborn, 2012). Il est à noter que ces caractéristiques d'imagerie ne s'appliquent pas aux traitements des hémorragies extra-axiales ou intraventriculaires.

c) Prédire l'expansion de l'hémorragie

L'élargissement de l'hémorragie est associé à une détérioration neurologique et est de mauvais pronostic. Des TDM en série chez des patients présentant une hémorragie hypertensive ont montré que l'hémorragie croît dans les premières heures après la présentation dans un sous-ensemble de patients (Broderick *et al.*, 1993; Brott *et al.*, 1997; Balami and Buchan, 2012). Dans la plupart, mais pas tous les cas, la majeure partie de l'expansion de l'hémorragie se produit dans les trois premières heures après l'apparition de l'HIC (Broderick *et al.*, 1993; Brott *et al.*, 1997; Mayer and Rincon, 2005; Morotti *et al.*, 2020).

Dans une étude prospective de 103 patients atteints d'HIC, la croissance de l'hémorragie (une augmentation de volume de 33%) s'est produite chez 38% des patients au cours des premières 24 heures (Brott *et al.*, 1997). En 2018, une méta-analyse étudiant plus de 5 400 sujets atteints d'HIC a permis d'identifier plusieurs prédicteurs indépendants de la croissance de l'hémorragie (Al-Shahi Salman *et al.*, 2018) :

- Délai plus court entre l'apparition des symptômes et l'imagerie initiale ;
- Volume de l'HIC ;
- Utilisation d'anti-plaquettaires ou d'anti-coagulants ;
- Extravasation de contraste (par exemple, « *spot sign* ») sur l'angio-TDM initiale.

Alors que tous les patients atteints d'HIC doivent être traités pour limiter le risque d'expansion de l'hémorragie, la présence d'examen radiologiques spécifiques peut inciter une approche plus agressive au suivi et au traitement des patients.

d) *Spot sign* sur l'angio-TDM

Le *spot sign* (Figure 10) décrit l'apparence de petites zones focales ou multifocales de prise de contraste au sein d'une hémorragie au scanner (Wada *et al.*, 2007). Le *spot sign* a été corrélé à une expansion de l'hémorragie et à un mauvais pronostic, y compris concernant la mortalité (Brouwers *et al.*, 2012; Phan *et al.*, 2019).

Dans une analyse rétrospective sur 367 patients atteints d'HIC aiguë, un *spot sign* a été trouvé chez 19% des patients et a été indépendamment associé à l'expansion de l'hémorragie (Oleinik *et al.*, 2009).

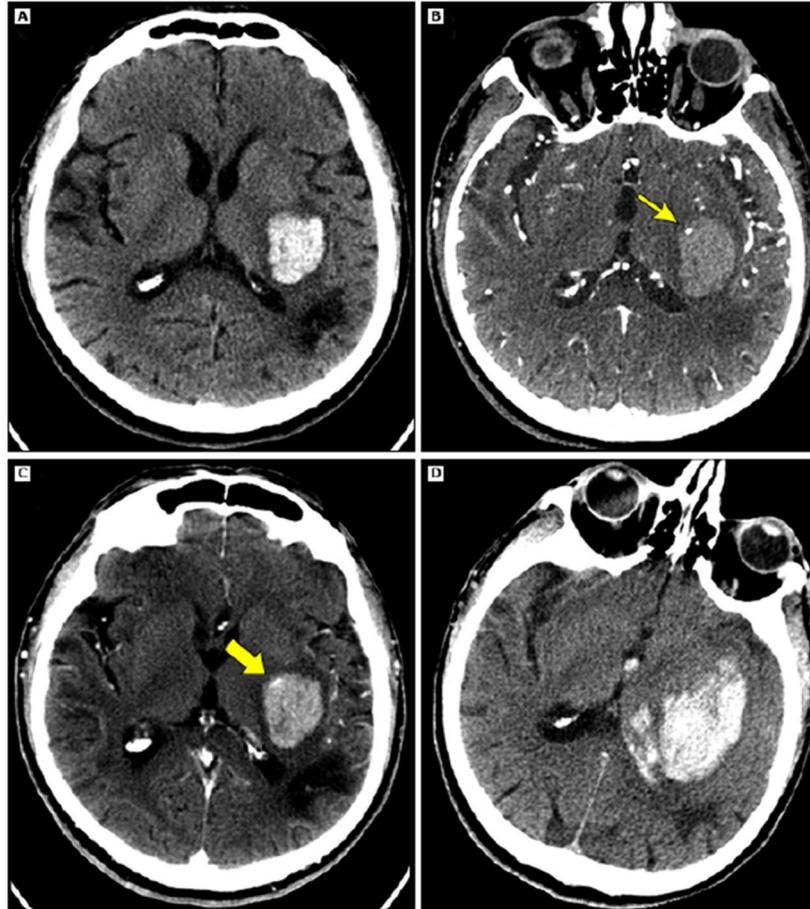


Figure 10 : Le « *spot sign* ». Patient présentant un *spot sign*, démontrant une extravasation de produit de contraste et prédisant une expansion de l'hématome.

(A) La TDM sans produit de contraste montre un hématome putaminal postérieur gauche et de la capsule interne avec un léger œdème périphérique. (B) Un petit spot de prise de contraste est visible en périphérie sur les images après injection, réalisant un « *spot sign* » (flèche). (C) La TDM post-contraste montre un élargissement du *spot sign*, compatible avec une extravasation active de produit de contraste (flèche épaisse). (D) L'image TDM non réhaussée un jour après la présentation révèle une croissance de l'hématome avec apparition d'une hémorragie intraventriculaire.

Bien que moins bien étudiés, des équivalents IRM de *spot sign* ont également été détectées sur les séquences pondérées T1 après injection de produit de contraste gadoliné, en particulier lorsqu'elles sont effectuées dans les 6 premières heures après le début de l'HIC (Schindlbeck *et al.*, 2016).

Ce « *spot sign* IRM » peut être associé à la croissance d'un hématome et à un pronostic défavorable, mais les données définitives font défaut (Khan *et al.*, 2018). Un score de *spot sign* qui note le nombre de *spot sign*, leur dimension maximale et l'atténuation s'est avéré être un puissant prédicteur de l'expansion de l'hémorragie ; de ces caractéristiques, le nombre de *spot sign* semble être le plus prédictif (Oleinik *et al.*, 2009; Huynh *et al.*, 2013; Romero *et al.*, 2013).

4. Imagerie de suivi et étiologique

Une fois l'HIC confirmée par TDM ou IRM cérébrales, une imagerie supplémentaire est justifiée en cas de détérioration clinique pour évaluer l'expansion de l'HIC ou une récurrence hémorragique. Une étude d'imagerie de suivi peut aussi être effectuée pour renseigner que le saignement est stabilisé. En général, une imagerie ultérieure est également effectuée pour identifier une cause sous-jacente de l'HIC à aider à orienter les mesures préventives pour réduire le risque d'hémorragie récurrente. La nécessité pour une évaluation plus approfondie afin de déterminer la cause de l'HIC varie selon le contexte clinique.

Pour certains patients, l'étiologie de l'HIC est identifiée avec des études initiales de neuro-imagerie, et d'autres études d'imagerie ne sont pas nécessaires. Un exemple peut inclure un patient stable avec une HIC aiguë dans le putamen évocatrice d'une vasculopathie hypertensive qui a des antécédents d'une hypertension de longue date. Pour les autres patients, les études d'imagerie initiales n'excluent pas suffisamment d'autres causes d'HIC, et une évaluation de suivi est requise. On obtient alors une imagerie de suivi lorsqu'une cause sous-jacente est suspectée par les signes cliniques ou les premiers résultats d'imagerie. Les résultats d'imagerie initiaux pouvant suggérer une cause sous-jacente spécifique comprennent (**Figure 11**):

- Œdème péri-hématomal précoce disproportionné par rapport à l'HIC sous-jacente (**Figure 11 (A)**) ;
- HIC dans le territoire vasculaire artériel suggérant un infarctus ischémique primaire (**Figure 11 (B)**) ;
- Hémorragie multifocale (**Figure 11 (C)**) ;
- Hémorragie intraventriculaire isolée (**Figure 11 (D)**).

L'évaluation d'une éventuelle pathologie structurelle sous-jacente peut être occultée et déformée par l'hématome ou l'œdème environnant. Dans ces cas, l'imagerie retardée effectuée après le début du saignement et de la formation de l'œdème peut permettre d'identifier les patients présentant des anomalies structurelles à haut risque de récurrence d'HIC.

L'IRM cérébrale avec contraste est la modalité préférée pour aider à identifier la cause sous-jacente de l'HIC pour la plupart des patients. Pour les patients qui ne peuvent pas subir d'IRM, la TDM avec contraste est une alternative moins sensible. Une imagerie vasculaire (par exemple, angio-TDM ou IRM ou artériographie cérébrale) est réalisée lorsqu'une lésion vasculaire sous-jacente est suspectée (Oleinik *et al.*, 2009; Josser E Delgado Almandoz *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2011; Van Asch *et al.*, 2013).

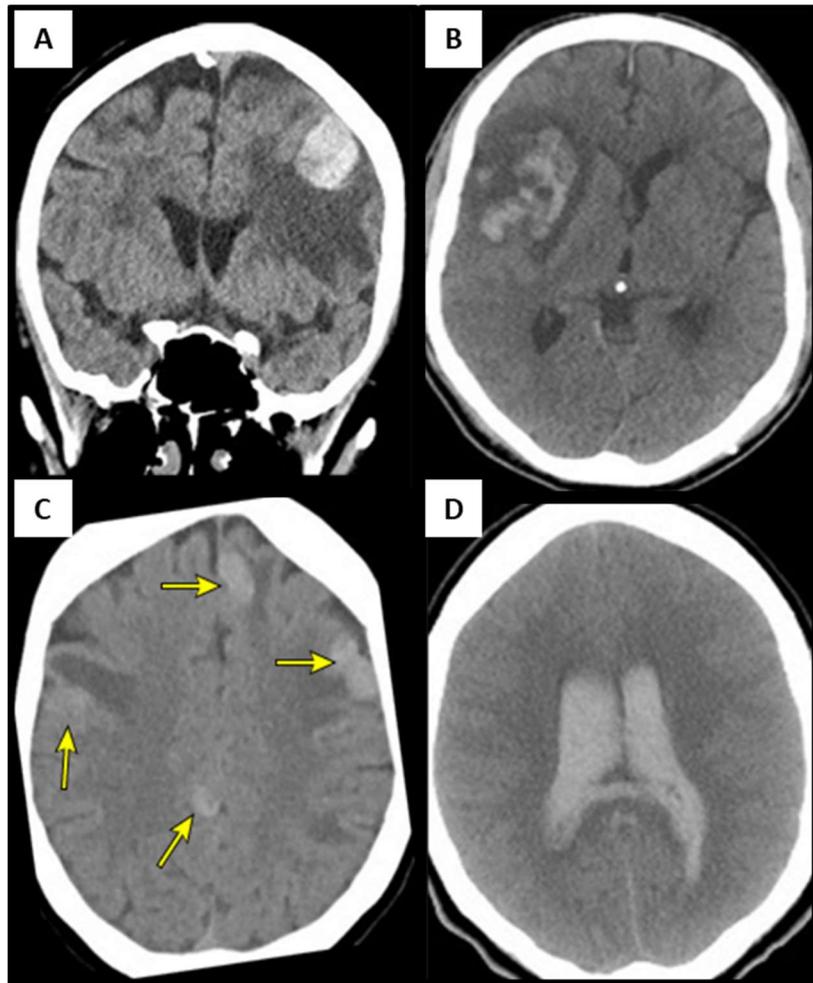


Figure 11 : Résultats initiaux d'imagerie pouvant suggérer une cause sous-jacente spécifique. (A) Imagerie TDM d'un patient présentant un œdème péri-hématomal précoce. (B) Imagerie scanner CT d'un patient présentant une transformation hémorragique suite à une ischémie primaire. (C) Imagerie scanner CT d'un patient présentant une hémorragie multifocale. (D) Imagerie scanner CT d'un patient présentant une hémorragie intraventriculaire isolée.

HIC spontanée

- La lésion du parenchyme cérébral se produit *via* l'**expansion de l'hématome** et l'**œdème périlésionnel**.
- Les étiologies associées à l'HIC comprennent l'**hypertension**, l'**AAC** et les **malformations vasculaires rompues**.
- Les principaux facteurs de risque d'HIC comprennent l'**âge**, l'**hypertension** et la **prise d'un traitement anti-thrombotique** (anti-plaquettaire et anti-coagulant).
- Les patients atteints d'HIC présentent généralement une apparition aiguë d'un déficit neurologique focal tel qu'une **hémiparésie** ou une **aphasie**.
- La neuroimagerie avec la **TDM** et l'**IRM** est **obligatoire** pour confirmer le diagnostic d'HIC et pour exclure les AVC ischémiques lors de l'admission des patients aux urgences.
- Les prédicteurs de la croissance de l'hémorragie associés à la détérioration neurologique comprennent un délai plus court entre l'**apparition des symptômes**, le **volume initial** de l'HIC, l'utilisation de **médicaments antithrombotiques** et l'imagerie des signes d'hétérogénéité de l'HIC sur la TDM sans contraste sur l'angioscanner.
- L'IRM cérébrale avec contraste est la **modalité favorite** pour aider à identifier la cause sous-jacente de l'HIC pour la plupart des patients. L'imagerie vasculaire (par exemple, l'**angioscanner** ou l'**angio-IRM**) est réalisée lorsqu'une **lésion vasculaire sous-jacente** est suspectée.

VII. Traitements et pronostic

1. Gestion pré-hospitalière

La gestion pré-hospitalière de l'HIC aiguë se concentre sur l'entretien des voies respiratoires, l'assistance cardiovasculaire et le transport rapide vers l'établissement de soins d'AVC aigu le plus proche. Les établissements dépourvus d'unités de soins intensifs et d'expertise en soins de l'AVC doivent transférer les patients stabilisés atteints d'une HIC aiguë vers un centre de soins tertiaire approprié. Les premières étapes de la prise en charge aiguë au service des urgences comprennent l'évaluation clinique et le diagnostic par imagerie.

2. Admission à l'unité de soins intensifs ou unité neurovasculaire (UNV)

Les patients atteints d'HIC aiguë doivent être admis à l'hôpital avec une expertise en neurologie, neurochirurgie, neuroradiologie et soins intensifs, et surveillés dans une unité de soins intensifs (USI) ou une unité dédiée à l'AVC (UNV) (Abid *et al.*, 2013; Ciccone *et al.*, 2013; Langhorne *et al.*, 2013; Hemphill *et al.*, 2015b; Gross, Jankowitz and Friedlander, 2019). Les patients atteints d'HIC aiguë sont à risque de détérioration neurologique au cours des premiers jours en raison de complications telles que l'expansion de l'hématome, l'élévation de la PIC, le développement d'une hydrocéphalie, des convulsions ou un engagement cérébral (Maas *et al.*, 2013).

3. Prise en charge du saignement aigu

L'arrêt du saignement dans l'HIC se produit *via* les voies intrinsèque et extrinsèque de la cascade de coagulation et la tamponnade vasculaire imposée par la voûte crânienne rigide (Qureshi, Mendelow and Hanley, 2009). Les facteurs qui retardent ce processus en inhibant l'hémostase comprennent l'exposition à des médicaments anti-thrombotiques et une pression artérielle non contrôlée.

Un contrôle rapide de ces facteurs peut réduire le risque de morbidité associé à l'élargissement de l'hématome. Les stratégies de réversion des traitements anti-thrombotiques diffèrent selon la classe de médicaments utilisés.

a. Réversion des anti-coagulants

Dans le cadre de l'HIC aiguë, les patients ayant déjà utilisé des anti-coagulants ou des agents anti-plaquettaires semblent avoir des volumes d'hématome initiaux plus importants et une tendance à l'expansion de l'hématome conduisant à un pronostic défavorable (Cucchiara *et al.*, 2008; Flaherty *et al.*, 2008; Falcone *et al.*, 2013). Les patients sous traitement anti-coagulant oral ont un taux de mortalité de 38 à 73% après une HIC (Rosand *et al.*, 2004; Cucchiara *et al.*, 2008; Xian *et al.*, 2021). Ces taux semblent être trois à quatre fois plus élevés que chez ceux qui ne sont pas sous anti-coagulothérapie (Cucchiara *et al.*, 2008). Ce risque accru peut être atténué mais pas éliminé par une réversion rapide de l'anticoagulation (Dowlatshahi *et al.*, 2012).

Les patients atteints d'HIC associée aux AOD peuvent avoir de meilleurs résultats que ceux atteints d'HIC associées à la warfarine. Dans certaines petites études observationnelles, les patients atteints d'HIC associée aux AOD se sont avérés avoir des volumes d'HIC plus petits et de meilleurs résultats cliniques que ceux présentant une HIC associée à la warfarine (Takahashi *et al.*, 2016; Wilson *et al.*, 2016). D'autres études n'ont pas réussi à montrer cette différence (Wilson *et al.*, 2017; Gerner *et al.*, 2018). Cependant, dans une vaste étude de cohortes basée sur un registre incluant près de 20 000 patients atteints d'HIC associée à l'anti-coagulation, le risque de mortalité à l'hôpital ou de sortie en soins palliatifs était plus faible chez ceux qui prenaient des AOD que chez ceux qui prenaient de la warfarine (38% contre 43%) (Xian *et al.*, 2021). De plus, le taux d'incapacité ou de dépendance à la sortie était plus faible et le taux de retour à domicile était plus élevé pour les patients atteints d'HIC associée aux AOD que ceux atteints d'HIC associée à la warfarine et similaire à ceux qui ne prenaient pas d'anti-coagulation au moment de l'HIC.

L'utilisation d'anti-plaquettaires est associée à une croissance de l'hématome et à un plus mauvais pronostic après une HIC dans certaines études (Toyoda *et al.*, 2005; Naidech *et al.*, 2009; Falcone *et al.*, 2013) mais pas toutes (Brott *et al.*, 1997; Nilsson *et al.*, 2002; Flibotte *et al.*, 2004; Rosand *et al.*, 2004; Foerch *et al.*, 2006). En 2010, une méta-analyse regroupant 25 études de cohortes de patients atteints d'HIC a conclu que l'utilisation antérieure d'anti-plaquettaires était associée à une mortalité accrue mais pas à un plus mauvais pronostic global après HIC (Thompson *et al.*, 2010).

Dans une grande étude observationnelle de 2021 portant sur plus de 13 000 patients atteints d'HIC, le taux de mortalité à 90 jours était de 44% chez les patients atteints d'HIC prenant des anti-coagulants et ceux prenant des anti-plaquettaires, contre 26% chez ceux qui ne prenaient pas de médicaments anti-thrombotiques au moment de l'HIC (Apostolaki-Hansson *et al.*, 2021). Un bon résultat fonctionnel à 90 jours a été obtenu par 27% des patients prenant des anti-coagulants et 25% de ceux prenant des anti-plaquettaires contre 40% de ceux sans traitement anti-thrombotique. Les patients prenant des médicaments anti-thrombotiques étaient aussi plus âgés et présentaient plus de comorbidités. Ces biais potentiels limitent la valeur de ces études pour conclure sur le rôle indépendant des traitements anti-thrombotiques sur le pronostic post HIC.

Le traitement anti-thrombotique combiné (anti-coagulant et anti-plaquettaire) a été associé à un plus mauvais pronostic et à un volume initial d'HIC plus important que le traitement en monothérapie. Dans une analyse regroupée de trois études observationnelles allemandes incluant 3 545 patients atteints d'HIC, un résultat fonctionnel favorable à 3 mois était moins fréquent que chez ceux prenant de la warfarine et un anti-plaquettaire par rapport à ceux prenant de la warfarine seule (24% contre 32%) (Sprügel *et al.*, 2018).

De plus, les patients prenant un agent anti-plaquettaire et de la warfarine ou un AOD avaient des volumes d'HIC initiaux plus importants que ceux prenant l'un ou l'autre des anti-coagulants seuls (warfarine et anti-plaquettaire). Par ailleurs, il y avait une tendance vers des volumes d'HIC plus importants chez les patients sous bithérapie *versus* monothérapie anti-plaquettaire.

Pour les patients qui développent une HIC, tous les médicaments anti-coagulants et anti-plaquettaires doivent être stoppés initialement. Les thérapies pour inverser les effets des médicaments anti-coagulants doivent être administrés immédiatement (Figure 12). Les agents d'inversion spécifiques aux médicaments comprennent :

- *Warfarine*

Le concentré de complexe pro-thrombotique à 4 facteurs (4F PCC) ou à défaut, un complexe prothrombine à 3 facteurs avec du facteur VII activé recombinant ou du plasma frais congelé (PFC), peut être administré chez les patients (Hemphill *et al.*, 2015a). Les vitamines K intraveineuses doivent être également administrées pour maintenir les effets à courte durée d'action du 4F PCC ou PFC.

- *Anti-coagulants oraux directs*

Les stratégies d'inversion des AOD diffèrent selon l'agent et sont présentées dans la **Figure 12** ci-dessous.

- *Héparine et héparines de bas poids moléculaire*

Le sulfate de protamine est recommandé comme traitement d'urgence des patients atteints d'HIC associée à l'héparine (Hemphill *et al.*, 2015a). La dose appropriée de sulfate de protamine dépend du type d'héparine (agents non fractionnés ou de faible poids moléculaire), de la dose d'héparine administrée et du temps écoulé depuis cette dose. Les patients présentant un déficit sévère en facteur de coagulation ou une thrombocytopénie sévère doivent recevoir un facteur de remplacement approprié ou une transfusion de plaquettes (Hemphill *et al.*, 2015a).

Anticoagulant	Agent d'inversion (tous sont administrés par voie i.v.)
Dabigatran (Pradaxa; inhibiteur oral de la thrombine)	Idarucizumab (Praxbind). Dose : 5 grammes
Inhibiteurs oraux du facteur Xa : - Apixaban (Eliquis) - Edoxaban (Lixiana, Savaysa) - Rivaroxaban (Xarelto)	- Andexanet alpha (AndexXa). La posologie du bolus initial et de la perfusion ultérieure dépend du niveau de dose de l'inhibiteur du Fxa et de l'intervalle écoulé depuis sa dernière prise -OU- - 4-factor PCC (Kcentra, Beriplex P/N, Octaplex). Le dosage peut être effectué avec une dose fixe de 2000 unités OU une dose basée sur le poids de 25 à 50 unités par kg.

Figure 12 : Agents d'inversion des anticoagulants oraux directs pour les hémorragies mettant la vie en danger (risque imminent de décès par hémorragie).

a. *Autres stratégies hémostatiques non recommandées*

Pour les patients atteints d'HIC sans coagulopathie et ceux non exposés à un traitement anti-thrombotique (anti-coagulant ou anti-plaquettaire), il est suggéré de ne pas utiliser une thérapie hémostatique spécifique en dehors du cadre d'un essai clinique. Alors que la thérapie hémostatique offre un potentiel théorique d'améliorer le pronostic en arrêtant l'hémorragie en cours et en empêchant l'élargissement de l'hémorragie, les avantages cliniques restent à prouver (Hemphill *et al.*, 2015a; Al-Shahi Salman *et al.*, 2018) et ces thérapies peuvent entraîner des complications thrombo-emboliques (Diringer *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2008). Les deux agents hémostatiques les plus étudiés pour une utilisation dans l'HIC spontanée sont le facteur de la coagulation VII activé recombinant (FVIIar) et l'acide tranexamique (inhibiteur de la fibrinolyse).

- *Facteur VIIa recombinant*

Le FVIIar favorise l'hémostase en activant la voie extrinsèque de la cascade de coagulation. Des études préliminaires ont suggéré que le traitement de l'HIC avec le FVIIar était sûr et efficace (Mayer *et al.*, 2005). Cependant, dans l'essai multicentrique en double aveugle sur le FVII dans l'AVC hémorragique aigu (FAST), le FVIIar n'est pas parvenu à améliorer les résultats chez les patients atteints d'HIC aiguë (Mayer *et al.*, 2008). L'essai a assigné au hasard 841 patients atteints d'HIC spontanée pour recevoir soit du FVIIar (20 ou 80 mg/kg) soit un placebo dans les 4 heures suivant l'apparition des symptômes. Par rapport au placebo, le traitement par le FVIIar a produit une réduction significative de la croissance des hématomes mais n'a pas entraîné d'amélioration du nombre de décès ou d'incapacités graves à 90 jours.

Le FVIIar est associé à un risque de thrombose par activation du système de coagulation (O'Connell *et al.*, 2003). Dans l'essai FAST, la fréquence globale des événements indésirables thromboemboliques artériels graves (infarctus du myocarde ou infarctus cérébral) était plus élevée dans le groupe assigné à 80 mg/kg que ceux assignés au placebo (8% vs 4%) (Mayer *et al.*, 2008). Des résultats similaires ont été notés dans l'analyse des données regroupées de trois essais contrôlés randomisés antérieurs sur le FVIIar pour l'HIC spontanée (Diringer *et al.*, 2008). De plus, des études ont observé que le traitement par le FVIIar pour l'HIC était associé à des taux accrus d'élévation de la troponine et d'infarctus du myocarde (Sugg *et al.*, 2006) ainsi que des taux plus élevés que prévu d'hydrocéphalie post-hémorragique (Subramaniam *et al.*, 2006).

- *Acide tranexamique*

L'acide tranexamique inhibe la fibrinolyse et l'activité protéolytique de la plasmine. Les essais cliniques n'ont pas montré de résultat fonctionnel ou de bénéfice en termes de mortalité par rapport au placebo. L'essai sur l'acide tranexamique pour l'hémorragie intracérébrale primaire hyperaiguë (TICH-2) a assigné au hasard plus de 2 300 sujets atteints d'HIC aiguë à un traitement avec de l'acide tranexamique ou un placebo correspondant dans les 8 heures suivant l'apparition des symptômes (Sprigg *et al.*, 2018). A 90 jours, il n'y avait aucune différence dans l'état fonctionnel ou la mortalité entre les deux groupes de traitement, malgré des réductions précoces de la croissance des hématomes (à 2 jours) et de la mort (à 7 jours).

Dans un autre essai portant sur des patients atteints d'HIC qui ont été traités dans les 4,5 heures suivant l'apparition des symptômes, ceux assignés à l'acide tranexamique avaient un taux de croissance d'HIC et des résultats fonctionnels similaires à ceux assignés au placebo (Meretoja *et al.*, 2020).

- *Transfusion de plaquettes*

La transfusion de plaquettes à la suite d'une HIC chez les patients prenant un traitement antiagrégant plaquettaire est actuellement non recommandée. Ceci est basé sur les résultats de l'étude PATCH publiée en 2016, qui a randomisé 190 patients sous traitement antiplaquettaire présentant une HIC, dont 97 dans le groupe transfusion de plaquettes et 93 dans le groupe traitement standard (Baharoglu *et al.*, 2016). L'odds ratio (OR) ajusté de mort ou de dépendance à 3 mois était de 2.05 ($p=0.0114$) en défaveur de la transfusion de plaquettes. Vingt-quatre pourcents des patients du groupe transfusion de plaquettes sont décédés contre 17% dans le groupe contrôle. Ces résultats démontrent les risques associés aux traitements hémostatiques à la phase aiguë de l'HIC. Le mécanisme expliquant ce mauvais pronostic à la suite d'une transfusion de plaquettes reste débattu.

- b. *Gestion de la pression artérielle*

Une pression artérielle élevée est fréquente chez les patients atteints d'HIC aiguë. Les patients peuvent développer une pression artérielle élevée en raison d'une augmentation de la PIC et de la douleur due à l'effet de masse de l'hémorragie. De plus, de nombreux patients atteints d'HIC aiguë ont une pression artérielle élevée en raison d'une hypertension initiale comorbide. Des élévations incontrôlées et une variabilité de la pression artérielle (PA) sont des facteurs de risque d'expansion hémorragique et de mauvais pronostic (Zhang *et al.*, 2008; Manning *et al.*, 2014; Divani *et al.*, 2019). L'hypertension artérielle dans l'HIC spontanée aiguë est gérée comme suit, en accord avec les directives de l'American Heart Association (Hemphill *et al.*, 2015a).

- Pour les patients atteints d'HIC aiguë qui présentent une pression artérielle systolique (PAS) comprise entre 150 et 220 mmHg, il est suggéré d'abaisser la PAS à un objectif de 140 mmHg, idéalement dans la première heure suivant l'apparition des symptômes, à condition que le patient reste cliniquement stable (Hemphill *et al.*, 2015a).

Ce degré de réduction de la PA semble sûr chez la plupart des patients et peut améliorer les résultats fonctionnels.

- Pour les patients atteints d'HIC aiguë qui présentent une PAS >220 mmHg, il est suggéré de diminuer cette PAS à <220 mmHg (Hemphill *et al.*, 2015a). Par la suite, la PA est progressivement réduite (sur une période de quelques heures) jusqu'à une plage cible de 140 mmHg à 160 mmHg, à condition que le patient reste cliniquement stable. Les patients dont l'état clinique se détériore au cours de cette période peuvent nécessiter une réduction du traitement antihypertenseur aigu. L'objectif de pression artérielle optimale est incertain, mais une PAS de 140 à 160 mmHg est une cible raisonnable pour les patients qui restent cliniquement stables.

Le choix des médicaments doit tenir compte de la rapidité et de l'étendue de la réduction de la PA, du mode d'administration (bolus contre perfusion), des comorbidités individuelles des patients, des effets indésirables potentiels et de l'expérience locale (Hemphill *et al.*, 2015a). Il est important de surveiller tous les patients d'une éventuelle détérioration neurologique pendant le traitement. La réduction de la PAS en dessous de 140 mmHg dans les premières heures après l'apparition de l'HIC ne s'est pas avérée clairement bénéfique pour réduire la mortalité ou l'invalidité et peut augmenter le risque d'événements indésirables, y compris l'hypoperfusion cérébrale et les lésions rénales (Ohwaki *et al.*, 2004).

- Pour la plupart des patients avec une PAS initiale ≥ 160 mmHg, il est préférable d'employer la nicardipine (un inhibiteur calcique) pour le traitement initial car il agit rapidement et peut être titré rapidement.
- Pour la plupart des patients avec une PAS initiale < 160 mmHg, il est suggéré de commencer par le labetalol (β -bloquant) pour sa facilité d'administration et sa longue durée d'effet.

Cependant, le choix de l'agent anti-hypertenseur et le taux optimal de réduction dépendent de facteurs concernant le patient et de l'expérience locale ; les données pour guider la sélection dans ce cadre manquent.

Plusieurs médicaments intraveineux peuvent être utilisés pour contrôler la PA dans ce contexte, notamment la nicardipine, le labétalol, la clévidipine, l'esmolol, l'énalaprilate et le fénoldopam. Le nitroprussiate et la nitroglycérine sont généralement évités car ils peuvent augmenter la PIC.

La relation entre la PA et les résultats chez les patients atteints d'HIC est complexe, et les données pour spécifier les stratégies de traitement optimales font défaut. Les avantages potentiels du traitement de l'hypertension artérielle chez les patients atteints d'HIC en phase aiguë doivent être mis en balance avec les risques potentiels. Les principaux problèmes concurrents sont les suivants :

- Une PA sévèrement élevée peut aggraver l'HIC en incitant des saignements continus ou récurrents et en provoquant une expansion de l'hémorragie et des résultats potentiellement pires (Ohwaki *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2013). À l'inverse, l'abaissement de la PA pourrait atténuer ces risques et peut-être améliorer les résultats.
- L'abaissement rapide de la PA pourrait causer d'autres blessures en favorisant l'hypoperfusion cérébrale et systémique (Qureshi *et al.*, 2016). À l'inverse, réduire lentement la PA élevée avec des réductions progressives tout en surveillant la détérioration clinique pourrait aider à prévenir ces complications en maintenant une perfusion cérébrale et systémique adéquates.

Des études cliniques visant à évaluer ces problèmes ont montré qu'une baisse agressive de la PA dans l'HIC aiguë est associée à une croissance réduite des hématomes (Qureshi *et al.*, 2005, 2010; Anderson *et al.*, 2010). De plus, l'abaissement de la PA ne semble pas altérer le flux sanguin cérébral dans la région péri-hématomale (Butcher *et al.*, 2004, 2013; Gould and Raposo, 2013). Les données des essais cliniques n'ont pas démontré de bénéfices constants en matière d'innocuité et de résultats d'une réduction aiguë de la PA. Dans l'essai INTERACT2 sur la réduction intensive de la PA dans l'HIC aiguë, 2 839 patients atteints d'HIC aiguë ont été affectés (dans les 6 heures suivant l'apparition des symptômes) soit à une baisse intensive de la PA, soit à une prise en charge traditionnelle (PAS cible <140 mmHg vs PAS <180 mmHg) (Anderson *et al.*, 2013). La PAS moyenne de base était de 179 mmHg. Il y avait une tendance à la baisse des taux de décès et d'invalidité grave à 90 jours avec une baisse intensive de la PA, bien que cela ne soit pas statistiquement significatif (52% contre 55.6%). De plus, une baisse intensive de la tension artérielle était associée à de meilleures mesures du devenir clinique des patients selon les scores de l'échelle de Rankin modifiée.

Les taux de détérioration neurologique aiguë et d'autres événements indésirables étaient similaires dans les groupes de patients. L'essai ATACH-2 (*AntiHypertensive Treatment of Acute Cerebral Hemorrhage-2*) n'a trouvé aucune différence dans les taux de décès ou d'invalidité parmi 1 000 patients atteints d'HIC aiguë assignés dans une fenêtre de temps plus tôt (dans les 4.5 heures) à une PAS cible plus intensive de 110 à 139 mmHg par rapport à une norme PAS cible de 140 à 179 mmHg (39% *vs* 38%) (Qureshi *et al.*, 2016). De plus, le taux de détérioration neurologique aiguë chez les patients assignés à un traitement intensif était similaire à ceux assignés à un traitement standard.

Cependant, le taux d'événements rénaux indésirables était plus élevé dans le groupe de traitement intensif (9% contre 4%). L'incapacité à atteindre l'objectif de PA était aussi plus fréquente dans le groupe intensif (12% contre 1%).

Dans une analyse post-hoc utilisant les données individuelles des patients des essais INTERACT2 et ATACH-2, chaque réduction de 10 mmHg de la PAS au cours des premières 24 heures était associée à une augmentation de 10% des chances d'une meilleure récupération fonctionnelle, jusqu'à un seuil aussi bas que 120 à 130 mmHg (Moullaali *et al.*, 2019). Dans cette analyse, la PA moyenne de base combinée était de 178 mmHg et le volume moyen de l'HIC était de 11mL. Il n'est pas clair si ces résultats améliorés s'appliqueraient aux patients présentant des élévations plus sévères de la PA de base, à ceux présentant une HIC plus sévère ou à ceux traités au-delà des intervalles de temps aigus appliqués dans les essais.

c. Traitement neurochirurgical

La pression intracrânienne est habituellement contrôlée par une thérapie osmotique (injection de mannitol concentré par exemple). En cas d'échec, il existe des indications à un traitement neurochirurgical même si l'HIC est généralement gérée de manière conservatrice puisque les indications et le bénéfice clinique de l'évacuation lors de la chirurgie reste controversée. La norme en intervention chirurgicale reste la craniotomie (Hemphill *et al.*, 2015b). Le plus grand essai clinique reste, à ce jour, l'essai STICH I, incluant 1 033 patients atteints d'un HIC, qui visait à comparer la chirurgie précoce et le traitement standard disponible (Mendelow *et al.*, 2005). Il n'a pas été démontré de différence de résultat fonctionnel favorable à 6 mois ou de mortalité dans le groupe chirurgical par rapport au groupe médical.

L'analyse en sous-groupe de l'HIC lobaire superficielle a démontré une augmentation absolue de 8% des résultats fonctionnels chez le groupe à intervention chirurgicale comparé au groupe médical (Mendelow *et al.*, 2005). L'essai STICH II suivant, mené par la même équipe, a été conçu pour évaluer le potentiel positif de ce sous-groupe de l'essai STICH I (Mendelow *et al.*, 2013). STICH II a recruté 601 patients atteints d'HIC lobaire superficielle. Les investigateurs ont comparé la chirurgie précoce à la chirurgie conservatrice initiale à nouveau et n'ont pas montré de meilleur résultat fonctionnel dans ce deuxième essai (Mendelow *et al.*, 2013).

Également, ces dernières années, le rôle potentiel de l'évacuation mini-invasive de l'HIC a été étudié. Des essais évaluant le rôle de la chirurgie mini-invasive comprenant la « chirurgie mini-invasive + alteplase dans l'évacuation de l'hémorragie intracérébrale » (MISTIE) (Hanley *et al.*, 2017, 2019). L'essai de phase II MISTIE II a étudié l'innocuité du traitement mini-invasif *via* l'évacuation par cathéter guidée par imagerie de l'HIC avec application supplémentaire de l'alteplase par rapport au traitement médical standard (Hanley *et al.*, 2016). De ce même groupe, des résultats d'une étude de phase III randomisée plus importante (MISTIE III) ont été récemment publiés (Hanley *et al.*, 2019). Il en a résulté qu'il n'y avait pas de différence statistique entre les 2 groupes traités au niveau du résultat fonctionnel après 365 jours (Hanley *et al.*, 2019). Cependant, l'exploration des résultats secondaires suggère que la réduction du volume de l'hématome à 15mL ou moins dans le groupe « intervention » était associé à un meilleur résultat fonctionnel chez les patients stabilisés. Il n'y a actuellement aucune preuve que cette approche doit être utilisée en routine, mais d'autres essais sont nécessaires pour définir le rôle de cette approche mini-invasive prometteuse. D'autres études observationnelles ont étudié une autre approche qui consistait à « décompresser » le cerveau des patients atteints d'HIC (Fung *et al.*, 2012, 2016). L'essai clinique SWITCH en cours compare la craniectomie décompressive et une meilleure prise en charge médicale seule dans l'HIC située dans les noyaux gris centraux ou le thalamus.

Enfin, un dernier essai clinique s'est intéressé à l'hémorragie intraventriculaire (HIV). L'HIV est un facteur prédictif indépendant de mauvais résultat fonctionnel après HIC et se produit chez 45% des patients. Elle conduit potentiellement à l'hydrocéphalie, qui diminue la probabilité d'un résultat fonctionnel favorable à long terme (Bhattathiri *et al.*, 2006; Gaberel, Magheru and Emery, 2012).

Cet essai clinique récent, randomisé, en double aveugle, contrôlé par placebo, CLEAR III, s'est intéressé à l'étude de l'influence de l'application d'alteplase chez des patients atteints d'HIV auxquels des drains sont régulièrement placés (Hanley *et al.*, 2017). Ils ont rapporté une réduction de la mortalité chez les patients subissant une irrigation par alteplase. Cependant, le résultat fonctionnel n'a pas été amélioré. Le taux d'invalidité grave chez les survivants était élevé (Hanley *et al.*, 2017). Malgré ce résultat décevant, cette stratégie de placement de drain guidée par imagerie reste prometteuse et demeure une cible de futurs essais. En effet, courant 2025, un essai clinique randomisé nommé EVACUATE (*Ultra-Early, Minimally inVAsive intraCerebral Haemorrhage evAcUATion Versus Standard trEatment*) entrera en phase de recrutement et visera à évacuer l'hématome des patients atteints d'HIC *via* une chirurgie mini-invasive.

Outre l'HIC, certains essais cliniques s'intéressent également à cette stratégie de fibrinolyse intraventriculaire dans l'hémorragie sous-arachnoïdienne anévrysmale, qui constitue également une forme dévastatrice d'AVC. L'essai clinique randomisé et contrôlé de phase III nommé *Intraventricular Fibrinolysis for Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage* (FIVHeMA) actuellement en cours de recrutement va comparer deux groupes ; l'un subissant un drainage ventriculaire externe et l'autre recevant ce drainage ventriculaire externe et une fibrinolyse intraventriculaire *via* l'alteplase [[ClinicalTrials.gov \(NCT03187405\)](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03187405)]. Les résultats de cette étude sont attendus pour l'année 2023 et devront, le cas échéant, démontrer une amélioration du résultat fonctionnel des patients atteints d'hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA). Toutes ces stratégies de prises en charge du saignement aigu des patients atteints d'HIC ont fait l'objet de nombreux essais cliniques cités dans le **Figure 13** ci-dessous (**Figure 13**).

Nom de l'essai clinique	Phase	Population	Intervention de l'étude	But principal	Statut
<i>Abaissement intensif de la PA</i>					
INTERACT-2	3	HIC spontanée	Tout agent hypotenseur	mRS 3-6 à 90j	Complété
ATACH-II	3	HIC spontanée supratentorielle	Nicardipine intraveineuse	mRS 4-6 à 90j	Terminé
INTERACT-3	Non applicable	HIC spontanée supratentorielle	Réversion anticoagulante	mRS 0-5 à 6M	Recrutement
<i>Réversion de la coagulopathie</i>					
PATCH	3	HIC spontanée supratentorielle de patients ayant été sous anti-plaquettaire	Transfusion de plaquettes	mRS ordinaire à 3M	Complété
PUNCH	Non applicable	HIC spontanée supratentorielle	Transfusion de plaquettes	Volume HIC à 24h	Terminé
ASPIRE	3	HIC spontanée supratentorielle	Apixaban et Aspirine voie orale	Volume HIC à 24h	Terminé
<i>Thérapie hémostatique</i>					
FAST	3	HIC spontanée	Facteur VII activé recombinant	mRS ordinaire à 12M	Recrutement
STOP-IT	2	HIC spontanée supratentorielle	Facteur VII activé recombinant	Thromboembolies et hématorne à 24h	Complété
SPOTLIGHT	2	HIC spontanée supratentorielle	Facteur VII activé recombinant	Volume HIC à 24h	Complété
TICH-2	3	HIC spontanée	Acide tranexamique	Mort ou dépendance à 90j	En cours
Andexanet	4	HIC spontanée aiguë	Andexanet alpha	Bonne efficacité à 12h	Recrutement
STOP-MSU	2	HIC spontanée	Acide tranexamique	Volume HIC à 24h	Recrutement
<i>Ciblage de l'élimination/réduction de l'hématome</i>					
STICH	3	HIC spontanée supratentorielle	Évacuation chirurgicale de l'hématome	Échelle de Glasgow à 6M	Complété
STICH-2	3	HIC spontanée lobaire	Évacuation chirurgicale de l'hématome	Échelle de Glasgow à 6M	Complété
MISTIE-3	3	HIC spontanée supratentorielle HIC ≥ 40mL	Chirurgie mini-invasive + injection de r-tPA	mRS 0-3 à 180j	Complété
ENRICH	Non applicable	HIC spontanée	Évacuation chirurgicale de l'hématome	mRS ordinaire à 3M	Recrutement
EVACUATE	Non applicable	HIC spontanée	Chirurgie mini-invasive et évacuation de l'hématome	mRS 0-3 à 3M	Recrutement en 2025
CLEAR3	3	HIV obstruant le 3 ^{ème} et le 4 ^{ème} ventricules	Alteplase	mRS ≤3 à 180j	Complété

Figure 13 : Principaux essais cliniques en recrutement, en cours, complétés ou terminés sur l'HIC (adapté de (Participants* et al., 2018) et complété à partir de clinicaltrials.gov)

4. Pronostic précoce

Les principaux déterminants du résultat fonctionnel et de la mortalité au cours des 90 premiers jours après une HIC aiguë comprennent les facteurs de risque cliniques et les caractéristiques spécifiques observées en neuro-imagerie. Les résultats fonctionnels peuvent être évalués à différents moments après l'HIC et en utilisant des seuils de performance variables ou des outils de notation clinique. L'ERM est fréquemment utilisée (**Figure 14**). Dans plusieurs essais, les patients atteints d'HIC atteignant un score de 0 à 3 ont été décrits comme ayant un bon résultat fonctionnel ; les mauvais résultats comprenaient les notes de 4 à 6.

Score	Description
0	Aucun symptôme
1	Pas d'incapacité malgré les symptômes; capable d'accomplir toutes les tâches et activités habituelles
2	Handicap léger; incapable de mener à bien toutes les activités précédentes, mais capable de s'occuper de ses propres affaires sans aide
3	Handicap modéré; nécessitant de l'aide, mais capable de marcher sans aide
4	Handicap modérément sévère ; incapable de marcher sans aide et incapable de subvenir à ses besoins corporels sans aide
5	Handicap grave; alité, incontinent et nécessitant des soins infirmiers et une attention constants
6	Mort

Figure 14 : Échelle de Rankin modifiée (reproduite à partir de (Van Swieten et al., 1988)).

a. Les taux de mortalité

Dans diverses études, le taux de mortalité à 30 jours de l'HIC variait de 32% à 52% (Fogelholm et al., 2005; Flaherty et al., 2006; Sacco et al., 2009; Charlotte Jj van Asch et al., 2010) ; la moitié de ces décès sont survenus dans les deux premiers jours (Franke et al., 1992; Broderick et al., 1993; Charlotte JJ van Asch et al., 2010). Certaines preuves suggèrent que le taux de mortalité a diminué depuis le début des années 2000, peut-être en raison de meilleurs soins de soutien et de prévention secondaire (Jolink et al., 2015). Cependant, cette réduction de la mortalité peut être partiellement attribuée à une proportion accrue de survivants handicapés (Béjot et al., 2018).

Plusieurs études suggèrent que l'hémorragie due à des malformations vasculaires est associée à une mortalité plus faible que les autres causes d'HIC (Beslow *et al.*, 2010; Lo *et al.*, 2013; Murthy *et al.*, 2017).

b. Les facteurs de risque de mauvais résultats

Plusieurs facteurs de risque ont été associés à un mauvais pronostic fonctionnel et à la mortalité chez les patients atteints d'HIC aiguë. Ils comprennent les facteurs de risque cliniques et les caractéristiques d'imagerie associées à l'HIC énoncés ci-dessous :

- *Les facteurs de risque cliniques*

- Age avancé
- Déficience grave à l'examen de base ou détérioration neurologique précoce
- Retrait anticipé du soutien
- Utilisation anti-thrombotique antérieure

- *Les facteurs de risque d'imagerie*

- Volume initial d'HIC
- Localisation de l'HIC
- Extension intraventriculaire
- Forme et caractéristiques de l'hématome
- Croissance de l'hématome

VIII. Pronostic à long terme

Le taux de récupération après HIC peut être le plus élevé au cours des premiers mois. Cependant, la plus grande mesure de récupération peut ne pas être évidente avant 6 à 12 mois après HIC. Une étude prospective de 2016 a étudié le risque de démence des patients après une hémorragie intracérébrale spontanée en cherchant à déterminer son incidence et ses facteurs de risque après HIC (Moulin *et al.*, 2016). Il en a résulté qu'il existe un risque substantiel de démence incidente chez les survivants sans démence d'HIC ; les résultats de cette étude suggèrent que l'AAC sous-jacente est un facteur contribuant à la survenue de la démence d'apparition récente (Moulin *et al.*, 2016).

Plus récemment, cette même équipe du Pr Cordonnier a tenté d'identifier les caractéristiques initiales et les nouveaux événements cliniques associés à un déclin fonctionnel chez les patients ayant survécu 6 mois après une HIC (Pasi *et al.*, 2020).

Les résultats de cette étude ont révélé que près d'un quart des patients atteints d'HIC spontanée ont développé un déclin fonctionnel au cours du temps. L'âge, le volume de l'HIC, le score mRS plus élevé à 6 mois et les nouveaux événements cliniques après l'HIC sont les principaux déterminants (Pasi *et al.*, 2020).

Traitements et pronostic de l'HIC

- Objectifs du traitement initial :
 - la **prévention** de l'**extension** de l'hémorragie
 - la **surveillance** et la **gestion** de l'**hypertension intracrânienne**.
 - la gestion d'autres complications neurologiques et médicales.

- **Arrêt** de tous les traitements **anti-coagulants** et **anti-thrombotiques**
- **Réversion** des traitements anticoagulants si possible.

- Contrôle de la **pression artérielle systémique**

- Gestion de la **pression intracrânienne élevée**
- Utilisation de la **thérapie osmotique** (solution hypertonique ou mannitol)

- Stratégies **hémostatiques** non recommandées
- **Facteur de coagulation VII activé recombinant (FVIIar)**
 - **Réduit** la croissance de l'hématome mais **pas d'amélioration** du pronostic
- **Acide tranexamique** (inhibiteur de la fibrinolyse)
 - **Pas de réduction** de l'hématome, **pas d'amélioration** des résultats fonctionnels

- Intervention **chirurgicale**
- Hématome cérébelleux : **craniectomie** et **évacuation de l'hématome**
- Autres hématomes : ventriculostomie sans décompression de la fosse postérieure

- Taux de mortalité
- Entre **32% et 52%** à **30 jours**
- **Moitié** des décès surviennent durant les **deux premiers jours**

IX. Modèles expérimentaux pré-cliniques d'hémorragie intracérébrale spontanée

Au sein de la recherche pré-clinique, deux modèles d'HIC sont utilisés de manière régulière et répandue : le modèle collagénase et le modèle par injection de sang autologue (Rosenberg *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1994).

1. Modèle d'hémorragie intracérébrale par injection stéréotaxique de sang

Le premier modèle consiste en une **injection stéréotaxique de sang hétérologue ou autologue**. C'est en 1994 que Yang et collaborateurs ont découvert qu'il était possible d'injecter à un débit constant du sang autologue (extrait de l'artère fémorale) *via* l'utilisation d'une pompe à micro infusion (Yang *et al.*, 1994). Ils ont démontré par ce modèle qu'il était possible de créer un hématome contrôlable et reproductible au sein du noyau caudé droit de l'animal (Yang *et al.*, 1994). Il s'agit d'un modèle qui a été appliqué à un grand nombre d'études sur l'HIC.

Cependant, l'un des problèmes majeurs de cette technique est le reflux de sang dans le tractus de l'aiguille ou l'espace sous-dural avec un taux d'injection rapide. Par la suite, l'incapacité de cette technique à reproduire la pression artérielle systémique pouvant influencer la taille de l'hématome est aussi considérée comme un inconvénient de ce modèle. Également, l'exploitation de l'artère fémorale engendre des déficits comportementaux en aval de la chirurgie. Enfin, même si une équipe a montré qu'un saignement secondaire se produisait après l'injection de sang autologue chez des rats diabétiques, il n'est pas encore clair que ce modèle mime le phénomène d'hémorragie secondaire retrouvé chez l'homme (Liu *et al.*, 2011). Pour toutes ces raisons, nous ne nous sommes pas focalisés dans ce travail sur ce modèle car nous sommes intéressés aux dommages primaires de l'hémorragie et non pas aux secondaires.

2. Modèle d'hémorragie intracérébrale par injection stéréotaxique de collagénase

Un second modèle utilise l'**injection stéréotaxique de collagénase** dans la zone cérébrale d'intérêt. La collagénase est une enzyme protéolytique qui dégrade la membrane basale et le collagène interstitiel des vaisseaux sanguins (Harris and Krane, 1974).

Par conséquent, Rosenberg et collaborateurs ont, en 1990, réalisé un nouveau modèle d'HIC spontanée en utilisant des injections stéréotaxiques de collagénase chez des rats Sprague-Dawley (Rosenberg *et al.*, 1990). Depuis toutes ces années, des modifications ont été apportées à ce modèle notamment des changements du site d'injection, des ajustements de la concentration de collagénase injectée et des volumes d'injection (Figure 15).

Il s'agit d'un modèle permettant la rupture des petits vaisseaux sanguins cérébraux afin d'induire une hémorragie mais de manière contrôlée et reproductible en injectant la collagénase dans le parenchyme cérébral (James, Warner and Laskowitz, 2008). L'avantage de ce modèle est sa capacité à mimer les saignements intraparenchymateux spontanés retrouvés chez l'homme tout en s'affranchissant des difficultés techniques de manipulation de sang (Andaluz, Zuccarello and Wagner, 2002). De plus, ce modèle simule l'expansion de l'hématome du saignement continu qui se produit naturellement chez un patient atteint d'HIC (Kazui *et al.*, 1996). C'est donc pour tous ces avantages que nous avons choisi le modèle collagénase dans nos travaux de thèse afin de mimer au mieux ce qu'il se produit en clinique et de tenter de cibler et traiter le saignement en phase précoce.

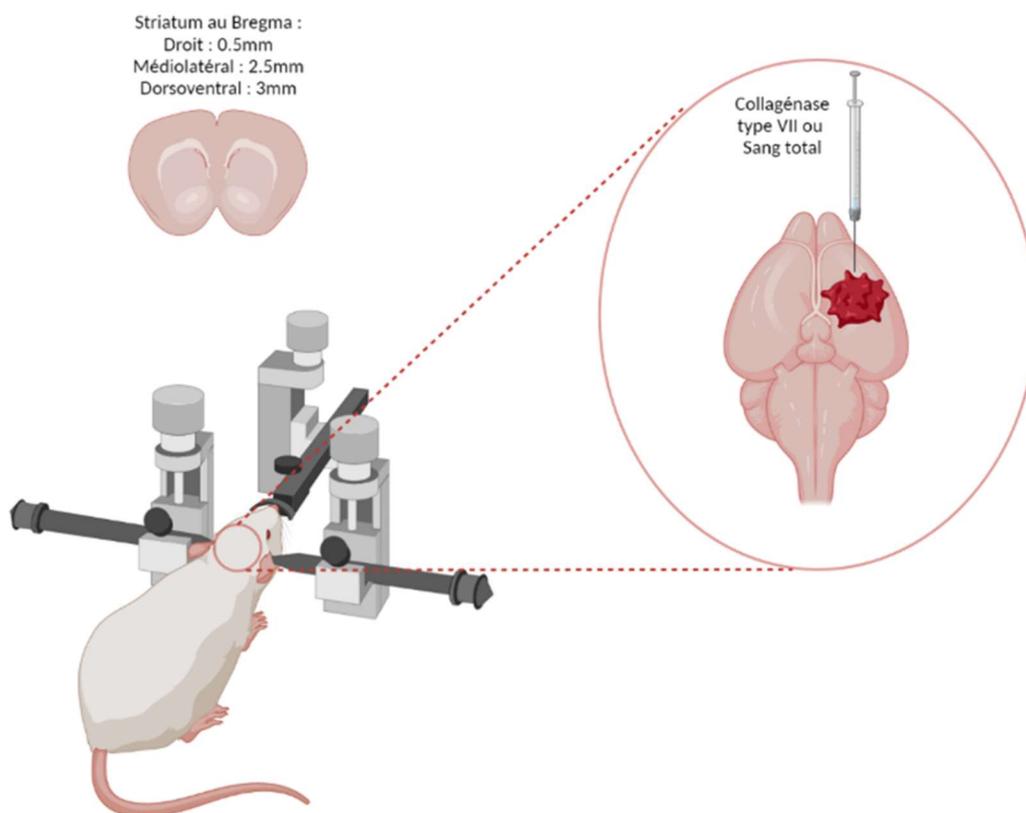


Figure 15 : Représentation schématique du modèle d'HIC par l'injection stéréotaxique de collagénase chez le rongeur.

3. Suivi comportemental

Les études réalisées chez le rongeur, plus particulièrement dans le cadre de pathologies neuro-vasculaires ou de traumatismes, sont le plus souvent complétées de divers tests comportementaux afin de mettre en évidence :

- des déficits fonctionnels ou sensitifs retrouvés à la fois chez l'homme et chez le rongeur ;
- une récupération fonctionnelle de l'animal, spécifique ou non à la pathologie ou au traitement testé (Gaberel *et al.*, 2014; Lemarchant *et al.*, 2014).

Au sein d'un laboratoire, plusieurs tests sont utilisés en routine. L'évaluation du score clinique ou neuroscore, en parallèle d'un suivi pondéral, permet d'évaluer l'état général de l'animal, particulièrement au stade aigu du modèle (Tejima *et al.*, 2007). Le *corner test*, l'actimétrie ou encore le *Catwalk* (Noldus®) permettent une évaluation plus précise des déficits fonctionnels chez un animal ainsi que la récupération fonctionnelle associée (Okauchi *et al.*, 2010; Lemarchant *et al.*, 2014).

Malgré l'optimisation des outils qualitatifs et quantitatifs pour mesurer des paramètres comportementaux, il est à noter que les espèces utilisées en laboratoire, particulièrement les rongeurs, possèdent une récupération spectaculaire, spontanée et rapide. Cette récupération précoce est l'un des principaux défauts de transversalité, entre un modèle animal et la pathologie humaine et le résultat de nombreux échecs d'essais cliniques.

Cette première partie de manuscrit a permis de mieux comprendre les enjeux de la pathologie de l'HIC tant au niveau physiopathologique qu'au niveau de sa prise en charge. Nous avons pu admettre que le besoin d'un traitement dans la phase précoce de l'HIC est nécessaire pour freiner rapidement la croissance de l'hématome et améliorer le devenir fonctionnel des patients. Les stratégies hémostatiques qui ont, jusqu'alors, échoué en termes de ciblage, sont, cependant, un élément sur lequel il faut s'attarder car il s'agit de stratégies prometteuses pour stopper le saignement dès la prise en charge du patient. C'est pourquoi dans la partie suivante de ce manuscrit, nous aborderons plus en détails ce qu'est l'hémostase et ce que peuvent apporter les agents hémostatiques dans le traitement des HIC.

B. L'hémostase

L'hémostase joue un rôle essentiel dans la prévention de la perte de sang qui se produit en raison de la rupture des parois des vaisseaux, soit à cause d'un traumatisme, soit d'un état pathologique sous-jacent comme dans les AVC hémorragiques. Les effets secondaires délétères des saignements incontrôlés se traduisent à de nombreux niveaux, qu'ils soient microscopiques ou macroscopiques. En effet, lorsqu'une blessure se produit, les plaquettes s'activent au niveau du site de la blessure et génèrent de la fibrine. La fibrine produite forme ainsi un bouchon qui va arrêter le saignement. En cas de saignement incontrôlé, les plaquettes ne sont pas en mesure de constituer un tampon. Pour pallier à cela, la solution serait de trouver l'« hémostat » idéal. Celui-ci doit être non immunogène, non toxique et biodégradable. Afin d'être efficace dans les saignements aigus, il doit être capable d'une administration intraveineuse immédiate, ciblée et spécifique au site pour éviter le risque de thromboembolie. Idéalement, l'« hémostat » doit arrêter rapidement le saignement aigu, c'est-à-dire dans les 2 minutes suivant l'administration, en se frayant rapidement un chemin dans le *pool* de sang (Morrison, 2013).

I. Définition

L'hémostase est un processus physiologique naturel qui arrête le saignement d'une coupure ou d'une blessure en formant un caillot sanguin. Ce faisant, elle maintient un flux sanguin régulier dans le système circulatoire. Le saignement se produit lorsque l'intégrité de la paroi vasculaire est rompue, exposant la matrice sous-endothéliale au sang. Les muscles lisses présents dans le système vasculaire se contractent pour tenter d'arrêter le flux sanguin sur le site de la blessure, un phénomène appelé vasoconstriction. Ces contractions spasmodiques stoppent efficacement les saignements dans les petits vaisseaux sanguins. Dans les vaisseaux sanguins plus grands, la vasoconstriction limite considérablement le flux sanguin, réduisant ainsi les dommages supplémentaires au site affecté. Les composants exposés du sous-endothélium activent deux voies principales, impliquant les plaquettes et la fibrine, pour la formation de caillots. Le processus de formation de caillots sanguins n'est activé que quelques secondes après la blessure et reste localisé au site de la blessure. Par conséquent, il s'agit d'un processus très strictement réglementé, afin d'éviter le risque de complications thromboemboliques (Gale, 2011).

Les interactions entre la cascade de coagulation et la voie fibrinolytique sont extrêmement critiques pour maintenir l'équilibre thrombo-hémorragique (Palta, Saroa and Palta, 2014). L'hémostase se produit principalement en deux étapes, primaire et secondaire avec une étape complémentaire ; la fibrinolyse (Figure 16).

- **L'hémostase primaire** fait référence à l'activation et à l'agrégation des plaquettes, entraînant la formation temporaire d'un bouchon plaquettaire ;
- **La coagulation plasmatique** ou **hémostase secondaire** se réfère à l'activation de la cascade de coagulation, entraînant ainsi un dépôt de filet de fibrine sur la plaie. Cela forme un caillot puissant qui arrête complètement le flux sanguin (Triplett, 2000) ;
- **La fibrinolyse** va dissoudre le caillot sanguin suite à la restauration de l'intégrité du vaisseau.

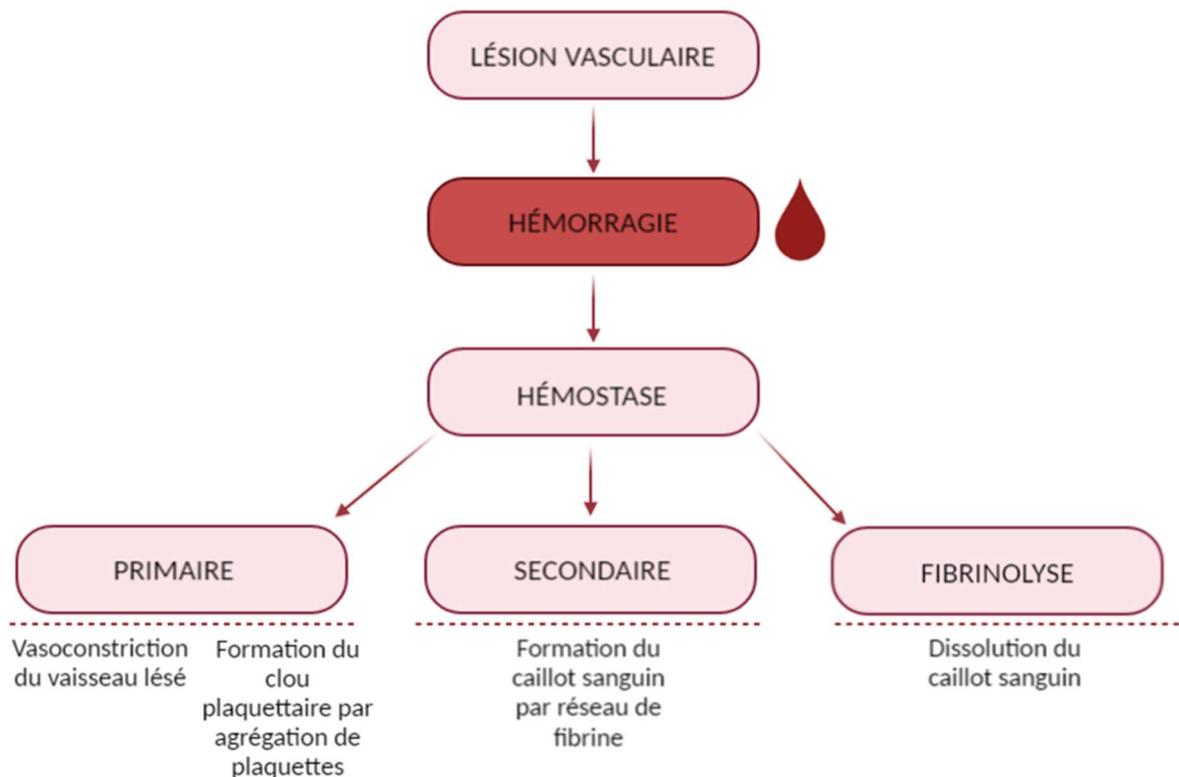


Figure 16 : Représentation schématique de l'hémostase lors d'une lésion vasculaire et ses trois étapes interdépendantes ; l'hémostase primaire, l'hémostase secondaire et la fibrinolyse.

II. L'hémostase primaire

Depuis 100 ans, l'importance du rôle joué par les plaquettes dans l'hémostase a été clairement élucidée dans la littérature. Une fonction adéquate ainsi qu'un nombre de plaquettes sont nécessaires pour que l'hémostase ait lieu (Farndale *et al.*, 2003). Au cours de l'hémostase primaire, les interactions entre le système vasculaire endommagé et les plaquettes, ainsi que leurs réponses sont soulignées. Elle comprend la formation d'un bouchon hémostatique primaire qui bloque temporairement le flux sanguin sur le site de la blessure.

Cette phase inclut principalement les contractions des muscles lisses, l'exposition de la matrice sous-endothéliale au sang et les réponses des cellules endothéliales des vaisseaux à la formation d'un bouchon primaire (Huebsch and Harker, 1981; Van Pelt *et al.*, 1994). Au cours de la formation d'un bouchon hémostatique primaire, les plaquettes sont tout d'abord activées, puis répondent une série d'événements telles que l'adhésion, la sécrétion, l'agrégation et la contraction (Shattil and Bennett, 1981).

Dans ces circonstances normales, de la prostacycline et de l'oxyde nitrique anti-thrombotique sont constamment produits, ce qui ne permet pas l'adhérence des plaquettes aux parois des vaisseaux. Une plaie traumatique expose les composants vasculaires du sous-endothélium tels que le facteur von Willebrand (vWF), le collagène et les protéines pro-coagulantes. Ce sont des composants hautement thrombogéniques qui activent la cascade de coagulation (Broos *et al.*, 2011; Palta, Saroa and Palta, 2014). Les plaquettes se lient à l'endothélium *via* le vWF et le collagène, devenant ainsi activées par le collagène, l'adrénaline, l'adénosine diphosphate et la thrombine. Lors de l'activation, les plaquettes changent de forme pour améliorer davantage leurs propriétés adhésives (Broos *et al.*, 2011). Les plaquettes activées libèrent une myriade de médiateurs, tels que le thromboxane A₂, qui attirent davantage de plaquettes vers la zone blessée, contribuant ainsi à la formation d'un bouchon hémostatique primaire (Cines *et al.*, 1998) (Figure 17).

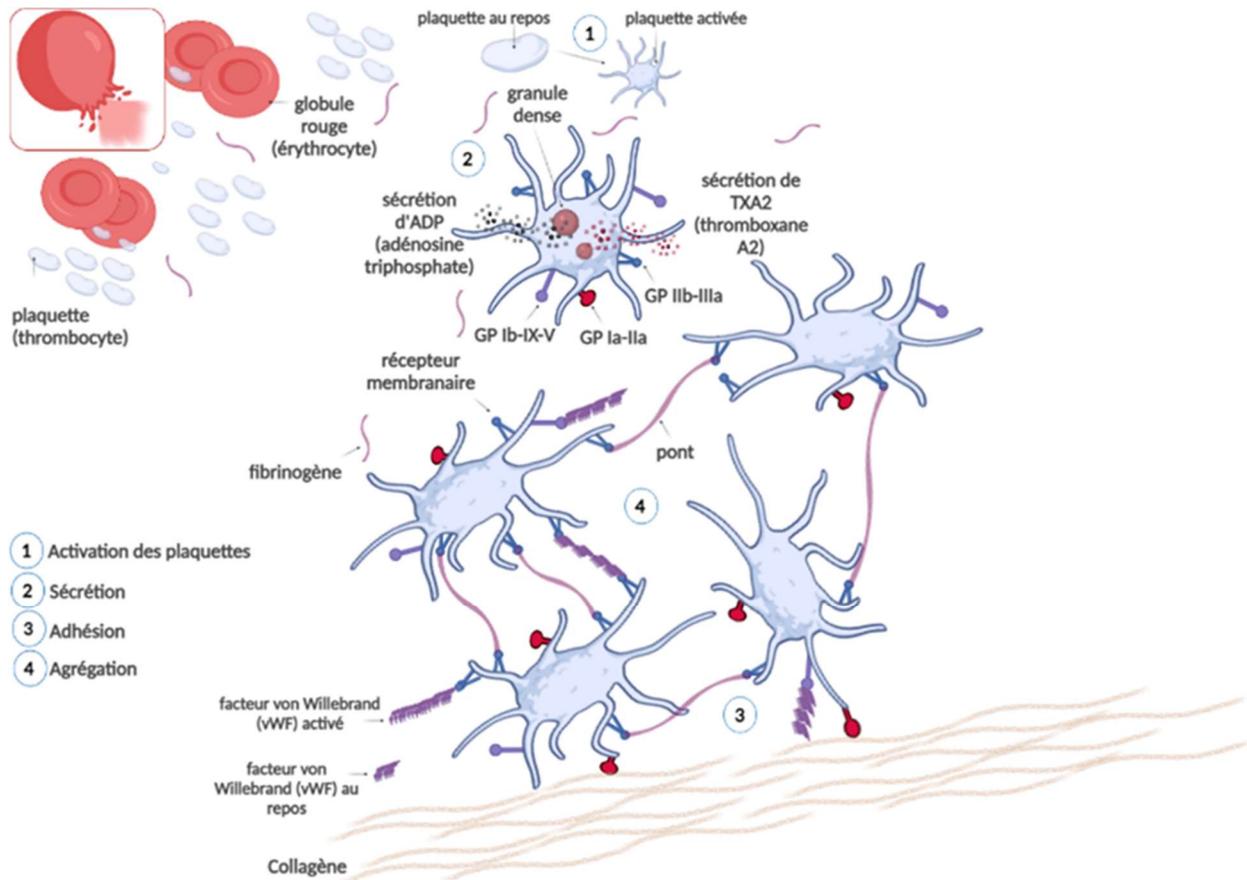


Figure 17 : Représentation schématique de la première étape de l'hémostase : l'hémostase primaire.

III. L'hémostase secondaire

L'hémostase secondaire comprend une série d'événements prédominés par les sérines protéases en cascade de la coagulation qui se terminent par la conversion du fibrinogène en fibrine par la thrombine. Au fur et à mesure que les parois des vaisseaux se rompent, le sang s'infiltré dans les tissus extravasculaires. Ces tissus contiennent des quantités opulentes de facteur tissulaire (FT), qui sert de cofacteur pour le facteur VIIa (Kirchhofer and Nemerson, 1996). Ces deux facteurs forment un complexe qui active davantage le facteur IX et le facteur X – une voie de la coagulation connue sous le nom de **voie extrinsèque** (Figure 18). Le facteur X est, en outre, activé par le facteur IXa, ainsi que son cofacteur VIIIa.

La prothrombine est ensuite activée par le facteur Xa, ainsi que son cofacteur Va, pour libérer la thrombine (Dahlbäck, 2000). La principale sérine protéase dans l'ensemble de la cascade de coagulation est la thrombine, qui participe à de nombreuses étapes importantes (Lane, Philippou and Huntington, 2005).

La thrombine régule la conversion du fibrinogène en fibrine, qui forme un maillage insoluble sur la plaie. Cet événement a lieu parallèlement à l'agrégation plaquettaire (Falati *et al.*, 2002). Le facteur XIII est également activé par la thrombine, qui est responsable du contrôle de la réticulation du filet de fibrine, renforçant ainsi directement le caillot (Posma, Posthuma and Spronk, 2016).

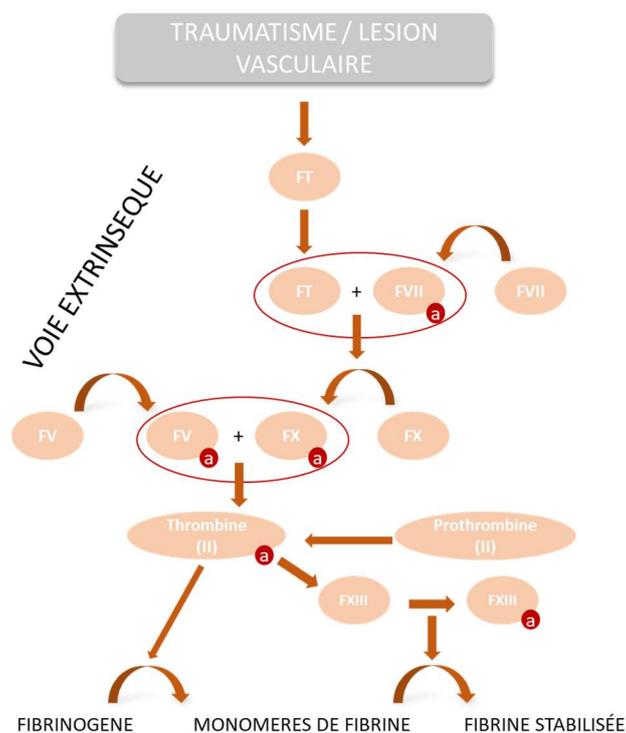


Figure 18 : Schématisation de la cascade d'activation de la voie extrinsèque de la coagulation. La présence de FT lors d'une lésion vasculaire génère de la fibrine stabilisée.

La majorité des inhibiteurs de la sérine protéase appartiennent à la famille des inhibiteurs des serpins. Ils régulent à la baisse la cascade de la coagulation en désactivant toutes les sérines protéases (Bianchini *et al.*, 2021). L'antithrombine est un inhibiteur central des sérines protéases (Bravo-Pérez, Vicente and Corral, 2019) (Figure 20). Elle inhibe le facteur Xa, la thrombine et les facteurs IXa et XIa à l'aide d'héparine ou d'héparane sulfate (Quinsey *et al.*, 2004).

L'hémostase secondaire implique la cascade de coagulation principalement activée par deux voies initiales, dont la voie FT (**voie extrinsèque**) et la voie d'activation par contact (**voie intrinsèque**) (**Figure 19**).

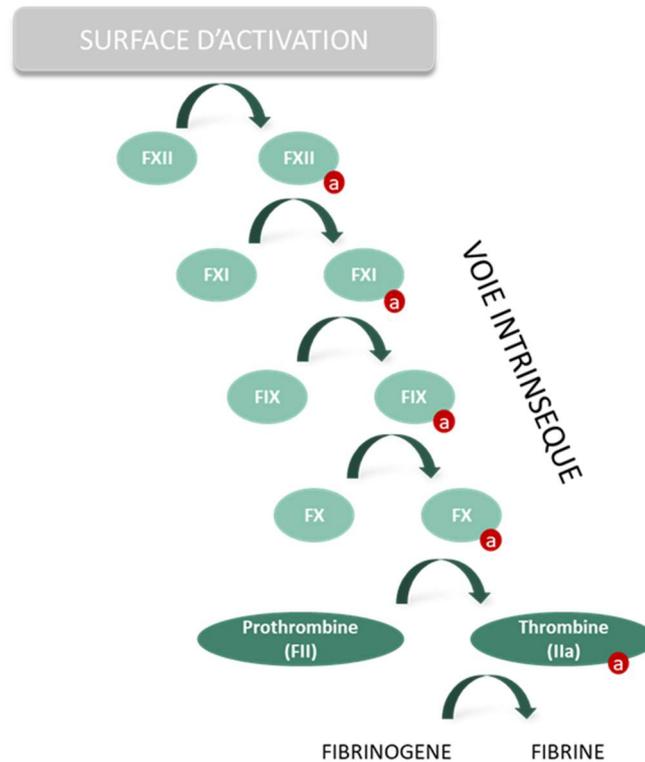


Figure 19 : Schématisation de la cascade d'activation de la voie intrinsèque de la coagulation. L'activation du FXII permet in fine la formation de fibrine.

Il est maintenant bien connu que la voie extrinsèque est d'une importance primordiale conduisant à une réponse rapide après une lésion externe du vaisseau sanguin. Il implique divers facteurs de coagulation, principalement le facteur VIIa dans le sang (Long *et al.*, 2016; Bekendam *et al.*, 2018). Suite à l'évacuation du sang du vaisseau endommagé, le FVII entre en contact avec le FT exprimé à la surface des fibroblastes et des leucocytes du stroma (cellules porteuses de FT). Cela aboutit finalement à la formation d'un complexe activé par le FT-FVIIa conduisant à l'activation de la « voie commune » (**Figure 20**) (Saad and Schoenberger, 2019). Pour compléter ces données, il est possible de trouver un tableau récapitulatif des principales caractéristiques du FT en page 59.

La voie intrinsèque implique un contact avec l'endothélium exposé, le collagène, le kininogène de haut poids moléculaire (KH), le prékallikréine et le facteur Hageman (FXII). Le facteur XII activé entraîne ensuite le développement d'un maillage de fibrine *via* l'activation de la voie commune (Garnier *et al.*, 2021). L'activation de la voie intrinsèque est considérée comme le résultat d'un traumatisme vasculaire interne et est plus lente que la voie extrinsèque (Figure 19).

Bien que la voie soit d'une importance vitale dans l'hémostase, sa suppression peut réduire le risque de thrombose chez les patients hospitalisés présentant un risque accru de maladies cardiovasculaires (Long *et al.*, 2016). Les voies intrinsèque et extrinsèque activent toutes deux la voie commune, notamment le FX, la prothrombine, le fibrinogène et le FXIII (Figure 20). L'activation de ces facteurs dont le FXa, la thrombine, la fibrine et le FXIIIa entraîne finalement le développement d'un caillot de fibrine stable (Boon, 1993; Monroe and Hoffman, 2009).

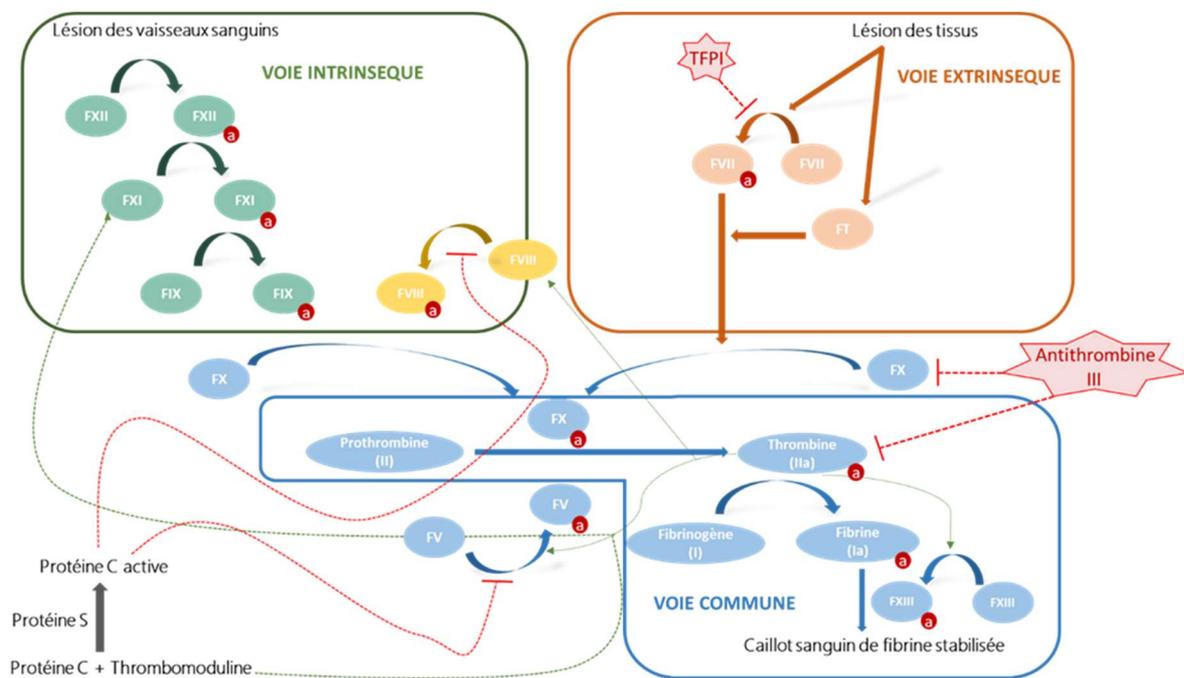


Figure 20 : Représentation schématique de la cascade de coagulation et de ses inhibiteurs. Après une lésion vasculaire, le sous-endothélium expose le collagène et le FT à la circulation sanguine. L'exposition de ces composants déclenche presque simultanément l'initiation de la voie extrinsèque et de la voie intrinsèque.

IV. La fibrinolyse

La fibrinolyse est un processus qui rentre dans le système de coagulation et qui consiste en la dissolution des caillots de fibrine sous l'action de la plasmine. Par ce mécanisme, la fibrinolyse fait décroître la quantité de fibrine dans le sang. En conséquence, elle contribue à protéger l'organisme contre les risques de thrombose. La plasmine est produite par le foie, sous forme inactive : le plasminogène (Chapin and Hajjar, 2015).

Ce dernier possède une affinité pour la fibrine et est incorporé dans le caillot lors de sa formation (ce qui permettra de le dégrader plus tard). L'activation du plasminogène en plasmine se fait au niveau du caillot. Cette réaction est catalysée par deux activateurs (Pawlak, Pawlak and Mysliwiec, 2008) :

- L'urokinase provenant de la pro-urokinase ; l'activation de l'urokinase s'effectue grâce à la kallikréine (enzyme intervenant en début de coagulation) et à la plasmine (amplification de la fibrinolyse)
- L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) sécrété par la paroi vasculaire après un traumatisme

La plasmine est une protéase possédant une spécificité assez large : elle lyse la fibrine, le fibrinogène et les protéines de coagulation (FV et FVIII). Elle coupe la fibrine en différents endroits libérant dans la circulation des fragments qui seront dégradés par d'autres protéases et éliminés par les reins. Différentes méthodes de laboratoire permettent de doser certains de ces produits de dégradation. La plasmine est inactivée par l'anti-plasmine α_2 . Quant à l'urokinase et le tPA, ils sont inhibés par les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène PAI-1 et PAI-2 (Hoylaerts *et al.*, 1982; Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Al-Horani, 2015).

L'hémostase

- L'hémostase est un processus physiologique naturel qui **arrête le saignement** d'une coupure ou d'une blessure en formant un **caillot sanguin**.
- Elle se produit principalement en 2 étapes, **primaire** et **secondaire** avec une étape complémentaire qui est la **fibrinolyse** :
- L'**hémostase primaire** fait référence à l'activation et à l'agrégation des plaquettes, entraînant la formation temporaire d'un bouchon plaquettaire ;
- La **coagulation plasmatique** ou **hémostase secondaire** se réfère à l'activation de la cascade de coagulation, entraînant ainsi un dépôt de filet de fibrine sur la plaie. Cela forme un caillot puissant qui arrête complètement le flux sanguin (Triplett, 2000) ;
- Les 2 phases de l'hémostase primaire et secondaire regroupent l'activation de la **voie extrinsèque** dépendante du **FT** et celle de la **voie intrinsèque** également appelée **phase contact**.
- La **fibrinolyse** consiste en la **dissolution des caillots de fibrine** sous l'action de la plasmine.

Le facteur tissulaire

1. Historique du FT

- Conversion de la prothrombine en thrombine dans le plasma induite par le FT (Gray, 1990);
- Activité du FT dépend de la présence de phospholipides (Nemerson, 1968; Hvatum, Hovig and Prydz, 1969);
- Suppression du gène FT chez la souris entraîne la mort au cours du développement embryonnaire ou peu de temps après la naissance (Bugge *et al.*, 1996; Carmeliet *et al.*, 1996; Toomey *et al.*, 1996);

2. Rôle dans la cascade de coagulation

- Hypothèse : FT extravasculaire sert d'enveloppe protectrice dans l'hémostase (D'Alessandro *et al.*, 2018);
- Modèle cellulaire de coagulation avec une cellule FT-positive et des plaquettes activées impliquant l'initiation, l'amplification et la propagation de la coagulation (Hoffman and Monroe, 2001);
- Complexe FT-FVIIa peut activer le FIX *in vitro* (Osterud and Rapaport, 1977; Zur and Nemerson, 1980);
- Complexe FT-FVIIa-FXa peut activer le FVIII (Kamikubo *et al.*, 2017) ;
- Complexe FT-FVIIa est inhibé par le TFPI de manière FXa-dépendante et l'activation de la thrombine par le FXI permet une activation supplémentaire du FIX (Gailani and Broze, 1991);
- FVIIa murin se lie avec une forte spécificité au FT humain, mais l'association du FVIIa humain avec le FT murin est significativement plus faible qu'avec le FT humain (Petersen *et al.*, 2005);
- Souris délétées en FT et en FVII meurent au cours du développement embryonnaire ou peu de temps après la naissance (Rosen *et al.*, 1997).

3. Expression dans les cellules circulantes et vasculaires

- Souris à faible taux de FT succombent occasionnellement à des HIC mortelles (Pawlinski *et al.*, 2004; Bode and Mackman, 2016);
- Souris Nestin-Cre (souris dont le FT est supprimé dans toutes les cellules neuronales) à faible taux de FT et FT^{fl/fl} ont toutes deux présentés une HIC accrue par rapport aux souris contrôles dans un modèle d'HIC (Wang *et al.*, 2016);
- Environ 1,5% des monocytes CD14⁺ humains expriment de faibles taux de FT intracellulaire dans des conditions physiologiques (Egorina *et al.*, 2005) mais l'exposition des monocytes au LPS *in vitro* entraîne une expression rapide et transitoire de FT (Semeraro *et al.*, 2009);
- En condition physiologique, le FT est exclusivement exprimé par les monocytes circulants ;
- En condition pathologique, les monocytes libèrent des vésicules extracellulaires FT-positives qui se lient à d'autres cellules (plaquettes, neutrophiles, cellules endothéliales) (Sovershaev *et al.*, 2012);
- Accumulation des VE monocytaires FT⁺ dans le thrombus est dépendante de l'interaction de la Ps-Sélectine plaquettaire et de son co-récepteur, le PSGL-1 exprimé à la surface des VE monocytaires (Falati *et al.*, 2003).

4. Expression au niveau cérébral

- Existe une faible proportion de FT libre présent dans le parenchyme cérébral et les vaisseaux cérébraux (Nevo *et al.*, 2019);
- Astrocytes sont la principale source de FT (Mackman *et al.*, 1993).

V. Types d'agents hémostatiques

L'objectif principal du clinicien est d'identifier le site de la blessure et de choisir une technique hémostatique qui pourrait potentiellement arrêter le saignement aigu. En cas de blessure mortelle, une étendue de possibilités peut être utilisée pour augmenter le processus d'hémostase, principalement par l'utilisation d'agents hémostatiques locaux ou systémiques. Les agents hémostatiques locaux sont administrés par voie topique et représentent des substances coagulantes ou vasoconstrictrices permettant d'accélérer l'hémostase au niveau des plaies. Les agents hémostatiques systémiques, quant à eux, sont administrés par voie générale pour le traitement des hémorragies. Par conséquent, ces différents agents hémostatiques agissent soit en renforçant le mécanisme de coagulation inné, soit plus directement en fournissant un agent hémostatique pour arrêter le saignement. Dans cette sous-partie d'introduction, nous discuterons rapidement des techniques employées en routine par voie topique ou systémique pour stopper le saignement aigu.

1. Les agents hémostatiques locaux administrés par voie topique

a. Agents hémostatiques zéolite minérale

Les pansements hémostatiques à base de zéolite minérale agissent comme un tamis moléculaire, ces agents absorbent l'eau, concentrant ainsi divers facteurs de coagulation, plaquettes et érythrocytes sur le site de la lésion, formant alors un bouchon (Alam *et al.*, 2005). Exemples : la Kaoline et le *QuickClot* (Figure 21).

b. Agents à base de chitosan

Le chitosan est un polysaccharide naturel, non immunogène, biocompatible et biodégradable. Sa charge positive attire les érythrocytes et les plaquettes chargés négativement. Il favorise l'activation, l'adhérence et l'agrégation plaquettaires au site de la plaie (Periyah *et al.*, 2015). Exemples : HemCon®, Celox® et TraumaStat® (Figure 21).

c. Agents hémostatiques biologiquement actifs

Les agents hémostatiques biologiquement actifs sont appelés ainsi car ils ont le potentiel d'activer la cascade de la coagulation. Cela se fait en grande partie *via* le clivage enzymatique du fibrinogène par la thrombine. Une étendue d'agents hémostatiques biologiquement actifs sont actuellement disponibles, qui diffèrent en termes de composition, de mode d'action et de méthode d'administration (Zhong *et al.*, 2021).

- *Pansement de fibrine humaine*

Les produits à base de fibrine, tels que les colles de fibrine, sont utilisés pendant les chirurgies vertébrales, afin de renforcer le processus de guérison des fistules traumatiques délibérées. Ils sont aussi utilisés pour initier le processus d'hémostase (Epstein, 2014) (Figure 21).

- *Pansement sec de colle de fibrine (DFSD)*

Le pansement sec de fibrine comprend de la thrombine, du fibrinogène, du facteur XIII et du Ca^{2+} , sous forme de poudre. Le fibrinogène, la thrombine et le facteur XIII sont dérivés de sources humaines. Une grande étendue d'études a été réalisée, testant l'efficacité du DFSD. Il s'est avéré efficace pour stopper les saignements incontrôlés dans les lésions rénales (Morey *et al.*, 2001) et les lésions hépatiques (Holcomb *et al.*, 1999) (Figure 21).

- *Thrombine*

La thrombine est la partie centrale de la cascade de coagulation (Lomax and Traub, 2009). FloSeal® est une matrice approuvée par la *Food Drug Administration* (FDA) et disponible dans le commerce, composée de gélatine bovine et de thrombine humaine. Il est utilisé lorsque la ligature ou l'intervention chirurgicale ne sont plus efficaces pour contrôler l'hémorragie (Adams, Jones and Brost, 2001) (Figure 21).

- *Collagène*

Récemment, le collagène microfibrillaire a suscité un immense intérêt car il peut rapidement arrêter l'hémostase. Il est le plus souvent utilisé en conjugaison avec d'autres agents biologiquement actifs, tels que la thrombine et le fibrinogène. Exemple : TachoSil® (Figure 21).

- *Facteur VII activé recombinant*

Le FVIIar est disponible dans le commerce sous le nom de Novoseven® pour l'administration intraveineuse. Il arrête rapidement les saignements incontrôlés. Dans la cascade de coagulation normale, le FVIIa agit comme cofacteur pour le FT. L'utilisation clinique du FVIIar nécessite des concentrations élevées de FVIIa (Giansily-Blaizot and Schved, 2017). Bien que NovoSeven® puisse arrêter avec succès l'hémorragie intracrânienne, son utilisation a toutefois diminué en milieu pré-hospitalier en raison d'effets indésirables mortels, des coûts exceptionnellement élevés et de l'exigence de réfrigération pour le stockage (Lashof-Sullivan, Shoffstall and Lavik, 2013). FVIIar provoque de graves problèmes thromboemboliques et immunogènes. Des doses multiples sont généralement nécessaires pour arrêter complètement l'hémorragie, avec une dose unique d'une valeur d'environ 10 000\$ (Benharash, Bongard and Putnam, 2005). En effet, comme précisé dans la partie A « L'accident vasculaire cérébral » de l'introduction de ce manuscrit, dans l'essai multicentrique en double aveugle sur le FVII dans l'AVC hémorragique aigu (FAST), le FVIIar n'est pas parvenu à améliorer les résultats chez les patients atteints d'hémorragie intracérébrale aiguë (Mayer *et al.*, 2008). Par rapport au placebo, le traitement par le FVIIar a produit une réduction significative de la croissance des hématomes mais n'a pas entraîné d'amélioration du nombre de décès ou d'incapacités graves à 90 jours. Des résultats similaires ont été notés dans l'analyse des données regroupées de trois essais contrôlés randomisés antérieurs sur le FVIIar pour l'HIC spontanée (Diringer *et al.*, 2008) (Figure 21).

- *Plaquettes et substituts*

Des produits dérivés de plaquettes lyophilisées sont disponibles dans le commerce pour activer la coagulation de manière spécifique au site de saignement. Ceci est réalisé par une agrégation plaquettaire et l'adhésion au site où elle est nécessaire.

d. Anti-fibrinolytiques

Les anti-fibrinolytiques représentent la classe de médicaments favorisant le processus de coagulation du sang en ralentissant la dégradation des caillots formés. Ils agissent comme les analogues structuraux de la lysine. Ainsi, la conversion du plasminogène en plasmine est inhibée, bloquant la dégradation de la maille de fibrine et empêchant un saignement excessif. L'acide tranexamique, l'aprotinine et l'acide ϵ -aminocaproïque sont inclus dans la classe des anti-fibrinolytiques.

- *Acide tranexamique*

L'acide tranexamique est un analogue structurel de la lysine. Il est couramment administré par voie intraveineuse dans les chirurgies cardiaques pour minimiser les saignements pré-opératoires et le besoin de transfusion (Myles *et al.*, 2017). Les faibles coûts en font un agent hémostatique idéal. Cependant, il est limité au cadre opératoire, en raison du risque de complications thromboemboliques. Des doses plus élevées auraient provoqué des convulsions chez certains patients (Huang *et al.*, 2014) (Figure 21).

- *Aprotinine*

L'aprotinine est un inhibiteur des sérines protéases, dérivée du poumon bovin. Elle inhibe des enzymes telles que la plasmine et la kallikréine (Mannucci, And and Cattaneo, 1992). Aussi, elle préserve la fonction plaquettaire, principalement en inhibant les récepteurs activés par les protéases présentes sur les membranes externes des neutrophiles, des plaquettes et de l'endothélium (Hardy, 2001). La formulation d'aprotinine est disponible dans le commerce, Trasylo[®], qui a maintenant été retiré du marché en raison de réactions anaphylactiques graves (Mangano *et al.*, 2007) (Figure 21). Il existe plusieurs autres anti-fibrinolytiques tels que l'acide ϵ -aminocaproïque qui est utilisé dans les risques de thromboses ou les transplantations hépatiques (Mannucci, And and Cattaneo, 1992; Norfolk and Seghatchian, 2000) et l'acide 4-(aminométhyl) benzoïque qui est utilisé pour son rôle d'inhibiteur compétitif de l'activation du plasminogène par l'urokinase et la streptokinase (Landmann, 1973) (Figure 21).

e. Agents absorbables

Les agents absorbables ou matriciels servent de plate-forme pour la génération de thrombus. Il existe un grand nombre d'agents matriciels actuellement utilisés, tels que le collagène, l'amidon et la cellulose (Mannucci, 1998) (Figure 21).

- *Collagène*

Le collagène est isolé des composants bovins. Sa nature micro-fibrillaire lui permet d'être utilisé comme un puissant agent hémostatique. Il améliore l'activation, l'adhérence et l'agrégation plaquettaires. Son utilisation est indiquée dans le traitement de saignements parenchymateux et chez les patients coagulopathiques sous héparine (Figure 21).

- *Amidon et cellulose*

L'amidon et la cellulose régénérés oxydés sont des agents hémostatiques d'origine végétale. Elles sont disponibles pour leur utilisation immédiate et ont le potentiel d'absorber 7 à 10 fois leur propre masse, formant une masse gélatineuse qui renforce le caillot formé. Ils activent la voie intrinsèque de la cascade de coagulation, activant directement les plaquettes (Figure 21).

f. *Albumine et glutaraldéhyde*

Les adhésifs tissulaires sont connus pour leurs activités d'étanchéité et hémostatique et sont utilisés en clinique depuis de nombreuses décennies. Le glutaraldéhyde et l'albumine sont les adhésifs tissulaires utilisés en conjugaison les uns avec les autres, pour stopper l'hémorragie dans les gros vaisseaux (Figure 21).

2. *Agents hémostatiques à base de micro- et nanoparticules administrées par voie systémique*

Un grand nombre de thérapies à base de micro- et nanoparticules ont été proposées à ce jour. Cependant, elles présentent toutes certaines lacunes et sont toujours en cours d'essais cliniques. Les plaquettes allogéniques améliorent considérablement les taux de survie chez les patients traumatisés, mais elles ont des problèmes de stockage, une courte durée de conservation et peuvent provoquer une allo-immunisation.

- *Nanoparticules topiques*

Une étendue de nanoparticules topiques a émergé ces derniers temps, et peut effectivement stopper les saignements incontrôlés. Selon une étude réalisée par Ellis-Behnke et collaborateurs (Ellis-Behnke *et al.*, 2006), les peptides auto-assemblés atteignent l'hémostase en moins d'un quart de minute lorsqu'ils sont appliqués sur des modèles blessés du système nerveux, des hépatocytes et de la peau.

De même, le concept de nanofibres auto-assemblantes a été avancé par Luo et collaborateurs (Luo, Wang and Zhang, 2011). Ces molécules peptidiques chargées arrangent rapidement les into-nanofibres, imitant la matrice extracellulaire et contrôlant le saignement rapidement.

Behrens et collaborateurs (Behrens *et al.*, 2014) ont développé avec succès des nanoparticules d'hydrogel à base de N-(3-aminopropyl) méthacrylamide qui possèdent une excellente efficacité hémostatique en raison de leurs propriétés de gonflement et de leur charge positive, qui attirent les érythrocytes et les plaquettes chargés négativement, conduisant à la formation de caillots. Cette formulation peut stopper le saignement 12 minutes plus rapidement dans les blessures à la queue d'un modèle de rat amputé (Behrens *et al.*, 2014) (Figure 22).

- *Nanoparticules intraveineuses*

Une pléthore de nanoparticules administrées par voie intraveineuse a été développée jusqu'à présent, qui activent directement ou indirectement la cascade de coagulation (Lashof-Sullivan, Shoffstall and Lavik, 2013; Annabi *et al.*, 2014). Diverses études animales ont été réalisées pour déterminer l'efficacité des nanoparticules liposomales, recouvertes de plusieurs groupes fonctionnels (Lashof-Sullivan, Shoffstall and Lavik, 2013; Modery-Pawlawski *et al.*, 2013; Lashof-Sullivan *et al.*, 2014). Ces études *in vivo* impliquant l'attachement des chaînes dodécapeptidiques aux membranes des liposomes a démontré une diminution de l'adhérence plaquettaire, en raison de son interaction avec les plaquettes activées (Lashof-Sullivan, Shoffstall and Lavik, 2013). La blessure expose les composants de la matrice sous-endothéliale au sang, tels que le collagène et le facteur vWF. Ces complexes liposomaux ont manifestement montré une activation et une agrégation plaquettaire améliorées, réduisant ainsi de moitié le saignement dans une mesure du temps de saignement de queue murine après lésion (Modery-Pawlawski *et al.*, 2013).

Également, dans une étude de Bertram et collaborateurs (Bertram *et al.*, 2009), les plaquettes synthétiques ont été développées en utilisant un centre de copolymères. Ces molécules se lient aux plaquettes activées, augmentant leurs propriétés adhésives et d'agrégation, et réduisant les saignements de 50% (Bertram *et al.*, 2009).

De plus, les nanoparticules intraveineuses qui incorporaient un noyau poly (acide lactique) étaient plus stables que celles avec un noyau poly (acide lactique-co-glycolique), permettant une meilleure traduction clinique (Lashof-Sullivan *et al.*, 2016).

Et, dans une autre étude menée par Anselmo et collaborateurs (Anselmo *et al.*, 2014), des nanoparticules ressemblant à des plaquettes ont été synthétisées. Celles-ci étaient biochimiquement et biophysiquement similaires aux plaquettes naturelles. Elles peuvent être facilement transférées du site d'administration au site blessé, en raison de leur déformabilité, qui ressemble à la nature malléable des plaquettes.

Ces particules nano-fabriquées ont démontré une diminution de 65% du temps de saignement, lorsqu'elles sont administrées dans un modèle de mesure du temps de saignement de queue murine après lésion (Anselmo *et al.*, 2014).

Les particules naturelles présentent des caractéristiques avantageuses pour le traitement ciblé hémostatique des hémorragies intracérébrales en phase précoce. En effet, ces particules, aussi appelées vésicules extracellulaires (VE), sont des particules enrobées de membrane sécrétées par presque tous les types de cellules des mammifères (Curtis *et al.*, 2013; Raposo and Stoorvogel, 2013; Tan *et al.*, 2014). Sous les deux conditions physiologique et pathologique, divers types de cellules, y compris les cellules endothéliales, les lymphocytes, les cellules dendritiques, les mastocytes, les plaquettes, les érythrocytes, les cellules cancéreuses, les neurones et les oligodendrocytes sécrètent des VE (Harding, Heuser and Stahl, 1983; Pan and Johnstone, 1983; van Niel and Raposo, 2018). Les VE sont présentes dans divers tissus et fluides biologiques, et l'une des sources les plus étudiées est le sang. Les VE circulantes sont relativement faciles à obtenir avec des prélèvements peu invasifs, et, plus important encore, elles se sont avérées être des médiateurs essentiels de la communication cellulaire entre différents tissus et être impliquées dans divers processus cellulaires (Robbins and Morelli, 2014; Urbanelli *et al.*, 2016; Dickhout and Koenen, 2018; Kikuchi *et al.*, 2019).

C'est pour toutes ces raisons que les VE représentent une alternative intéressante et prometteuse pour les stratégies à visée hémostatique dans le traitement des saignements en phase aiguë. Ce point sera souligné plus amplement dans la partie suivante (C. Les vésicules extracellulaires).

Type d'agent hémostatique	Produit	Avantages	Inconvénients
Agents hémostatiques zéolite minéral	Kaoline (<i>local</i>)	Inerte; n'engendre pas de réponse immunitaire	Engendre des blessures thermiques jusqu'aux brûlures
	QuickClot (<i>local</i>)	Facile à utiliser et permet un accès proche des tissus	
Chitosan	HemCon (<i>local</i>)	Non toxique, biodégradable et biocompatible	Cher
	Celox (<i>local</i>)	Facile à appliquer, s'adapte à toute cavité de la plaie	Difficile à enlever si poudre pas humide
	TraumaStat (<i>local</i>)	Non toxique, biodégradable et biocompatible	Disponible pour pleins de situations cliniques
	DFSD (<i>local</i>)	Pas de transmission virale, stable à température ambiante	Cher
Pansement de fibrine humaine	TISSEEL (<i>local</i>)	Efficace chez les patients sous héparine; empêche les fuites grâce aux renforcements	Aprotinine provoque de l'immunogénicité et des réactions anaphylactiques
	Thrombine (<i>local</i>)	Utilisé quand les procédures de ligature ne sont plus efficaces	Source bovine qui peut mener à des réactions allergiques
Agents biologiquement actifs	Collagène (<i>local</i>)	Peut être adapté en fonction de l'utilisation prévue	Peut provoquer des réaction immunologiques
	Facteur VII activé recombinant (<i>systémique</i>)	Arrête rapidement une hémorragie interne	Cher, cause des complications thromboemboliques
Antifibrinolytiques	Acide tranexamique (<i>systémique</i>)	Peut être administré par voie intraveineuse et est très rentable	Risques de complication thromboemboliques et épilepsie
	Aprotinine (<i>systémique</i>)	Réduit efficacement le besoin en transfusion sanguine après une chirurgie cardiaque	Risques de réactions anaphylactiques
	EACA (<i>systémique</i>)	Administré en toute sécurité lors de l'hémorragie d'une muqueuse	Risques de complication thromboemboliques
Agents absorbables	Amidon (<i>local</i>)	Relativement peu coûteux, stable à température ambiante	Cause des dommages, non utilisable par voie intraveineuse
	Cellulose (<i>local</i>)	Biocompatible, facile à enlever en humidifiant	Non suffisante pour les saignements sévères
	Collagène (<i>local</i>)	Biocompatible; élimine la transmission de maladies	Cher, le site doit être séché avant application
Albumine et glutaraldéhyde	Bioglu (<i>local</i>)	Utilisé avec succès chez les patients coagulopathiques ayant subi des procédures vasculaires	Lésion du tissu nerveux; fuite de la Bioglu à travers les trous d'aiguille

Figure 21 : Agents hémostatiques traditionnels administrés par voie locale ou systémique

Type d'agent hémostatique	Produit	Avantages	Inconvénients
Particules synthétiques ou dérivées de cellules	Microparticules	Offre une livraison ciblée et spécifique au site	Risques de problèmes immunogéniques
	Nanoparticules topiques	La réduction de la taille et l'utilisation de matériaux biocompatibles peuvent aider à réduire les risques associés aux particules de plus grande taille	L'absorption des protéines entraîne l'absorption de particules par le système du RES
	Nanoparticules intraveineuses	Les particules plus petites peuvent échapper au RES, améliorant ainsi le temps de circulation. Exiger des doses plus petites et améliorer l'efficacité	Problèmes liés au stockage de la stabilité des particules car l'exigence de réfrigération est un obstacle à leur utilisation

Figure 22 : Micro- et nanoparticules hémostatiques administrées par voie systémique

Les agents hémostatiques

- L'objectif principal du clinicien est d'**identifier le site de la blessure** et de choisir une **technique hémostatique** pour **arrêter le saignement aigu**.
- Les agents hémostatiques **traditionnels** :
 - Agents hémostatiques zéolite minérale
 - Agents à base de chitosan
 - Agents hémostatiques biologiquement actifs :
 - **Pansement de fibrine humaine** (initie le processus d'hémostase)
 - **Thrombine** (active les plaquettes et forme des caillots stables)
 - **Collagène** (arrête rapidement le saignement sous forme de patch)
 - **FVII activé recombinant** (NovoSeven® stoppe l'hémorragie mais engendre des effets secondaires délétères pour les patients atteints d'HIC)
 - **Plaquettes et substituts** (en combinaison avec le fibrinogène : renforce la formation de caillots)
 - Anti-fibrinolytiques (inhibent la conversion du plasminogène en plasmine)
 - **Acide tranexamique** (verrouille les sites de liaisons du plasminogène pour inhiber son activation)
 - **Aprotinine** (inhibe la sérine protéase)
 - Agents absorbables (servent de plateforme pour la génération de thrombus)
- Les agents hémostatiques à base de **micro- ou nanoparticules** :
 - **Nanoparticules topiques** (concepts de peptides auto-assemblés et de nanofibres auto-assemblantes)
 - **Nanoparticules intraveineuses** (injection de particules naturelles avantageuses car stables et transposables à la clinique)

En conclusion, un large spectre d'agents hémostatiques est actuellement disponible pour augmenter le processus d'hémostase. Le choix de l'agent hémostatique dépend largement du site de la plaie, de l'intensité de la lésion traumatique, de facteurs économiques et de la préférence du clinicien. Les plaies externes peuvent être facilement traitées à l'aide de pansements à base de chitosan, de zéolite minérale et fibrine humaine. Les agents absorbables, tels que l'amidon, la cellulose et le collagène peuvent arrêter efficacement les saignements externes, étant biocompatibles, stables, faciles à utiliser, avec des coûts associés relativement moindres. Les hémostatiques à base d'albumine et de glutaraldéhyde sont utilisés avec succès chez les patients coagulopathiques subissant des procédures vasculaires. Les hémorragies internes peuvent être traitées efficacement en utilisant des agents biologiquement actifs et des anti-fibrinolytiques. Cependant, ils s'accompagnent d'effets secondaires délétères, tels que le risque de complications thromboemboliques, limitant leur utilisation aux seuls milieux hospitaliers.

Les défauts existants des hémostatiques traditionnels rendent leur utilisation dans des conditions cliniques relativement moins critiques, évitant leur application dans des situations d'urgences graves. Un agent hémostatique idéal doit être non toxique, stable et rentable. Surtout, il doit être capable de stopper rapidement les saignements incontrôlés, sans provoquer de réponses immunitaires ni de complications thromboemboliques. Jusqu'à présent, aucun agent hémostatique commercialisé n'est susceptible d'être considéré comme un « agent hémostatique idéal », en émane un besoin urgent de raffinement continu des agents hémostatiques administrés par voie topique et intraveineuse. Dernièrement, la nanotechnologie a suscité un vif intérêt pour le développement de nanoparticules hémostatiques qui peuvent faciliter de tels stratagèmes en fournissant une administration ciblée potentiellement efficace, spécifique au site. De nombreuses nanoparticules administrées par voie intraveineuse sont actuellement en cours d'essais cliniques pour établir leur efficacité, leur dose, leur toxicité et leurs effets secondaires à long terme.

Concernant les perspectives futures, des progrès technologiques continus dans l'industrie des soins de santé justifient une approche améliorée du développement d'agents hémostatiques. Les particules synthétiques enrobées et dérivées de cellules peuvent surmonter les obstacles dans le contrôle des saignements internes, en termes de maîtrise des coûts et de réponses immunogènes. Avec le développement de nanoparticules topiques améliorées, une augmentation rapide de saignements externes non contrôlés peut être atteinte avec succès. Les nanoparticules administrées par voie intraveineuse peuvent constituer une approche prometteuse pour arrêter les saignements internes incontrôlés, sans déclencher de réponses immunitaires. Avec l'avènement d'agents hémostatiques rentables, non toxiques, stables et plus efficaces, ne nécessitant aucune condition de stockage particulière, il sera possible de stopper les saignements internes et externes incontrôlés, en un quart de minute dans un avenir proche.

Les nouveaux systèmes d'administration, tels que l'administration ciblée sur les saignements possèdent un grand potentiel pour rendre les agents hémostatiques actuels plus efficaces. Plus important encore, ces nouveaux agents hémostatiques constituent une option prometteuse pour le traitement des hémorragies intracérébrales spontanées aiguës qui n'ont, à ce jour, encore aucun traitement ciblé efficace pour stopper rapidement le saignement.

Ce ciblage efficace du saignement actif constitue un enjeu crucial pour le traitement des HIC. Par conséquent, l'« hémostat » idéal doit, en plus d'activer la coagulation au niveau du site de saignement, venir cibler efficacement l'activation endothéliale liée à la lésion vasculaire. Comme discuté précédemment, les VE générées par les cellules activées de l'organisme possèdent des caractéristiques intéressantes pour constituer cet « hémostat » idéal. C'est pourquoi dans la prochaine partie de cette introduction nous énumérons les VE existantes et leurs potentiels thérapeutiques.

C. Les vésicules extracellulaires

Au cours de la dernière décennie, les vésicules extracellulaires sont devenues d'importants médiateurs de la communication intercellulaire et sont notamment impliquées dans la transmission de signaux biologiques entre les cellules procaryotes et eucaryotes supérieures pour réguler un large éventail de processus biologiques. De plus, les rôles physiopathologiques des vésicules extracellulaires commencent à être reconnus dans des maladies telles que le cancer, les maladies infectieuses et les maladies neurodégénératives, mettant en évidence de nouvelles cibles potentielles pour une intervention thérapeutique. Également, les vésicules extracellulaires sont susceptibles d'avoir des applications dans la thérapie. Dans cette troisième partie d'introduction, nous passerons en revue les progrès récents dans la compréhension de la biologie des vésicules extracellulaires, et discuterons des nouvelles opportunités thérapeutiques qu'elles offrent.

I. Définition et historique

Les vésicules extracellulaires (VE) sont des particules enrobées de membrane sécrétées par presque tous les types de cellules des mammifères (Curtis *et al.*, 2013; Raposo and Stoorvogel, 2013; Tan *et al.*, 2014). Les VE sont issues du bourgeonnement de la membrane cytoplasmique de leur cellule mère dans des conditions physiologiques et pathologiques, y compris la coagulation, l'inflammation, la tumorigenèse et la différenciation (Raposo and Stoorvogel, 2013). Elles sont connues pour transporter des ARN, des protéines et des lipides en provenance de leurs cellules mères lors de la génération de VE, qui a lieu fréquemment sous activation cellulaire ou stress (Raposo and Stoorvogel, 2013).

Les premières particules de type VE ont été suggérées par Edward G. Horder à la fin des années 1800 (Horder, 1899). En 1946, elles ont été identifiées comme des particules dérivées des plaquettes possédant une activité pro-coagulante dans le plasma normal (Chargaff and West, 1946) et, plus de 20 ans plus tard, en 1967, Peter Wolf a identifié des vésicules dérivées de plaquettes activées et les a appelées « poussière plaquettaire » (Wolf, 1967). La première description des VE d'origine cellulaire érythropoïétique a été fournie par Johnstone et collaborateurs en 1987 en utilisant des réticulocytes de mouton cultivés *in vivo* (Johnstone *et al.*, 1987).

Les VE sont présentes dans le sang et d'autres fluides corporels, y compris la salive, le lait maternel, l'urine, le sperme, le liquide nasal et le liquide céphalo-rachidien (Robbins and Morelli, 2014; Yáñez-Mó *et al.*, 2015; Szatanek *et al.*, 2017). De nombreux types de cellules de l'organisme, y compris les cellules endothéliales, les lymphocytes, les cellules dendritiques, les mastocytes, les plaquettes, les érythrocytes, les cellules cancéreuses, les neurones et les oligodendrocytes sécrètent des VE en condition physiologique et pathologique (Harding, Heuser and Stahl, 1983; Pan and Johnstone, 1983; van Niel and Raposo, 2018). Considérées à l'origine comme un moyen d'éliminer les déchets cellulaires, les VE sont maintenant considérées comme des véhicules de communication intercellulaire qui ont un impact sur plusieurs processus physiologiques et pathologiques (Harding, Heuser and Stahl, 1983; Pan and Johnstone, 1983).

II. Classification et biogenèse

Les VE sont classées en fonction de leur origine cellulaire et/ou leur fonction biologique ou en fonction de leur biogenèse (Figure 23). Comme déterminées par leur biogenèse, les trois principales classes de VE sont les **exosomes**, les **microvésicules** et les **corps apoptotiques**.

Type de vésicules	Caractéristiques			
	Origine	Taille	Marqueurs	Composition
Exosomes	Voie endolysosomale ; bourgeonnement intraluminal de corps multivésiculaires (CMV) et fusion de CMV avec la membrane cellulaire	40-120 nm	Tétraspánines (comme TSPAN29 et TSPAN30), composants de ESCRT, PDCD6IP, TSG101, flotilline, MFGE8	ARNm, miARN et d'autres ARN non codantes ; protéines membranaires et cytoplasmiques incluant les molécules et récepteurs de complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH)
Microvésicules	Surface cellulaire : bourgeonnement externe de la membrane cellulaire	50-1000 nm	Intégrines, sélectines, ligand de CD40	ARNm, miARN, ARN non codantes, protéines cytoplasmiques et membranaires, incluant des récepteurs
Corps apoptotiques	Surface cellulaire : bourgeonnement externe de la membrane cellulaire en apoptose	50-2 000 nm	Quantités importantes de phosphatidylsérine	Fractions nucléaires, organelles cellulaires

Figure 23 : Classification des vésicules extracellulaires basée sur leur origine cellulaire ou leur fonction biologique ou en fonction de leur biogenèse.

ESCRT endosomal sorting complex required for transport, *MFGE8*, milk fat globule-EGF factor 9 protein ; *PDCD6IP*, programmed cell death 6 interacting protein (aussi connu sous le nom d'*ALIX*) ; *TSG101*, tumor susceptibility gene 101 protain ; *TSPAN29*, tetraspanin 29 (EL Andaloussi *et al.*, 2013).

Ici, nous parlerons plus particulièrement de la classe des microvésicules et peu de celle des exosomes. Leur dénominateur commun est qu'elles sont toutes des vésicules dérivées de cellules qui sont entourées d'une bicouche lipidique, allant de 30 nm à 2 000 nm de diamètre, selon leur origine.

Contrairement aux microvésicules, qui sont générées par le bourgeonnement de la membrane plasmique, les exosomes sont issus de la voie endolysosomale.

Par conséquent, bien qu'elles soient fortement enrichies en phosphatidylsérine (PS), la composition membranaire des microvésicules reflète mieux celle de la cellule mère que la composition membranaire des exosomes. Les deux types de VE contiennent des protéines cytoplasmiques, certains lipides, des protéines et des ARN interagissant avec le radeau lipidique, mais, en raison de leur biogenèse très régulée, les exosomes hébergent généralement certains composants définis supplémentaires (Théry, Ostrowski and Segura, 2009; Lee, El Andaloussi and Wood, 2012) (Figure 23). Plusieurs mécanismes ont été récemment identifiés pour réguler la biogenèse des exosomes, facilitant ainsi la cargaison de protéines et d'ARN pour générer des exosomes avec une composition biochimique précise (Raiborg and Stenmark, 2009; Bobrie *et al.*, 2011; Baietti *et al.*, 2012).

Malgré ces avancées récentes, les termes « exosome » et « microvésicule » ont été utilisés de manière interchangeable dans de nombreuses études publiées, en raison d'une compréhension encore incomplète de la biogenèse, des incohérences dans les protocoles de purification et du manque de caractérisation approfondie des VE.

III. Composition des VE

La sécrétion de VE semble être un processus conservé au cours de l'évolution, présent dans tous les règnes de la vie (Timmers *et al.*, 2008). Concernant la biologie fondamentale, la recherche sur les VE se concentre sur la compréhension de la biogenèse et de la libération de ces vecteurs naturels, ainsi que de leur devenir lors de l'interaction avec les cellules cibles.

La recommandation en recherche est d'utiliser le terme VE comme terme général comme indiqué dans les directives pour les études sur les VE (MISEV) (Théry, Kenneth W Witwer, *et al.*, 2018). Les preuves protéomiques suggèrent qu'une signature protéique centrale de VE (par exemple, CD63, CD9 ou CD81) de protéines vésiculaires hautement exprimées est communément partagée entre les VE d'origines cellulaires parentales diverses (Potolicchio *et al.*, 2005). Diverses tétraspanines sont couramment utilisées comme marqueurs moléculaires des VE (Cocucci and Meldolesi, 2015; Dinkla *et al.*, 2016).

Pour ajouter une complexité supplémentaire, les VE portent toujours des signatures spécifiques aux cellules mères, qui sont des composants cruciaux permettant des interactions avec les cellules cibles de manière très différente (Al-Nedawi *et al.*, 2008).

En plus de la signature centrale des protéines vésiculaires hautement exprimées et hautement enrichies, d'autres composants protéiques généralement peu abondants et moins enrichis sont présents ; ces protéines reflètent l'origine spécifique des cellules mères des VE et peuvent aussi varier en fonction de la nature et de la biogenèse des différentes sous-populations de VE (Skog *et al.*, 2008) (Figure 24).

Plusieurs études ont identifié des signatures protéiques à la surface membranaire des VE telles que des taux élevés de cholestérol, de sphingomyéline et de céramide (Muralidharan-Chari *et al.*, 2009; Palmisano *et al.*, 2012; Tauro *et al.*, 2013; Tricarico, Clancy and D'Souza-Schorey, 2017). Les études de VE sur les cellules endothéliales ont révélé une surface protéique composée d'E-Sélectine, de cadhérine, d'ICAM-1 et d'intégrines (Favretto *et al.*, 2019) (Figure 24). De plus, les VE peuvent exposer des marqueurs de cellules activées comme la P-Sélectine (CD62P) (Diamant *et al.*, 2004) et vont participer à la coagulation, promouvoir la thrombose et l'apoptose (Campello *et al.*, 2011; Baulch *et al.*, 2016; Korenevskii *et al.*, 2018).

Dans cette partie d'introduction, nous élucidons l'assemblage des VE au niveau cellulaire/moléculaire et leur médiation des activités de signalisation intercellulaire sélective pour étendre la recherche biomédicale (Chaput and Théry, 2011).

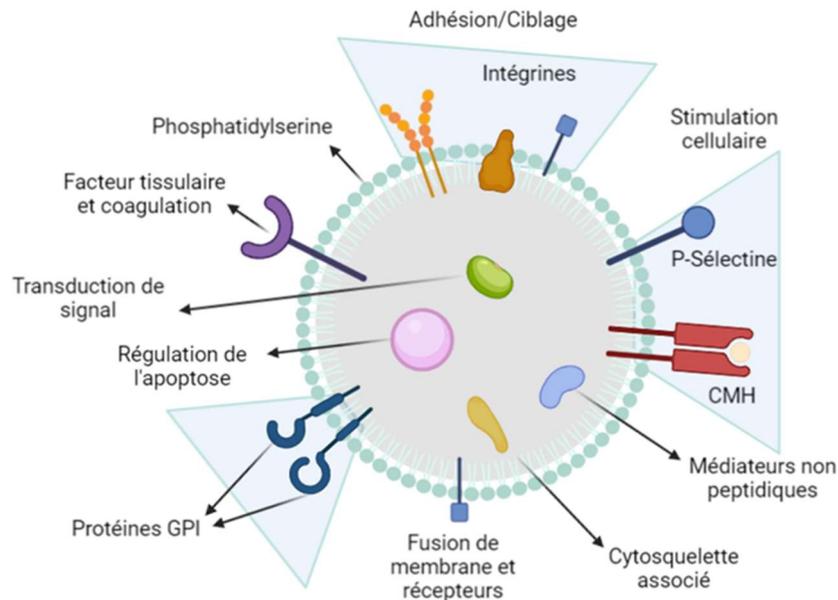


Figure 24 : Représentation schématique de la composition membranaire des VE dérivées de cellules.

Les vésicules extracellulaires

- Les VE sont des **particules enrobées de membrane** sécrétées par presque tous les types de cellules des mammifères et possèdent un diamètre compris entre 30 nm et 2 000 nm.
- Leur classification se fait en fonction de leur **origine cellulaire** et/ou leur **fonction biologique** ou de leur **biogenèse** en **3 grandes classes** :
 - Les **exosomes** issus de la voie endolysosomale
 - Les **microvésicules** issues du bourgeonnement externe de la membrane cellulaire
 - Les **corps apoptotiques** issus du bourgeonnement externe de la membrane cellulaire en apoptose.
- Les VE sont considérées comme des **véhicules de communication intercellulaire** ayant un impact sur plusieurs processus physiologiques et pathologiques.
- La distinction des sous-populations de VE se fait par **caractérisation complète** des VE selon les **directives MISEV de 2018**.
- Les **signatures protéiques** centrales des VE sont le **CD9, le CD63 et CD81**.
- Les autres signatures protéiques des VE sont le cholestérol, la sphingomyéline, la céramide, l'E-Sélectine, la cadhérine, ICAM-1, les intégrines ou encore la P-Sélectine.

IV. Rôles biologiques des VE

Les VE exercent leurs effets sur les processus biologiques fondamentaux d'une manière pléiotrope, en activant directement la cellule au niveau des récepteurs de surface *via* des protéines et ligands lipidiques bioactifs. Ainsi, elles vont fusionner leur contenu de membrane dans la membrane de la cellule receveuse et délivrer des effecteurs, y compris des facteurs de transcription, des oncogènes, de petits et de grands ARN régulateurs non codants (tels que les microARN (miARN), les ARNm et les particules infectieuses dans le récipient cellulaire (Baj-Krzyworzeka *et al.*, 2006; Ratajczak *et al.*, 2006; Valadi *et al.*, 2007; Camussi *et al.*, 2011; Lee, El Andaloussi and Wood, 2012).

De cette façon, les VE participent au maintien d'un état physiologique – par exemple, l'entretien des cellules souches, la réparation tissulaire (Gatti *et al.*, 2011), la surveillance immunitaire (Raposo *et al.*, 1996) et la coagulation sanguine (Del Conde, Corie N Shrimpton, *et al.*, 2005) (Figure 25).

Les VE peuvent ainsi être considérées comme signalosomes pour plusieurs processus biologiques fondamentaux. Par exemple, elles peuvent activer les réponses immunitaires ou supprimer l'inflammation de manière tolérogène participant ainsi à la surveillance immunitaire (Baj-Krzyworzeka *et al.*, 2002, 2007; Liu *et al.*, 2006; Clayton *et al.*, 2007, 2008; Yu *et al.*, 2007; Eken *et al.*, 2008; Simhadri *et al.*, 2008; Sprague *et al.*, 2008). Il a été démontré que les VE confèrent une suppression immunitaire *via* plusieurs mécanismes : elles peuvent améliorer la fonction des lymphocytes T régulateurs (Clayton *et al.*, 2007), supprimer l'activité des cellules *natural killer* (NK) et CD8⁺ (Liu *et al.*, 2006; Clayton *et al.*, 2008) et inhiber la différenciation des monocytes en CD45 ainsi que la maturation des CD46 (Figure 25).

En revanche, les VE peuvent avoir des effets sur l'activation immunitaire pour favoriser la prolifération et la survie des cellules souches hématopoïétiques (Baj-Krzyworzeka *et al.*, 2002) et l'activation des monocytes (Baj-Krzyworzeka *et al.*, 2007), des cellules B (Sprague *et al.*, 2008) et des cellules NK (Simhadri *et al.*, 2008).

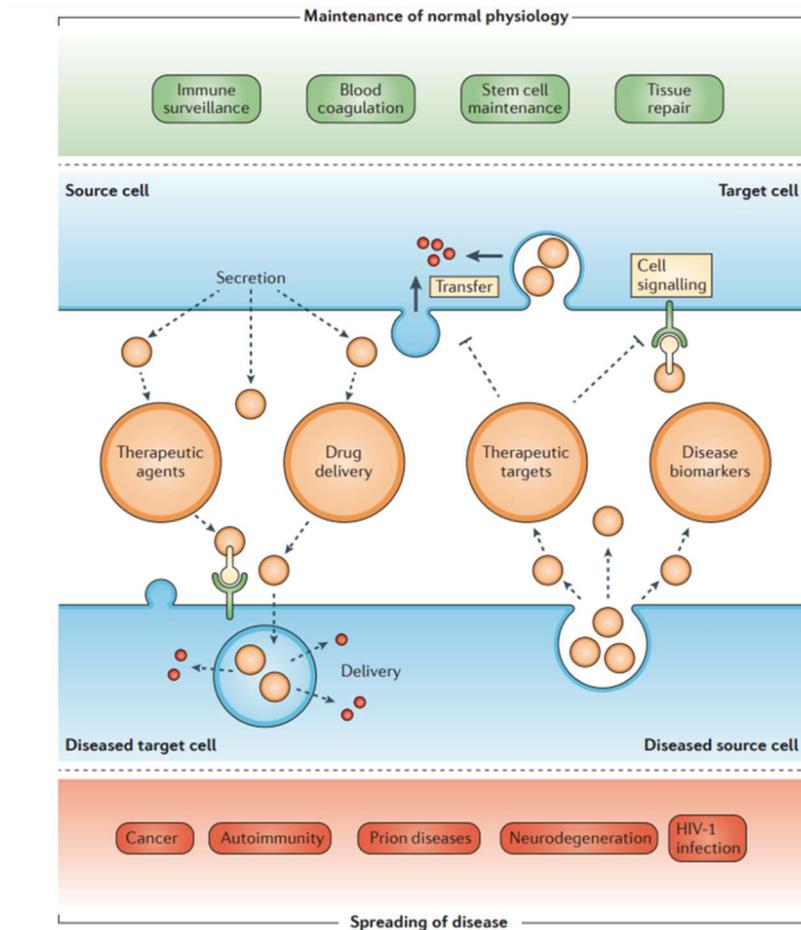


Figure 25 : Rôle des VE dans le maintien d'un état physiologique et dans la pathogenèse de la maladie. (EL Andaloussi et al., 2013)

Il a été reconnu qu'au sein du système cérébral, les neurones communiquent *via* la sécrétion de substances de VE qui peuvent contribuer à la plasticité synaptique locale et distale (Chivet *et al.*, 2012) – par exemple, *via* la libération accrue de VE contenant des récepteurs de neurotransmetteurs de neurones corticaux après une augmentation de l'activité glutamatergique (Lachenal *et al.*, 2011). Les VE sont aussi impliquées dans la modulation du phénotype cellulaire – par exemple, en convertissant le phénotype des cellules souches hématopoïétiques en un phénotype de cellules hépatiques (Jang *et al.*, 2004) et en déplaçant le transcriptome des cellules de la moelle osseuse et le protéome vers un phénotype pulmonaire *in vivo* (Aliotta *et al.*, 2007, 2012; Quesenberry and Aliotta, 2010).

Fait important, plusieurs rapports ont montré que les VE sont impliquées dans l'entretien des cellules souches et de leur plasticité, indiquant que les VE dérivées de cellules souches ont un rôle central dans la régénération tissulaire après une blessure (Camussi *et al.*, 2011; Lai, Chen and Lim, 2011; Ratajczak *et al.*, 2012).

Les VE jouent également un rôle important dans la cascade de coagulation de par leur effet pro-coagulant. En effet, la PS et le Facteur Tissulaire (FT), qui sont exprimés à la surface des VE, sont directement impliqués dans l'activation de la coagulation (Gieseler *et al.*, 2018). Le FT est inhibé dans les cellules au repos. Par ailleurs, la sphingosine (un lipide présent sur la membrane plasmique des VE) est hydrolysée après un stress, éliminant ainsi l'inhibition du FT, conduisant à l'activation du FT (Wang, Pendurthi and Rao, 2017) et affectant l'effet pro-coagulant sur les cellules réceptrices. De plus, en 2003, Myers et collaborateurs ont démontré que les VE d'origine plaquettaire portant de la P-Sélectine à leur surface pouvaient améliorer la fibrinogénèse et normaliser le temps de saignement des souris hémophiles en ciblant les VE vers le site lésé (Myers *et al.*, 2003). Ceci est dû à la combinaison de la P-Sélectine avec son ligand PSGL-1 aidant au recrutement du FT par les VE qui va, par la suite, moduler l'état de la coagulation sanguine (Myers *et al.*, 2003).

Une telle étendue de fonctions cellulaires et biologiques indique que les VE, en raison de leur signalisation pléiotrope, peuvent avoir un potentiel thérapeutique inné – par exemple, dans les domaines de la régénération en médecine ou en immunothérapie – comme discuté plus en détails ci-après.

V. Rôles pathologiques des VE

Compte tenu de leur rôle fondamental dans la régulation des processus biologiques, il n'est pas surprenant que, dans certains contextes, les VE jouent un rôle important dans la pathogenèse de la maladie. Le rôle le mieux compris des VE est leur rôle dans la biologie de la tumeur : de nombreuses études ont mis en cause les VE dans la formation d'une niche tumorale pré-métastatique (Peinado *et al.*, 2012; Rak and Guha, 2012).

Les VE sont capables de stimuler la progression tumorale (Camussi *et al.*, 2011; Rak and Guha, 2012) *via* leur capacité à effectuer les processus suivants : induire la prolifération dans les cellules (stimuler la croissance tumorale) (Al-Nedawi *et al.*, 2008; Skog *et al.*, 2008) ; activer

l'angiogenèse (Al-Nedawi *et al.*, 2008, 2009; Skog *et al.*, 2008) ; favoriser le remodelage matriciel *via* la sécrétion de protéases matricielles (Sidhu *et al.*, 2004) ; induire des métastases (Sidhu *et al.*, 2004; Peinado *et al.*, 2012) ; et promouvoir l'évasion immunitaire en modulant l'activité des cellules T (Jeong *et al.*, 2005; Wieckowski *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2012).

Bien que le rôle des VE dans le cancer ait récemment fait l'objet d'études approfondies (Camussi *et al.*, 2011; Rak and Guha, 2012), des exemples clés illustrant le rôle des VE dans la tumorigenèse sont mis évidence ci-dessous. Plusieurs années avant que les VE aient été découvertes pour être impliquées dans la propagation de la tumeur, les VE sécrétées par les cellules tumorales étaient connues pour posséder des propriétés pro-coagulantes directes (Dvorak *et al.*, 1981) ou indirectes (à médiation plaquettaire activée) (Del Conde, Corie N Shrimpton, *et al.*, 2005), établissant un lien entre la propagation du cancer et celle induite par les VE dans la thrombose (Tesselaar *et al.*, 2007).

Des résultats similaires ont été rapportés par Skog et collaborateurs (Skog *et al.*, 2008), montrant que les VE dérivées de cellules de glioblastome primaire humaines transfèrent non seulement l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) (se trouvant à la surface des cellules tumorales) mais aussi divers miARN qui stimulent la croissance tumorale et l'angiogenèse (Skog *et al.*, 2008). Dans une étude de suivi par Al-Nedawi et collaborateurs (Al-Nedawi *et al.*, 2009), il a été démontré que les VE dérivées de cellules tumorales transféraient l'EGFR activé aux cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*, pour stimuler l'angiogenèse (Al-Nedawi *et al.*, 2009).

En inhibant l'absorption des VE par le blocage de la PS, cette étude a rapporté une réduction marquée du taux de croissance tumorale et une densité microvasculaire réduite chez les souris avec des xénogreffes de carcinome humain (Al-Nedawi *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que les VE peuvent déclencher une croissance tumorale en stimulant la prolifération des cellules cancéreuses et en induisant l'angiogenèse dans les cellules endothéliales voisines, donc interférer avec ce processus pour atténuer la progression tumorale. Très récemment, des VE dérivées de cellules de mélanome se sont avérées modifier les cellules de la moelle osseuse vers un phénotype pro-métastatique *via* le transfert horizontal du récepteur MET (Peinado *et al.*, 2012), établissant davantage leur rôle dans la médiation de la communication entre les cellules tumorales et les cellules normales.

De manière intéressante, en plus des VE dérivées de tumeurs, les macrophages associés aux tumeurs peuvent sécréter des VE enrichies en certains miARN qui favorisent l'invasion locale des cellules cancéreuses du sein (Yang *et al.*, 2011). Certains des effets médiés par les VE sécrétées par la tumeur sont liés à la modulation directe de la fonction du système immunitaire. Par exemple, les VE peuvent favoriser l'échappement immunitaire des tumeurs en induisant un élargissement de la régulation des cellules T (Wieckowski *et al.*, 2009) et en libérant le ligand FAS (FAS-L) (une protéine transmembranaire de la famille du TNF), induisant ainsi l'apoptose des lymphocytes T CD8⁺ et augmentant l'expression de MétalloProtéinase Matricielle de type 9 (MMP-9) dans les cellules de mélanome (Jeong *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2012).

Au-delà du cancer, les VE ont été impliquées dans la propagation de nombreux pathogènes, y compris : VIH-1, *via* le transfert horizontal du récepteur de chimiokines CC 5 (CCR5), qui est utilisé pour l'entrée des cellules virales (Mack *et al.*, 2000) ; le virus d'Epstein-Barr (EBV) *via* le transfert de miARN viraux qui répriment l'expression de gènes cibles de l'EBV dans les cellules non infectées (Pegtel *et al.*, 2010) ; et prions, *via* la délivrance sélective de protéines prions (PrP) avec certaines modifications et glycoformes en cellules neuronales (Mack *et al.*, 2000; Vella *et al.*, 2007; Pegtel *et al.*, 2010). Il est aussi probable que les VE contribuent à la propagation locale de maladies neurodégénératives. Les neurones sont connus pour communiquer par la sécrétion de VE qui contribue à la plasticité synaptique locale, mais ces VE permettent aussi une communication à plus longue distance au sein du système nerveux central et ont une influence sur les réseaux de neurones statiques situés à distance (Chivet *et al.*, 2012).

Cela a été élégamment démontré dans le contexte de la maladie d'Alzheimer ou celui de la maladie de Parkinson (Bellingham *et al.*, 2012) (Emmanouilidou *et al.*, 2010).

Collectivement, ces études indiquent que les VE ont un rôle important et fondamental dans de nombreuses étapes de la progression tumorale. De plus, les VE sont impliquées dans des pathologies associées aux tumeurs tels que les événements thrombotiques (Tesselaar *et al.*, 2007). En effet, de nombreuses cellules cancéreuses libèrent des VE enrichies en FT (Del Conde, Corie N Shrimpton, *et al.*, 2005) – le composant central de la cascade de coagulation sanguine (comme vu précédemment dans la seconde partie de cette introduction B. L'hémostase). Ceci, en combinaison avec le fait qu'elles exposent la PS, les VE peuvent fournir une surface pour l'assemblage de composants de coagulation et ainsi entraîner un processus pro-thrombotique (Camussi *et al.*, 2011).

Enfin, il est connu que les VE dérivées de monocytes représentent une composante majeure des VE portant du FT (Angelillo-Scherrer, 2012) (Figure 26).

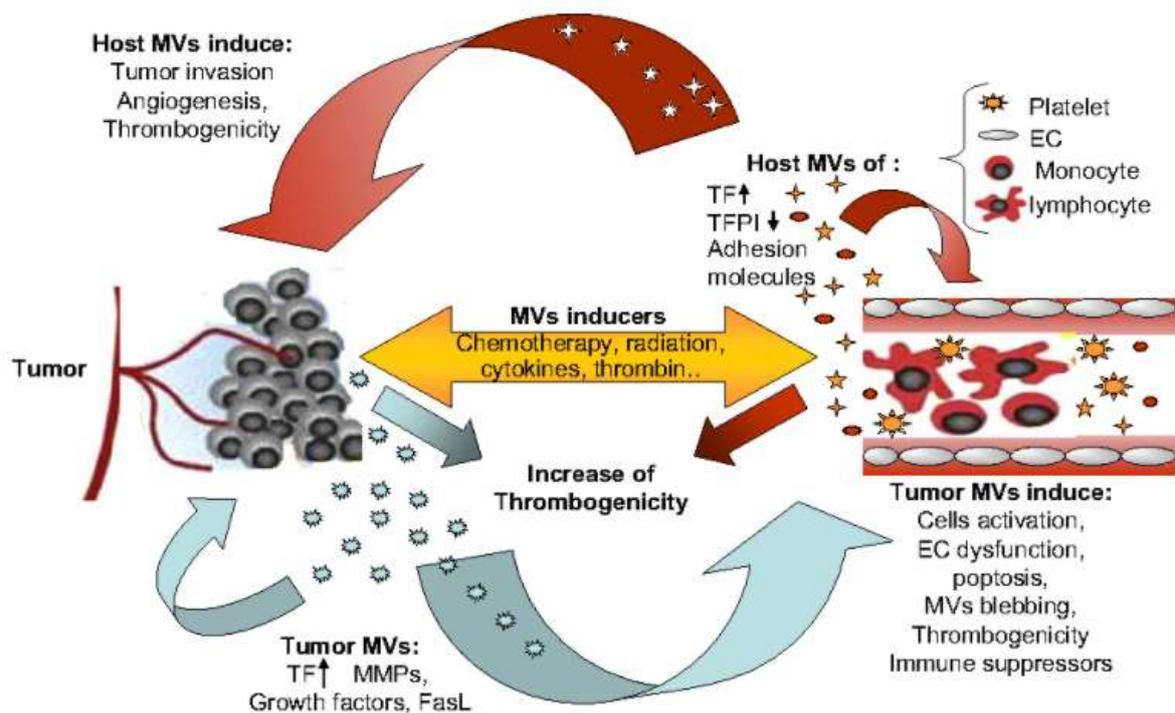


Figure 26 : Le rôle des VE dans le cancer.

L'exposition des cellules à des stimulateurs tels que la chimiothérapie, les radiations, les cytokines et la thrombine entraîne la libération de VE à partir de cellules tumorales ainsi que des cellules hôtes. Les VE dérivées de tumeurs expriment des taux élevés de FT, de facteurs de croissance, de MMPs et de FAS ligand (Aharon and Brenner, 2009).

Il a été démontré par différentes études l'implication des VE dans la formation de thrombus *in vivo* soutenue utilisant de manière endogène des VE formées ou injectées de manière exogène et dans des modèles de thrombose chez la souris. Le travail pionnier des groupes de Furie et de Falati en 2003 a montré que les VE s'accumulent rapidement sur le site de la lésion vasculaire dans un modèle de lésion au laser de petites artères musculaires (Falati *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 2004). Ils ont pu montrer que les VE contribuent au développement de plaquettes et de thrombi riches en fibrine sur les sites de lésion vasculaire. Les VE expriment le PSGL-1 et le FT (Falati *et al.*, 2003). La liaison de ces VE à la P-Sel sur les plaquettes activées de l'endothélium favorise l'accumulation de FT dans le développement du thrombus et la génération localisée de thrombine (Falati *et al.*, 2003). Del Conde et collaborateurs ont montré *in vivo* que la fusion de membranes de VE exposant le FT et de plaquettes activées entraîne le transfert de FT (Del Conde, Corie N Shrimpton, *et al.*, 2005).

Cette fusion entraîne une co-localisation du FT et des facteurs de coagulation, favorisant ainsi l'initiation et la propagation très efficaces de la cascade de coagulation (Figure 27). Ce résultat a été reproduit dans divers modèles murins de thromboses artérielle et veineuse avec différentes sources de VE (Owens and Mackman, 2011; Zwicker *et al.*, 2011). D'autres mécanismes contribuent à la régulation des propriétés pro-coagulantes des VE. Ceux-ci reposent sur l'équilibre entre le TNF et les cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-10. En effet, en 2007, l'IL-10 endogène a été signalée pour réguler à la baisse l'expression du FT dans les monocytes et la libération de VE portant du FT à leur surface, empêchant ainsi la génération de thrombine (Poitevin *et al.*, 2007).

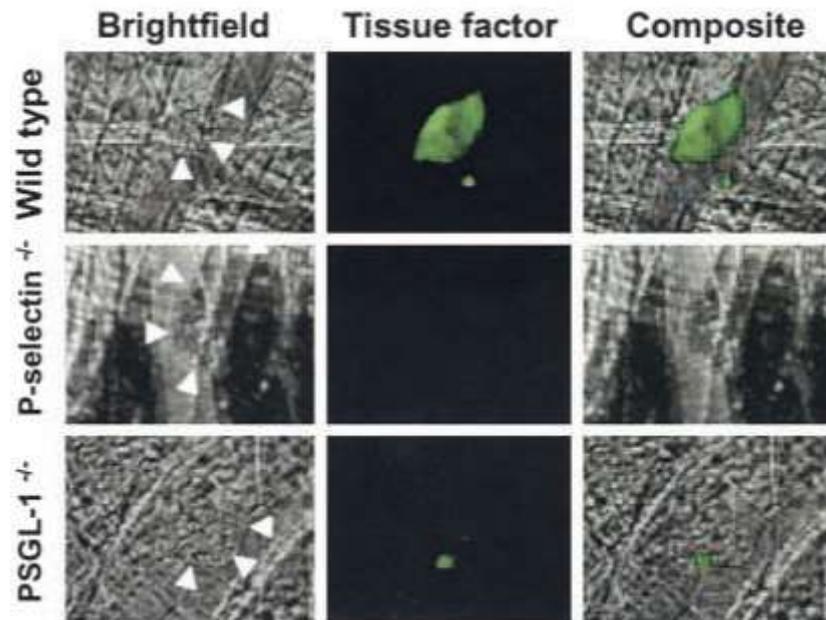


Figure 27 : Accumulation de facteur tissulaire dans le thrombus artériel en développement (Falati et al., 2003).

Les VE possèdent donc une caractéristique pro-coagulante importante dans les processus physiologiques et constituent une alternative intéressante dans les thérapies à visée hémostatique. Nous allons donc, dans la partie suivante, discuter de l'utilisation des VE en tant que *drug carriers* pour le développement de futures thérapies dans le saignement intracérébral.

Rôles des vésicules extracellulaires

Rôles biologiques

- Les effets des VE sur les processus biologiques se font *via* l'**activation directe de la cellule** au niveau des **récepteurs de surface** *via* des **protéines** et des **ligands bioactifs**, fusionnant le contenu de leur membrane dans celle de la cellule receveuse.
- Les VE participent au maintien d'un état physiologique :
 - L'**entretien des cellules souches** (modulation du phénotype cellulaire)
 - La **réparation tissulaire** (entretien des cellules souches)
 - La **surveillance immunitaire** (suppression immunitaire)
 - La **coagulation sanguine** (rôle pro-coagulant *via* le FT et la PS portés à leur surface : les VE réduisent le temps de saignement chez les souris hémophiles par exemple.

Rôles pathologiques

- Les VE jouent un rôle dans la **biologie de la tumeur** ; elles sont capables de stimuler la progression tumorale.
- Les VE peuvent conduire à la **formation de thrombus** *via* le FT et la PS qu'elles portent à leur surface.
- Les VE sécrétées par les cellules tumorales sont connues pour avoir des **propriétés pro-coagulantes directes** : lien entre la propagation du cancer et celle induite par les VE dans la thrombose.
- Les VE dérivées de cellules de mélanome ont un rôle dans la **médiation de la communication** entre les cellules tumorales et les cellules normales.
- Les VE sont aussi impliquées dans la **propagation de nombreux pathogènes** :
 - VIH-1, virus d'Epstein-Barr, les prions
 - Maladie d'Alzheimer
 - Maladie de Parkinson

VI. Les VE en tant que *drug carriers*

1. Développement

En raison de leur taille nanométrique, leur stabilité ainsi que leur biocompatibilité, les VE ont été reconnues comme des vésicules *viables* pour une application thérapeutique. Des études récentes ont mis en évidence le potentiel thérapeutique des VE, étudiées dans des essais cliniques de phase I et II pour leur capacité de régénération (Niada *et al.*, 2021), leur potentiel vaccinal (Wilkhu *et al.*, 2014; Roier *et al.*, 2015; Shehata *et al.*, 2019), leur activité immunothérapeutique (Hao *et al.*, 2021; Saha *et al.*, 2021), et leur application comme *drug carriers* (NCT01294072). En effet, les applications pré-cliniques et thérapeutiques des VE dans les pathologies telles que la réparation et la régénération des tissus sont d'ores et déjà bien avancées.

Avec le développement de nouveaux outils analytiques, il a été constaté que de nombreuses techniques d'isolation précédemment appliquées ne sont pas suffisamment spécifiques aux VE et conduisent à l'inclusion de nombreux contaminants (Figure 28). Les méthodes sont constamment affinées, mais elles exposent souvent les limites du domaine. Effectivement, pour chaque nanosupport de médicament, une caractérisation physico-chimique complète et ses interactions dans les environnements biologiques doivent être étudiées pour le développement thérapeutique. Cependant, les méthodologies bien adaptées aux VE font encore défaut. Ces vésicules sont assemblées et conditionnées de manière spécifique à la cellule. C'est pourquoi, bien qu'elles soient difficiles du point de vue du développement de *drug carriers*, ces propriétés font des VE un biomarqueur prometteur pour les biopsies liquides dans plusieurs applications (Ayers *et al.*, 2019).

Méthode	Principe de séparation	Avantages	Limites
Ultracentrifugation	Densité Vitesse de flottaison	<ul style="list-style-type: none"> Le plus largement utilisé Méthode robuste Possibilité d'identifier des sous-populations de VEs 	<ul style="list-style-type: none"> Lourde charge de travail Peut conduire à la rupture des VEs Faible rendement Grand volume de matière première requis
Chromatographie d'exclusion de taille	Rayon hydrodynamique	<ul style="list-style-type: none"> Rapide et simple Intégrité de la vésicule maintenue pendant l'isolation Peut être utilisée dans les processus de mise à l'échelle 	<ul style="list-style-type: none"> Contamination potentiellement significative par des particules non VEs (exemple, lipoprotéines)
Précipitation	Solubilité	<ul style="list-style-type: none"> Méthode facile et bon marché Rendement élevé Possibilité d'applications cliniques 	<ul style="list-style-type: none"> Risques élevés de co-isollement de contaminants non vésiculaires Ne convient pas à la réalisation d'études fonctionnelles
Immunocapture	Marqueurs de surface	<ul style="list-style-type: none"> Isolation très pure Peut être combinée à la cytométrie en flux Capable d'isoler des sous-populations de VEs 	<ul style="list-style-type: none"> Ne convient actuellement pas à une isolation complète de VEs Technique onéreuse
Ultrafiltration	Rayon hydrodynamique	<ul style="list-style-type: none"> Peut très bien être combinée à d'autres méthodes Facile à réaliser dans tous les laboratoires 	<ul style="list-style-type: none"> Le type de filtre et la méthode d'ultrafiltration influencent considérablement le rendement et la composition des VEs Résolution plutôt limitée
Fractionnement par flux de champ	Rayon hydrodynamique Mobilité électrophorétique	<ul style="list-style-type: none"> Peut identifier des sous-ensembles de VEs plus petites 	<ul style="list-style-type: none"> Équipements spécifiques requis et expertise associée Ne peut être utilisée comme méthode autonome
Microfluidiques	Marqueurs de surface Rayon hydrodynamique Densité	<ul style="list-style-type: none"> Isolation peut être combinée avec la caractérisation des VEs Des sous-populations peuvent être isolées De petits volumes d'échantillons sont nécessaires 	<ul style="list-style-type: none"> Nécessite un niveau d'expertise spécifique Ne convient pas à des fins thérapeutiques
Méthode d'affinité membranaire	Affinité membranaire	<ul style="list-style-type: none"> Capable d'isoler toutes les VEs au lieu de seulement les sous-populations 	<ul style="list-style-type: none"> Impossible de faire la distinction entre les VEs et les fragments de cellules

Figure 28 : Vue d'ensemble des avantages et des limites des méthodes d'isolement des VE les plus courantes (adapté de (Stam et al., 2021)).

b. La caractérisation comme prérequis pour les études de sécurité et d'efficacité

Une caractérisation complète des VE et de leurs interactions avec les cellules et les tissus est essentielle pour leur utilisation dans les applications d'administration médicamenteuse. Alors que la caractérisation de l'innocuité et de l'efficacité est essentielle pour l'avancement clinique, des informations sur le mode d'action des VE peuvent ouvrir de nouvelles frontières dans l'ingénierie des *drug carriers*. L'identification de propriétés suffisantes pour réaliser un ciblage à longue distance est cruciale pour atténuer les risques associés à la grande complexité de ce système. Cependant, la taille et la complexité accrue des VE par rapport aux systèmes d'administration synthétiques (par exemple, les liposomes), qui contribuent en partie à la capacité supérieure d'administration de médicaments des VE, rendent difficile la caractérisation complète et l'assurance d'une qualité satisfaisante (Rohde, Pachler and Gimona, 2019).

Les problèmes de pureté et d'identité posent des défis majeurs pour les techniques analytiques. Ces considérations doivent être prises en compte puisque les VE peuvent constituer une thérapie cellulaire. Les techniques de caractérisation standards, par exemple, l'analyse de suivi des nanoparticules, l'imagerie par cytométrie en flux et la détection de composants par des moyens biochimiques (y compris l'imagerie (Chuo, Chien and Lai, 2018), la cytométrie et le western blot), impliquent des mesures de taille. Récemment, les VE ont également été utilisées comme plateforme pour visualiser et étudier des protéines membranaires enrichies par microscopie électronique à transmission (Zeev-Ben-Mordehai *et al.*, 2014). Les technologies à haut débit telles que le séquençage de nouvelle génération et la spectrométrie de masse (Kreimer *et al.*, 2015) (protéomique, lipidomique et transcriptomique), ainsi que la cryomicroscopie électronique, contribuent grandement à l'évaluation de la composition moléculaire et de la structure des VE (Figure 29).

	Taille	Détection phosphatidylsérine	Activité procoagulante	Origine cellulaire	Quantification absolue	Disponibilité/simplicité
Cytométrie en flux	+	++	-	++	++	++
Capture en phase solide	-	++	++	++	-	++
Microscopie électronique	++	-	-	-	-	+
Microscopie confocale	++	++	+	+	+	-
Microscopie à force atomique	++	-	-	+	++	-
Spectroscopie de corrélation photonique	++	-	-	-	++	-
ELISA	-	-	-	+	-	++
NTA	++	-	-	+	++	+

Figure 29 : Caractéristiques de chaque mode de détection des microvésicules.

Une investigation systématique sur l'efficacité et l'innocuité des VE nécessite la détermination de leur identité et de leur pureté. Pour cela, l'*International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) a initié la standardisation des techniques d'isolement et de caractérisation des VE en 2014. Les recommandations MISEV ont été mises à jour en 2018 par 382 chercheurs (Théry, Kenneth W. Witwer, *et al.*, 2018). Le tableau ci-dessous résume les caractéristiques les plus fondamentales devant être évaluées lorsque l'on travaille sur des VE (Figure 30) portant sur :

- Leur taille et leur rendement
- Leur morphologie et la présence d'une bicouche lipidique
- Leur différence par rapport aux débris cellulaires
- Leur degré de pureté
- Leur nomenclature

Pour améliorer encore plus la rigueur et la reproductibilité, la plateforme EV-TRACK a été créée en 2017 (Van Deun *et al.*, 2017). EV-TRACK est une base de connaissances de *crowdsourcing* qui permet aux auteurs de déposer leurs protocoles d'isolement et de caractérisation avant publication et de recevoir des recommandations sur les lacunes potentielles de la conception animale. Plus récemment, des conseils supplémentaires sur le matériau de référence optimal à utiliser lors de la caractérisation des VE ont été proposés (Welsh *et al.*, 2020).

Paramètres à déterminer	Lecture et pertinence
La distribution des tailles doit être analysée à l'aide de techniques telles que l'analyse de suivi de nanoparticules et détection d'impulsions résistives réglables	Taille et rendement
Les VE uniques doivent être visualisées à haute résolution, en utilisant pour exemple la microscopie électronique ou analyseur de particule unique	Morphologie et présence de bicouche
Aucun marqueur largement applicable n'a été proposé. Cependant, au moins une transmembrane ou protéine cytosolique doit être analysée pour démontrer les caractéristiques de VE	Différenciation des débris cellulaires
Aucune recommandation n'a été faite pour les marqueurs négatifs universels. Cependant, les contaminants et les principaux constituants des structures non VE doivent être soigneusement éliminés pour démontrer la caractéristique de VE	Degré de pureté de la formulation des VE
Le terme généralisé « vésicule extracellulaire » doit être utilisé quand une identification claire de la sous-population manque	Éviter les abus de nomenclature

Figure 30 : Synthèse des recommandations MISEV définies en 2018 (adapté de (Herrmann, Wood and Fuhrmann, 2021)).

c. Capacités de ciblage et clairance

Les composants spécifiques présents à la surface des VE permettent une absorption préférentielle par des cellules, des tissus et des organes (Peinado *et al.*, 2015, Belov *et al.*, 2016, Wu *et al.*, 2020). Ainsi, les VE peuvent avoir une capacité de ciblage inhérente et le potentiel à fournir de l'ARN fonctionnel à d'autres cellules (Valadi *et al.*, 2007) et à travers certaines barrières biologiques, telles que la BHE (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011).

Alors que les systèmes d'administration de médicaments synthétiques ont montré une efficacité de ciblage nettement inférieure à celle des systèmes d'administration de médicaments naturels, les VE peuvent constituer une voie naturelle pour un transport efficace (Murphy *et al.*, 2021). En effet, il a été montré que différents types de VE de tumeur de mammifère ciblent préférentiellement les cellules saines dans le tissu prédict, par exemple, les cellules épithéliales et les fibroblastes pulmonaires, en fonction du modèle d'expression de l'intégrine des cellules mères (Hoshino *et al.*, 2015). Des résultats similaires ont été obtenus pour les VE des cellules de sarcome, qui ont montré une localisation préférentielle des tumeurs (Qiao *et al.*, 2020). Pour des raisons de *safety*, ces VE anti-cancéreuses ne conviennent pas en tant que *drug carriers*, en raison de leur influence négative sur l'invasion tumorale ou la transition épithéliale-mésenchymateuse, où elles peuvent être porteuses de gènes de résistance tumorale (Dai *et al.*, 2020) (Figure 31).

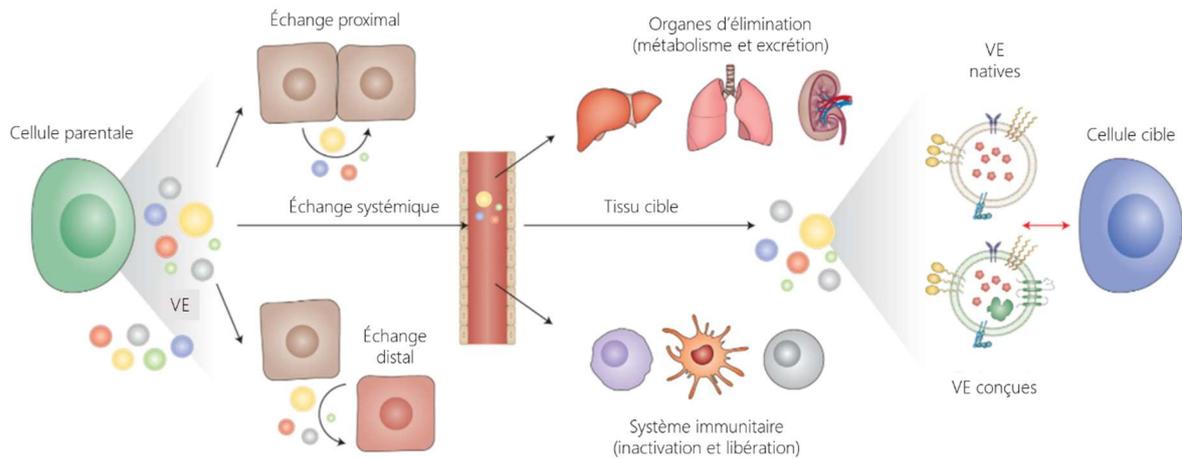


Figure 31 : Illustration de la diaphonie cellulaire induite par les VE, des mécanismes de clairance et des réponses immunitaires

(Herrmann, Wood and Fuhrmann, 2021).

Une évaluation comparative des VE dérivées de différentes lignées cellulaires et de leur mode de biodistribution a montré que, bien que les VE se soient accumulées principalement dans le foie, les poumons, la rate et le tractus gastro-intestinal, la source des VE et la voie d'administration ont considérablement influencé la biodistribution (Wiklander *et al.*, 2015). De nombreuses études indiquent que l'administration systémique de VE conduit à une accumulation non spécifique dans le foie, la rate, le tractus gastro-intestinal et les poumons (Lai *et al.*, 2014; Wiklander *et al.*, 2015).

Fait intéressant, les VE natives ont également montré une accumulation substantielle dans le tissu tumoral (Lai *et al.*, 2014; Wiklander *et al.*, 2015), un effet encore renforcé par l'ajout d'un ligand de ciblage spécifique. Cependant, la demi-vie des VE est considérablement plus courte que celle des liposomes. Même lorsque les propriétés furtives étaient mises en œuvre *via* l'hydrogel polyéthylène glycol (PEG), la demi-vie terminale des VE était d'au plus de 60 minutes (Kooijmans *et al.*, 2016), tandis que celle des liposomes modifiés pouvait atteindre plusieurs heures (Henriksen *et al.*, 2015). Il est à noter que ces études ont utilisé des colorants fluorescents pour marquer les VE et des radionucléides pour marquer les liposomes, une différence qui peut affecter la comparabilité. Par conséquent, des études de biodistribution plus comparatives sont nécessaires, en particulier avec des VE non dérivées de cellules cancéreuses. Une évaluation directe comparant l'efficacité d'administration des VE et des liposomes nécessiterait également l'optimisation du système de comparaison liposomale en plus de l'ingénierie des VE (Johnsen *et al.*, 2018).

Un autre paramètre important, mais sous-estimé, indiquant l'efficacité des VE en tant que *drug carriers* est la rigidité mécanique de l'environnement de la cellule cible. Une approche récente utilisant des hydrogels simulant une matrice extracellulaire a montré que les VE étaient supérieures aux liposomes pour échapper aux environnements de relaxation du stress (Lenzini *et al.*, 2020), indiquant l'influence des protéines de surface des vésicules.

d. Réponses immunitaires et toxicité potentielle

Les VE détiennent le potentiel puissant d'immunomodulation, en provoquant et en supprimant la réponse du système immunitaire (Zhou *et al.*, 2020). Elles partagent, par exemple, des similitudes structurelles avec les virus et des découvertes récentes démontrent que les virus exploitent des mécanismes associés à l'absorption et à la libération des VE (Feng *et al.*, 2013 ; Urbanelli *et al.*, 2019).

Également, les VE ont été largement revendiquées comme biocompatibles sur la base de leur origine cellulaire de mammifère et de leur composition « physiologique », mais une telle généralisation doit être évitée. L'administration intraveineuse de VE purifiées à partir de lait bovin à des souris n'a induit aucun événement indésirable et seulement une libération modérée de cytokines (Somiya, Yoshioka and Ochiya, 2018). De même, de nombreuses données de *safety* sont disponibles sur l'administration de VE dérivées de cellules sanguines lors de transfusions sanguines : dans la plupart des cas sans effet indésirable notable, même si les VE dérivées de plaquettes ont été récemment associées à des lésions pulmonaires aiguës liées à la transfusion (McVey *et al.*, 2021). En revanche, l'activité oncogène potentielle des VE – en particulier les VE dérivées de cellules souches avec une activité angiogénique, qui ont une activité potentiellement tumorale dans les tumeurs préexistantes qui sont dormantes en raison du manque d'activité angiogénique – reste une préoccupation majeure.

Les VE peuvent transporter des peptides tumoraux ou pathogènes présentés par les principaux récepteurs de complexe majeur d'histocompatibilité pour provoquer des interactions avec les composants du système immunitaire, une technique utilisée, par exemple, en immunothérapie contre le cancer (Robbins and Morelli, 2014; Mehanny, Lehr and Fuhrmann, 2021). Pour le développement de *drug carriers*, les VE doivent avoir une faible immunogénicité et être dérivées de cellules humaines saines.

Par exemple, l'administration intraveineuse et intrapéritonéale de VE dérivées de cellules rénales embryonnaires humaines à des souris pendant 3 semaines n'a pas montré d'effets toxiques (Zhu *et al.*, 2017). Cette découverte fournit une indication importante pour l'utilisation potentielle de VE en tant que *drug carriers*, et presque toutes les données provenant d'études sur des primates non humains sont également rassurantes. En résumé, l'immunogénicité et la biocompatibilité de chaque formulation de VE individuellement doivent être évaluées. Plus précisément, les études sur les modèles *in vivo* suffisamment complexes, y compris des modèles avancés bidimensionnels et tridimensionnels (Thippabhotla, Zhong and He, 2019), et leur traduction en modèles animaux rongeurs et non primates, devraient être évaluées. En plus des études de distribution dans les organes et d'une sélection rigoureuse de méthodes de marquage des VE (Li *et al.*, 2020), des études évaluant l'administration répétée sous divers régimes sont nécessaires pour permettre des investigations cliniques plus poussées.

L'utilisation de VE de manière autologue en transférant les cellules du patient dans un milieu de culture et en isolant les VE pour une ré-administration au patient a été proposée. Bien que les VE puissent être utilisées de cette manière pour certaines applications, plusieurs problèmes limitent cette stratégie, notamment pour les maladies aiguës telles que les infections ou les incidents cardiovasculaires (de Abreu *et al.*, 2020).

L'utilisation de VE autologues est possible dans certaines conditions, y compris celles pour lesquelles (1) l'utilisation de VE autologues est importante, par exemple, pour le transfert médié par les VE vers les mitochondries afin de maintenir la compatibilité génétique (Ikeda *et al.*, 2021) et, (2) une source de VE autologues est facilement disponible, par exemple, pour l'utilisation de VE dérivées du sang ou du plasma à des fins autologues, comme lorsque les vésicules de patients cancéreux sont utilisées dans un protocole de transplantation autologue visant à administrer des traitements aux tissus tumoraux (Villa *et al.*, 2021). Cependant, la plupart des applications sont susceptibles d'utiliser des VE non autologues bien établies, principalement en raison des besoins, des considérations de *safety* et de l'opportunité réglementaire/commerciale d'un produit rationalisé et exceptionnellement bien qualifié. Cette approche est préférée parce que des VE non modifiées et non autologues ont été administrées à des sujets humains dans de nombreuses études cliniques avec de bons résultats en matière de *safety* (Lener *et al.*, 2015).

Actuellement, cette voie est poursuivie avec les VE dérivées de cellules souches mésenchymateuses (CSM) pour la médecine régénérative et les VE dérivées de cellules dendritiques pour l'administration de vaccins, car ces vésicules se sont révélées sûres dans plusieurs essais cliniques de phase 1 (Escudier *et al.*, 2005).

e. Translation clinique

Alors que les scientifiques ont tenté d'exploiter les propriétés uniques des VE pour développer des systèmes intelligents d'administration de médicaments qui présentent des avantages substantiels en termes de ciblage, de *safety* et de pharmacocinétique par rapport à ceux des nanosupports synthétiques, la translation vers la clinique des VE reste difficile (Clemmens and Lambert, 2018). En raison de la complexité inhérente des VE elles-mêmes, de l'hétérogénéité de taille et des variations naturelles (lot à lot) rencontrées lors de leur production, les risques intrinsèques du processus de production sont plus élevés que ceux des systèmes de production purement synthétiques. Par une sélection et/ou une ingénierie appropriée des cellules à partir desquelles les VE sont dérivées, diverses plateformes pour charger les VE et conjuguer des fragments de ciblage ont été développées (Elsharkasy *et al.*, 2020).

Celles-ci peuvent être divisées en 3 groupes : (1) les **VE naturelles**, qui sont natives ou obtenues à partir de cellules génétiquement modifiées ; (2) des **VE hybrides**, qui sont post-modifiées avec des médicaments ou des ligands de surface ; (3) **liposomes inspirés de la VE** (Figure 32).

La substance active dans les thérapies à base de VE détermine leur classification pharmaceutique (Lener *et al.*, 2015). D'un point de vue réglementaire, les groupes susmentionnés appartiennent probablement à la catégorie pharmaceutique des produits biologiques (appelés médicaments biologiques, produits biologiques ou biopharmaceutiques, selon les pratiques régionales) (Lener *et al.*, 2015).

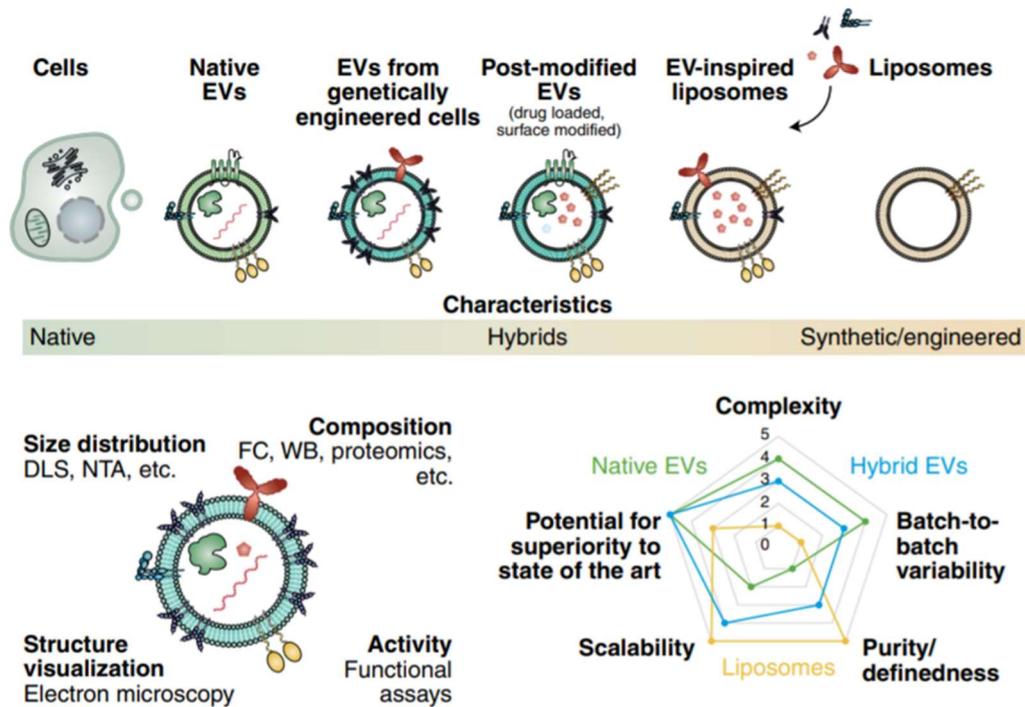


Figure 32 : Les VE peuvent être regroupées sur la base de l'origine de leurs constituants dans des VE natives, des VE provenant de cellules (génétiqument) modifiées, des VE post-modifiées ou liposomes inspirés de VE.

Comme les VE sont d'origine cellulaire, elles sont intrinsèquement plus complexes que les systèmes de support synthétiques. DLS, diffusion de lumière dynamique ; FC, cytométrie en flux ; NTA, analyse de suivi de nanoparticules ; WB, western blot (Herrmann, Wood and Fuhrmann, 2021).

En général, les substances actives des produits biologiques sont plus complexes que celles des médicaments non biologiques. Actuellement, les substances et les constructions avec ce niveau de complexité ne peuvent être produites que par des organismes vivants. Cependant, de telles méthodes de production peuvent entraîner une **hétérogénéité** des produits. Du point de vue de la conception, cette hétérogénéité est influencée à la fois par les processus biologiques à l'intérieur des cellules utilisées pour exprimer les produits biologiques (traitement en amont) et par le processus de fabrication utilisé pour produire les produits biologiques (traitement en aval) (Vulto and Jaquez, 2017). Notamment, les conditions de culture des VE influencent fortement les aspects de la qualité du produit, en particulier le rendement, la composition des VE et la bioactivité des VE (Patel *et al.*, 2017).

Contrairement aux cellules de mammifères produites pour la thérapie cellulaire, pour lesquelles de tels écarts peuvent être au moins partiellement compensés par des adaptations phénotypiques et une synthèse *de novo*, les VE sont produites relativement **statiques** ; ainsi, on ne s'attend pas à ce qu'elles changent substantiellement après la récolte (à l'exception de la dégradation).

Dans l'ensemble, étant donné l'impact considérable des changements mineurs sur la qualité et l'activité du produit, la **stabilité** du processus de fabrication de VE est considérée comme inférieure à celle de la production de cellules ou d'anticorps. Malgré cette limitation, la fabrication de VE peut s'appuyer sur ces processus (Iancu and Kandalaf, 2020). Bien que des parties cruciales des bonnes pratiques de fabrication puissent être adaptées à partir des domaines existants des produits biologiques, des liposomes et des thérapies cellulaires, la taille et la complexité compositionnelle et structurelle des VE sont uniques et nécessitent donc des contrôles supplémentaires en cours de processus. Ces **contrôles** en cours de fabrication comprennent des mesures pour garantir un produit final répondant aux attributs de qualité critiques précédemment identifiés et pouvant inclure la mesure de la taille et de la concentration, l'exclusion des contaminants, l'identification des marqueurs fonctionnels et l'évaluation de la charge médicamenteuse pour évaluer l'activité thérapeutique par nombre de vésicules.

En raison de la taille et de la complexité des VE, les **limites technologiques** peuvent entraver la caractérisation physico-chimique, immuno-chimique ou fonctionnelle détaillée du produit VE d'un point de vue analytique, notamment du point de vue de la production et du contrôle qualité. La capacité actuellement limitée de caractérisation des produits a aussi des implications pour la compréhension mécanistique des EV en tant que *drug carriers* et peut rendre le processus de traduction lourd et risqué, similaire à celui d'autres produits à base de nanoparticules. Cependant, malgré la controverse récente sur le potentiel de la nanomédecine, les formulations nanométriques permettent des biodistributions différentes de celles possibles pour les médicaments gratuits et peuvent donc conférer des avantages considérables (Contera, De La Serna and Tetley, 2021).

Actuellement, les fabricants de produits biologiques sont invités à identifier toutes les substances d'un médicament qui provoquent une certaine action pharmacologique, immunologique ou métabolique et sont responsables des effets biologiques (thérapeutiques), en indiquant le mode ou le mécanisme d'action du médicament.

De plus, les composants non actifs (appelés excipients) utilisés dans la formulation finale doivent être déclarés. Fait intéressant, dans une revue récente de l'ISEV, il a été postulé que, si l'ensemble de l'effet thérapeutique pouvait être attribué aux molécules chargées ou non aux VE dans les systèmes avec des VE chargées en médicaments, les VE seraient considérées comme des excipients. Dans ce cas, seul le profil de *safety* et non le mode d'action serait demandé pour les VE. Cependant, la pertinence des approches conventionnelles de test de toxicité pour les produits biopharmaceutiques et les VE est limitée (Lener *et al.*, 2015) en raison des propriétés structurelles et biologiques uniques de ces produits, telles que la spécificité d'espèce, l'immunogénicité et les activités pléiotropes. Les approches centrées sur l'analyse des risques individualisée, telles que celles appliquées aux produits de base de cellules humaines, peuvent être plus applicables, comme l'a récemment suggéré la communauté ISEV (Lener *et al.*, 2015).

Les vésicules extracellulaires en tant que *drug carriers*

- De nombreuses techniques d'isolation précédemment appliquées **ne sont pas encore suffisamment spécifiques aux VE** et conduisent à l'inclusion de nombreux contaminants.
- Une **caractérisation complète** des VE est **essentielle** pour leur utilisation dans les applications d'**administration médicamenteuse**.
- Les techniques standards de caractérisation sont : la **cytométrie en flux**, l'**analyse de suivi de nanoparticules** et la **détection de composants par des moyens biochimiques**.
- De nouvelles technologies peuvent être utilisées pour caractériser les VE ; **séquençage de nouvelle génération** et **spectrométrie de masse**.
- Les techniques de caractérisation des VE ont été recommandées en 2018 par l'ISEV.
- Les VE constituent une **voie naturelle pour un transport efficace de médicaments**.
- Des études de **biodistribution** ont montré que les VE s'accumulaient dans le foie, les poumons, la rate et le tractus gastro-intestinal.
- La **demi-vie des VE** est d'au plus **60 minutes**.
- Pour le développement de **drug carriers**, les VE doivent avoir une **faible immunogénicité** et **être dérivées de cellules humaines**.
- Les données provenant d'études sur les **rongeurs** et les **primates non humains** sont **rassurantes** sur les VE en tant que **drug carriers** puisque l'**administration i.v. de VE** de lait bovin à des souris n'induit **aucun effet indésirable**.
- L'**utilisation de VE autologues** est une solution **onéreuse** et **limitante**.
- L'**utilisation de VE non autologues** est **préférée** et a déjà fait l'objet de tests chez des **sujets humains** avec de bons résultats en matière de **safety**.
- Les VE dérivées de cellules souches mésenchymateuses (CSM) ou de cellules dendritiques se sont révélées sûres dans plusieurs essais cliniques de phase 1.
- Il existe 3 types de VE exploitables en clinique :
 - Les VE naturelles
 - Les VE hybrides
 - Les liposomes inspirés de la VE

Les perspectives de ce domaine des VE au cours de la dernière décennie ont amélioré notre compréhension de la biogenèse, du contenu moléculaire et de la fonction biologique des VE. Il y a, cependant, des obstacles à surmonter avant d'utiliser les VE comme thérapies (**Figure 33**).

Le choix et la **caractérisation d'une source cellulaire** appropriée pour la production de VE en fonction de l'usage thérapeutique visé est essentiel et de la plus haute importance. Les MSC et les cellules dendritiques bien étudiées, sont susceptibles d'être utilisées, au moins dans certains contextes de maladies, en raison de leurs propriétés immunomodulatrices et de leur utilisation antérieure en toute sécurité dans des conditions cliniques. En revanche, il existe une liste croissante de sources cellulaires supplémentaires nécessitant d'autres caractérisations et tests, pouvant convenir à une utilisation clinique. Par exemple, les cellules progénitrices endothéliales pour l'infarctus du myocarde (*Chen et al., 2018*) ou les cellules épithéliales de l'amnios pour le traitement de la fibrose pulmonaire (*Tan et al., 2018*). Un autre aspect qui doit être abordé est l'expansion du format et des conditions de culture des cellules (2D/3D *vs* culture en suspension, effets du milieu de culture sur le rendement et la composition des VE). Une variété de méthodes sont actuellement développées et optimisées pour l'isolement des VE, mais l'identification d'une technique optimale permettant un isolement évolutif des VE pures et de qualité clinique est toujours en cours.

Pour utiliser les VE comme **agent thérapeutique**, la stabilité et le stockage doivent être examinés plus en amont. De plus, l'activité des VE isolées doit être évaluée dans des tests d'activité standardisés, qui manquent encore actuellement. Les VE thérapeutiques doivent, en outre, être caractérisées en modèles précliniques pour évaluer la *safety*/toxicologie et la pharmacocinétique et profils pharmacodynamiques pour étayer les prévisions de doses cliniques. Les multiples observations de l'impact des VE sur divers processus biologiques dans l'organisme et leur capacité à **transférer** des composants bioactifs sur des barrières biologiques, comme moyen de communication intercellulaire, suggèrent que les VE pourraient être exploitées pour une utilisation thérapeutique.

Les approches thérapeutiques potentielles incluent l'utilisation des VE comme vecteurs d'administration de médicaments, les thérapies immunomodulatrices ou régénératives et les vaccins anti-tumoraux et pathogènes.

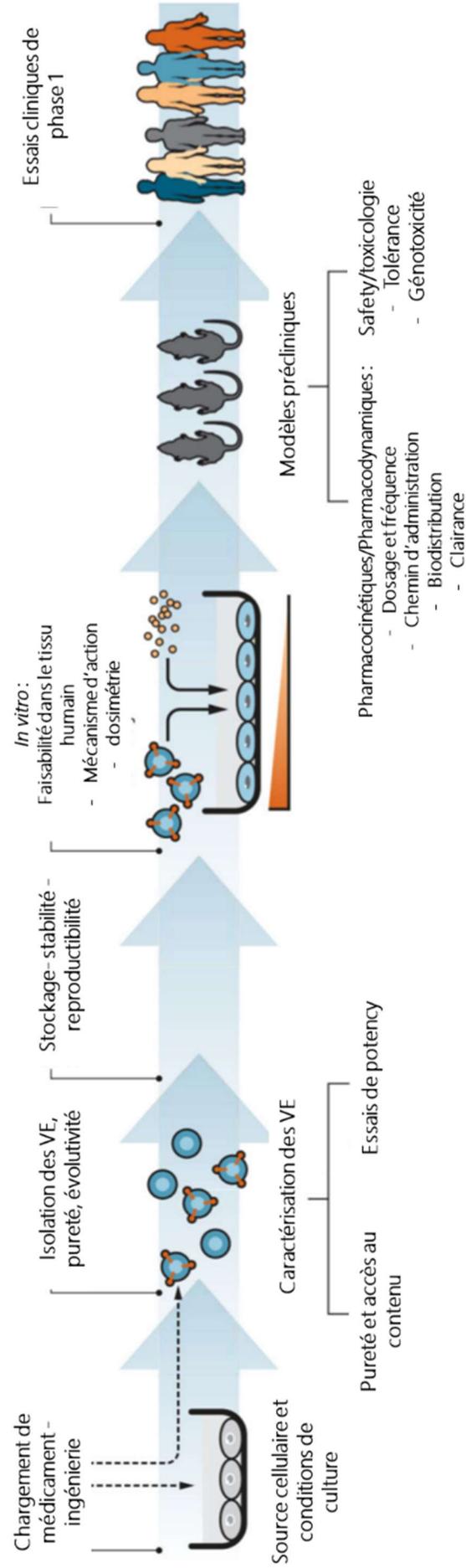


Figure 33 : Organigramme illustrant des considérations importantes pour le développement de thérapies à base de VE (adapté de (Wiklander et al., 2019)).

Les essais cliniques terminés et en cours, ainsi que de nombreuses études précliniques (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011; Kamekar *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2018), indiquent que la thérapie par les VE est réalisable et que les VE sont sûres et bien tolérées.

Les VE émergent comme des entités thérapeutiques très puissantes, soulignant le potentiel thérapeutique des propriétés innées des VE et l'utilisation comme système pour les médicaments à petites molécules, les espèces d'ARN, et l'administration de protéines thérapeutiques en combinaison avec des fragments de ciblage. Les VE représentent un point idéal entre l'administration de médicaments, les produits biologiques et les thérapies cellulaires : elles peuvent être utilisées comme propre outil d'administration, agissent comme biothérapeutiques et imitent l'action des thérapies cellulaires sans l'inconvénient de la prolifération. Le domaine en est encore à ses balbutiements, mais des recherches pour optimiser la production des VE et pour étudier leur biologie, leur contenu et la fonction complexe des VE sont en cours. Il semble probable que les VE deviendront une future plateforme de produits biopharmaceutiques.

Compte tenu des propriétés hémostatiques avantageuses des VE ainsi que de leur puissant potentiel thérapeutique dans de nombreuses pathologies, nous parlerons dans la dernière partie de cette introduction du rôle de ces VE dans l'activation endothéliale et leur fixation à la paroi vasculaire.

D. L'activation endothéliale

Tout au long de cette introduction, nous avons pu mettre en évidence que l'HIC est une pathologie qui requiert un traitement rapide et ciblé en phase aiguë. Il s'agit d'un processus engendrant un saignement actif au sein du parenchyme cérébral où l'hémostase ne parvient plus à effectuer son rôle de protection et où l'activation endothéliale est accrue. Des agents hémostatiques systémiques ont d'ores et déjà été élaborés pour traiter l'HIC. Cependant, leur capacité à cibler le site de saignement demeure inefficace. Comme nous avons pu le voir dans la partie (C. Les vésicules extracellulaires), les VE constituent une alternative intéressante pour le ciblage de ce saignement puisqu'elles possèdent à leur surface des protéines permettant de cibler les vaisseaux endommagés par le PSGL-1 puis d'activer la coagulation par le FT. Ainsi, dans le cadre de ce ciblage du saignement actif, il est nécessaire de caractériser l'activation endothéliale mise en jeu dans l'HIC afin de promouvoir l'action d'un traitement ciblé au site de saignement. Nous discuterons donc dans cette dernière partie d'introduction des mécanismes de l'activation endothéliale et des outils permettant de la mettre en évidence.

I. L'endothélium vasculaire

Physiologiquement, la paroi artérielle (ou endothélium) est constituée de 3 tuniques : la plus interne est l'intima, formée d'une seule couche de cellules endothéliales (CE). La média est constituée de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques. La couche la plus externe est l'adventice regroupant les fibres de collagène, les filets nerveux et des vaisseaux nutritifs. Ces trois tuniques sont présentes sur différents types de vaisseaux : artères musculaires et artères élastiques. Les CE recouvrent les vaisseaux de chaque système organique et régulent le flux de substances nutritives, de diverses molécules biologiquement actives et les cellules sanguines elles-mêmes. Le rôle de « gardien » de l'endothélium que possèdent les CE est affecté par la présence de récepteurs liés à la membrane pour de nombreuses molécules, notamment des protéines (facteurs de croissance, protéines coagulantes et anticoagulantes), des particules de transport de lipides et des hormones.

L'endothélium a longtemps été considéré comme une membrane inerte semblable à la cellophane qui tapisse le système circulatoire avec, comme fonction principale, le maintien de la perméabilité de la paroi vasculaire. Depuis les années 1900, il est reconnu que l'endothélium est un organe hétérogène, dynamique et disséminé qui possède des fonctions sécrétoires, synthétiques, métaboliques et immunologiques vitales (Fishman, 1982). La surface des CE chez l'adulte est composée d'environ 1 à 6×10^6 alvéoles, pèse environ 1kg et couvre une surface d'environ 1 à 7m² (Augustin, Kozian and Johnson, 1994a).

L'endothélium joue aussi un rôle central dans la régulation du flux sanguin. Cela résulte en partie de la capacité des CE au repos à générer une surface anti-thrombotique active qui facilite le transit du plasma et des constituants cellulaires dans tout le système vasculaire. Les perturbations, telles que celles qui peuvent se produire aux sites d'inflammation ou des contraintes de cisaillement hydrodynamique élevées, perturbent ces activités et activent les CE pour créer un microenvironnement pro-thrombotique et anti-fibrinolytique. Le flux sanguin est aussi régulé par la sécrétion et l'absorption de substances vasoactives par l'endothélium qui agit de manière paracrine pour contracter et dilater des parois vasculaires spécifiques en réponse à des stimuli tels que l'endotoxine.

L'étude détaillée de la fonction endothéliale est devenue possible pour la première fois avec le développement dans les années 1970 des techniques de culture de CE *in vitro* (Jaffe *et al.*, 1973; Lewis *et al.*, 1973; Gimbrone, Cotran and Folkman, 1974). Cependant, des limites de cette approche ont été identifiées notamment concernant la réalisation que la culture cellulaire perturbe les CE de leur état de repos *in vivo* (0.1% de réplifications par jour) à un phénotype activé (1% à 10% de réplifications par jour) ceci impliquant des pertes de fonctions associées à divers organes. Il existe maintenant des systèmes analytiques plus complexes permettant d'étudier les propriétés des CE et leurs interactions au sein de la paroi vasculaire. Les études de recombinaison génétique chez la souris sont susceptibles de faire progresser la compréhension des CE sur leurs rôles physiologiques et pathologiques dans la thrombose, l'athérosclérose, les métastases tumorales ou encore le rejet d'organe.

Le but de cette partie d'introduction est de fournir un aperçu général de la participation des CE à plusieurs processus biologiques. Nous nous centrerons principalement sur les mécanismes d'adhésion aux CE au regard des lésions vasculaires.

II. Hétérogénéité des cellules endothéliales

De nombreuses maladies vasculaires humaines sont strictement limitées à des types de vaisseaux particuliers. Par exemple, la contribution des plaquettes à la pathogenèse de la thrombose artérielle et veineuse diffère tout comme ces deux types de vaisseaux à l'athérosclérose. Les cellules tumorales peuvent montrer une prédilection similaire à métastaser à travers des lits vasculaires particuliers (Zetter, 1997). De plus, les événements cliniques tels que les thromboses sont généralement épisodiques et souvent localisés à un seul vaisseau. La base de la variation est mal comprise, mais peut résider en partie dans l'hétérogénéité des CE elles-mêmes.

1. Hétérogénéité des cellules endothéliales au sein et entre les tissus

La variation de l'apparence de l'endothélium capillaire dans les différents sites vasculaires a été reconnue depuis longtemps et semble bien adaptée à différentes fonctions. Par exemple, le cerveau et la rétine sont bordés par des CE reliées par des jonctions qui aident à maintenir la BHE ; le foie, la rate et la moelle osseuse sont bordés par des CE permettant le trafic cellulaire entre les espaces intercellulaires ; tandis que les villosités intestinales, les glandes endocrines et les reins sont doublés par des CE fenêtrées qui facilitent la perméabilité sélective requise pour une absorption, une sécrétion et un filtrage efficaces.

Les CE de divers tissus sont également hétérogènes en ce qui concerne leur phénotype de surface et leur expression protéique. Par exemple, le facteur von Willebrand (vWF), utilisé couramment comme marqueur pour les CE, n'est pas exprimé uniformément sur les cellules de tous les types de vaisseaux (Dumas *et al.*, 2021; Gurevich *et al.*, 2021). En effet, l'expression de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est limitée *in vivo* à environ 3% sur les CE vasculaires (Saito, Ishikawa and Yokoyama, 2020) et l'expression constitutive de l'uPA serait confinée dans les CE rénales (Louise and Obrig, 1994; Bifulco *et al.*, 2013). Les CE microvasculaires diffèrent dans leur susceptibilité à subir l'apoptose induite par du plasma de patients atteints de thrombocytopénie (Mitra *et al.*, 1997). L'induction du FT après perfusion de cytokines ou endotoxines est aussi limitée à des vaisseaux spécifiques (Soult *et al.*, 2014) parmi bien d'autres exemples d'hétérogénéité au niveau de l'expression protéique.

L'un des exemples les plus clairs d'hétérogénéité de la CE réside dans l'expression des récepteurs des molécules d'adhésion impliqués dans le trafic cellulaire. Pour donner deux exemples, Lu-ECAM-1 (molécule d'adhésion de CE spécifique aux poumons) est exclusivement exprimée par les CE post-capillaires pulmonaires (Duong *et al.*, 2020) alors que Mad-CAM-1 (molécule d'adhésion cellulaire d'adressine de la muqueuse) est exprimée principalement sur les veinules endothéliales de l'intestin (Schippers *et al.*, 2021).

2. Régulation environnementale et génétique du phénotype des cellules endothéliales

De nombreuses preuves indiquent que l'hétérogénéité des CE se développe, en partie, en raison de la variation de l'exposition de la CE à des stimuli environnementaux, dont certains n'agissent qu'à courtes distances ou nécessitent même un contact cellule-cellule pour effectuer un changement. De nombreux facteurs exogènes affectent le phénotype des CE, notamment des forces mécaniques, des promoteurs et inhibiteurs de croissance solubles, cytokines, lipides et protéines plasmatiques (thrombine, plasmine, anticorps) et le contact avec les cellules circulantes et tissulaires. Il existe de nombreux exemples de la façon dont le microenvironnement peut réguler le phénotype endothélial, un phénomène qui a été appelé transdifférenciation (Augustin, Kozián and Johnson, 1994b). L'hétérogénéité de la CE peut donc résulter d'une concentration d'effecteurs exogènes ou être due à des variations de réactivité (McCarthy *et al.*, 1991).

Les CE micro- et macro-vasculaires diffèrent par la minutie de leur croissance, leur capacité à former des structures de type capillaire, la synthèse de prostaglandine (PGI₂) et l'expression de récepteurs d'adhésion pour les lymphocytes (Ahmed *et al.*, 2011).

III. Le rôle de l'endothélium dans la coagulation

Une fonction physiologique cruciale de l'endothélium est de faciliter la circulation sanguine en fournissant une surface anti-thrombotique qui inhibe l'adhésion plaquettaire et la coagulation. Cependant, lorsque l'endothélium est perturbé par des forces physiques ou par des facteurs chimiques, les cellules subissent des changements dans leur programme biochimique qui aboutissent à leur transformation en une surface pro-thrombotique.

Un équilibre dynamique existe entre ces deux états, modulé à la fois au niveau de la transcription des gènes, et au niveau de la cellule intacte, permettant souvent à l'endothélium lésé de revenir à son état basal une fois le stimulus pro-coagulant dissipé (Jamwal and Sharma, 2018). Bien que les caillots de fibrine se soient formés à la suite de l'activité pro-coagulante, la fonction de l'endothélium est de limiter les dommages vasculaires et l'inflammation. En effet, la perte de l'activité anti-coagulante peut prédisposer à plusieurs troubles thrombotiques courants discutés dans les parties qui suivent.

1. Les mécanismes anti-coagulants

Le contrôle de la génération de thrombine est une étape essentielle dans l'équilibre entre les activités anti-thrombotiques et pro-coagulantes de l'endothélium (Figure 34). La thrombine stimule les voies pro-coagulantes sur les CE elles-mêmes. Il n'est donc pas surprenant que plusieurs voies d'activation sont impliquées pour restreindre la génération de la thrombine (Zhou *et al.*, 2020; Larsen and Hvas, 2021). La matrice entourant l'endothélium contient du sulfate d'héparane et des glycosaminoglycanes (GAG) apparentés favorisant l'activité de l'antithrombine associée aux cellules/matrices III (AT-III) (Nishinaga and Shimada, 1994) ; le sous-endothélium contient aussi du dermatane sulfate, favorisant l'activité de l'antithrombine *via* le cofacteur de l'héparine II (He *et al.*, 2008). Les CE empêchent également la formation de thrombine par l'expression d'un inhibiteur de la voie du FT (TFPI), qui se lie au FXa au sein du complexe FT/VIIa/Xa (Catieau *et al.*, 2018).

Le TFPI est libéré par des CE *via* l'héparine. Le TFPI et l'AT-III contribuent tous deux à l'hémostase physiologique et peuvent être absents dans les états thrombotiques acquis (Butenas, Van't Veer and Mann, 1999).

L'endothélium aide également à contenir l'activité de la thrombine par l'expression de la thrombomoduline (TM) (Giri *et al.*, 2021). La liaison de la thrombine à la TM facilite la capacité de l'enzyme à activer la protéine C anti-coagulante. Dans ce sens, l'activité de la protéine C activée (APC) est renforcée par son co-facteur protéique S, qui est synthétisée, entre autre, par les CE (Hassouna, 2009). Les CE expriment également des récepteurs pour l'APC (Lin *et al.*, 2020) régulant l'activité de cette voie. L'APC, à son tour, favorise l'inactivation des facteurs activés V et VIII.

La liaison de la thrombine à la TM atténue aussi la capacité de l'enzyme à activer les plaquettes, le FV, le FXIII et le fibrinogène et favorise ainsi l'activité fibrinolytique des CE. De plus, la TM inhibe indirectement l'activité de la prothrombinase en se liant au FXa (Rezaie, 1998). La thrombine liée à la TM est rapidement endocytée et dégradée (Iakhsiev, Rezaie and Idell, 2007).

Diverses cytokines inflammatoires régulent négativement la transcription du gène de la TM et accélèrent son internalisation (Holnthoner *et al.*, 2017; M. Li *et al.*, 2021) tout en favorisant l'expression du FT. La TM soluble est aussi sécrétée dans le plasma et des taux plasmatiques élevés ont été identifiés dans divers troubles associés aux lésions de la CE (Cucurull and Gharavi, 1997).

2. Les mécanismes pro-coagulants

L'étape cruciale de la transformation de la surface membranaire anti-coagulante en pro-coagulante est l'induction du FT (Figure 34). Comme nous avons pu le mentionner précédemment dans cette introduction (partie B. L'hémostase), le FT est l'élément déclencheur de la voie extrinsèque de la cascade de coagulation. Ainsi, il accélère dramatiquement l'activation dépendante du FVIIa, des FX et FIX, il n'est donc pas surprenant que le FT ne soit pas exprimé par l'endothélium non perturbé, au moins dans l'organisme adulte (Drake, Morrissey and Edgington, 1989). L'interruption du gène du FT est associée à des troubles dans le développement vasculaire et le saignement embryonnaire mortel (Bugge *et al.*, 1996; Carmeliet *et al.*, 1996; Toomey *et al.*, 1996) mais la source et la fonction du FT pendant le développement n'ont pas été élucidées.

La synthèse du FT est induite *in vitro* par divers agonistes, dont la thrombine, l'endotoxine, plusieurs cytokines, le cisaillement, l'hypoxie, les lipoprotéines oxydées etc (Neubauer and Zieger, 2021; Sharma *et al.*, 2021). Le FT est localisé principalement sous et entre les CE en culture (Ryan *et al.*, 1992), bien que certaines preuves d'expression à la surface cellulaire aient été présentées (Narahara *et al.*, 1994).

Au sein de la partie (C. Les vésicules extracellulaires) de cette introduction, nous avons indiqué que les cellules en culture génèrent aussi des vésicules extracellulaires contenant du FT (Karpman *et al.*, 2015) et les taux plasmatiques de FT sont élevés chez les patients présentant une coagulation intravasculaire disséminée (Okugawa *et al.*, 2000). L'expression du FT est rapidement induite après une lésion vasculaire (Duque *et al.*, 2020), et le FT est retrouvé associé aux CE dans les plaques d'athérosclérose (Rauch *et al.*, 2000; Asada *et al.*, 2020) et dans les vaisseaux d'origine tumorale (SUN *et al.*, 2021). Une fois les CE exprimant le FT exposées au plasma, l'activité de la prothrombinase est générée et la fibrine est formée à la surface des cellules (Stern *et al.*, 1985). Cela implique que les CE expriment des sites de liaison pour les FIX, IXa, X et Xa, la thrombine et la fibrine (Cohen, Turner and Moake, 2020). Pourtant, l'identité et l'emplacement de la plupart de ces sites de liaison sont inconnus, de même que leur rôle dans l'hémostase physiologique ou dans la thrombose.

Il a récemment été démontré que le FIX se lie au collagène de type IV dans la MEC (Cheung *et al.*, 1996) bien que son site d'association cellulaire favorisant l'assemblage du complexe d'activation intrinsèque du FX n'ait pas été identifié. Les CE expriment aussi des récepteurs pour les protéines de la voie du facteur de contact (Betapudi *et al.*, 2016), mais leur rôle dans l'hémostase est incertain. Le site de liaison de la CE le mieux caractérisé pour une protéine de coagulation est le récepteur de la thrombine, également appelé PAR-1. Ce récepteur est une protéine couplée aux protéines de haute affinité (Wang *et al.*, 2010) qui est activée lorsqu'un fragment dérivé de l'extrémité aminée de la protéine, formée à la suite d'un clivage par la thrombine, se lie au fragment de récepteurs associés aux cellules restantes. La liaison de la thrombine conduit à un large éventail de changements dans l'expression des molécules pro-thrombotiques et anti-thrombotiques par les CE cultivées, y compris FT, PAI-1, NO, PAF et PGI₂, entre autres (Catar *et al.*, 2021). La thrombine est aussi mitogène pour les CE, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses et est chimiotactique pour les monocytes.

La découverte subséquente de trois autres récepteurs couplés aux protéines G activés par la protéase, PAR-2, PAR-3 et PAR-4 a permis de montrer que PAR-2 est exprimé sur certaines cellules humaines, alors que PAR-1 est exprimé sur les plaquettes humaines. Quant à PAR-3, il est exprimé par la moelle osseuse humaine et les mégacaryocytes de souris, mais son expression sur les CE n'a pas été établie (Thompson *et al.*, 2010; Momi *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2021).

Enfin, PAR-4 est exprimé dans une variété de tissus et de types cellulaires comprenant les plaquettes, les cellules des muscles vasculaires lisses et les cellules neuronales (Vanderboor *et al.*, 2019). Les CE expriment aussi plusieurs récepteurs de la fibrine et des récepteurs spécifiques des produits de dégradation de la fibrine (Ferrari do Outeiro-Bernstein *et al.*, 2002), dont une transglutaminase tissulaire (TG2) (Ha *et al.*, 2018) et l'intégrine $\alpha v\beta 3$, bien que les preuves concernant leur expression *in vivo* ne soient en train d'émerger (Veenstra, Tang and Kern, 2013; Fischer *et al.*, 2019).

La liaison de la fibrine favorise l'adhésion à la CE, la propagation, la prolifération et la migration ; la rétraction cellulaire ; l'adhérence des leucocytes ; et l'inhibition de la synthèse de PGI₂. Les CE cultivées expriment aussi la GPIIb, qui se lie au vWF sécrété de manière constitutive par les CE et, vraisemblablement, les multimères ultralarges du vWF libéré des corps de Weibel-Palade en réponse à un certain nombre d'agonistes (Tian *et al.*, 2021). L'expression de GPIIb par les CE est renforcée par le TNF (Stewart, Kashour and Marsden, 1996), montrant ainsi que cette glycoprotéine participe au fonctionnement physiologique ou pathologique de la liaison du vWF *in vivo*. Les altérations génétiques et acquises dans la structure, l'expression et la fonction de ces récepteurs aux CE peuvent contribuer à des troubles hémorragiques et thrombotiques inexplicables. Cependant, malgré une étude assez approfondie de la fonction pro-coagulante de la CE en culture, la mesure dans laquelle l'adhérence plaquettaire ou la formation de fibrine se produisent réellement à la surface de l'endothélium intact *in vivo* fait encore défaut. La meilleure preuve indirecte vient peut-être de modèles animaux de septicémie dans lesquels une coagulation intravasculaire dépendante du FT et une lésion ischémique se produisent en l'absence de perturbation manifeste de la CE (Taylor, 1994). Néanmoins, la contribution de l'endothélium, des plaquettes, des monocytes et d'autres types de cellules dans ces modèles nécessiteront des études plus approfondies.

IV. Perturbation des cellules endothéliales et lésion vasculaire

Depuis des années, il est postulé que l'endothélium doit rester dans un état de repos ou non perturbé pour optimiser l'expression des activités anti-coagulantes qui empêchent la formation de thrombus (voir dans la partie « rôle de l'endothélium dans la coagulation »).

Cependant, l'endothélium est un organe dynamique qui répond à un ensemble d'agonistes et défis environnementaux en subissant un processus d'activation semblable à celui des plaquettes et aboutissant ainsi à la perte des propriétés anti-coagulantes et/ou pro-coagulantes (Figure 34).

Bien que le rôle de l'endothélium dans la pathogenèse de la thrombose *in vivo* reste à prouver, de plus en plus de preuves suggèrent un dérèglement de la fonction des CE en tant que pivot dans le développement de plusieurs maladies thrombotiques. Des facteurs plasmatiques tels que des anticorps ou des lipoprotéines qui perturbent la fonction endothéliale *in vitro* ont été identifiés.

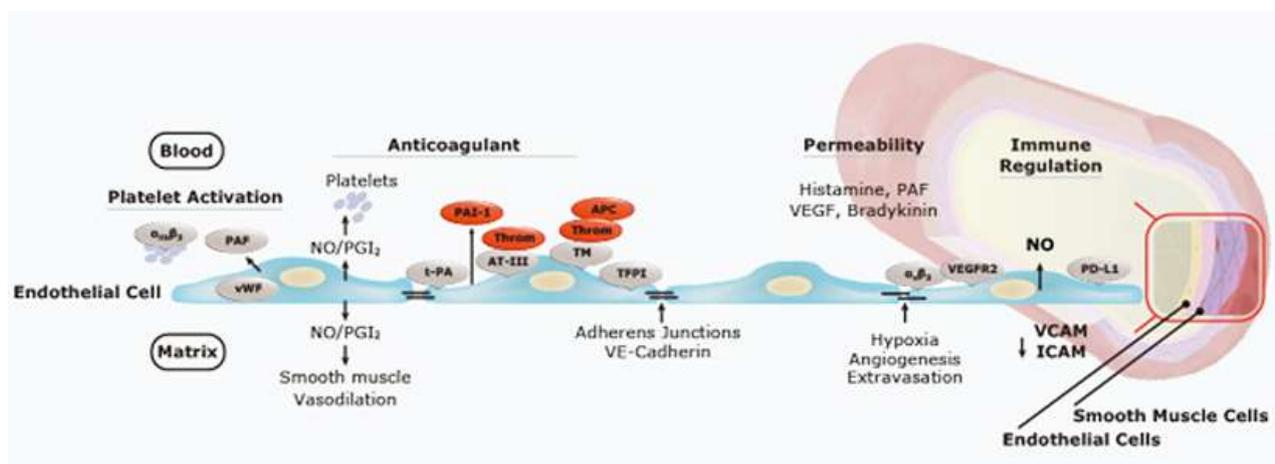


Figure 34 : Rôle des cellules endothéliales au cours de processus pathologiques.

1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif a été proposé comme mécanisme commun à diverses blessures telles que les lipides insaturés, divers produits chimiques ou des métabolites libérés par les leucocytes qui migrent vers le système vasculaire en réponse à une infection et/ou à lésion auto-immune. Les voies impliquées dans l'initiation et le contrôle des lésions oxydantes font l'objet d'études considérables. La LDL oxydée et son dérivé peroxyde, la lysophosphatidylcholine, stimule la protéine kinase activée C, le renouvellement des phosphoinositides et la libération de Ca^{2+} . Elle peut également altérer la réplication des CE et l'angiogenèse et induire l'apoptose (Babu *et al.*, 2015). Les cytokines telles que le TNF, peuvent à la fois induire des espèces réactives de l'oxygène dans les CE et stimuler le facteur de transcription ubiquitaire NF- κ B, entraînant une activation transcriptionnelle d'autres molécules d'adhésion leucocytaire telles que VCAM-1 (Tropea *et al.*, 1996). Les réactions d'oxydation favorisent aussi la formation d'AGE qui contribue à la vasculopathie diabétique (Trinh-Trang-Tan *et al.*, 2010) et l'initiation de l'activation transcriptionnelle de VCAM-1 (Zeng *et al.*, 2021) et de la protéine chimiotactique de monocytes (MCP-1), qui favorise l'entrée des monocytes dans la paroi vasculaire (Peng *et al.*, 2019).

2. Le « *shear stress* »

Les CE sont exposées en permanence au « *shear stress* » ou contraintes de cisaillement des fluides conduisant à une interaction dynamique entre la cellule et le substratum *via* des sites de contact focaux. Les changements induits par le cisaillement dans les forces biomécaniques transduites peuvent non seulement provoquer un réarrangement du cytosquelette et une morphologie altérée, mais aussi des changements dans l'expression du gène endothélial (Sapp *et al.*, 2019; Fuh *et al.*, 2021) (Figure 35).

La plupart des études ont principalement examiné les changements qui se produisent dans les heures suivant le début du flux, ce qui peut mieux refléter la situation dans les lits vasculaires exposés à du sang nouvellement circulant tel qu'une post-angioplastie, mais la réponse adaptative de l'endothélium aux forces de cisaillement est moins bien caractérisée. Un effet du « *shear stress* » sur la biologie vasculaire est suggéré, par exemple, par l'observation d'une diminution de la fonction vasodilatatrice au niveau des points de branchements coronariens, qui ont une prédilection pour l'athérosclérose (Millan-Orge *et al.*, 2021).

Il a été rapporté que le « *shear stress* » module l'expression de la TM de manière réversible (Sapp *et al.*, 2019) et bloque l'expression du FT des CE induite par les cytokines (Stojanovic *et al.*, 2021). Le(s) mécanisme(s) responsable(s) de la modulation de l'expression du gène des CE par le « *shear stress* » est à l'étude. Au moins une partie des effets induits par le « *shear stress* » est médiée par la modulation du gène de transcription. Un certain nombre de gènes, tels que le PDGF- β contiennent un ou plusieurs éléments sensibles aux contraintes de cisaillement (Khachigian *et al.*, 1997).

Parallèlement à cela, le travail de Vion et collaborateurs en 2013 a permis de révéler que le « *shear stress* » avait aussi pour rôle de réguler la génération de VE dérivées de cellules endothéliales (A. C. Vion *et al.*, 2013). En effet, dans cette étude comparative, ils ont pu mettre en évidence que le « *shear stress* » stimule la libération de VE de cellules endothéliales par l'activation des voies Rho kinases et Erk1/2 (A.-C. Vion *et al.*, 2013).

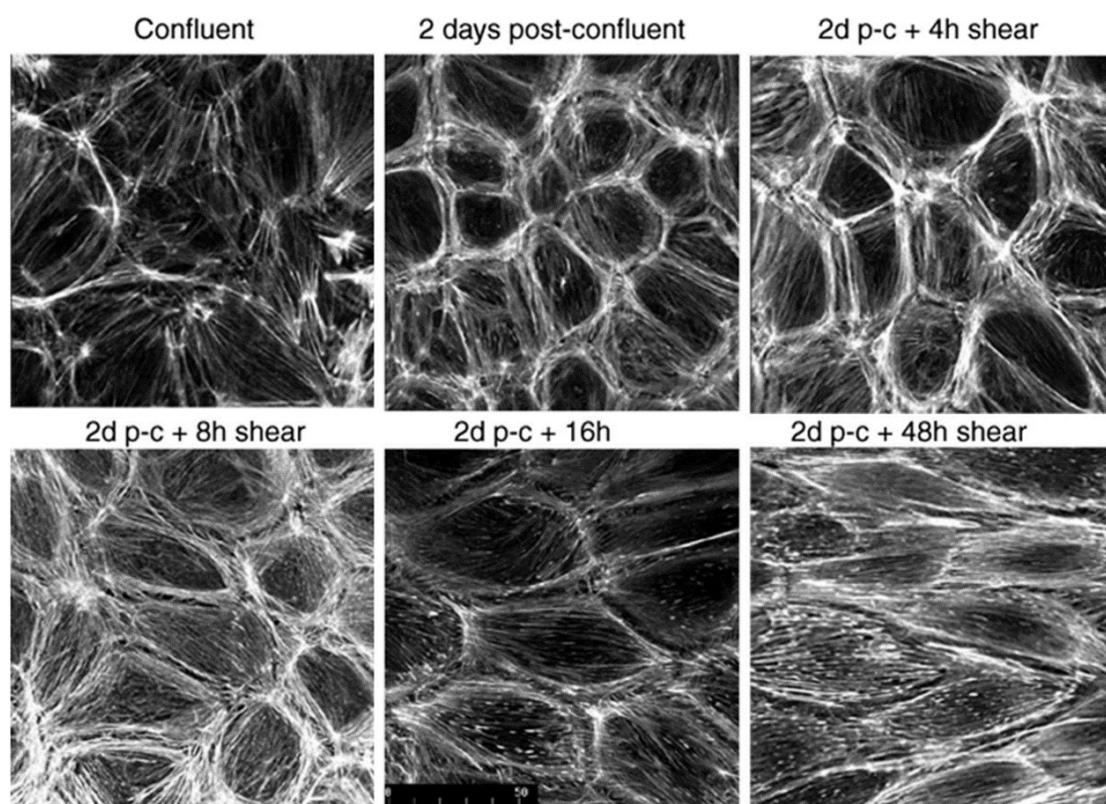


Figure 35: La post-confluence affecte l'organisation de l'actine dans les réponses des cellules endothéliales au *shear stress* (Noria *et al.*, 2004).

L'endothélium vasculaire et les cellules endothéliales en condition inflammatoire

- Les CE se trouvent dans l'ensemble système circulatoire. Leur structure présente des variations (hétérogénéité endothéliale) en fonction des différents compartiments auxquels ils appartiennent, par exemple :

- le **cerveau** et la **rétine** pour le maintien de la BHE
- le **foie**, la **rate** et la **moelle osseuse** pour permettre le trafic cellulaire entre les espaces intercellulaires
- les **glandes endocrines** et les **reins** pour faciliter la perméabilité sélective.

- L'hétérogénéité des CE au sein et entre les tissus peut être **à l'origine des variations** retrouvées dans de **nombreuses maladies vasculaires** telles que **l'athérosclérose** ou la **thrombose veineuse**.

- Les CE expriment **des protéines à leur surface** telles que :

- le facteur vWF, le tPA, l'uPA
- le FT
- les molécules d'adhésion (MadCAM-1, VCAM-1, ICAM-1...)

- Le rôle de l'endothélium est de **limiter les dommages vasculaires** lors d'une lésion ou d'une inflammation *via* des mécanismes :

- **Anti-coagulants** : Mécanismes engendrés par **l'inhibition de la thrombine** *via* les CE
- **Pro-coagulants** : **Présence du FT** accélérant la coagulation à la surface cellulaire par fixation sur des récepteurs tels que PAR-1, PAR-2, PAR-3 et PAR-4.

- Le **dérèglement de la fonction des CE** serait à l'origine du développement de plusieurs **maladies de type thrombotiques** :

- Le **stress oxydatif** : altère la réplication des CE et l'angiogenèse et induit l'apoptose
- Le « **shear stress** » provoque un réarrangement du cytosquelette et des changements d'expression du gène endothélial

V. Interaction entre les cellules endothéliales et les cellules sanguines

Comme mentionné précédemment, en plus de la contribution des CE dans la régulation de la coagulation sanguine, elles expriment également des molécules de surface cellulaire qui orchestrent le trafic des cellules sanguines circulantes. Ces molécules d'adhésion présentes à la surface des CE aident à diriger la migration des leucocytes dans des organes spécifiques et accélèrent la migration vers les sites d'inflammation, par exemple, en réponse à l'IL-6 (Oelze *et al.*, 2021) parmi beaucoup d'autres (Reymond *et al.*, 2012; Muller, 2014).

1. Interactions des plaquettes et des leucocytes avec la paroi vasculaire.

Les leucocytes et les plaquettes circulants peuvent adhérer à des régions spécifiques de l'endothélium, aux composants sous-endothéliaux exposés pendant le processus de surveillance immunitaire ainsi qu'en réponse à une lésion tissulaire ou une infection (Kummer *et al.*, 2020). Ces interactions multicellulaires sont des précurseurs essentiels de l'inflammation physiologique et de l'hémostase. À l'inverse, l'adhésion incontrôlée des leucocytes et des plaquettes contribue à des troubles inflammatoires et thrombotiques. Sous les forces de cisaillement, les plaquettes et les leucocytes interagissent avec les surfaces des vaisseaux par un processus en plusieurs étapes comprenant :

- L'**état de repos** des leucocytes au sein du compartiment sanguin ;
- L'**activation** des leucocytes déclenchée par la détection des chimiokines
- Le **roulement** des leucocytes *via* leur interaction avec les sélectines exprimées à la surface de l'endothélium ;
- L'**adhésion** des leucocytes à la paroi vasculaire par leur interaction avec les molécules d'adhésion (VCAM-1 et ICAM-1) ;
- La **transmigration** des leucocytes à travers la couche endothéliale par un mécanisme dépendant de PECAM-1 (Figure 36).

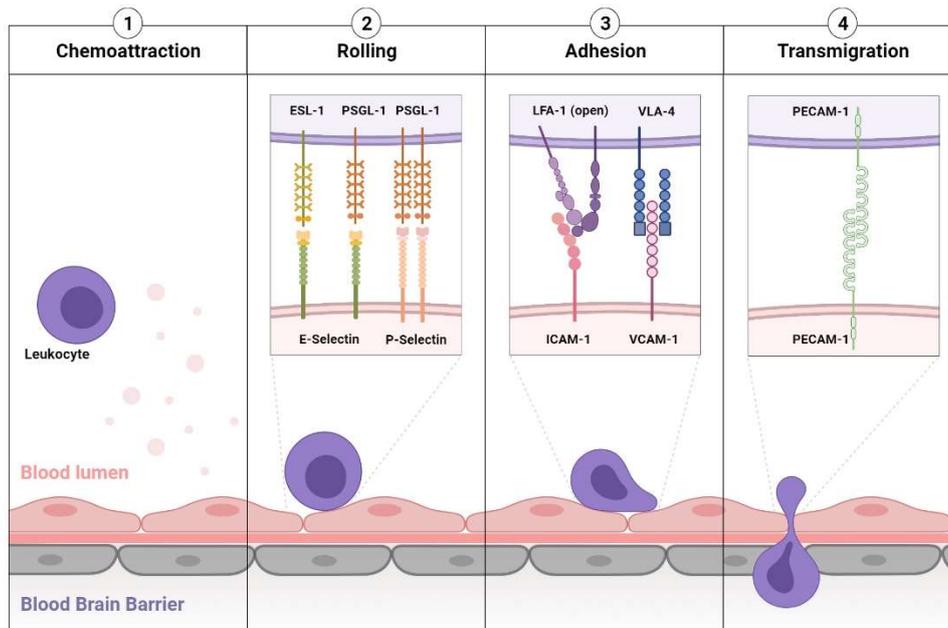


Figure 36 : Étapes de la transmigration leucocytaire : implication des molécules d'adhésion endothéliales (Gauberti and Martinez de Lizarrondo, 2021).

2. Adhésion des leucocytes et des plaquettes durant l'inflammation

Pendant l'inflammation, les leucocytes et les plaquettes s'attachent et roulent sur la surface de la CE. Les cellules, immobilisées, se répandent et migrent finalement entre les CE pour atteindre les tissus sous-jacents. Dans la plupart des cas, les interactions avec les sélectines, des glycoprotéines transmembranaires qui reconnaissent les glucides de la surface cellulaire des ligands retrouvés sur les leucocytes, initient et médient l'attache et le roulement des leucocytes à la surface de la CE (McEver, Moore and Cummings, 1995). Les sélectines constituent une famille de trois molécules connues, chacune ayant un domaine amino-terminal de la lectine dépendant du Ca^{2+} , un domaine EGF, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique (Figure 37).

- La L-sélectine est exprimée sur la plupart des leucocytes et se lie à des ligands exprimés constitutivement sur les veinules endothéliales des tissus lymphoïdes, aux ligands induits sur l'endothélium des sites d'inflammation et aux ligands exposés aux autres leucocytes.
- L'E-sélectine est exprimée sur les CE activées et les leucocytes.

- La P-sélectine est une sélectine stockée au sein des corps de Weibel-Palade et exprimée rapidement à la surface de la membrane plasmique des CE lors de l'activation et de la transmigration des leucocytes et des plaquettes activées (Kerfoot and Kubes, 2002). L'activation des plaquettes conduit à l'exocytose de cette sélectine (Furie, Furie and Flaumenhaft, 2001).

Tout comme l'E-Sélectine, la P-Sélectine se lie aux ligands des leucocytes. Les leucocytes adhérents à l'endothélium peuvent entrer en contact avec les leucocytes circulants à travers la molécule de L-Sélectine, entraînant l'amplification des leucocytes et leur recrutement aux sites d'inflammation (Walcheck *et al.*, 1996). Au niveau des sites d'hémorragies, les leucocytes s'attachent et roulent sur les plaquettes adhérentes (McEver, 2015). Les monocytes recrutés de cette manière peuvent augmenter la génération de fibrine, peut-être en élaborant le FT après leur activation (Palabrica, Lobb, Furie, Aronovitz, Benjamin, Y.-M. Hsu, *et al.*, 1992). Les ligands de sélectines exprimés sur les veinules endothéliales interviennent aussi dans le laminage des plaquettes activées et améliorent l'accumulation des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques (Diacovo *et al.*, 1996). Ainsi, les sélectines initient des réponses inflammatoires, immunitaires et hémostatiques en favorisant les interactions multicellulaires transitoires dans des conditions de stress.

	Expression cellulaire	Ligands protéiques
P-sélectine (GMP-140, PADGEM, CD62P)	Endothélium activé et plaquettes	PSGL-1 CD24
E-sélectine (ELAM-1, CD62E)	Endothélium activé	PSGL-1 ESL1 L-sélectine Podocalyxine
L-sélectine (MEL-14, CD62L)	Expression constitutive sur les leucocytes	PSGL-1 GlyCAM-1 MAdCAM-1 CD34 Podocalyxine

Figure 37 : Les différentes caractéristiques des sélectines
(adapté de (Kappelmayer and Nagy, 2017).

Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés au rôle du ligand PSGL-1 et à sa capacité à se fixer à la P-sélectine exprimée par les vaisseaux lors d'une lésion vasculaire. Par conséquent, la P-sélectine est la sélectine sur laquelle nous nous sommes le plus rapporté. Cette sélectine joue un rôle dans l'hémostase et la thrombose en médiant l'agrégation hétérotypique des plaquettes sur l'endothélium activé ou les leucocytes adhérents. Elle participe aussi à l'agrégation homotypique des plaquettes activées et le transfert de VE contenant du FT et le ligand des sélectines PSGL-1. En effet, dans un modèle de thrombose chez le primate, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-P-Sélectine inhibe l'accumulation des leucocytes dans le thrombus et diminue ainsi le dépôt de fibrine (Palabrica, Lobb, Furie, Aronovitz, Benjamin, Y. M. Hsu, *et al.*, 1992). Ces résultats, confirmés par d'autres études chez l'animal, indiquent que la présence des leucocytes dans le thrombus est médiée par la P-Sélectine et qu'ils participent à l'accumulation de fibrine au sein du thrombus (Toombs *et al.*, 1995; Gross, 2005; Darbousset *et al.*, 2014). Cette sélectine est aussi responsable de l'augmentation d'expression du FT par les monocytes (Furie and Furie, 2004). Bien que ces observations soient avérées, d'un point de vue cinétique, elles ne peuvent expliquer le mécanisme par lequel l'interaction P-Sélectine/PSGL-1 participe à la formation et l'amplification du thrombus. En effet, les différences d'expression de FT et de génération de fibrine entre des souris sauvages ou déficientes en P-Sélectine apparaissent très précocement, avant même le recrutement leucocytaire (R.Vandendries, Furie and Furie, 2004). Par ailleurs, la synthèse *de novo* de FT par les monocytes est un processus plutôt long *in vitro* (quelques heures) (Furie and Furie, 2004). L'hypothèse actuellement acceptée est qu'il existe un pool de FT circulant mobilisable, capable de s'accumuler dans le thrombus en formation et que des VE émises par les leucocytes portent simultanément le FT et PSGL-1 (Furie and Furie, 2004; R.Vandendries, Furie and Furie, 2004).

Cette proximité « physique » entre PSGL-1 et FT permet de rendre compte du rôle de l'interaction PSGL-1/P-Sélectine dans la croissance du thrombus (Furie and Furie, 2004; R.Vandendries, Furie and Furie, 2004). Plusieurs études ont montré l'intérêt de l'antagonisation de l'axe P-Sélectine/PSGL-1 dans la résolution du thrombus. Une méta-analyse a donc comparé l'efficacité d'inhibiteurs de cette voie par rapport à des HBPM (héparine de bas poids moléculaire) dans le traitement de la thrombose veineuse profonde.

L'inhibition de l'interaction P-Sélectine/PSGL-1 semble équivalente aux HBPM en réduisant le thrombus sans augmenter le risque hémorragique (Ramacciotti *et al.*, 2010). L'interaction P-Sélectine/PSGL-1 intervient dans la formation des agrégats leucocytes-plaquettes qui pourraient avoir un rôle pathogène dans la thrombose artérielle et l'athérosclérose (Cerletti *et al.*, 2012).

Le PSGL-1

- **Historique du PSGL-1**

- Première identification en 1995 (Moore *et al.*, 1995) ;
- Présent à la surface des leucocytes ;
- Homodimère de type mucine lié par un pont disulfure dont la masse moléculaire est d'environ 120kDa.

- **Localisation tissulaire du PSGL-1**

- A l'origine, le PSGL-1 a été retrouvé dans les lignées myéloïdes et lymphoïdes (érythrocytes et plaquettes) (Moore, 1998) ;
- Dans les années 2000, des équipes découvrent le PSGL-1 dans les cellules T et cellules souches hématopoïétiques (Kieffer *et al.*, 2001; Katayama *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2005) ;
- Le PSGL-1 a été retrouvé sur les veinules du petit intestin murin (Rivera-Nieves *et al.*, 2006) ;
- Il est exprimé à la surface des CE de la veine ombilicale où il médie l'adhésion des monocytes dans des conditions de flux (Martins *et al.*, 2007; Carlow *et al.*, 2009) .

- **Fonctions du PSGL-1**

- Le PSGL-1 est un ligand de la P-Sélectine ;
- In vitro*, l'inhibition du PSGL-1 entraîne un blocage de son interaction avec la P-Sélectine inhibant ainsi l'adhérence des neutrophiles sur des cellules exprimant la P-Sélectine (Moore, 1998) ;
- In vivo*, le PSGL-1 médie le roulement des neutrophiles, des éosinophiles et des lymphocytes T dans la microcirculation (Norman *et al.*, 1995) (Moore, 1998) ;
- Le PSGL-1 est aussi un ligand de la L-Sélectine participant ainsi au roulement secondaire des neutrophiles circulants (Carlow *et al.*, 2009; Moore, 1998) ;
- Le PSGL-1 est également un ligand de la E-Sélectine (Hidalgo *et al.*, 2007) .

Ainsi, afin de faire le lien avec la partie d'introduction de ce manuscrit « C. Les vésicules extracellulaires », les VE portant à la fois du FT et du PSGL-1 à leur surface présentent un avantage considérable pour se fixer à la P-Sélectine exprimée par les vaisseaux endommagés lors d'une lésion vasculaire, et médier la coagulation.

3. Outils d'imagerie utilisant des particules ciblant les cellules endothéliales activées au niveau cérébral

Dans le contexte de nos travaux de thèse, l'hémorragie intracérébrale engendre un grand nombre de mécanismes et notamment celui de l'activation endothéliale au niveau du site de saignement. Par conséquent, il est nécessaire de cibler cette activation endothéliale pour en comprendre les enjeux dans cette pathologie. C'est pourquoi l'utilisation d'outils d'imagerie tels que l'IRM moléculaire permettant la détection de cette activation endothéliale est fondamentale.

Le système nerveux central est considéré comme un organe immunitaire privilégié, sous surveillance permanente pour détecter les tissus endommagés (Louveau, Harris and Kipnis, 2015). Cette surveillance nécessite un trafic contrôlé des leucocytes entre le sang et le parenchyme cérébral à travers la BHE. Ceci est permis par l'expression des molécules d'adhésion par les CE du système cérébrovasculaire (Wu, Liu and Zhou, 2017). Dans un contexte de neuroinflammation, les cellules gliales du parenchyme, telles que la microglie et les astrocytes, libèrent des cytokines pro-inflammatoires (telles que le TNF et les interleukines) et des chimiokines, activant ainsi les CE environnantes et attirant les leucocytes circulatoires (Nourshargh and Alon, 2014). L'IRM moléculaire peut exploiter cette expression spécifique de protéines pour révéler des processus neuro-inflammatoires.

Le concept général de l'IRM moléculaire est d'injecter un agent de contraste sur une protéine d'intérêt et d'effectuer une séquence IRM pour détecter l'accumulation de l'agent de contraste *in situ*, révélant ainsi l'expression de la protéine d'intérêt (Weissleder and Nahrendorf, 2015). De fait, l'agent de contraste doit porter un matériau de production de contraste et être capable d'atteindre et de se lier à la protéine d'intérêt. Dans le contexte d'un agent de contraste ciblant une protéine exprimée du côté luminal des CE, les particules injectées par voie intraveineuse peuvent facilement atteindre leur cible.

4. Applications de l'IRM moléculaire sur la neuro-inflammation

Depuis l'étude phare introduisant l'utilisation de l'IRM moléculaire à base de *Microparticles of Iron Oxide* (MPIO), de nombreuses études ont confirmé la *viabilité* de cette méthode et démontré son application dans plusieurs troubles du système nerveux central (Gauberti, Fournier, *et al.*, 2018; Gauberti, P. Fournier, *et al.*, 2018).

Les quatre principaux types d'applications qui ont été rapportés sont le diagnostic précoce, la détection de lésions infracliniques, le suivi de la réponse thérapeutique et l'évaluation de la gravité des troubles du SNC (Montagne *et al.*, 2012; Gauberti and Martinez de Lizarrondo, 2021). Par exemple, en utilisant l'IRM moléculaire de la P-Sélectine dans la moelle épinière, il est possible de prédire la rechute de la maladie avant les symptômes cliniques (Fournier *et al.*, 2017). En clinique, l'utilisation de l'IRM moléculaire chez les individus à haut risque, cela pourrait permettre la mise en place d'un traitement prophylactique avant l'apparition des symptômes, dès les premiers stades de la maladie. Plusieurs rapports ont aussi démontré l'intérêt de l'IRM moléculaire de VCAM-1 pour détecter des métastases cérébrales précoces (Serres *et al.*, 2012).

Il existe des preuves d'une corrélation entre la gravité d'une lésion cérébrale et l'intensité de l'activation endothéliale qui en résulte. Par conséquent, l'évaluation quantitative de l'activation endothéliale à l'aide de MPIOs ciblée peut révéler la gravité de la maladie (Figure 38). Cela a été démontré dans une étude sur l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, où le volume de signaux MPIOs ciblant VCAM-1 dans le cerveau et celui de signaux MPIOs ciblant P-Sélectine dans la moelle épinière sont corrélés au stade clinique de la maladie (Serres *et al.*, 2011; Montagne *et al.*, 2012; Fournier *et al.*, 2017).

Dans le contexte de l'HIC, les MPIOs ciblant VCAM-1 sont également employés pour étudier l'inflammation péri-hématomale (Gauberti *et al.*, 2013). Ainsi, le travail de Gauberti et collaborateurs a permis de mettre en évidence que l'imagerie améliorée par MPIOs-VCAM-1 semble être prometteuse dans la détection des individus présentant des réponses cérébrovasculaires sévères après un AVC (Gauberti *et al.*, 2013).

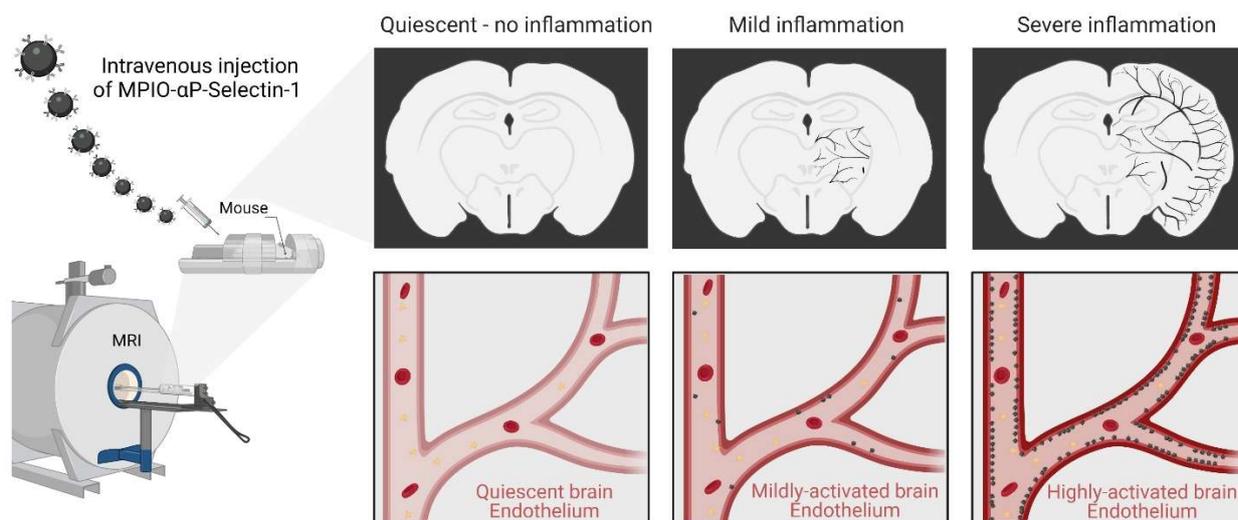


Figure 38 : Représentation schématique de la relation entre la sévérité de l'activation endothéliale et les changements de signal induits par MPIOs à l'IRM (signal voids) (Gauberti and Martinez de Lizarrondo, 2021).

L'IRM moléculaire employant des MPIOs ciblant la P-Sélectine permettrait donc d'étudier spécifiquement l'activation endothéliale et le site de saignement actif qui l'engendre dans le cadre d'une HIC. C'est donc dans cette optique que nos travaux ont été menés afin de démontrer que notre traitement cible de manière spécifique les vaisseaux lésés où la P-Sélectine est exprimée dans le cadre d'une HIC.

Interaction entre les cellules endothéliales et les cellules sanguines

- Les CE expriment des **molécules de surface cellulaire** qui :
 - orchestrent le trafic des cellules sanguines circulantes
 - aident à diriger les leucocytes dans les organes spécifiques
 - accélèrent la migration vers les sites inflammatoires
- Sous des forces de cisaillement, les **plaquettes** et les **leucocytes** interagissent avec les **surfaces des vaisseaux** par un processus en plusieurs étapes :
 - l'**état de repos** des leucocytes au sein du compartiment sanguin ;
 - l'**activation** des leucocytes déclenchée par la détection des chimiokines ;
 - le **roulement** des leucocytes *via* leur interaction avec les sélectines exprimées à la surface de l'endothélium ;
 - l'**adhésion** des leucocytes à la paroi vasculaire par leur interaction avec les molécules d'adhésion (VCAM-1 et ICAM-1) ;
 - la **transmigration** des leucocytes à travers la couche endothéliale par un mécanisme dépendant de PECAM-1.
- Pendant l'inflammation, les leucocytes s'attachent et roulent à la surface de la CE. Cette attache se fait *via* des **sélectines** :
 - La **L-Sélectine** exprimée sur la plupart des leucocytes
 - L'**E-sélectine** exprimée sur les CE activées et les leucocytes
 - La **P-Sélectine** exprimée sur la membrane plasmique des CE et celle des plaquettes activées.
- Des études ont montré que la proximité physique entre la **P-sélectine** et son ligand **PSGL-1** exprimé en simultané avec le **FT à la surface de VE** a un rôle dans **la croissance des thrombi**.
- L'**IRM moléculaire** peut exploiter l'expression spécifique de protéines pour révéler des **processus neuro-inflammatoires**.
- L'imagerie moléculaire de **MPIOs ciblant la P-Sélectine** de la moelle épinière permet de prédire la rechute de la maladie avant les symptômes cliniques.
- Dans le contexte de l'**HIC**, les MPIOs ciblant VCAM-1 sont également employés pour étudier **l'inflammation péri-hématomale**.

PROJET DE THÈSE

L'AVC hémorragique, défini comme un saignement dans le parenchyme cérébral, reste une cause majeure de mortalité et d'invalidité permanente. Il existe des besoins non satisfaits de thérapies efficaces pour améliorer la récupération après un AVC hémorragique, en particulier l'hémorragie intracérébrale (HIC), la forme la plus grave d'AVC, qui représente 15% de tous les cas d'AVC (Owens Johnson *et al.*, 2019). La croissance précoce de l'hématome dans l'HIC survient chez un tiers des patients dans les trois heures suivant le début des symptômes et est un facteur prédictif de mauvais pronostic. Malheureusement, nous manquons encore de traitement en phase aiguë. Des essais cliniques ont montré qu'une thérapie hémostatique non ciblée utilisant le facteur VII activé recombinant (rFVIIa) réduisait la croissance des hématomes mais entraînait également un taux inacceptable d'effets secondaires, y compris des thromboses diffuses à la dose la plus élevée (Mayer, 2007).

Par conséquent, des traitements ciblés capables de favoriser sélectivement l'hémostase au site de saignement sont donc nécessaires. Les vésicules extracellulaires (VE) peuvent constituer une cible prometteuse pour arrêter le saignement. Les VE sont des vésicules libérées par les cellules lors de leur activation et qui présentent à leur surface les mêmes récepteurs que leur cellule parentale. *De facto*, il est connu que les VE dérivées de monocytes peuvent porter à leur surface le facteur tissulaire (FT), facteur clé du déclenchement de la voie extrinsèque de la cascade de coagulation (Osterud, 2012). Des études antérieures ont rapporté que les VE portant du FT s'accumulent pendant la formation de thrombus avec des interactions dépendantes de P-Sélectine/PSGL-1 et favorisent la génération de thrombine (Falati *et al.*, 2003).

Ainsi, l'**hypothèse** de nos travaux de thèse est que l'administration de VE exogènes pro-coagulantes (portant le FT et du PSGL-1) va activer la coagulation au niveau du site de saignement, réduire la croissance des hématomes et améliorer les déficits associés dans l'HIC.

L'**objectif** principal de cette thèse est donc de générer une grande quantité de VE pro-coagulantes d'origine monocyttaire puis de démontrer leur efficacité en tant que pansements hémostatiques intravasculaires dans des modèles pré-cliniques d'HIC.

Pour atteindre cet objectif, **plusieurs axes ont été abordés** au cours de cette thèse :

- Mise au point de la production d'une lignée cellulaire monocyttaire THP-1 pour la génération à grande échelle de VE à partir d'un bioréacteur ;
- Mesure de la concentration de VE purifiées
- Caractérisation morphologique des VE par technique de microscopie confocale et Western Blot (anti-CD14, anti-FT et anti-PSGL-1), *Nanoparticle Tracking Analysis* et *Exoview* ;
- Caractérisation fonctionnelle des VE par des expériences *in vitro* de formation de thrombus dans du sang et du plasma humains ;
- Caractérisation fonctionnelle des VE par des expériences *in vivo* dans un modèle de mesure du temps de saignement de queue murine après lésion ;
- Administration *in vivo* des VE pro-coagulantes exogènes dans des modèles pré-cliniques rongeur d'hémorragie intracrânienne par injection intrastriatale de collagénase (avec ou sans prise d'anti-coagulants pour aggraver le saignement) pour tester leur innocuité et leur potentiel thérapeutique

Ces travaux de thèse ont donné lieu à la rédaction d'une étude originale : « *Extracellular vesicles bearing tissue-factor improve outcome after collagenase-induced intracranial hemorrhage* ».

RÉSULTATS

Exogenous nanovesicles bearing tissue factor improve outcome in intracranial hemorrhage stroke models by acting as hemostatic patches.

Authors: Fanny Potzеха¹, Alice Grangier*², Manuel Navarro-Oviedo*¹, Suzanne Goursaud, Mervé Yetim¹, Yohann Repessé^{1,3}, Florence Gazeau², Thomas Gaberel^{1,4}, Amanda K.A. Silva², Denis Vivien^{1,5}, Maxime Gauberti^{§1,6} Sara Martinez de Lizarrondo^{§1}

* These authors contributed equally

§ These authors share senior authorship

Affiliations:

¹Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, PhIND "Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders", Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, Cyceron, 14000 Caen, France

²MSC, Université de Paris CNRS, UMR7057, 45 rue des Saints Pères 75006, Paris, France.

³CHU Caen, Department of Hematology and Hemostasis, CHU de Caen Côte de Nacre, Caen, France.

⁴CHU Caen, Department of Neurosurgery, CHU de Caen Côte de Nacre, Caen, France.

⁵CHU Caen, Clinical Research Department, CHU de Caen Côte de Nacre, Caen, France.

⁶CHU Caen, Department of diagnostic imaging and interventional radiology, CHU de Caen Côte de Nacre, Caen, France.

To whom correspondence should be addressed: Sara Martinez de Lizarrondo, PhD, INSERM U1237 "Physiopathology and Imaging for Neurological Disorders (PhIND)", Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, GIP Cyceron, Bd Henri Becquerel, BP5229, 14074 Caen, France, Phone: 0033.231.47.01.55, Fax: 33.231.47.02.22, Mail: smartinez@cyceron.fr

ABSTRACT

Intracerebral hemorrhage (ICH) is the most severe stroke subtype. Stopping the ongoing bleeding using pro-hemostatic agents is a promising therapeutic strategy that remains limited by serious side effects such as uncontrolled thrombosis. In the present study, we developed an original therapeutic strategy for ICH based on the administration of nanosized extracellular vesicles (EVs) that can trigger the coagulation cascade specifically at the site of active bleeding. We first generated large amounts of EVs from TNF-stimulated THP-1 monocytes in bioreactors. Those monocyte-EVs presented a mean size of ~300 nm, a high pro-hemostatic activity reducing the clotting time in a dose- and TF-dependent manner and a high expression of a targeting protein on their surface (P-Selectin Glycoprotein Ligand 1, PSGL-1). In preclinical models of ICH in mice, intravenous injection of mEVs improved stroke outcome in a dose-dependent manner. mEVs at 1 mg/kg prevented hematoma growth by 43% and improved neurological score at 24h compared to control mice ($p < 0.01$, $n = 15/\text{group}$). These effects were also present in more severe models of ICH (enoxaparin or warfarin treated mice). Importantly, the beneficial effect was blocked when using antibodies blocking either TF or PSGL-1, suggesting that both the pro-coagulant activity and the ability to target damaged brain vessels are mandatory for the therapeutic efficacy of EVs. To conclude, exogenous mEVs bearing TF and PSGL-1 improve outcome after collagenase-induced ICH by acting as intravascular hemostatic patches.

INTRODUCTION

Intracerebral hemorrhage (ICH), defined as spontaneous bleeding into the brain, is the deadliest, most disabling, and least treatable form of stroke. Compared with ischemic stroke and subarachnoid hemorrhage, victims of ICH suffer higher mortality and are left with more severe deficits¹. In contrast to advances in the acute management of subarachnoid hemorrhage and ischemic stroke, effective therapies for ICH are not available, treatment is primarily supportive, and outcomes remain poor². Blood pressure reduction and osmotherapy are usually given in the acute setting, but the effect of these interventions is unclear³⁻⁶. The role of surgical hematoma evacuation remains controversial as well. Previous studies have demonstrated the feasibility of CT-guided stereotaxic thrombolysis and clot aspiration for small deep hematomas and intraventricular local thrombolytic therapy for hastening the removal of intraventricular hemorrhage⁷⁻⁹, but latest trials of these interventions did not improve the proportion of patients who achieved a long-term outcome after ICH^{8,10}. In recent years, attention has shifted to early hematoma growth as an important cause of early neurological deterioration after ICH. Historically, bleeding in ICH was thought to be completed within minutes of onset, and neurological deterioration during the first day was attributed to cerebral edema and mass effect around the hemorrhage^{11,12}. Prospective and retrospective studies indicate that early hematoma growth occurs in one third of ICH patients scanned within 3 hours of onset and is associated with poor outcome¹³⁻¹⁶. The three most consistently identified predictors of poor outcome after ICH are hematoma volume, the presence of intraventricular hemorrhage, and depressed level of consciousness¹⁷⁻¹⁹. Of these, hematoma volume has been identified as the single most powerful predictor of 30-day mortality after ICH²⁰. Given the evidence that ongoing bleeding can occur for several hours after onset, it is plausible that ultra-early hemostatic therapy might minimize hematoma volume and improve outcome²¹. In this paradigm, ultra-early hemostatic

therapy for ICH could be used as the counterpart to thrombolytic intervention for acute ischemic stroke.

Clinical trials using untargeted hemostatic therapy, such as recombinant activated Factor VII (rFVIIa) which forms a complex with exposed tissue factor (TF), activating the extrinsic coagulation pathway²², showed that this approach is promising. Results showed that rFVIIa administration promoted efficient hemostasis and reduced hematoma growth. Unfortunately, rFVIIa treatment was associated with risk of systemic coagulation or thromboembolic complications^{23, 24}. Targeted treatments able to selectively promote hemostasis at the site of bleeding are therefore necessary.

Circulating extracellular vesicles (EVs) are small (0.1–1 μm) membrane vesicles originating from many different cells by membrane blebbing after activation, apoptosis, or high *shear stress*^{25, 26}. EVs, as their parental cells, provide cell surface component and are well known to participate in the coagulation process. In *in vitro* studies with plasma from healthy individuals, EVs enhance thrombin generation, fibrin clot structure and clot stability²⁷.

Importantly, previous studies have reported that monocyte-derived EVs (mEVs), which are the main source of blood-borne TF²⁸, are recruited to sites of vascular injury *in vivo*, accumulate during thrombus formation and locally promote thrombin generation²⁹⁻³¹. Thus, the aim of this project was to generate large amounts of hemostatic mEVs to be used as hemostatic patches in different preclinical models of ICH.

METHODS

Reagents

Tumor Necrosis Factor was purchased from PeproTech (Rocky Hill, NJ). THP-1 cell line (ATCC® TIB-202™), fetal bovine serum, Carboxyfluorescein succinidimyl ester (CFSE) came from Sigma. INTEM-S, EXTEM-S came from ROTEM®. The cell plasma membrane staining kit – Orange Fluorescence Cytopainter was purchased from Abcam (France). The Lymphoprep™, Penicillin/Streptomycin, mouse monoclonal antibody anti-phosphatidylserine, human monoclonal antibody anti-TF (HTF-1), goat anti-collagen type IV (Col IV) used for immunohistochemical analyses were obtained from Southern Biotech (Birmingham, AL, USA). Donkey anti-goat antibody F(ab)'2 fragments were purchased from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). The purified mouse anti-human PSGL-1 (CD162, clone KPL-1) and CD-14 were purchased from BD Biosciences™.

In vitro THP-1 monocyte culture

Human monocyte cell line, THP-1 cells (obtained from ATCC) were cultivated in 0.2µm filtered Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Sigma Aldrich) supplemented with 10% EVs-depleted Fetal Calf Serum (FCS) and 2% penicillin/streptomycin, at 37°C with 5% CO₂. 10x10⁶ cells were cultured in T75 Flasks and 0.05mM of β-Mercaptoethanol was added to reduce cellular aggregates.

THP-1 mEVs production in Bioreactors after TNF stimulation

A minimum of 25x10⁶ THP-1 cells were cultured in a cell suspension bioreactor (CeLLine, Wheaton®). Monocytes were placed in the cell compartment on a 10 kDa semi-permeable membrane and a 0.2 µm filtered complete medium (RPMI 1640) containing 20% EVs-depleted

FBS and 1% Penicillin-Streptomycin was added in the nutrient compartment, and RPMI 1640 + 1% Penicillin-Streptomycin in the upper compartment.

Cells were kept in the bioreactor for 72 hours, after that time, in order to promote mEVs generation, THP-1 cells were stimulated 100 ng/mL of recombinant human Tumor Necrosis Factor (TNF) (PeproTech, Rocky Hill, NJ) for 48h. After that, cellular debris of the supernatant was removed by centrifugation at 2000xG for 5 minutes. mEVs were purified after ultracentrifugation at 20 000xG for 90 minutes at 4°C. Purified mEVs were washed twice and resuspended in 0.1µm filtered NaCl/Hepes buffer (150 mM NaCl and 10 mM HEPES, pH=7.4) and stored at -80°C.

GMP-like THP-1 mEV production in 3D cell culture by turbulence stimulation

THP-1 cells (ATCC) were cultivated in T75 flasks RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% Fœtal bovine serum (Corning) and 1% penicillin/streptomycin (5000UI/ml, Thermofisher), and incubated at 37°C with 5% CO₂. They were kept without agitation at a concentration between 2E5 cells/ml and 1E6 cells/ml. Cells were passed every 2-4 days.

Approximately 1×10^8 THP-1 cells were washed with RPMI 1640 and 1% penicillin/streptomycin to remove serum then resuspended in 400mL of this serum-free production media in a 1 L spinner (Bellco) at 37°C with 5% CO₂ using an agitator. The stirring intensity was set to obtain a diameter of the smallest vortex (Kolmogorov length) of 25 µm for 6 hours to generate turbulence *shear stress* stimulation. After that, cellular debris of the supernatant was removed by centrifugation at 2000xG for 10 minutes. mEVs were then ultracentrifuged at 150 000xG for 2 hours to obtain an EV pellet which was resuspended in PBS.

Protein Measurement

The protein content of mEVs was determined using Pierce BCA protein Assay Kit (Thermo Scientific, Weston, FL, United States). The BCA working reagent and protein standard were prepared by following the instructions provided by the manufacturer. Bovine serum albumin was used as a standard.

Size

The size distribution was determined using two independent methods. Size was measured at baseline using Laser Scanning Confocal Microscopy method and using the Nanoparticle tracking analysis.

mEVs immobilization and immunolabeling assessment

To immobilize the mEVs, micro-wells (μ -Slides, Ibidi) were first coated overnight with 2 μ g/ml of dopamine diluted in sterile water. Purified mEVs, diluted in NaCl/Hepes buffer, were incubated at 37°C during 30 minutes in the presence of Cell Plasma Membrane Marker (CPMM, Abcam). This protocol allows labelling virtually all cell-derived mEVs (data not shown). Then, mEVs diluted in NaCl/Hepes buffer were then seeded in coated micro-wells and were immobilized in the dark at room temperature in the absence of stirring. Immunofluorescence was performed using monoclonal mouse antibodies against either TF, PSGL-1 or CD-14 (1: 1500).

Laser scanning confocal microscopy

Laser-scanning confocal microscopy (LSCM) was performed using an inverted Leica SP8 confocal microscope (Leica Microsystems SAS) equipped with an Argon Gas laser and an X40 NA=1.4 oil immersion objective. For CPMM detection, excitation was set at 546 nm and

emission filters between 560 and 650 nm. Field of view was set at 1 μm x 1 μm with a 1024x1024 planar matrix (pixel size= 97.6 nm x 97.6 nm).

Image analysis

An automated segmentation method was developed with the ImageJ software (v1.45r, NIH). CPMM staining was first used to identify mEVs and estimate their number and size using automatic Otsu-thresholding and the integrated “particle analysis” setting. CPMM positive particles were estimated using the “ROI manager” of ImageJ. In particular, the Feret’s diameters of the MPs were computed.

Western blot

Lysed mEVs samples were resolved for the western blot on 8% SDS-Page gels (Biorad) gels in reduced (for TF) and non-reduced (for PSGL-1) conditions. Proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane by Fast Blot transfer stacks (BioRad). Blots were blocked with 5% BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France) in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween-20 and then incubated overnight with the same buffer at 1% BSA with either anti-TF or anti-PSGL-1 antibodies (1/1500), followed by incubation with a peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (1/50000, Sigma) and developed by a Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system (GE Healthcare, France) using ImageQuant™ LAS 4000 camera (GE healthcare, France).

Nanoparticle tracking analysis

The size distribution and concentration measurements were performed with a ZetaView® instrument (ZetaView® QUATT-NTA PMX-420, ParticleMetrix, Germany). Before measurements, samples were diluted to the appropriate concentration (between 2×10^7 particles

per ml and 1×10^8 particles per ml) in sterile PBS. Eleven positions were recorded for each sample. The acquisition was performed with the following parameters: laser wavelength: 488nm, Sensitivity: 80, Shutter: 100.

Zeta Potential Measurement

Zeta potential analyses were realized, after 1/100 dilution in NaCl 1 mM, using a NanoZS® apparatus equipped with DTS 1070 cell. All measurements were performed in triplicate at 25 °C, with a dielectric constant of 78.5, a refractive index of 1.33, a viscosity of 0.8872 cP and a cell voltage of 150 V. The zeta potential was calculated from the electrophoretic mobility using the Smoluchowski equation.

Exoview

Three independent batches of EV preparations for each condition were analyzed by ExoView R100 (NanoView Biosciences) following the manufacturer's protocol. Briefly, 35 µL of isolated EVs diluted in Exoview buffer to a concentration of 3×10^8 part/ml (from NTA measurement) were incubated on the ExoView Tetraspanin Chip for human EVs and placed in a 24-well plate for 16 h at room temperature. The chips were washed three times then fixed for 10 min at room temperature with Exoview Cargo Kit Solution C. After three washes, chips were permeabilized with Exoview Cargo Kit solution D. Chips were then incubated 1h with anti-CD63 AlexaFluor-488 (NanoView Biosciences), anti-calnexin AlexaFluor 647 (BD Biosciences) and anti-syntenin AlexaFluor 555 (NanoView Biosciences) antibodies, at a dilution of 400, 400 and 1000 respectively in the Exoview Blocking Solution. The chips were then washed and dried. Finally, the chips were imaged with the ExoScan 3.0 acquisition software and data was analyzed using ExoViewer 3.0 with thresholds set to 400-20000 for the

488nm channel, 300-20000 for the 555nm channel and 710-20000 for the 647nm channel according to the signal on the control isotype chips.

Plasma Clotting time

The effect of mEVs during clot formation was studied by monitoring the change in turbidity in human or mouse plasma using a microplate reader (Fluostar Optima, BMG Labtech). Calcium Chloride (25 mmol/L final concentration) was added to citrated plasma diluted 1:2 in HEPES buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, and 0.4% BSA, pH=7.4) to promote coagulation. Samples were incubated at 37°C with mEVs at increasing doses and absorbance (405 nm) was monitored for 2 hours every 15 seconds at 37°C. When appropriate, anti-TF blocking antibody was also added to inhibit extrinsic pathway clot. Results are expressed as the time to achieve 75% maximal absorbance (75% Clotting time, CT). All experiments were performed in triplicate.

Rotational thromboelastography (ROTEM)

For thromboelastography assays, human fresh blood was drawn into 0.109 mol.L⁻¹ trisodium citrate. Within 30 min, 300 µL of blood was added in EXTEM-S® or INTEM-S® reagents *vial* (-TEM®) in presence of increasing concentrations of mEVs (control, 2, 5 and 20x10⁸) and clotting was monitored. When appropriated, blocking-TF antibody was added to prevent extrinsic pathway activation. Clotting time (CT, seconds), amplitude at 10 minutes (A10), clot formation time (CFT, seconds), maximal clot firmness (MCF, mm) and alpha angle (α angle, °) were measured to characterize and quantify the coagulation activation, clot firmness and clot stability using rotational thromboelastography (ROTEM, TEM®). Blood of healthy donors (Etablissement Français du Sang, Ile de France) was collected and tested with the appropriate

ethics prior approval as stated in the EFS/Inserm U1237 agreement #PLER-UPR/2018/017, ensuring that all donors gave a written informed consent, and providing anonymized samples.

Thrombin generation assay

Thrombin generation measurements were performed pooled platelet free plasma with the ST Genesis® Thrombin Generation System (Stago, Asnières-sur-Seine, France). The reagent STG®-BleedScreen (STG-BLS) was selected since we wanted a test where thrombin generation was initiated by a mixture of procoagulant phospholipids and low picomolar level of human tissue factor (TF), balanced for sensitivity to procoagulant factor deficiencies while minimizing contact activation. Dose-response of mEVs (from 0 – 20×10^8 EVs/mL) was added and thrombin generation studied. When appropriated, anti-TF and Corn Tripsin inhibitor (CTI) were added. A reference plasma and two quality controls for low and normal thrombin generation were tested for parameter normalization. The assay was triggered by dispensing a fluorogenic substrate and CaCl_2 . The following parameters were measured: lag time, peak height, time to peak, endogenous thrombin potential (ETP), ETP inhibition, and velocity index.

Erythrocyte hemolysis assay

The erythrocyte toxicity of the mEVs was conducted as described by Mazzarino et al³² with minor modifications on human blood. Briefly, 1mL of human fresh blood was drawn into 0.109 mol.L⁻¹ trisodium citrate by venous puncture. Erythrocytes were purified by centrifugation at 2000g for 5min and washed three times in 10 mL of saline. Then, 50 μL of purified and washed erythrocytes were added to 950 μL of saline containing different concentrations of mEVs (control, 2, 5 and 20×10^8 /mL final concentration) and incubated in 37 °C under mild agitation. Then, erythrocytes were removed by centrifugation at 2000g for 5 min. Then, the absorbance of the resulting supernatant was measured by UVvis and by spectrometer at 540 nm. Saline

control solution (0.9% NaCl) and distilled water were used as negative (0% lysis) and positive (100% lysis) controls respectively. The hemolysis rate at 540 nm was calculated as follows: Hemolysis rate (%) = $(A_s - A_{c-} / A_{c+} - A_{c-}) \times 100$. Where A_s , A_{c-} and A_{c+} represent the absorbance of the sample, Negative and positive controls respectively³². The experiments were performed in triplicate.

Animals

All experiments were performed on 8 to 12-week-old male Swiss mice (Janvier, France). Animals were maintained under specific pathogen-free conditions at the *Centre Universitaire de Ressources Biologiques* (CURB, Basse-Normandie, France) and all had free access to food and tap water. Experiments were approved by the local ethical committee of Normandy (CENOMEXA, APAFIS#17834). For surgeries, mice were anesthetized with isoflurane 5% and maintained under anesthesia with 2% isoflurane in a 70%/30% gas mixture (N₂O/O₂). The rectal temperature was maintained at 37.5 °C throughout using a feedback-regulated heating system. A catheter was inserted into the tail vein of mice for intravenous administration of mEVs.

Tail Bleeding assay

Animals were anesthetized with isoflurane a mixture of ketamine, xylazine and atropine (at 100, 10 and 1.2 mg/kg, respectively) and body weight (accurate to mg) was obtained. Animals were placed in prone position. A distal 2-mm segment of the tail was amputated with a scalpel. The tail was immediately immersed in a 1.5 mL Eppendorf tube containing isotonic saline pre-warmed in a water bath to 37 °C. The position of the tail was vertical with the tip positioned about 2 cm below the body horizon. Each animal was monitored for 30 min even if bleeding

ceased, to detect any re-bleeding. Bleeding time was determined using a stop clock. The experiment was terminated at the end of 30 min.

When appropriated, animals received i.o. injection of mEVs at 1 mg/kg before (1 minute) or after (1- or 15 minutes) tail amputation.

IntraCranial Hemorrhage (ICH) model

A unilateral striatal injection of collagenase type VII (0.1 U in 1 μ L of saline) was performed after placing Swiss male mice (35 g) in a stereotaxic frame (coordinates: 0.5 mm anterior, 2.5 mm lateral, -3 mm ventral to the bregma). Solutions were injected using a glass micropipette to minimize hemorrhage-unrelated tissular damage. The needle was then removed, the craniotomy closed with surgical wax and the scalp sutured. Mice received an intra-peritoneal injection of buprenorphine (0.03 mg/kg) 20 minutes before and were anesthetized in 2% isoflurane in a mixture of O₂/N₂O 33%/67% with a rectal temperature maintained at 37 °C.

mEVs hemostatic treatment

mEVs were diluted in saline and administered i.v. in 200 μ l bolus (at 1 mg/kg~4x10⁹ EVs, unless otherwise stated). Treatment was given 30 minutes after hemorrhagic stroke. Catheter incision was closed, and mice were allowed to recover.

When appropriate, mEVs solutions were pre-incubated 30 minutes with blocking anti-TF (20 μ g/mL) or anti-PSGL-1 (20 μ g/mL) antibodies before injection, as previously described.

Enoxaparin treatment

Enoxaparin (Sigma-Aldrich) was dissolved in saline and administered i.p. (2 mg/kg) after further dilution in saline (50%/50%). Treatment was given 10 minutes before hemorrhagic stroke.

Warfarin treatment

Warfarin (Tahor, Pfizer) was dissolved in distilled water and administered *per os* (2 mg/kg). Warfarin was given at 36h before hemorrhagic stroke. Coagucheck INRange, a reader for the INR measurement as part of the monitoring of treatment with vitamin K antagonists was used before the surgery to confirm that animals were >1.5 INR index.

Magnetic resonance imaging (MRI)

Experiments were carried out on a Pharmascan 7 T/12 cm system using surface coils (Bruker, Germany). T2-weighted images were acquired using a MSME sequence: TE/TR 51 ms/2500 ms with 70 μm *70 μm *500 μm spatial resolution. 3D T2*-weighted gradient echo imaging with flow compensation (GEFC, spatial resolution of 93 μm *70 μm *70 μm interpolated to an isotropic resolution of 70 μm) with TE/TR 12.6 ms/200 ms and a flip angle (FA) of 24° was performed to visualize MPIOs (acquisition time= 15 min). All T2*-weighted images presented in this study are minimum intensity projections of 4 consecutive slices (yielding a Z resolution of 280 μm). Lesion sizes were quantified blinded to the experimental data on T2-weighted images and signal voids quantification on 3D T2*-weighted images using automatic Otsu thresholding in ImageJ software (v1.45r).

Clinical Neurological Score

All mice were assessed at 4h, 24h using a 6-point Neuroscore scale (0 = no apparent deficit; 1 = slight deficit; 2 = circling; 3 = heavy circling; 4 = no movement; 5 = death) as described by Foerch and collaborators.

Passive IntraCranial Hemorrhage (ICH) model

A unilateral striatal injection of heterologous blood was performed after placing Swiss male mice (35 g) in a stereotaxic frame (coordinates: 0.5 mm anterior, 2.5 mm lateral, -3 mm ventral to the bregma). Heterologous blood was obtained after intracranial puncture in the thorax of anesthetized mice. Blood was drawn into a sterile 26 Gauge needle, which was connected to an infusion system containing a 50 μ L micro-syringe. The 26 Gauge was introduced into the right striatum. At a rate of 1 μ L/min, 5 μ L of blood was infused over 5 minutes followed by a waiting period of 10 minutes to allow clotting of the injected blood within the injection site. Mice received an intra-peritoneal injection of buprenorphine (0.03 mg/kg) 20 minutes before and were anesthetized in 2% isoflurane in a mixture of O₂/N₂O 33%/67% with a rectal temperature maintained at 37 °C.

Statistical analysis

Results are presented as the mean \pm SD. Statistical analyses were performed using Mann-Whitney's U-test. When more than two groups were compared, statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis (for multiple comparisons) followed by post-hoc Mann-Whitney's U-test. When comparing two groups, a p-value $<$ 0.05 was considered significant (two sided).

RESULTS

Generation of large-amounts of monocytic-derived EVs (mEVs) in bioreactors.

Our first objective was to produce mEVs in quantity large enough for *in vivo* studies. To this aim, monocytic cell-line THP-1 were grown in bioreactors and treated with TNF to generate mEVs (Figure 1A). mEVs accumulated in supernatants from TNF-stimulated monocytes and were purified by sequential ultra-centrifugation as previously reported³³. mEVs were labeled using a fixable-cell-plasma-membrane marker (CPMM), immobilized on polydopamine coated micro-wells and detected by laser scanning confocal microscopy (LSCM) using an automated analysis procedure in ImageJ. There was a linear relationship between the number of surface-immobilized mEVs and their concentration (Figure 1B and C). By LSCM, 80% of the apparent MP diameters ranged from 100 nm to 1.2 μm with a median size of 334 nm, which is similar to previously reported EVs sizes (Figure 1C). The few detected EVs with apparent diameter $>1 \mu\text{m}$ may correspond to aggregates of smaller EVs. Then we performed quantitative and morphological analyses by Nanoparticle tracking analysis (NTA using Zetasizer). Results showed that we were able to produce $4 \cdot 10^{10}$ mEVs per batch, corresponding to $\sim 400 \mu\text{g}$ of proteins. (Figure 1D). According to NTA analysis, 95% of the mEVs population had a diameter below 500 nm, and the mean size was 200 nm (Figure 1D and 1E). The discrepancies between LSCM and NTA results are expected given the differences in mEVs processing and measuring methods. Finally, tetraspanin markers (surface markers CD63, CD81 and CD9 and cytosolic Syntenin) were measured by Exoview (Supplemental figure 1). Results show that mEVs produced in bioreactors present the expected markers of extracellular vesicles, including low expression of Calnexin (used as a negative control to differentiate extracellular vesicles from exosomes, as proposed by ISEV recommendations) (Figure 1F). Altogether, these results

demonstrate that mEVs harboring classical markers of extracellular vesicles can be obtained in bioreactors.

Detection of mEVs monocytic-antigens using immunolabelling-LSCM and Immunoblot.

Then, we wanted to confirm that our isolated mEVs present monocytic surface markers, including CD14, Tissue factor (TF, that is known to be up-regulated after TNF stimulation), and P-Selectin Ligand-1 (PSGL-1). To this aim, we used fluorescent immunolabeling and LSCM. We immobilized the mEVs on polydopamine-coated micro-wells and performed high resolution LSCM with or without anti-CD14, anti-TF and anti-PSGL-1 primary antibodies coupled to fluorescently labelled secondary antibodies. No detergent was added to preserve MP membrane integrity and prevent antibody to reach intravesicular antigens. As shown on Figure 2, we were able to detect these three monocytic markers at the surface of mEVs (Figure 2A, 2B and 2C). We confirmed these results by immunoblot of lysed mEVs. As shown on Figure 2D and 2E, mEVs harbored high amounts of TF and PSGL-1 (Figure 2D and 2E). Therefore, we confirmed that our protocol allows production of mEVs harboring both TF and PSGL-1 on their surface.

mEVs pro-coagulant effects are mediated by the activation of the extrinsic pathway *in vitro*.

After having confirmed that the mEVs produced in bioreactors present the expected morphological characteristics and surface markers, we wanted to investigate their hemostatic potential. To that aim, we performed plasma (EVs-depleted) clotting assay using increasing concentrations of purified mEVs. As observed in Figure 3A, mEVs present high pro-coagulant activity reducing the clotting time in a dose-dependent manner. The higher dose (160×10^6 mEVs) was able to reduce the clotting time by more than 53% compared to control condition

(0 EVs) (Figure 3B). To determine if the hemostatic potential was dependent on the activation of FVIIa by TF on the surface of the mEVs, we used a blocking anti-TF antibody (20 µg/mL). As observed in Figure 3C, the addition of anti-TF significantly reduced the pro-coagulant effect of mEVs. To confirm these results and determine whether mEVs activate mainly the extrinsic or the intrinsic coagulation pathways, we repeated the clotting experiments using whole blood and thromboelastrometry (ROTEM). mEVs had an additive effect and reduced the clotting time in a dose-response manner when the coagulation was triggered with kaolin (INTEM-S), which activates the intrinsic pathway (Figure 4A and B). In contrast, no effect was observed when coagulation was triggered by an extrinsic pathway activator (EXTEM-S) (Supplemental figure 2). In other words, the pro-coagulant effect of mEVs is masked in the presence of a full activation of the extrinsic pathway. This result suggests that most of the pro-coagulant effects of mEVs is dependent on the activation of the extrinsic pathway. In line with these results, their pro-coagulant effects in ROTEM experiments were blocked in the presence of an anti-TF antibody (20 µg/mL) (Figure 4C and D).

To further study the effects of mEVs on the coagulation cascade, thrombin generation (TG) activity capacity was measured in the presence of mEVs using ST Genesia TG System (Stago) and STG®-BleedScreen reagent, that uses low picomolar level of TF to trigger coagulation. Dose-response of mEVs (from 0 – 20x10⁸ EVs/mL) showed that the time to peak shortened and the thrombin generated (peak weight) was higher in a EVs dose-dependent manner compared to control (0 EVs) and reference plasma (Supplemental Figure 3). Inhibition of extrinsic pathway using CTI resulted in little or no changes to the TG profile, further indicating that the extrinsic pathway is involved in the procoagulant effect of mEVs (Supplementary Figure 3). Moreover, less thrombin was generated in the presence of an anti-TF antibody (Supplementary Figure 3). Besides, the biocompatibility of mEVs was also briefly investigated *in vitro*. Hemolysis was unaffected by mEVs administration using human blood (Supplemental Figure

4). All these results support that purified mEVs trigger coagulation mainly by the extrinsic coagulation pathway and do not induce hemolysis.

Intravenous injection of mEVs reduces tail bleeding time *in vivo*.

Then, we wanted to study the hemostatic effects of mEVs *in vivo*. To that aim, we used the mouse tail bleeding model, a well-established model to study hemostasis. First, mEVs (1 mg/kg) were injected intra-orbital 1 minute after the tail incision. mEVs administration reduced the bleeding time and blood loss by 55%, compared to the control group (Figure 5A and B). A similar trend in the reduction of bleeding time and blood loss was observed when mEVs were injected 1 minute before incision (reduction of the bleeding time by 68% compared to controls, Figure 5C and D). In contrast, intra-orbital mEVs injection did not significantly reduce the bleeding time or blood loss when administered 15 minutes before tail incision (Figure 5E). This last result suggests that the hemostatic effect is transient, probably because of a short plasmatic half-life of mEVs. Overall, these results demonstrate that intra-orbital injection of exogenous mEVs reduces bleeding time in mice.

Dose-response study of mEVs in a model of intracranial hemorrhage (ICH) in mice.

We further evaluated the ability of mEVs to promote hemostasis in an ICH model in mice, induced by the intrastriatal injection of collagenase VII (Figure 6A). In this model, mEVs infusion was performed 30 minutes after the onset of ICH. We first performed a pilot dose-response study of mEVs (from 0 to 1 mg/kg) (Figure 6A). Hematoma volume was quantified by MRI at 24h and neurological deficits were measured at 4h and 24h post-ICH (Figure 6B). Only mEVs at the highest dose (1 mg/kg) significantly reduced ICH volume (Figure 6C) and improved neurological score at 24h (Figure 6D and E) compared to control mice (n=5/group).

Moreover, there was a dose-response relationship between mEVs and ICH volume (p for trend <0.05).

mEVs with hemostatic potential improve stroke outcome in mild and severe hemorrhagic strokes.

Thereafter, we wanted to confirm the results of our pilot dose-response experiment using a larger number of animals per group. We selected the 1 mg/kg mEVs dose according to our previous results (Figure 7A). In a confirmatory experiment involving 15 mice per group, mEVs administration at 1 mg/kg, 30 minutes after ICH onset, reduced the ICH volume by 43% (Figure 7B and C) and improved neurological score at 4h and 24h compared to control mice (Figure 7D and 7E, $p<0.01$). Then, we wanted to confirm if this beneficial effect was also present in a more severe model of ICH. To mimic a frequent clinical situation where ICH occurs in anticoagulated patients, we pre-treated the mice with either enoxaparin (2 mg/kg i.p., 10 minutes before collagenase injection) or warfarin (2 mg/kg *per os*, 36 hours before collagenase injection). Enoxaparin pre-treatment led to larger hematoma volumes (from ~ 18 to ~ 24 mm³). Intravenous injection of mEVs also presented beneficial effect in enoxaparin treated mice (Figure 8A), reducing by 40% the hematoma volume (Figure 8B-C) and improving the clinical score at 24h compared to control mice (Figure 8D-F). Mice pre-treated with warfarin presented low survival rates in the ICH model. The averaged survival rate increased from 12.5% to 55% after intravenous injection of mEVs compared to control mice ($p<0.05$, Supplemental Figure 6).

The beneficial effects of mEVs in ICH are mediated by both TF and PSGL-1.

To gain mechanistic insights on the beneficial effect of mEVs in ICH, we studied the role of two key proteins harbored at the surface of mEVs: TF and PSGL-1. The role of mEVs

expressing TF in clot propagation has been established *in vivo* in previous studies, but the ability of exogenous mEVs to localize to sites of injury and locally promote hemostasis remains unknown. To examine this hypothesis *in vivo*, mEVs were preincubated with either TF-blocking antibodies or control isotype antibodies and tested in the collagenase-induced ICH model (Figure 9A). Blocked-TF-mEVs showed no beneficial effect as compared to control mEVs in terms of hematoma volume (Figure 9B and C) and clinical score (Figure 9D-F). This result supports the key role of TF in the beneficial effect of mEVs.

Previous work demonstrated that incorporation of monocyte-derived, TF-positive EVs into a thrombus is mediated by the interaction of PSGL-1 on the surface of the EVs with P-selectin on the surface of activated platelets and endothelial cells. Thus, we wanted to confirm that the beneficial effect of mEVs administration in ICH was dependent on PSGL-1 binding on P-Selectin. To examine this hypothesis *in vivo*, mEVs were preincubated with either PSGL-1-blocking antibodies or control isotype antibodies and tested in the collagenase-induced ICH model (Figure 10A-B). As observed in Figure 10C, PSGL-1 blocked mEVs failed to reduce ICH volume or to improve the clinical score at 24h (Figure 10D and E). Therefore, these results support that both TF and PSGL-1 at the surface of the mEVs are critical for their beneficial effect.

mEVs do not worsen ICH outcome in an ICH model involving direct intracranial heterologous blood injection.

One of the risks associated with the use of hemostatic agents at the acute phase of ICH is the potential aggravation of ischemia and oedema occurring at the periphery of the hematoma. Thus, to isolate the putative deleterious effects of mEVs from their beneficial effects, we used an ICH model that consists in the direct injection of heterologous blood. In this model devoid of active bleeding, we treated the mice with mEVs (1 mg/kg) and assessed edema and lesion

size at 24 hours by T2 and diffusion weighted images. mEVs neither aggravated edema nor lesion size compared to control, supporting a favorable *safety* profile (Supplemental Figure 5).

Shear stress triggered secretion allows scalable and good manufacturing practice compatible production of hemostatic mEVs.

Given the favorable efficacy and *safety* profiles of mEVs, we wanted to develop a method of mEVs production that was scalable and compatible with good manufacturing practice (GMP) to pave the way for clinical use. To this aim, we used a method of *shear stress* triggered mEVs secretion in large bioreactors containing THP-1 monocytes (Figure 11A). This method is scalable, GMP compatible and commercially available^{34,35}(Everzom, Paris, France). The GMP compatible mEVs produced using this method were characterized *in vitro* to confirm that they present similar characteristics as the mEVs used in the previous experiments, in terms of surface markers (Figure 11B, C and D), hemostatic capacity (Figure 11E and F) and TF and PSGL-1 presence (Figure 11G). Then, they were tested *in vivo* in the collagenase induced ICH model. As shown in Figure 11H-L, these GMP compatible mEVs showed comparable beneficial effects in terms of ICH volume (Figure 11I and J) and clinical scores at 4h and 24h (Figure 11K and L).

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that intravenous injection of exogenous mEVs improves outcome in preclinical models of ICH. This effect is dependent on the activation of the extrinsic pathway of coagulation and on surface exposed TF and PSGL-1. Importantly, the *safety* profile of this new hemostatic agent appears favorable since no deleterious effect was detected in a model of ICH that does not involve active bleeding. Moreover, we demonstrated the feasibility of producing hemostatic mEVs using a scalable and GMP-compatible method, paving the way for clinical translation.

Previous studies demonstrated that the accumulation of TF into developing thrombi *in vivo* is dependent upon EVs PSGL-1 and platelet P-selectin^{30, 31}. Our results using blocking antibodies support this conceptual model of thrombus formation during ICH since blockade of either TF or PSGL-1 blunts the beneficial effect of exogenous mEVs. Mechanistically, circulating mEVs bind on the surface of developing thrombi expressing P-Selectin at the site of intracranial active bleeding and triggers the generation of thrombin by a TF-dependent mechanism. This favors the formation of stable hemostatic thrombus and improves ICH outcome.

The ability to target the pro-coagulant agent to the site of bleeding appears mandatory for clinical efficacy. Indeed, clinical trials using recombinant activated factor VII have shown deleterious arterial thrombotic events in patients who received the drug in the context of ICH²⁴. These deleterious effects limit the injectable dose of the hemostatic agent and require making a trade-off between the magnitude of the reduction in ICH volumes and the frequency of deleterious ischemic events. By allowing targeted activation of the coagulation cascade, mEVs could allow to reduce the side-effects and therefore to reach local concentration high enough to stop the active bleeding.

Several issues remained to be overcome to translate the present findings from mice to humans. First, we used a monocytic cell line (THP-1) to generate the mEVs. It is still unclear whether this immortalized cell line is suitable for the generation of EVs for clinical use. Several alternatives are available such as the use of primary monocytes from blood donors, the engineering of another cell line to express TF and PSGL-1 or the use of artificial vesicles (such as liposomes)³⁶. Second, the mEVs should be produced using a GMP compliant method. In this regard, our results using *shear stress* triggered mEVs secretion in large bioreactors are promising³⁴. Third, mEVs should be injected as soon as possible after ICH onset to block active bleeding and reduce the final ICH volume. Identification of the spot sign on computed tomography (associated with active bleeding and hematoma growth) could help to select the patients who are the most likely to benefit from hemostatic therapy, but clinical trials have been disappointing to date³⁷. Fourth, the immunologic response to exogenous mEVs remains poorly studied³⁸. We can however speculate that this would not be a critical issue in the context of a once-in-a-lifetime administration.

Beyond the potential clinical application, our study further emphasizes the role of EVs in hemostasis. The expected concentration of mEVs after intravenous injection in the plasma of the mice used in the present study is in the order of magnitude of total circulating EVs in healthy or pathological conditions (between 10^9 and 10^{11} EVs per ml of plasma as assessed by NTA) in humans³⁹. This suggests that endogenous mEVs could have a significant role in hemostasis, in addition to their role in thrombosis as previously demonstrated. Whether EVs from other parental cells (especially platelets and erythrocytes) could also participate in hemostasis and be used as a treatment of ICH remains to be investigated^{40,41}. Our results suggest that they should be less effective than mEVs since they do not co-express TF and PSGL-1.

CONCLUSION

Overall, our study demonstrates the hemostatic effect of exogenous mEVs in the context of ICH. The presence of PSGL-1 and TF on their surface appears key for their hemostatic effect, supporting that the ability to accumulate on developing thrombi by binding P-Selectin and to activate the extrinsic pathway of coagulation is mandatory for EVs to efficiently stop bleeding in the context of ICH. This result has implication for the design of hemostatic agents and for our understanding of the role of endogenous EVs in hemostasis. Clinical translation of these results will require development in the field of large scale EVs production, such as *shear stress* triggered mEVs secretion in large bioreactors.

CONFLICT OF INTEREST

Florence Gazeau, Amanda Karine Andriola Silva are co-founders of the spin-off Evora Biosciences. Amanda Karine Andriola Silva, is co-founders of the spin-off EverZom. The other authors have no conflicts to declare.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Agence Nationale de la Recherche “FLAMRING” ANR-20-CE19-0032-01 (SMdL), ANR-18-IDEX-0001, IdEx Université de Paris and by the Region Ile de France under the convention SESAME 2019 - IVETH (n° EX047011) (FG, AKS). This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union’s Horizon 2020 research and innovation program (grant agreement No. 852791 and 648779) and the L'Oréal-UNESCO For Women in Science French Fellowship Program (SMdL, 2014). MG is funded by the “Fondation Bettencourt Schueller” for a CCA-Inserm-Bettencourt position.

FIGURES

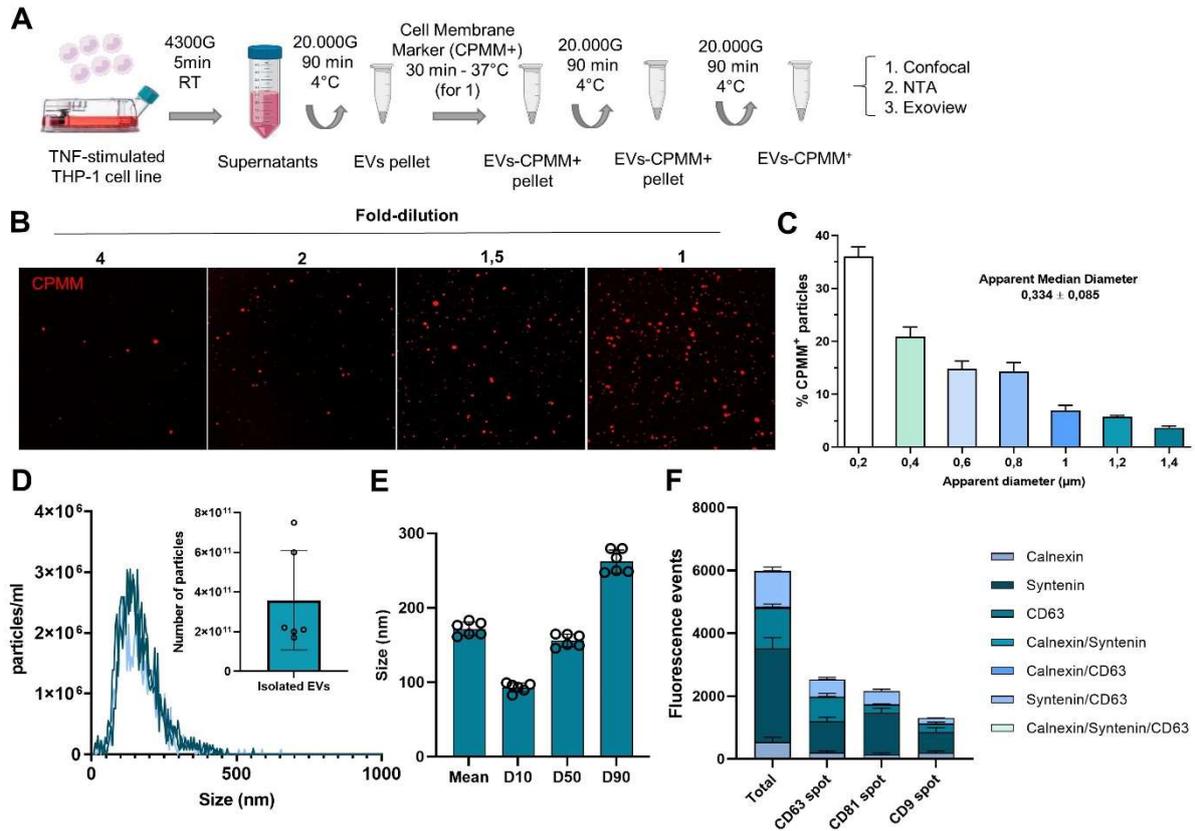


Figure 1

Generation and morphological characterization of purified mEVs by Laser Scanner Confocal Microscopy (LSCM), Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) and Exoview techniques. (A) Procedure to produce and purify mEVs from THP-1 cells in bioreactors (B) Dose-dependent detection of immobilized mEVs (CPMM⁺, red) using LSCM. (C) CPMM⁺ mEVs distribution depending on their size, including the apparent median diameter (0.334 ±/− 0.085 μm). (D) Size distributions and total mEVs number measured by NTA. (E) Mean, median (D50), 10th (D10) and 90th (D90) centile of size distributions. (F) Fluorescence events measured on Exoview chips for each tetraspanin (CD63, CD81 and CD9) spots showing the colocalization of the secondary antibodies. All experiments were performed in n=3 independent batches of isolated mEVs produced in bioreactors, error bars representing the SEM.

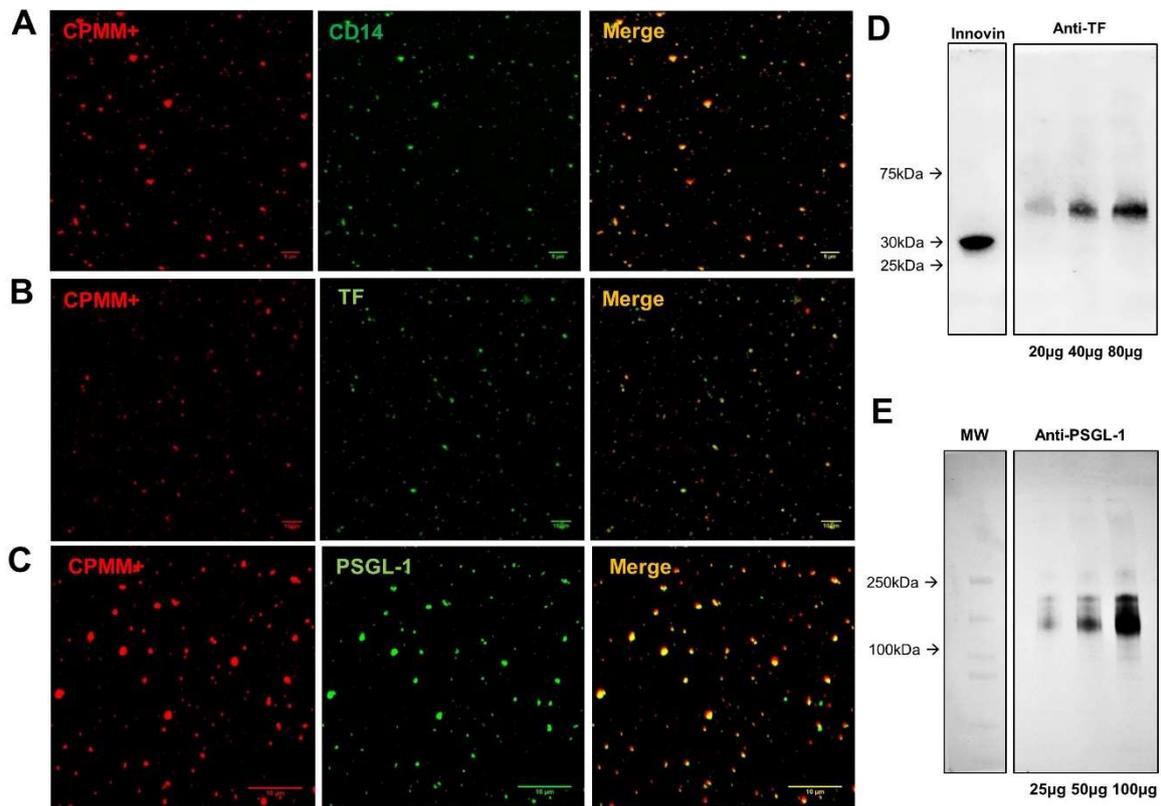


Figure 2

Monocyte-derived morphological characterization of purified mEVs by LSCM and Western blot (CD14, TF and PSGL-1 markers). Representative LSCM images of purified mEVs (CPMM⁺, red) immunostained for (A) CD14 (B) anti-TF and (C) anti-PSGL-1 (green) showing numerous positive events. (D) Representative Western Blot images of TF and (E) PSGL-1 after migration of the lysed proteins of mEVs. Innovin was used as control for TF immunoreactivity. All experiments were performed in n=3 independent batches of isolated mEVs produced in bioreactors.

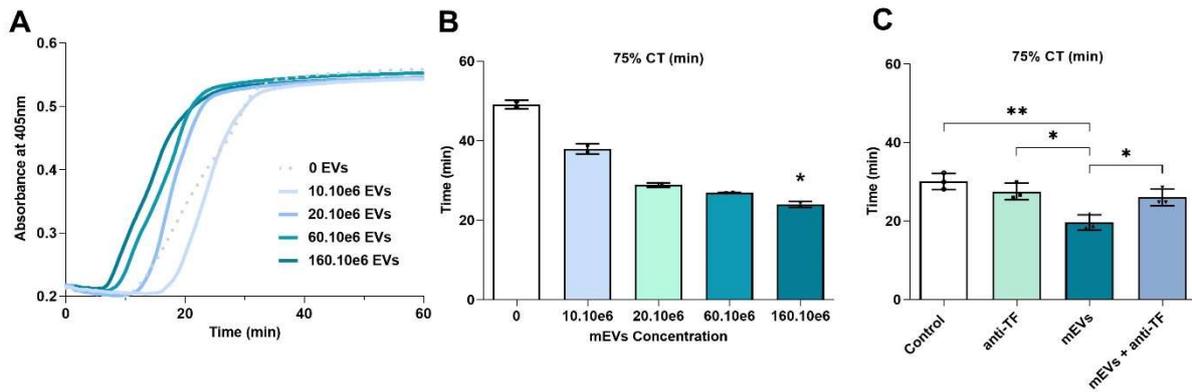


Figure 3

Functional characterization of purified mEVs in plasma clotting time *in vitro*. (A) Kinetics of clot formation at different concentrations of mEVs (0, 10, 20, 60 and 160x10⁶) in a turbidimetric assay in human plasma (EVs depleted). (B) Quantitative analysis of 75% of clotting time (75% CT), revealing that mEVs significantly shorten coagulation, without significant effects at lower concentrations. (C) Quantitative analysis of 75% CT, revealing that anti-TF blocked mEVs-mediated coagulation at the highest concentration studied (160x10⁶ mEVs). All experiments were performed in triplicate and independently replicated 3 times (n=3). (*p<0.05 and p<0.01 versus 0 mEVs condition, unless otherwise stated). CT= Clotting time.

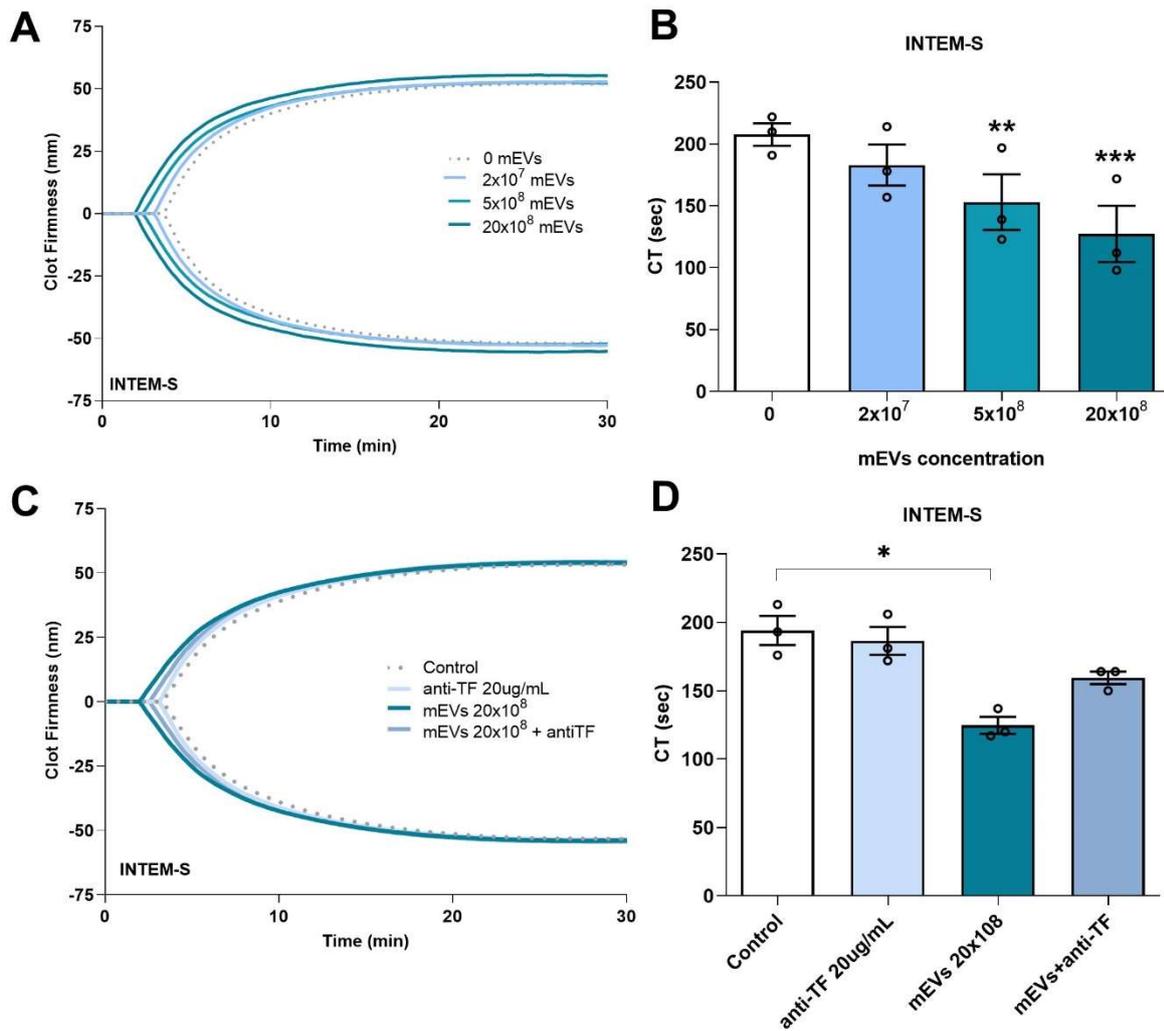


Figure 4

Functional characterization of purified mEVs using ROTEM (INTEM-S). Dose-dependent effects of mEVs on ROTEM parameters using human whole blood. **(A)** Representative ROTEM profiles of human whole blood incubated with different concentrations of mEVs (control, 0.2 , 5 and 20×10^8). **(B)** Corresponding quantifications showing reduction of clotting time in a dose-dependent manner after mEVs addition. **(C)** Representative ROTEM profiles of human whole blood incubated with the highest concentration of mEVs (20×10^8) in the presence or absence of anti-TF. **(D)** Corresponding quantifications revealing that anti-TF blocked mEVs-mediated coagulation at the highest concentration studied c (20×10^8 mEVs). All experiments were performed independently replicated in 3 different donors (n=3). (*p<0.05 and p<0.01). CT= Clotting time.

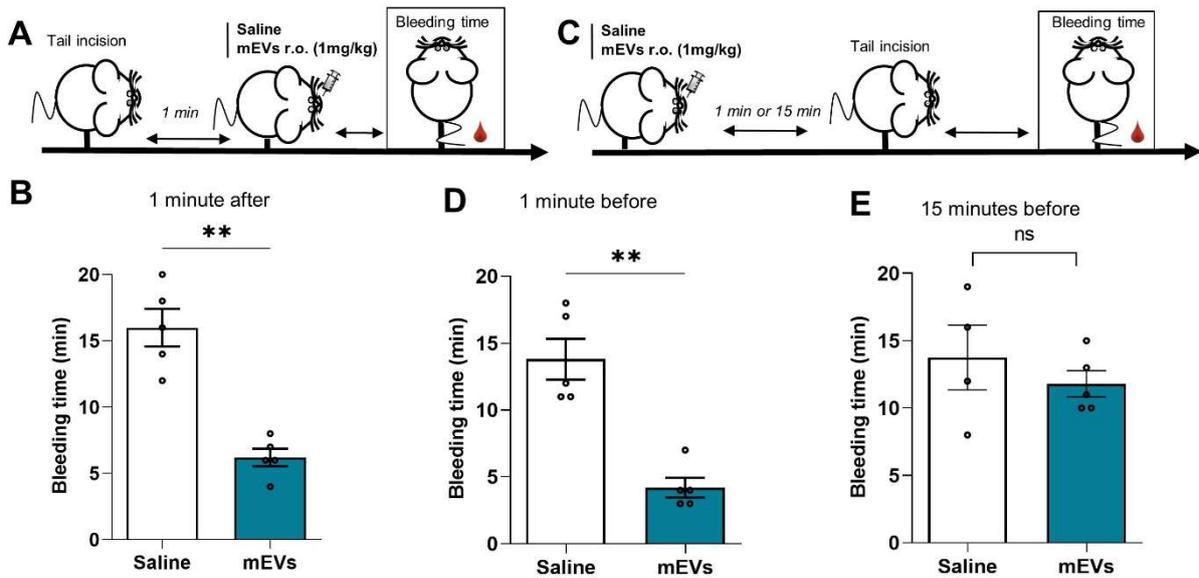


Figure 5

Hemostatic action of mEVs in a mouse tail bleeding model. (A) Schematic representation of the procedure where EVs were injected (1 mg/kg~ 4×10^9 EVs, retro-orbital) 1 minute after tail incision (B) Hemostatic efficacy of mEVs administration compared to control (saline, n = 5 mice/group) (C) Schematic representation of the procedure where EVs were injected (1 mg/kg, retro-orbital) 1- or 15 minutes before tail incision. (D and E) Hemostatic efficacy of mEVs compared to control (saline, n = 5 mice/group). All data are means \pm SEM; (** $p < 0.01$). ns, not significant.

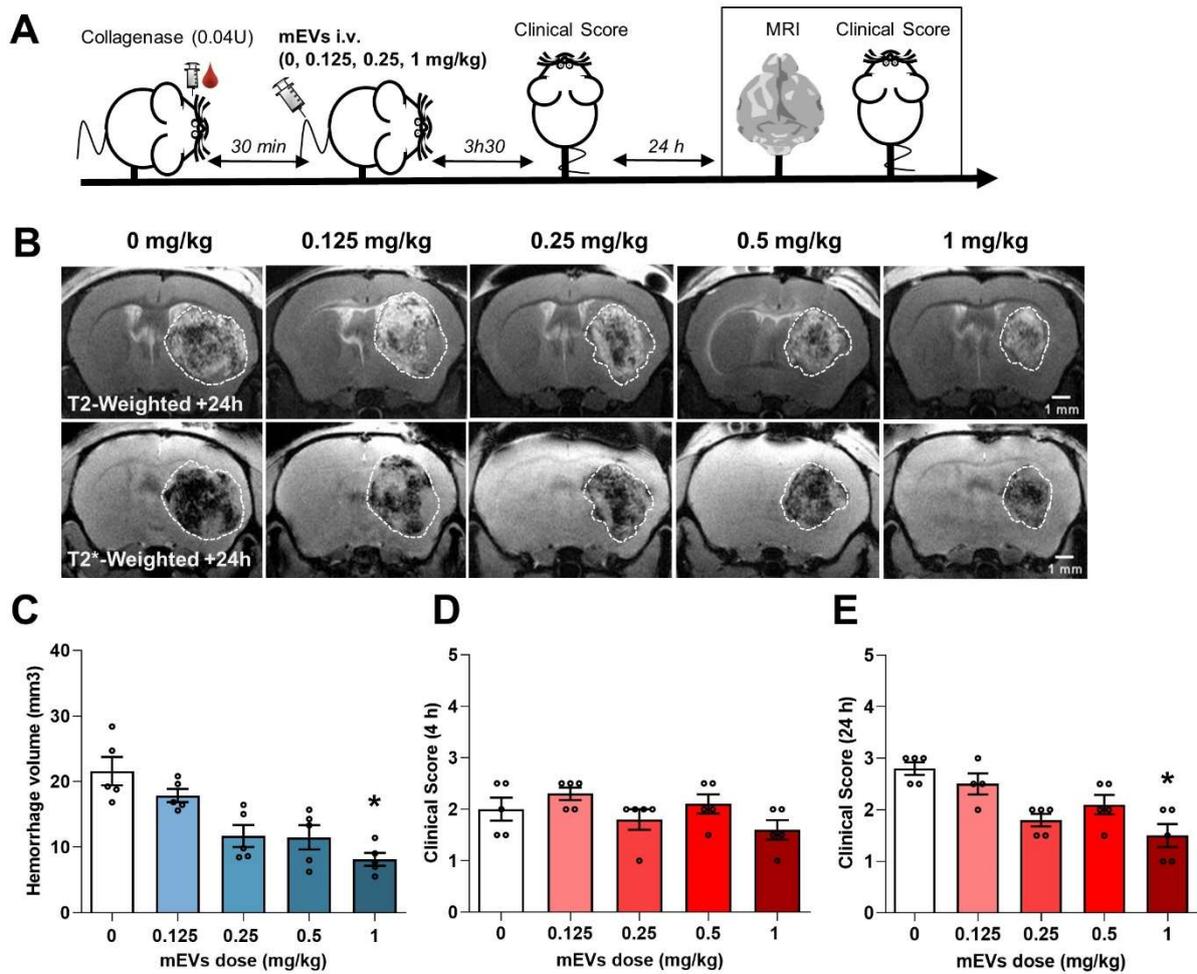


Figure 6

mEVs pilot study. Effect of different concentrations of mEVs (0, 0.125, 0.25, 0.5 and 1 mg/kg) on hematoma expansion in mild model of ICH (collagenase intra-striatal injection). **(A)** Schematic overview of the experimental protocol. **(B)** Representative T2 and T2*-Weighted MRI images at 24 hours of controls and mice receiving mEVs i.v. injection at all doses. **(C)** Hematoma volume at 24 hours in controls and the treated mice receiving mEVs at all doses (0, 0.125, 0.25, 0.5 and 1 mg/kg) (n=5 per group). **(D and E)** Clinical Score at 4 hours and 24 hours. *p<0.05 vs control (0 mg/kg).

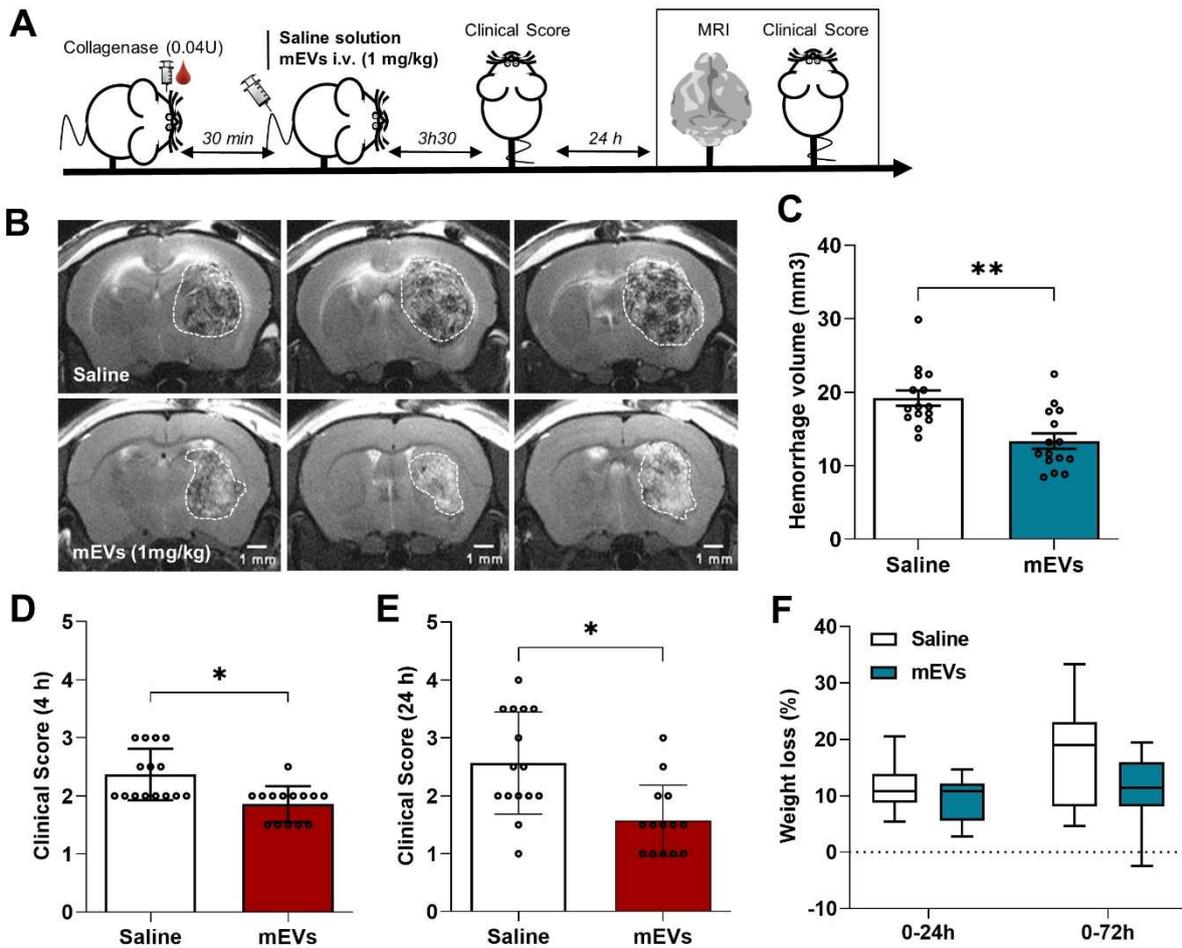


Figure 7

mEVs efficiently reduce hematoma growth and clinical outcome in mild-ICH stroke model. Effect of mEVs administration (1 mg/kg $\sim 4 \times 10^9$ EVs) on hematoma expansion in a mild model of ICH (collagenase intra-striatal injection). **(A)** Schematic overview of the experimental protocol. **(B)** Representative T2*-Weighted MRI images at 24 hours of control (saline) and treated mice (mEVs). **(C)** Hematoma volume at 24 hours in controls and the treated mice (mEVs, 1 mg/kg) (n=15 per group). **(D and E)** Clinical Score at 4 hours and 24 hours. **(F)** Percentage of weight loss (%) in both groups at 0-24h and 0-72h. *p<0.05 and *p<0.01 vs control (saline).

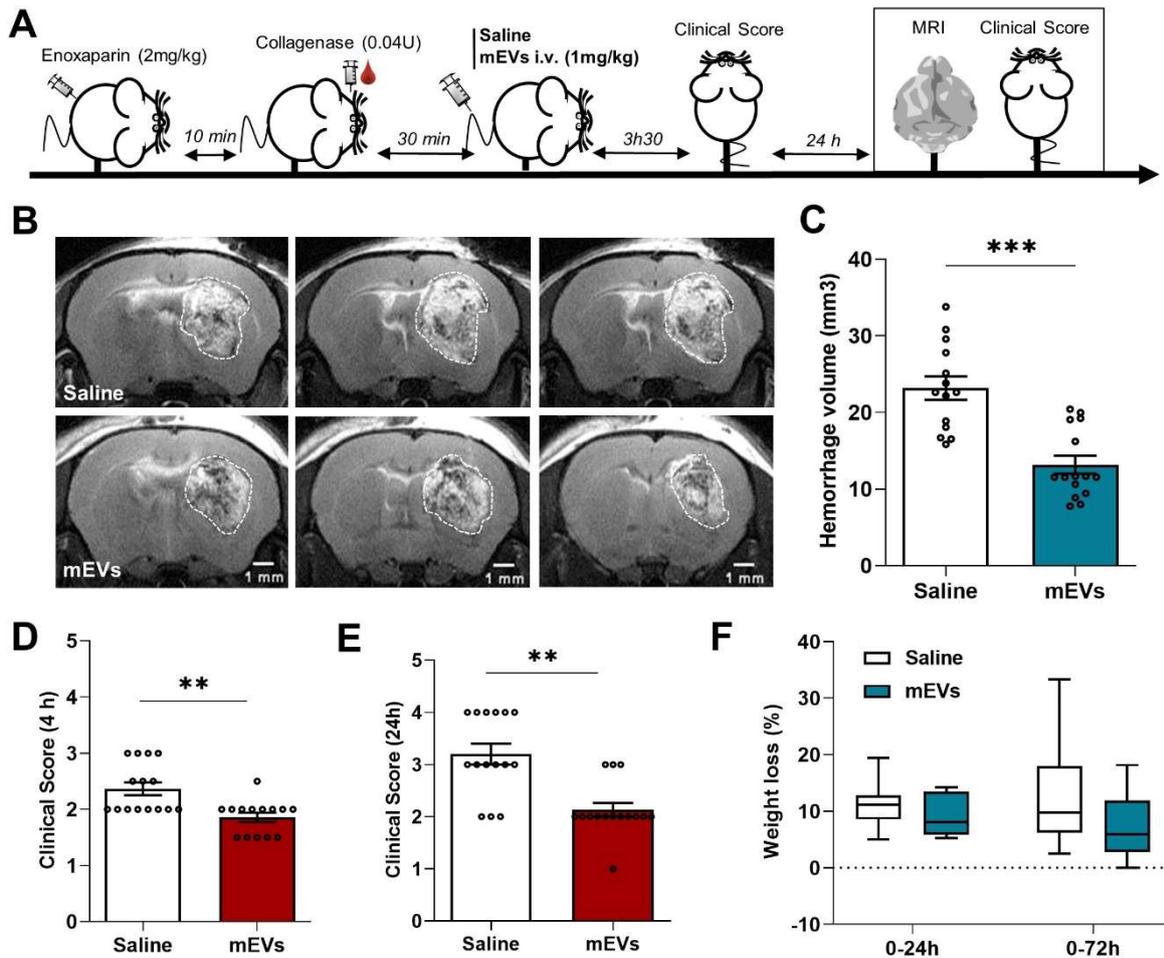


Figure 8

mEVs efficiently reduce hematoma growth and clinical outcome in severe-ICH stroke model. Effect of mEVs administration (1 mg/kg~ 4×10^9 EVs) on hematoma expansion in a severe model of ICH of anticoagulated mice (enoxaparin treatment and collagenase intra-striatal injection). **(A)** Schematic overview of the experimental protocol. **(B)** Representative T2*-Weighted MRI images at 24 hours of control (saline) and treated mice (mEVs). **(C)** Hematoma volume at 24 hours in controls and the treated mice (mEVs, 1 mg/kg) (n=15 per group). **(D and E)** Clinical Score at 4 hours and 24 hours. **(F)** Percentage of weight loss (%) in both groups at 0-24h and 0-72h. **p<0.01 and ***p<0.001 vs control (saline).

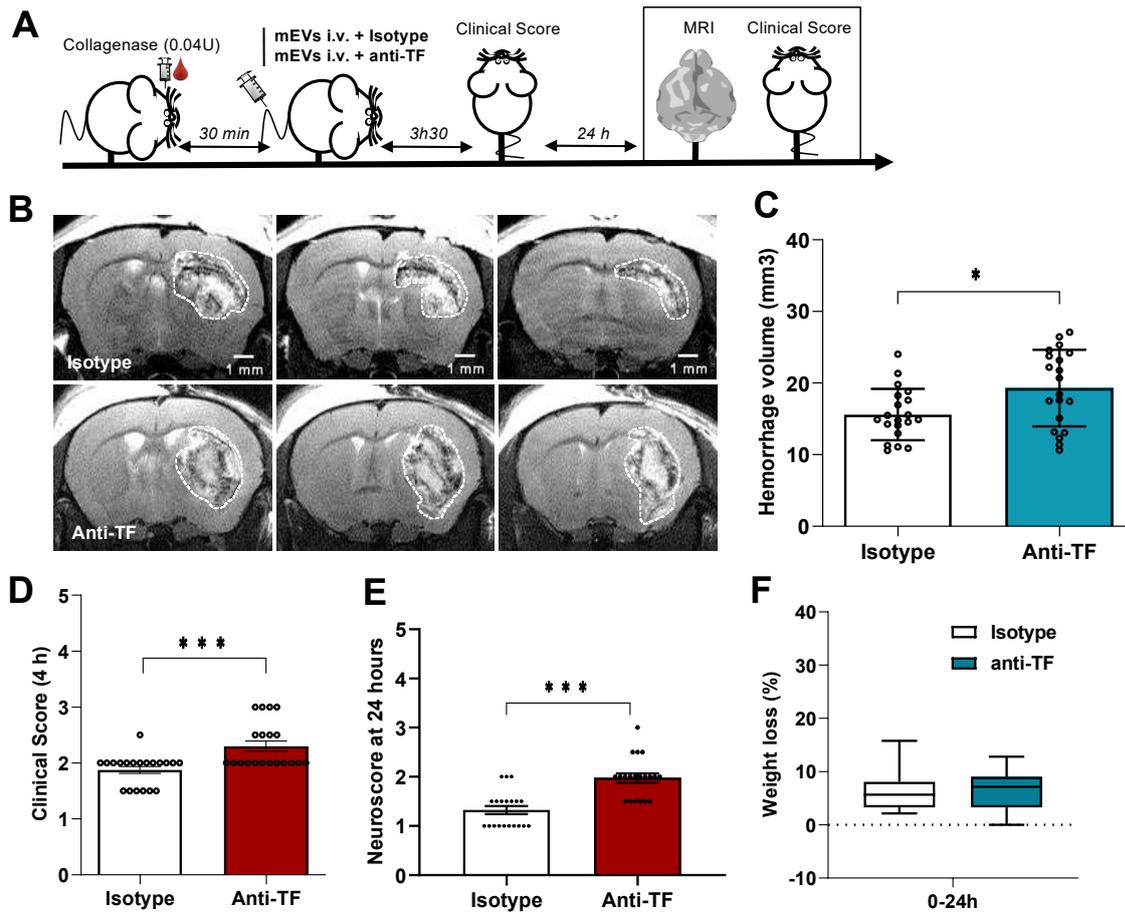


Figure 9

mEVs beneficial effect on hematoma growth and clinical outcome is dependent on TF activation. Effect of mEVs administration (1 mg/kg~ 4×10^9 EVs) on hematoma expansion in a mild model of ICH (collagenase intra-striatal injection). For this experience mEVs were pre-incubated with either anti-TF blocking antibody or their respective Isotype control. **(A)** Schematic overview of the experimental protocol. **(B)** Representative T2*-Weighted MRI images at 24 hours of control (isotype-EVs) and anti-TF treated mice (anti-TF-mEVs). **(C)** Hematoma volume at 24 hours in control (isotype-EVs) and anti-TF mice (anti-TF-mEVs) (n=20 per group). **(D and E)** Clinical Score at 4 hours and 24 hours. **(F)** Percentage of weight loss (%) in both groups at 0-24h and 0-72h. **p<0.01 and ***p<0.001 vs control (saline).

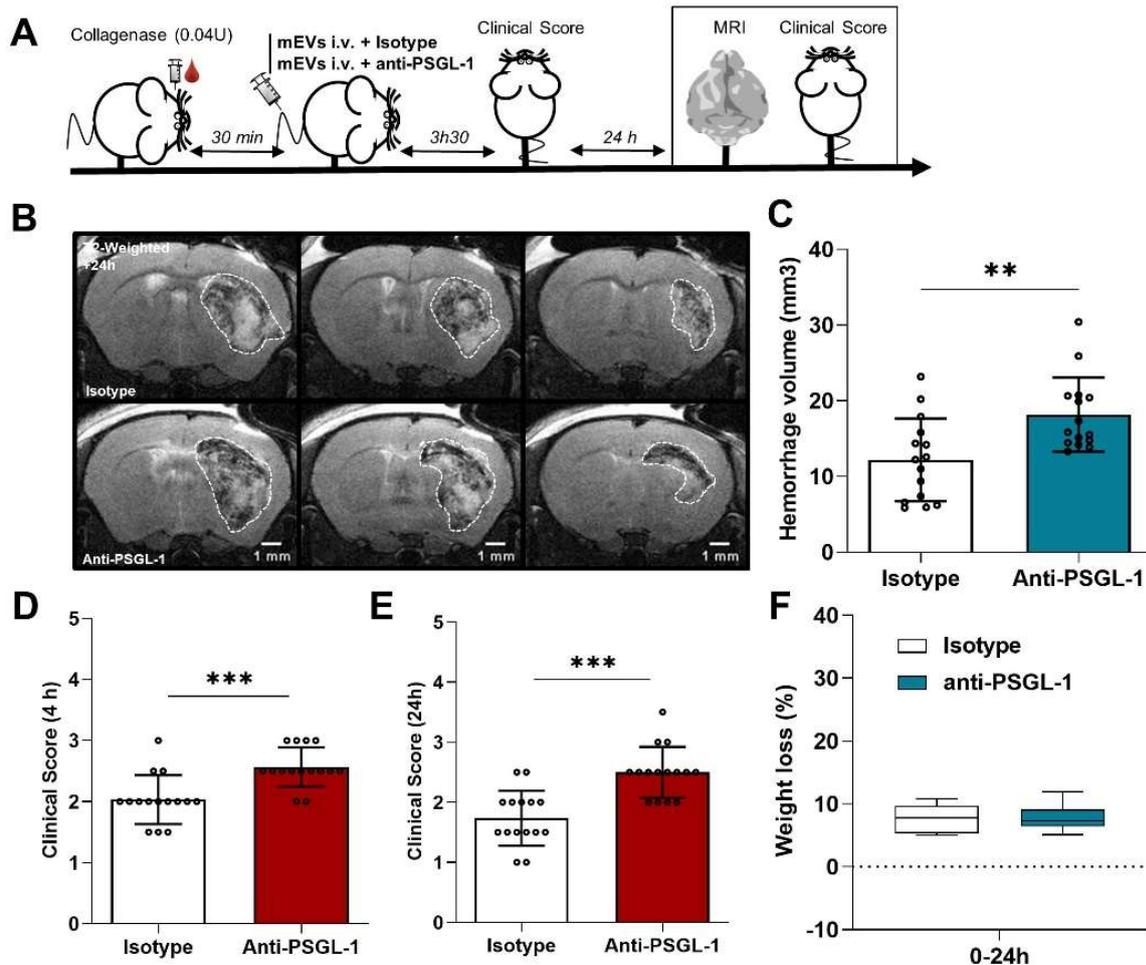


Figure 10

mEVs beneficial effect on hematoma growth and clinical outcome is dependent on PSGL-1 binding. Effect of mEVs administration (1 mg/kg~ 4x10⁹ EVs) on hematoma expansion in a mild model of ICH (collagenase intra-striatal injection). For this experience mEVs were pre-incubated with either anti-PSGL-1 blocking antibody or their respective Isotype control. **(A)** Schematic overview of the experimental protocol. **(B)** Representative T2*-Weighted MRI images at 24 hours of control (isotype-EVs) and anti-PSGL-1 treated mice (anti-PSGL-1-mEVs). **(C)** Hematoma volume at 24 hours in control (isotype-EVs) and anti-PSGL-1mice (anti-PSGL-1-mEVs) (n=15 per group). **(D and E)** Clinical Score at 4 hours and 24 hours. **(F)** Percentage of weight loss (%) in both groups at 0-24h and 0-72h. **p<0.01 and ***p<0.001 vs control (saline).

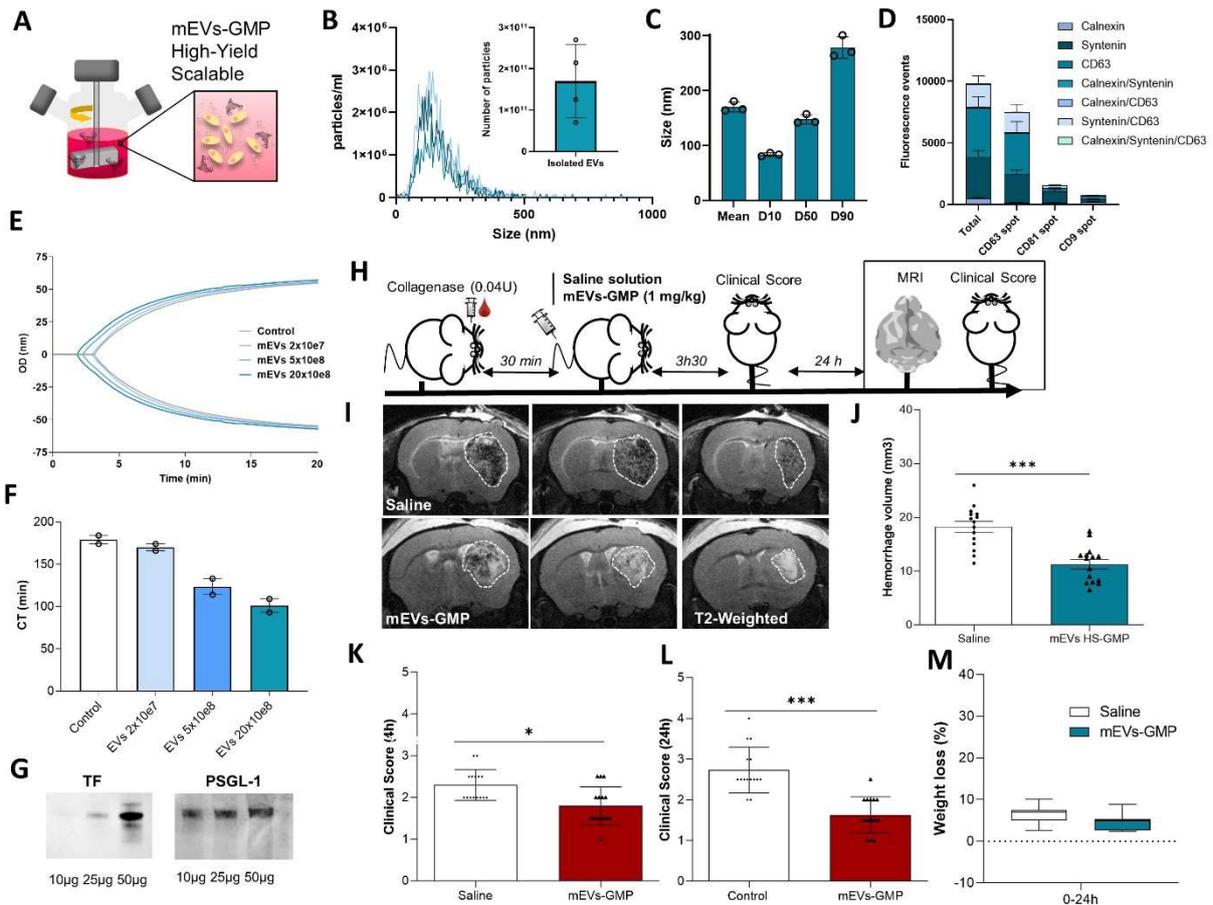


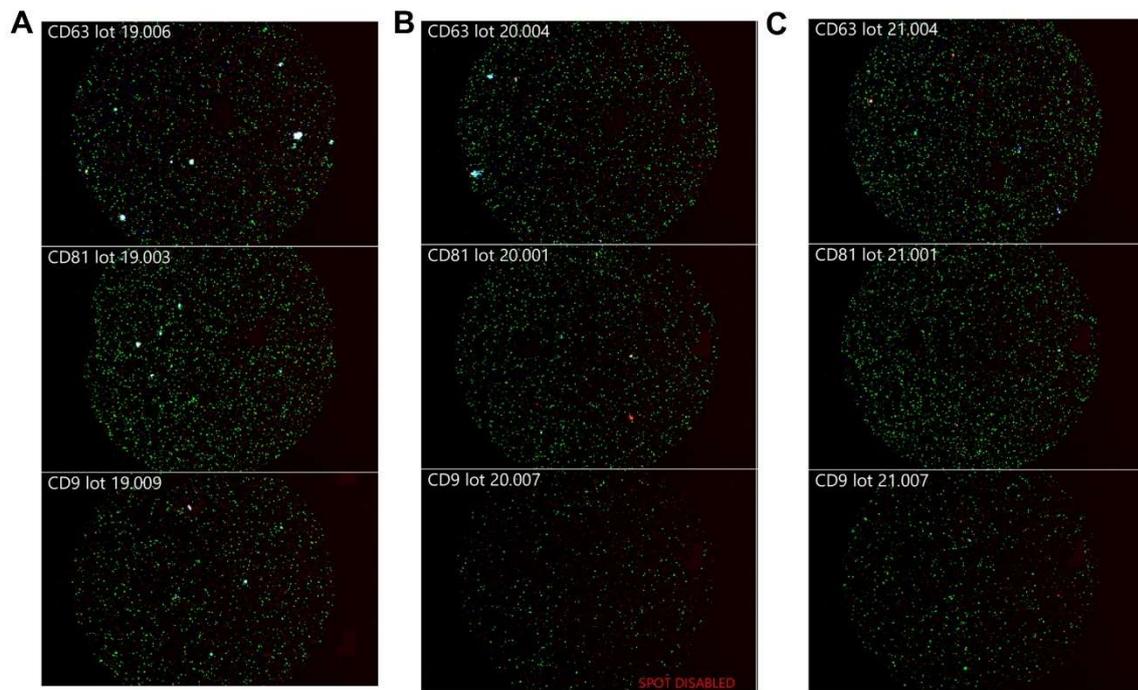
Figure 11

GMP-mEVs present same morphological and functional characteristics as mEVs, and also efficiently reduce hematoma growth and clinical outcome in mild-ICH stroke model.

(A) Procedure to produce GMP-mEVs from THP-1 cells in turbulense bioreactors **(B)** Size distributions and total GMP-mEVs number measured by NTA. **(C)** Mean, median (D50), 10th (D10) and 90th (D90) centile of size distributions. **(D)** Fluorescence events measured on Exoview chips for each tetraspanin (CD63, CD81 and CD9) spot showing the colocalization of the secondary antibodies. (n=3 independent batches). **(E)** Representative ROTEM profiles of human whole blood incubated with different concentrations of GMP-mEVs (control, 0.2, 5 and 20x10⁸). **(F)** Corresponding quantifications showing reduction of clotting time in a dose-dependent manner after GMP-mEVs addition. (n=2). CT= Clotting time. **(G)** Representative Western Blot images of TF and PSGL-1 of GMP-mEVs. **(H)** Schematic overview of the experimental protocol of the effect of GMP-mEVs administration (1 mg/kg ~ 4x10⁹ EVs) on hematoma expansion in a mild model of ICH (collagenase intra-striatal injection). **(I)** Representative T2*-Weighted MRI images at 24 hours of control (saline) and treated mice (GMP-mEVs). **(J)** Hematoma volume at 24 hours in controls and the treated mice (GMP-

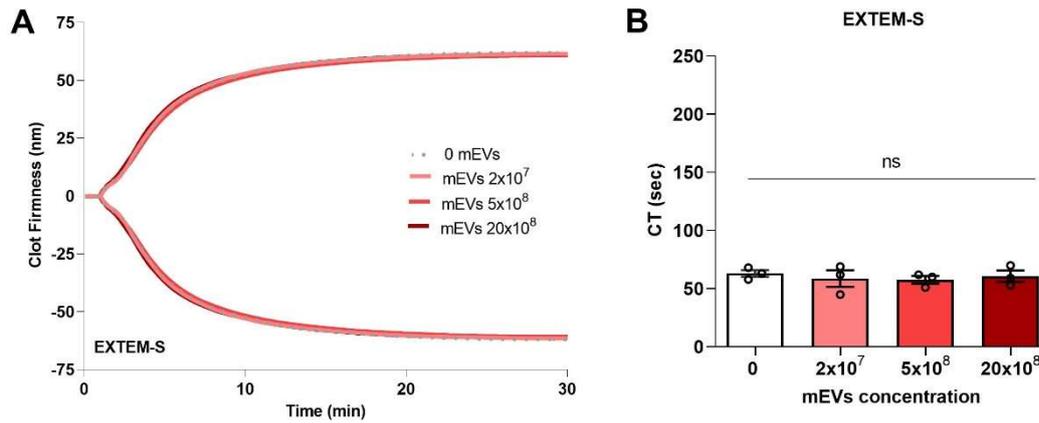
mEVs) (n=15 per group). **(K and L)** Clinical Score at 4 hours and 24 hours. **(M)** Percentage of weight loss (%) in both groups at 0-24h and 0-72h. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs control (saline).

SUPPLEMENTAL FIGURES



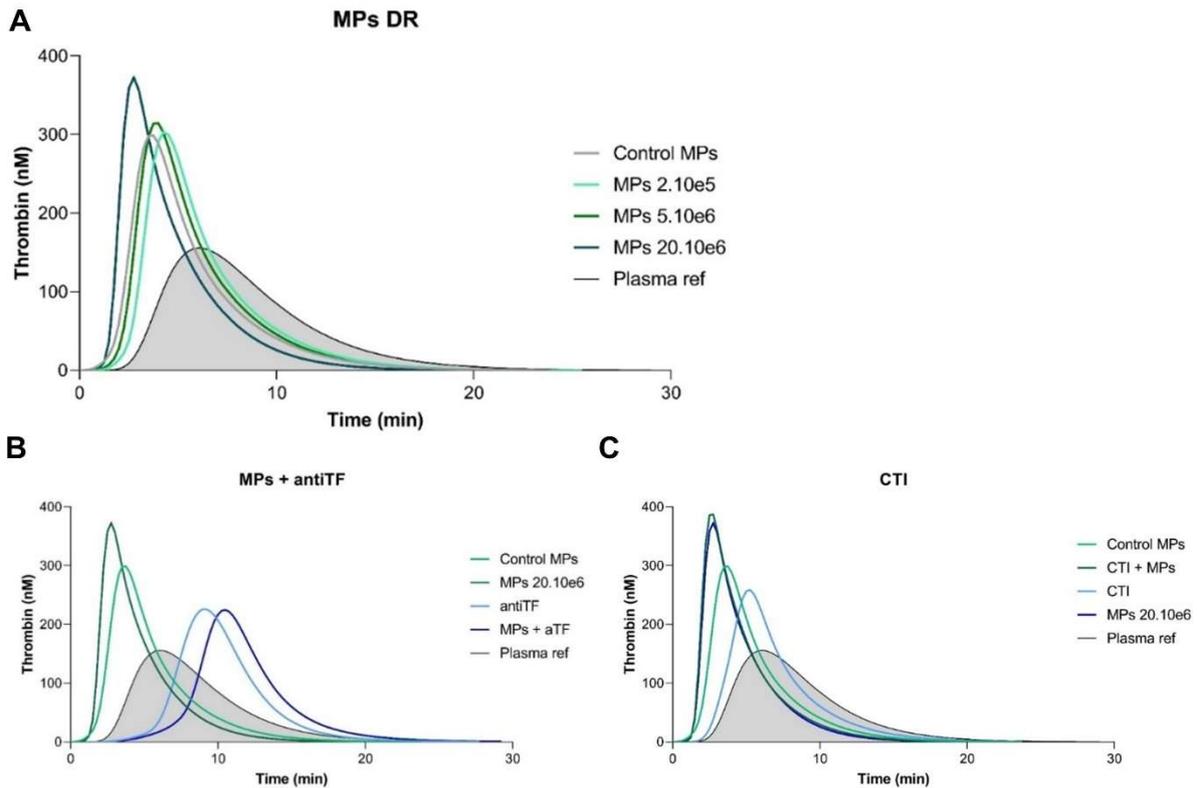
Supplemental Figure 1

Exoview analyses of tetraspanin presentation on mEVs derived from 3 independent batches. (A) for lot 19, (B) for lot 20 and (C) for lot 21. Unlabeled EV were captured on CD63, CD81, or CD9 antibody chips. Bound EV were stained with anti-CD9-AF488 (green), anti-CD81-AF488 (green), and anti-CD63-AF488 (green). The intensity of each fluorescent antibody signal reflects the relative abundance of each tetraspanin.



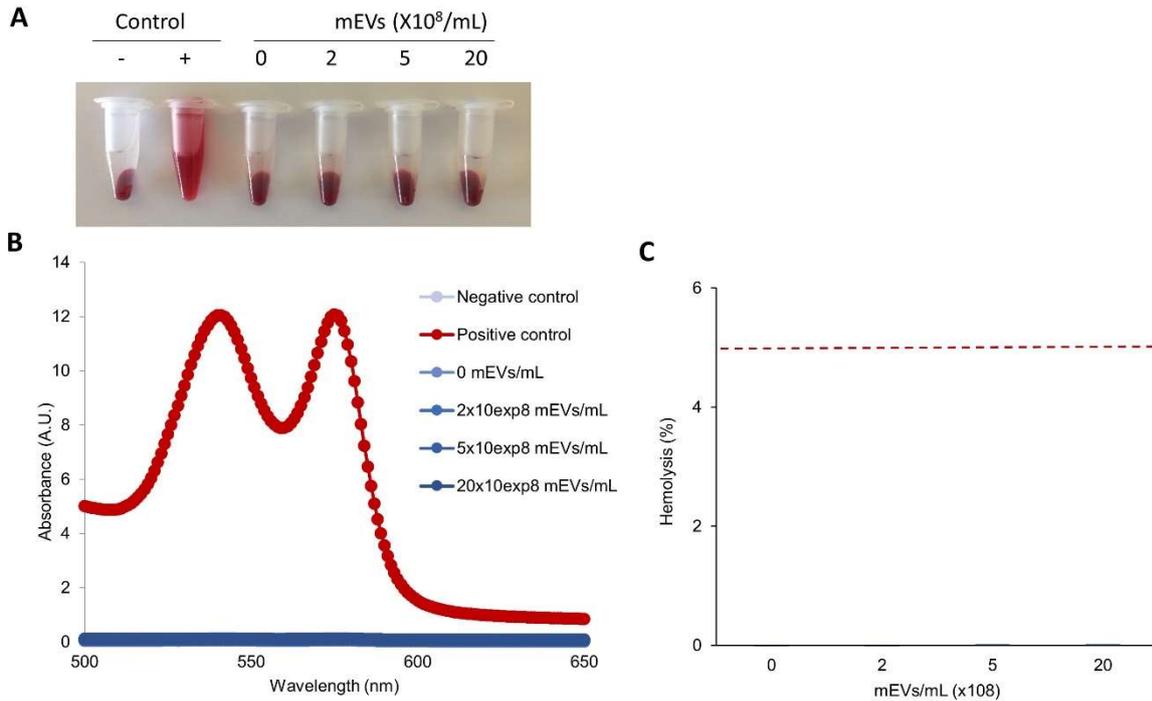
Supplemental Figure 2

Functional characterization of purified mEVs using ROTEM (EXTEM-S). Dose-dependent effects of mEVs on ROTEM parameters using human whole blood. (A) Representative ROTEM profiles of human whole blood incubated with different concentrations of mEVs (control, 0.2 , 5 and 20×10^8). (B) Corresponding quantifications showing no reduction of clotting time at any dose of mEVs, when clotting time is activated through the extrinsic pathway. All experiments were performed independently replicated in 3 different donors ($n=3$). (* $p<0.05$ and $p<0.01$). CT= Clotting time.



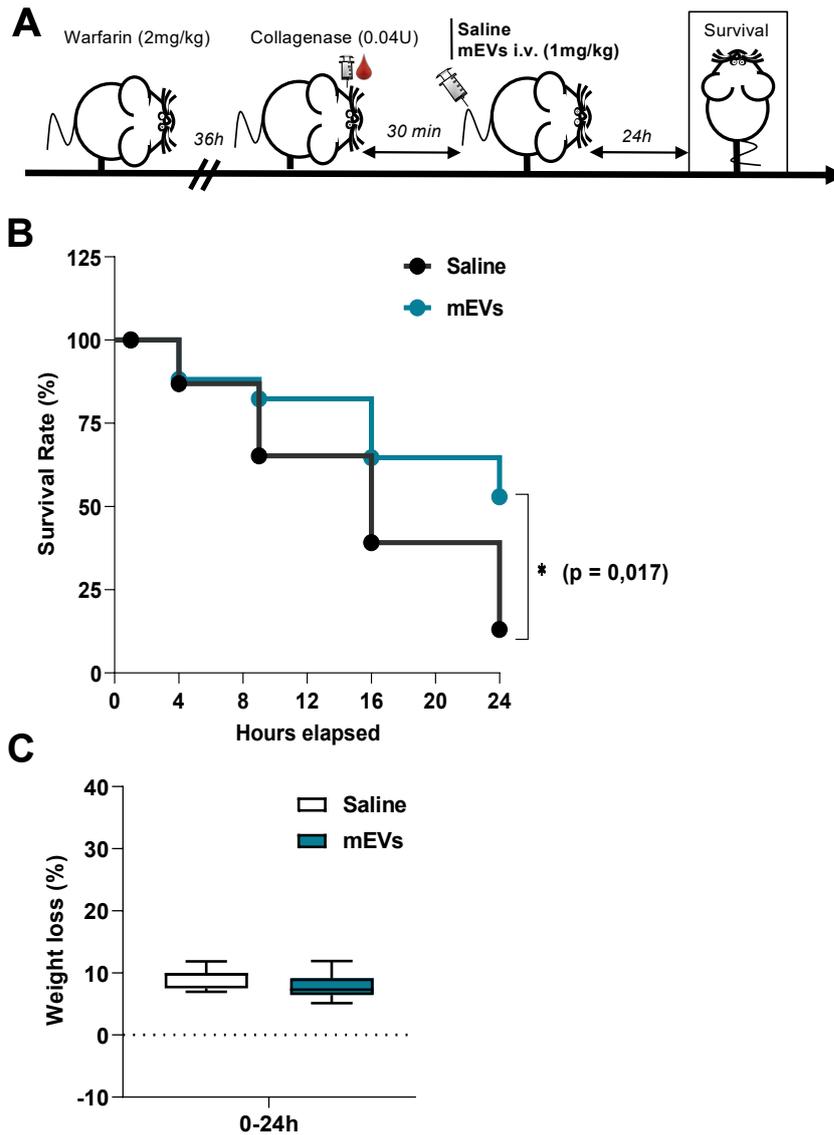
Supplemental Figure 3.

Thrombin generation assay of mEVs using STG-BleedScreen. Pooled plasma was incubated with different concentrations of mEV (0, 2, 5 and 20×10^8) and the reaction was initiated by the addition of reagent. **(A)** Thrombin generation assay representation showing that mEVs generated great amounts of thrombin (higher weight peak values) and presented shorter time to peak in a dose-dependent manner, as compared to control (0 mEVs) and the reference plasma. **(B)** Thrombin generation at the highest concentration of mEV (20×10^8 mEVs) was blocked with $20 \mu\text{g/mL}$ anti-TF antibody. **(C)** CTI had no effect on thrombin generation at the highest concentration of mEVs (20×10^8 EVs). Results are representative of three experiments. CTI = Corn Trypsin Inhibitor.



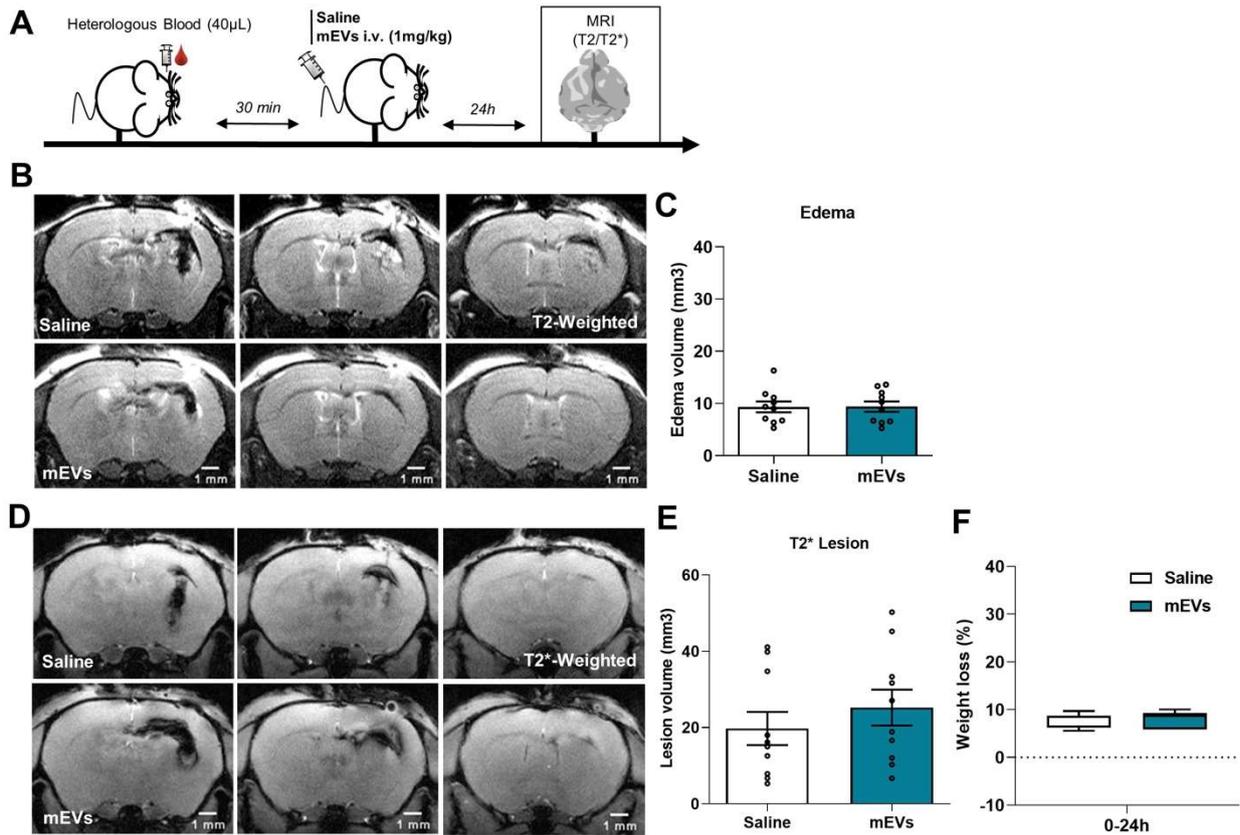
Supplemental Figure 4

Hemolysis assay in human blood. (A) Pictures of test tubes containing citrated human blood after incubation with different concentrations of mEVs (0, 2, 5 and 20x10⁸/mL) and centrifugation. (B) Spectroscopy of the supernatant of the different tubes. (C) Summary of the hemolysis rate for each condition measured by absorbance at 540 nm (representative of n=3 per group). No condition exceeded 5% of hemolysis.



Supplemental Figure 5

mEVs efficiently improve survival rate in a severe-ICH stroke model in warfarin-treated mice. Effect of mEVs administration (1 mg/kg~ 4×10^9 EVs) on survival in a severe model of ICH of anticoagulated mice (warfarin treatment *per os* 36 hours before collagenase intra-striatal injection). **(A)** Schematic overview of the experimental protocol. **(B)** Survival rates at 24 hours in controls and mEVs treated mice (1 mg/kg) (n=15 per group). **(C)** Percentage of weight loss (%) in both groups at 0-24h. * $p < 0.05$ vs control (saline).



Supplemental figure 6

mEVs administration neither impact edema nor lesion in a passive model of ICH stroke model. Effect of mEVs administration (1 mg/kg $\sim 4 \times 10^9$ EVs) on edema and lesion expansion in a mild model of ICH (heterologous blood intra-striatal injection). **(A)** Schematic overview of the experimental protocol. **(B)** Representative T2-Weighted MRI images at 24 hours of control (saline) and treated mice (mEVs). **(C)** Hematoma volume at 24 hours in controls and the treated mice (mEVs). **(D)** Representative T2*-Weighted MRI images at 24 hours of control (saline) and treated mice (mEVs). **(E)** Lesion volume at 24 hours in controls and the treated mice (mEVs). **(F)** Percentage of weight loss (%) in both groups at 0-24h. (n=10 per group).

REFERENCES

1. Garg R, Biller J. Recent advances in spontaneous intracerebral hemorrhage. *F1000Res*. 2019;8
2. Cordonnier C, Demchuk A, Ziai W, Anderson CS. Intracerebral haemorrhage: Current approaches to acute management. *Lancet*. 2018;392:1257-1268
3. Qureshi AI, Tuhrim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N. Engl. J. Med*. 2001;344:1450-1460
4. Broderick JP, Adams HP, Jr., Barsan W, Feinberg W, Feldmann E, Grotta J, et al. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: A statement for healthcare professionals from a special writing group of the stroke council, american heart association. *Stroke*. 1999;30:905-915
5. Anderson CS, Heeley E, Huang Y, Wang J, Stapf C, Delcourt C, et al. Rapid blood-pressure lowering in patients with acute intracerebral hemorrhage. *N. Engl. J. Med*. 2013;368:2355-2365
6. Qureshi AI, Palesch YY. Antihypertensive treatment of acute cerebral hemorrhage (atach) ii: Design, methods, and rationale. *Neurocrit. Care*. 2011;15:559-576
7. Carhuapoma JR, Barrett RJ, Keyl PM, Hanley DF, Johnson RR. Stereotactic aspiration-thrombolysis of intracerebral hemorrhage and its impact on perihematoma brain edema. *Neurocrit. Care*. 2008;8:322-329
8. Hanley DF, Thompson RE, Rosenblum M, Yenokyan G, Lane K, McBee N, 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;393:1021-1032
9. Goldstein JN, Fazen LE, Snider R, Schwab K, Greenberg SM, Smith EE, et al. Contrast extravasation on ct angiography predicts hematoma expansion in intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2007;68:889-894
10. Cordonnier C, Tymianski M. Mistie iii. *Stroke*. 2019;50:1634-1635
11. Alvarez-Sabín J, Delgado P, Abilleira S, Molina CA, Arenillas J, Ribó M, et al. Temporal profile of matrix metalloproteinases and their inhibitors after spontaneous intracerebral hemorrhage: Relationship to clinical and radiological outcome. *Stroke*. 2004;35:1316-1322
12. Yang GY, Betz AL, Chenevert TL, Brunberg JA, Hoff JT. Experimental intracerebral hemorrhage: Relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats. *J. Neurosurg*. 1994;81:93-102
13. Brott T, Broderick J, Kothari R, Barsan W, Tomsick T, Sauerbeck L, et al. Early hemorrhage growth in patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 1997;28:1-5
14. Li Q, Zhang G, Xiong X, Wang XC, Yang WS, Li KW, et al. Black hole sign: Novel imaging marker that predicts hematoma growth in patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2016;47:1777-1781
15. Davis SM, Broderick J, Hennerici M, Brun NC, Diringer MN, Mayer SA, et al. Hematoma growth is a determinant of mortality and poor outcome after intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2006;66:1175-1181
16. Li Q, Huang YJ, Zhang G, Lv FJ, Wei X, Dong MX, et al. Intraventricular hemorrhage and early hematoma expansion in patients with intracerebral hemorrhage. *Sci. Rep*. 2015;5:11357
17. Tuhrim S, Dambrosia JM, Price TR, Mohr JP, Wolf PA, Hier DB, et al. Intracerebral hemorrhage: External validation and extension of a model for prediction of 30-day survival. *Ann. Neurol*. 1991;29:658-663
18. Portenoy RK, Lipton RB, Berger AR, Lesser ML, Lantos G. Intracerebral haemorrhage: A model for the prediction of outcome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1987;50:976-979
19. Daverat P, Castel JP, Dartigues JF, Orgogozo JM. Death and functional outcome after spontaneous intracerebral hemorrhage. A prospective study of 166 cases using multivariate analysis. *Stroke*. 1991;22:1-6

20. Broderick JP, Brott TG, Duldner JE, Tomsick T, Huster G. Volume of intracerebral hemorrhage. A powerful and easy-to-use predictor of 30-day mortality. *Stroke*. 1993;24:987-993
21. Gulati D, Dua D, Torbey MT. Hemostasis in intracranial hemorrhage. *Front. Neurol*. 2017;8:80
22. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2007;27:1687-1693
23. Mayer SA, Brun NC, Begtrup K, Broderick J, Davis S, Diringer MN, et al. Efficacy and safety of recombinant activated factor vii for acute intracerebral hemorrhage. *N. Engl. J. Med*. 2008;358:2127-2137
24. Mayer SA, Brun NC, Broderick J, Davis SM, Diringer MN, Skolnick BE, et al. Recombinant activated factor vii for acute intracerebral hemorrhage: Us phase iia trial. *Neurocrit. Care*. 2006;4:206-214
25. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066
26. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol*. 2006;Chapter 3:Unit 3.22
27. Zubairova LD, Nabiullina RM, Nagaswami C, Zuev YF, Mustafin IG, Litvinov RI, et al. Circulating microparticles alter formation, structure, and properties of fibrin clots. *Sci. Rep*. 2015;5:17611
28. Owens AP, 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ. Res*. 2011;108:1284-1297
29. Mege D, Mezouar S, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C. Microparticles and cancer thrombosis in animal models. *Thromb. Res*. 2016;140 Suppl 1:S21-26
30. Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R, Dignat-George F, Lombardo D, Dubois C. Cancer cell-derived microparticles bearing p-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation *in vivo*. *J. Exp. Med*. 2009;206:1913-1927
31. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi *in vivo* is dependent upon microparticle p-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet p-selectin. *J. Exp. Med*. 2003;197:1585-1598
32. Mazzarino L, Loch-Neckel G, Dos Santos Bubniak L, Ourique F, Otsuka I, Halila S, et al. Nanoparticles made from xyloglucan-block-polycaprolactone copolymers: *Safety* assessment for drug delivery. *Toxicol. Sci*. 2015;147:104-115
33. Briens A, Gauberti M, Parcq J, Montaner J, Vivien D, Martinez de Lizarrondo S. Nanozymography using laser-scanning confocal microscopy unmasks proteolytic activity of cell-derived microparticles. *Theranostics*. 2016;6:610-626
34. Piffoux M, Volatron J, Cherukula K, Aubertin K, Wilhelm C, Silva AKA, et al. Engineering and loading therapeutic extracellular vesicles for clinical translation: A data reporting frame for comparability. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;178:113972
35. Silva AKA, Morille M, Piffoux M, Arumugam S, Mauduit P, Larghero J, et al. Development of extracellular vesicle-based medicinal products: A position paper of the group "extracellular vesicle translation to clinical perspectives - evolve france". *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;179:114001
36. Herrmann IK, Wood MJA, Fuhrmann G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat Nanotechnol*. 2021;16:748-759
37. Gladstone DJ, Aviv RI, Demchuk AM, Hill MD, Thorpe KE, Khoury JC, et al. Effect of recombinant activated coagulation factor vii on hemorrhage expansion among patients with spot sign-positive acute intracerebral hemorrhage: The spotlight and stop-it randomized clinical trials. *JAMA neurology*. 2019;76:1493-1501
38. S ELA, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12:347-357
39. Kuravi SJ, Yates CM, Foster M, Harrison P, Hazeldine J, Hampson P, et al. Changes in the pattern of plasma extracellular vesicles after severe trauma. *PLoS One*. 2017;12:e0183640

40. Thangaraju K, Neerukonda SN, Katneni U, Buehler PW. Extracellular vesicles from red blood cells and their evolving roles in health, coagulopathy and therapy. *International journal of molecular sciences*. 2020;22:153
41. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005;106:1604-1611

DISCUSSION

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, les VE dérivées de monocytes présentent des caractéristiques prometteuses pour cibler et stopper le saignement dans l'hémorragie intracérébrale. Durant la phase précoce de l'hémorragie intracérébrale, les vaisseaux endommagés expriment la P-Sélectine ce qui permet aux VE pro-coagulantes de s'y lier *via* le PSGL-1 qu'elles portent à leur surface et d'activer la coagulation *via* le facteur tissulaire. L'injection de VE dérivées de monocytes à potentiel pro-coagulant dans un modèle préclinique d'hémorragie intracérébrale n'a encore jamais été étudiée. Les travaux menés durant cette thèse se sont donc attachés à mettre en évidence le potentiel thérapeutique des VE dérivées de monocytes portant du facteur tissulaire dans un modèle préclinique d'hémorragie intracérébrale en agissant comme des pansements intravasculaires.

Les résultats de l'article « *Exogenous nanovesicles bearing tissue factor improve outcome in intracranial hemorrhage stroke models by acting as hemostatic patches* » démontrent que de grandes quantités de VE ont été générées dans des surnageants de monocytes stimulés au TNF dans des bioréacteurs (CellLine). Ces VE présentaient des caractéristiques spécifiques aux monocytes : une taille moyenne de 300 nm et une activité pro-coagulante élevée réduisant le temps de coagulation de manière dose- et FT-dépendante dans du plasma et du sang total humains. Dans les études précliniques d'HIC de ces travaux de thèse, l'injection intraveineuse des VE a réduit la croissance des hématomes de 43% et amélioré le devenir neurologique des animaux à 4h et à 24h par rapport aux animaux témoins. Cet effet bénéfique a été également retrouvé dans des modèles plus sévères d'HIC chez des souris traitées à l'énoxaparine et d'autres à la warfarine. Également, cet effet a été identifié dans des expériences *in vivo* de blocages du FT et du PSGL-1 des VE. La demi-vie de nos VE dérivées de monocytes a été étudiée de manière indirecte dans une expérience de mesure de temps de saignement sur la queue de souris après lésion. Cette expérience a permis de mettre en évidence que nos VE possédaient une demi-vie très courte (<15 minutes) car elles ont un effet hémostatique si elles sont injectées 1 minute avant la lésion mais n'ont plus d'effet lorsqu'elles sont injectées 15 minutes avant.

Nos travaux ont permis de révéler le caractère thérapeutique des VE dérivées de monocytes pour le traitement des hémorragies intracérébrales.

1. La culture cellulaire de monocytes issus de la lignée humaine THP-1

La première avancée de ces travaux de thèse à mettre en lumière est celle de la génération à grande échelle de nos VE dérivées de monocytes. En effet, comme démontré dans l'article « *Exogenous nanovesicles bearing tissue factor improve outcome in intracranial hemorrhage stroke models by acting as hemostatic patches* », nous avons choisi de mettre au point une méthode de production de VE à partir de bioréacteurs, nous permettant de générer environ 500 VE par monocyte. Cette méthode est comparable à celle utilisée en routine pour la culture de cellules souches mésenchymateuses. Une étude parue en 2017 a identifié les avantages et les inconvénients de cette méthode de culture par bioréacteurs (McKee and Chaudhry, 2017). Ils ont révélé que la culture statique en bioréacteur présentait des avantages considérables dans l'expansion cellulaire à haute densité et dans le contrôle des paramètres de culture. Ainsi, cette nouvelle méthode de culture de monocytes a permis d'optimiser l'expansion cellulaire afin de générer de grandes quantités de VE.

2. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des VE dérivées de monocytes

Afin d'étudier la capacité thérapeutique de nos VE dérivées de monocytes, nous avons étudié leur composition protéique par des techniques de western blot et de microscopie confocale. Nos résultats suggèrent que les VE que nous générons portent à la fois du FT à leur surface mais également du PSGL-1. En 2005, Del Conde et collaborateurs avaient également démontré cette composition protéique de microparticules dérivées de monocytes (Del Conde, Corie N. Shrimpton, *et al.*, 2005). Pour compléter notre caractérisation, nous avons étudié le potentiel hémostatique de nos VE dans des tests biologiques d'exploration de l'hémostase de plasma et sang total humains. L'association de nos VE portant du FT humain au FVIIa humain pour enclencher la voie extrinsèque de la cascade de coagulation a permis de révéler leur caractère hémostatique, de manière dose et FT-dépendantes.

Le premier atout de nos VE dérivées de monocytes est leur forte affinité à se lier au FVIIa humain puisqu'il s'agit de VE issus de monocytes humains. En effet, Petersen et collaborateurs avait indiqué que le FVIIa murin se lie avec une forte affinité au FT humain, mais que l'association du FVIIa murin avec le FT murin était significativement plus faible qu'avec le FT humain (Petersen *et al.*, 2005).

Ainsi, cette découverte de Petersen et collaborateurs nous a permis de confirmer que nous pouvons utiliser les VE que l'on génère dans nos modèles expérimentaux chez la souris en tant que preuve de concept.

En amont de nos études *in vivo*, nous avons tenté de mettre en évidence que le potentiel hémostatique de nos VE était dépendant de l'activation de la voie extrinsèque de la cascade de coagulation *in vitro* (voie du FT, vue dans la partie B. L'hémostase de l'introduction de ce manuscrit). Pour ce faire, nous avons étudié l'effet de nos VE dans des tests de mesure de temps de coagulation par la technique de thromboélastométrie (ROTEM®) dans du sang total humain en activant la voie extrinsèque (FT, EXTEM-S) ou en activant la voie intrinsèque (acide ellagique, INTEM-S) préférentiellement. Lorsque la voie extrinsèque est déjà activée de manière saturante par son activateur (FT), les VE n'avaient pas d'effet supplémentaire sur le temps de coagulation. En revanche, lorsqu'il s'agissait de la voie intrinsèque activée, elles permettaient de raccourcir le temps de coagulation de manière dose-dépendante (effet additif, en activant la voie extrinsèque de façon complémentaire). Ces expériences ont permis de confirmer que le pouvoir hémostatique de nos VE était majoritairement dépendant de l'activation de la voie extrinsèque. Cela a permis de mettre en évidence le caractère spécifique de nos VE dérivées de monocytes qui n'est pas retrouvé dans le cadre de l'utilisation de VE dérivées d'érythrocytes, par exemple, où la voie intrinsèque est également activée (Noubouossie *et al.*, 2020). S'ajoute à cela nos expériences de génération de thrombine qui ont permis de découvrir que nos VE sont capables de 1/ générer significativement de manière dose-dépendante plus de thrombine (augmentation de la hauteur du pic, exprimé en nM, qui mesure la quantité totale de thrombine générée) et de 2/ raccourcir le temps de latence (exprimé en minutes) correspondant à la phase de formation du caillot et de génération de thrombine. Nous avons pu démontrer que le potentiel hémostatique de nos VE était principalement dépendant du FT qu'elles portent à leur surface car l'effet sur la génération de thrombine était bloqué par l'anticorps bloquant le FT mais ne l'était pas en présence de Corn Trypsin Inhibitor (CTI, inhibiteur spécifique de la voie intrinsèque).

Contrairement à nos travaux, une étude récente a comparé différents types de VE dérivées de globules rouges, de plaquettes et de monocytes THP-1 (Figure 39). Il en a résulté que les VE issues de THP-1 possédaient une capacité à générer la thrombine nettement inférieure à celles des VE plaquettaires ou de globules rouges (Corradetti *et al.*, 2020).

La différence principale entre cette étude et nos travaux est la stimulation des cellules. Corradetti et collaborateurs ont isolé les VE de THP-1 sans stimulation tandis que nous avons stimulé les nôtres avec un agent pro-inflammatoire connu pour générer des VE dérivées de monocytes portant de grandes quantités de FT (Tripisciano *et al.*, 2017). De plus, dans leurs travaux, la génération de thrombine a été mesurée *via* un lecteur de plaques (*Synergy micro plate reader*), ce qui ne les rend pas comparables à nos expériences puisque nous avons utilisé une technologie de pointe (Genesia®).

Afin de compléter nos expériences, il serait intéressant de tester nos VE dans la génération de FX activé. En effet, le pouvoir pro-hémostatique de nos VE permettrait de faire croître la génération de FXa de manière dose-dépendante comme Witkowski et collaborateurs ont pu retrouver en 2020 avec des VE dérivées de THP-1 (Witkowski *et al.*, 2020). Également, très récemment, l'équipe de Poncelet et collaborateurs a élaboré un nouvel outil d'immuno-capture hybride avec une reproductibilité améliorée pour mesurer l'activité pro-coagulante dépendante du FT des VE des fluides corporels (Franco *et al.*, 2020). Cette nouvelle technique permettrait à notre caractérisation fonctionnelle de nos VE d'être complétée.

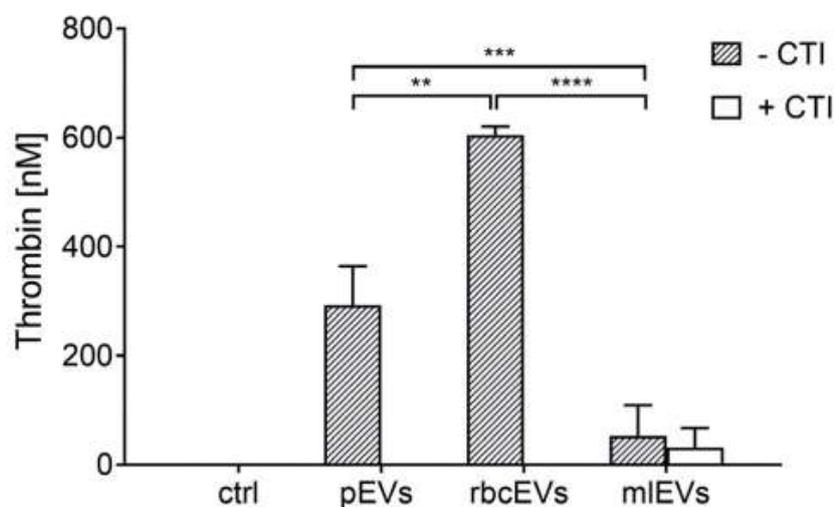


Figure 39 : Génération de thrombine induite par des VE dérivées de plaquettes, des VE dérivées de globules rouges et des VE dérivées de monocytes en présence ou en absence d'un inhibiteur de trypsine (CTI : 50µg/mL), un inhibiteur de l'activation de contact. La génération de thrombine a été quantifiée via le clivage d'un substrat fluorogénique (n=3); contrôle, plasma incubé avec seulement du tampon; **p≤0.01; *** p≤0.001; p≤ 0.0001 (Corradetti *et al.*, 2020).

Comme nous l'avons vu dans la troisième partie de l'introduction de ce manuscrit (C. Les vésicules extracellulaires), les VE sont connues pour avoir une composition protéique riche PS et en phosphatidyléthanolamine (PE). La PS est une protéine ayant une forte affinité pour l'annexine-V, tandis que la PE a une affinité pour la duramycine et la cynamine (Bloemen *et al.*, 2016; Hullin-Matsuda *et al.*, 2016). Depuis maintenant des années, il a été démontré, dans de nombreuses études, que les VE portaient des quantités différentes de PS et de PE (60% vs 40% respectivement) (Roy, Gallardo and Estelrich, 1998; Larson *et al.*, 2012).

Ainsi, en considérant que nous ne pouvions pas immobiliser toutes nos VE à partir d'une seule protéine de liaison (annexine-V), notre travail s'est penché sur l'immobilisation complète de toutes les VE PS- et PE-positives et négatives (Figure 40). Pour cela, nous avons élaboré une nouvelle méthode utilisant un *coating* à base d'une molécule biochimique dont les propriétés au pH légèrement basique permettent de générer une fine couche de polymères permettant d'immobiliser tout type de molécule. Grâce à cette nouvelle méthode, il nous a été possible d'identifier la composition protéique de nos VE, à savoir le CD14 (marqueur monocytaire) et le FT.

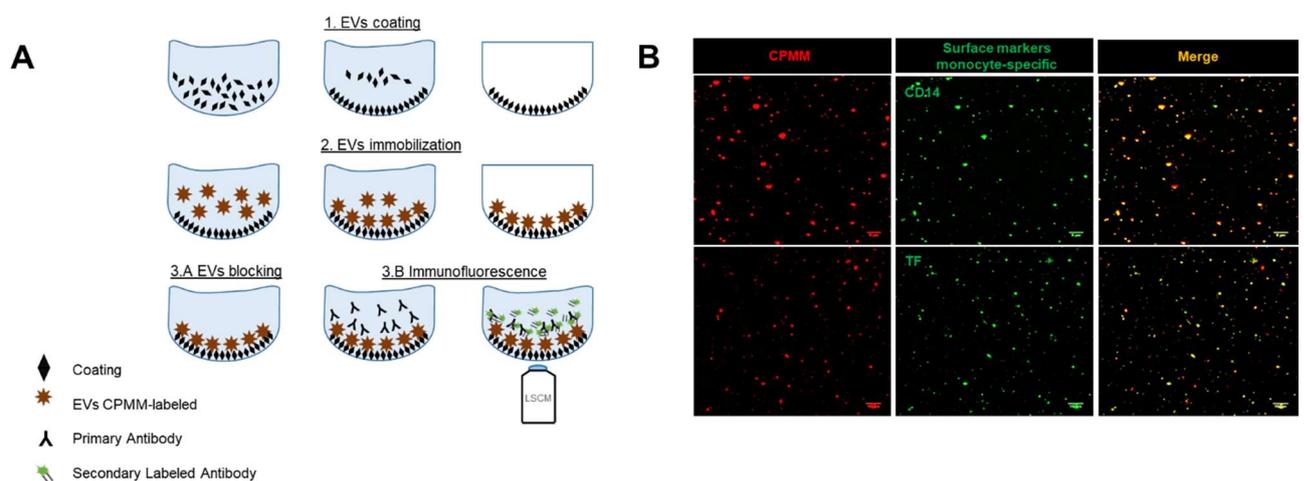


Figure 40 : Nouvelle méthode d'immobilisation et de caractérisation des VE.

(A) Représentation schématique de la méthode par laser scanning confocal microscopy (LSCM) permettant l'immobilisation et la caractérisation des VE individuellement (y compris le marquage et l'étude fonctionnelle). Étape 1 : Coating des micro-puits. Étape 2 : Immobilisation des VE marquées au cell plasma membrane marker (CPMM) sur la surface coatée. Étape 3: Caractérisation des VE immobilisées : 3A. Étape de blocage suivant la caractérisation morphologique des VE, y compris la distribution en nombre et en taille. 3B. Analyses d'immunofluorescence, utilisant des anticorps spécifiques primaires (dirigés contre les protéines présentes à la surface des VE, anti-CD14 et anti-FT) et secondaires marqués.

Cette nouvelle méthode a permis d'ajouter une spécificité et une randomisation à notre caractérisation. Cependant, afin de se rapprocher au mieux des recommandations pour tendre vers leur utilisation en thérapie clinique, il faudrait penser à évaluer le degré de pureté de nos VE (Théry, Kenneth W Witwer, *et al.*, 2018). En effet, la pureté des VE générées est cruciale de par leur petite taille.

Une étude parue en 2019 a démontré que l'isolation de VE par ultracentrifugation complétée par une exclusion de taille par chromatographie permettait d'obtenir une meilleure pureté dans le contrôle qualité (Roura and Bayes-Genis, 2019; van Balkom *et al.*, 2019).

3. Évaluation pré-clinique du potentiel thérapeutique des VE dérivées de monocytes

Concernant nos études *in vivo*, nous avons fait le choix du modèle d'injection stéréotaxique de collagénase puisqu'il s'agit du modèle mimant le mieux la phase précoce de l'HIC. En effet, la collagénase possède des caractéristiques permettant la rupture de liaisons peptidiques au niveau de la membrane basale des vaisseaux mimant ainsi l'expansion de l'hématome qui croît dans les premières heures comme retrouvée chez l'homme.

Ce modèle nous a permis de prendre en charge le saignement très précocement (30 minutes après le début de l'hémorragie), d'abaisser de manière significative le volume de lésion des animaux traités par rapport aux animaux contrôles et d'améliorer leur devenir neurologique. Ces résultats suggèrent que ces VE présentent des caractéristiques intéressantes pour la prise en charge des patients atteints d'HIC dès l'instant où le diagnostic est posé.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, l'HIC présente également des dommages secondaires induisant des réactions inflammatoires et l'apparition d'un œdème péri-lésionnel. Pour ajouter de la pertinence au potentiel thérapeutique de nos VE dans la phase précoce de l'HIC, nous les avons également testées dans un autre modèle d'HIC ; le modèle par injection stéréotaxique de sang hétérologue. Ce modèle permet de reproduire l'HIC dans sa phase plus tardive, lorsque l'expansion de l'hématome est terminée. Cette expérience nous a permis de montrer que nos VE n'induisaient pas plus d'inflammation ni d'œdème après l'HIC. Ce résultat était attendu puisque nos VE sont des vésicules bioactives ciblant seulement le saignement aigu *via* ses protéines d'assemblage et de liaison que sont le PSGL-1 et le FT.

L'introduction de ce manuscrit a également souligné que l'anti-coagulation avec la warfarine augmente de 2 à 5 fois le risque d'HIC, en fonction de l'intensité de l'anti-coagulation (Hald *et al.*, 2021). Par conséquent, il était essentiel de tester la capacité de nos VE à atténuer le saignement aigu dans des modèles plus sévères d'HIC, un modèle sous enoxaparine et un modèle sous warfarine.

Ces deux anti-coagulants ont été administrés en amont de l'induction de l'HIC afin de reproduire au mieux ce qu'il se produit en clinique. Le modèle d'HIC sous enoxaparine a permis de révéler que la thérapie aux VE réduit la croissance de l'hématome et améliore le devenir neurologique des animaux. En vue de la sévérité du modèle sous warfarine, l'étude de l'effet hémostatique de nos VE s'est seulement focalisée sur la survie des animaux et a indiqué que les animaux traités survivaient plus longtemps que les animaux contrôles. Ainsi, grâce à ces expériences, nous avons pu constater que les VE constituent une alternative prometteuse pour le traitement des HIC même en phase plus sévère.

Concernant les protéines de ciblage et de liaison FT et PSGL-1 que portent nos VE dérivées de monocytes, nous avons voulu démontrer leur rôle crucial dans ce processus de pansement intravasculaire par des expériences d'inhibition dans le modèle pré-clinique d'HIC. Ces expériences ont démontré que le caractère hémostatique de nos VE était dépendant du FT *in vivo* et que leur potentiel hémostatique ciblé était tributaire du PSGL-1.

Ces travaux ont permis de retrouver les mêmes résultats que Falati et collaborateurs en 2003 dans leur modèle de thrombus (Falati *et al.*, 2003). En effet, nos travaux ont confirmé que le FT porté par les VE allait s'accumuler au sein du thrombus en formation *via* le PSGL-1 qu'elles expriment, pour se fixer à la P-Sélectine exprimée par les plaquettes. Cette expression de la P-Sélectine par les plaquettes a été également démontrée dans une étude récente sur la formation de thrombus dans un modèle d'anévrisme aortique (Bonnard *et al.*, 2014). De manière complémentaire, les expériences d'inhibition du FT et du PSGL-1 ont permis de confirmer que cet effet hémostatique ciblé de nos VE est dépendant de ces deux protéines car, lors de leurs blocages, le traitement aux VE n'est plus bénéfique. De fait, par ces différents essais pré-cliniques, nous avons déterminé le mécanisme d'action de nos VE chez l'animal après une HIC.

La dernière partie de l'introduction de ce manuscrit discute de l'activation endothéliale et des outils permettant de la caractériser (D. L'activation endothéliale). Il s'agit d'un point essentiel que nous devons aborder dans les travaux futurs de cette thèse afin de démontrer la caractéristique de ciblage de nos VE. Pour ce faire, il serait pertinent d'utiliser l'IRM moléculaire à base de MPIOs ciblant la P-Sélectine comme il a été déjà effectué au laboratoire sur la molécule d'adhésion VCAM-1 dans des modèles expérimentaux d'AVC ischémiques et hémorragiques (Gauberti *et al.*, 2013). Cet outil d'imagerie permettra alors de démontrer l'expression endothéliale de la molécule d'adhésion P-Sélectine à la périphérie d'un saignement actif lors d'une HIC et de justifier que notre thérapie par VE dérivées de monocytes cible les vaisseaux lésés au niveau du site de saignement.

Enfin, des expériences complémentaires demeurent encore nécessaires afin de mettre en évidence le ciblage de nos VE au niveau du saignement actif. Pour ce faire, des études *in vivo* sur des modèles d'HIC avec injection de VE marquées par fluorescence ont été débutées récemment. Nous avons choisi de tester tout d'abord l'injection intra-artérielle de VE marquées par fluorescence dans notre modèle expérimental d'HIC permettant de distinguer les VE seulement au niveau du site de saignement. De plus, nous avons mis en place une expérience par microscopie biphotonique permettant d'induire une lésion vasculaire *via* un laser et d'injecter par voie intraveineuse nos VE marquées par fluorescence pour les suivre jusqu'au site de saignement actif. Il s'agit de résultats préliminaires que nous avons choisi de ne pas incorporer à notre manuscrit en préparation, faute d'un trop petit nombre d'expériences (Figure 41).

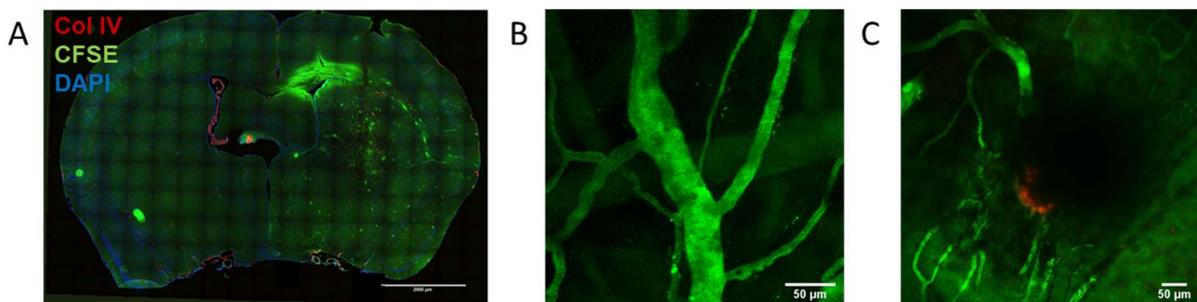


Figure 41 : Images représentatives de résultats préliminaires obtenus par immunohistologie et microscopie biphotonique.

(A) Les VE marquées par fluorescence en vert se localisent spécifiquement au niveau du site de saignement (côté ispatéral) comparativement au côté controlatéral après induction d'une HIC. (B) Image d'un vaisseau cérébral en vert (Dextran-FITC) à l'état basal. (C) Image du même vaisseau cérébral où les VE marquées par fluorescence en rouge s'accumulent au niveau du saignement actif environ 10 minutes après induction d'une lésion vasculaire au laser au microscope biphotonique.

4. Examen de la biodistribution des VE dérivées de monocytes

Les recommandations de l'ISEV pour la caractérisation complète des VE *in vivo* invitent les chercheurs à effectuer des études de biodistribution. Les études *in vivo* actuelles de la biodistribution des VE sont extrêmement hétérogènes avec des méthodologies très variées.

Les expériences rapportées incluent des différences dans 1) les doses de VE injectées, 2) les voies d'administration, 3) les animaux receveurs, 4) les organes étudiés, 5) les points temporels analysés, 6) les méthodes de suivi (tels que les colorants, la bioluminescence, le radiomarqueur) et 7) les techniques d'isolement des VE (Kang *et al.*, 2021). Cette diversité crée des défis dans la compréhension générale de la biodistribution des VE *in vivo*.

Dans une revue de Kang et collaborateurs, il a été rapporté que la voie d'administration la plus commune à toutes les études de biodistribution de la littérature était la voie intraveineuse (Kang *et al.*, 2021). Ceci coïncide bien avec nos études pré-cliniques. Également, ils ont pu révéler que les VE allaient s'accumuler principalement dans le foie, la rate et les poumons des animaux receveurs entre 1 et 24 heures post-injection (Figure 42). Cette étude de l'accumulation des VE dans les organes des animaux receveurs est une expérience nécessaire à effectuer pour nos travaux. En effet, ceci permettra de révéler l'innocuité de nos VE et de compléter notre caractérisation. Ainsi, nous pourrions démontrer que nos VE ne s'accumulent pas dans des organes non filtrants.

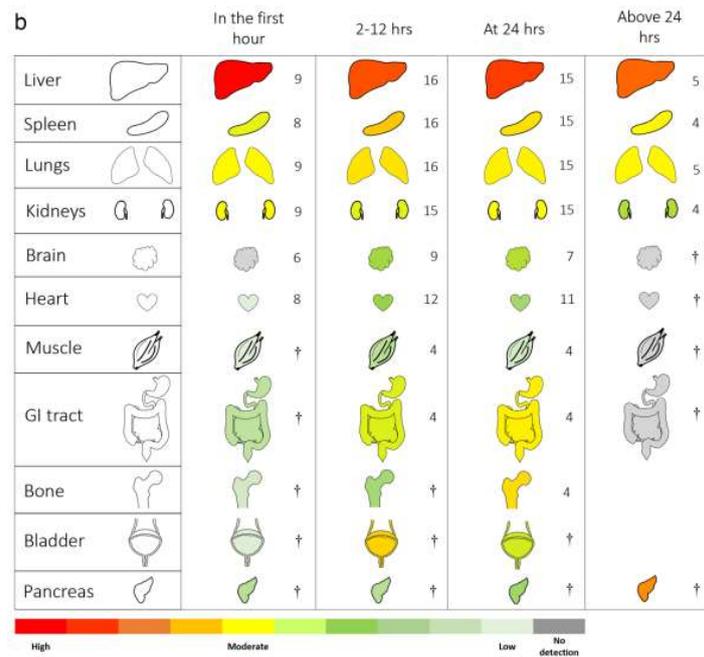


Figure 42 : Généralisation de la biodistribution des VE chez les animaux receveurs dans le temps après une administration intraveineuse à partir de 36 études *ex vivo* des organes prélevés (Kang *et al.*, 2021).

Ces études de biodistribution des VE chez les animaux receveurs ont également permis de démontrer que la demi-vie des VE au sein de l'organisme était d'au plus 1 heure (Figure 43) (Kang *et al.*, 2021). Nos expériences de mesures de temps de saignement corrént avec ces résultats puisque nos VE raccourcissent le temps de saignement de l'animal lorsqu'elles sont injectées juste avant ou juste après la lésion vasculaire (1 minute). Également, nos études ont permis de montrer que l'effet hémostatique de nos VE n'était plus présent si elles sont injectées plus de 15 minutes avant la lésion vasculaire.

De fait, nos résultats préliminaires sur ce modèle démontrent que la demi-vie de nos VE semble inférieure à 15 minutes dans l'organisme. De manière intéressante, des études similaires de mesure de temps de saignement de la queue ont été effectuées avec une injection intraveineuse de VE issues de globules rouges et retrouvent des résultats similaires aux nôtres (Kim *et al.*, 2018).

De par le fait que nos VE constituent une alternative prometteuse pour le traitement des HIC, il serait donc pertinent d'effectuer ces études de biodistribution. Pour ce faire, plusieurs groupes devraient être évalués avec différentes doses de VE marquées de manière intracellulaire et à différents temps. Ainsi, une évaluation précise de l'accumulation de nos VE *in vivo* pourra être effectuée et répondre au mieux aux normes vers la translation clinique.

Par ailleurs, afin de confirmer nos découvertes, il s'agirait, par la suite, d'injecter nos VE marquées de manière intracellulaire *via* un marqueur DiR (1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine Iodide), par exemple, et de les suivre au cours du temps dans l'organisme *via* une technique d'imagerie par fluorescence dans le proche infrarouge (NIRF) comme dans l'étude d'Haga et collaborateurs (Haga *et al.*, 2017). En effet, cette méthode utilisant des agents de contraste présentant des caractéristiques fluorescentes dans la fenêtre proche infrarouge (700-900nm) est considérée comme possédant un grand potentiel pour la pratique clinique à l'avenir de la chirurgie mini-invasive, compte tenu de sa capacité de navigation et d'identification anatomiques en temps réel. Par exemple, très récemment, cette technique d'imagerie par fluorescence a été employée pour suivre des VE dérivées de cancer du côlon chez la souris et étudier leur potentiel thérapeutique (Jing *et al.*, 2021). Ainsi, nous pourrions suivre en temps réel la biodistribution de nos VE dans l'organisme et leur accumulation.

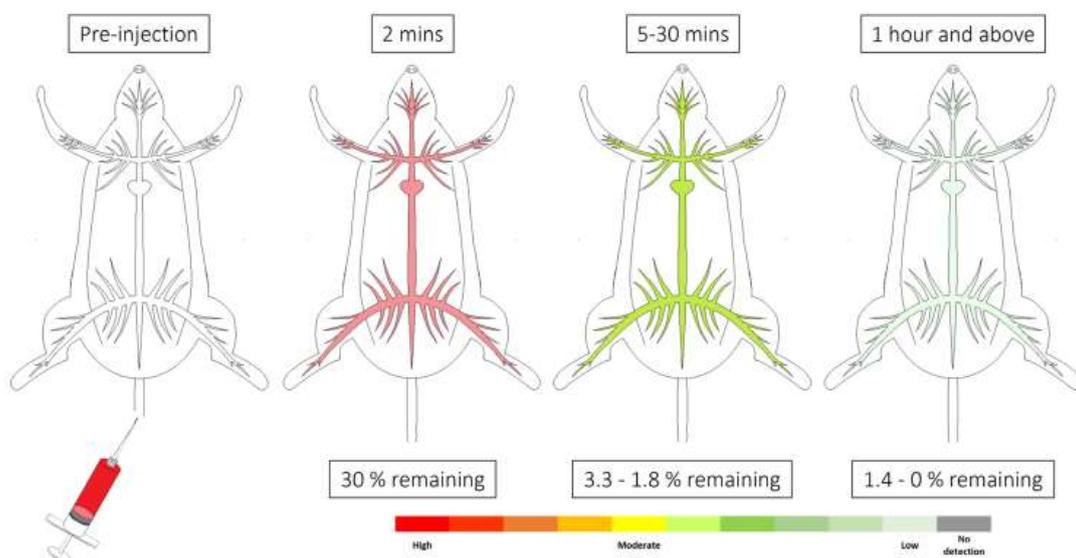


Figure 43 : Généralisation des VE détectables dans la circulation sanguine dans le temps après l'administration intraveineuse.

Les données ont été rassemblées à partir de 6 études qui ont étudié le taux de VE dans le sang, sans distinction entre sérum et plasma. Le pourcentage restant est représenté en pourcentage de la dose injectée (Kang *et al.*, 2021).

5. Comparaison des VE

Les VE d'origine monocyttaire ont été identifiées comme étant le principal type de VE portant le FT dans le compartiment sanguin (Mackman, 2009). Notre choix d'utilisation de VE dans nos travaux s'est donc penché sur les VE dérivées de monocytes tout en considérant que si l'on envisage un passage vers la clinique, la production de ces VE peut s'avérer difficile à partir de monocytes humains (coût, obtention, nombre...). Par conséquent, il serait pertinent d'envisager d'employer d'autres sources de VE portant du FT pour une translation alternative comme nous allons discuter ci-dessous.

Il y a près d'un siècle, il a été découvert que le lait maternel active le système de coagulation, mais le composant du lait qui déclenche la coagulation n'avait jusqu'à présent pas été identifié. Dans une étude en 2020, l'équipe de Hu et collaborateurs ont identifié ce composant et ont démontré que les VE présentes dans le lait maternel normal exposent le FT (Hu *et al.*, 2020).

Cette activité coagulante du FT résiste aux conditions digestives, imitant celles des nourrissons allaités, mais est sensible à la pasteurisation du lait de donneuses mis en commun, qui est couramment utilisé dans les unités de soins intensifs néonataux. De plus, ils ont démontré que contrairement au lait humain, le lait bovin, à la base de la plupart des préparations pour nourrissons, manque d'activité coagulante. Actuellement, la fonction physiologique des VE exposant le FT dans le lait maternel est inconnue, mais cette équipe suppose que ces VE peuvent être protectrices pour les nourrissons. Une autre explication pourrait être que les VE exposant le FT sont générées dans le lait maternel pour sceller la plaie du mamelon et ainsi réduire les saignements et l'inflammation des seins (Hu *et al.*, 2020).

Ainsi, cette étude permet de rendre compte que ces VE dérivées de lait maternel permettrait aussi la réduction du saignement aigu (Hu, Thaler and Nieuwland, 2021). En revanche, il n'a pas été démontré que ces VE exposaient le PSGL-1 leur permettant de se fixer à la P-sélectine exprimée par les vaisseaux endommagés lors d'un saignement. Il serait donc intéressant d'étudier les composants protéiques des VE dérivées de lait maternel afin de déceler si elles portent le PSGL-1 pour ainsi pouvoir les comparer à nos VE. De ce fait, si ces VE dérivées de lait maternel se révèlent avoir le même potentiel thérapeutique que nos VE dérivées de monocytes, le coût de production serait alors amoindri et l'accès au lait maternel *via* les biobanques déjà mis en place dans de nombreux hôpitaux serait plus accessible.

De plus, Yu et collaborateurs ont démontré que dans la salive humaine, des VE exposant du FT étaient également retrouvées (Yu *et al.*, 2018). Ils ont démontré qu'un sous-ensemble de ces VE portait à la fois le FT mais aussi le CD24 (un autre ligand de la P-sélectine) à leur surface. Cela a leur a ainsi permis de suggérer que de telles VE peuvent faciliter la coagulation au niveau d'un site de lésion cutanée où le saignement est aigu (Yu *et al.*, 2018).

Ces VE dérivées de salive humaine présentent également des caractéristiques prometteuses pour le traitement des HIC puisqu'elles portent à la fois le FT et le ligand de la P-Sélectine à leur surface. A l'avenir, il serait intéressant de comparer nos VE dérivées de monocytes et ces VE dérivées de salive humaine afin d'évaluer la puissance de leur potentiel thérapeutique dans des études *in vitro* et *in vivo*. Pour ce faire, comme étudié dans le travail de Gillum et celui de Matuk, il serait relevant de récolter la salive de sujets (environ 12 mL après exercice physique par exemple) afin de la filtrer puis d'en purifier les VE à une concentration d'environ 3.10^{10} VE par mL (Gillum *et al.*, 2017; Matuk *et al.*, 2021). Ainsi, si ces VE dérivées de salive humaine se révèlent être efficaces pour stopper le saignement actif, tout comme les VE dérivées de lait maternel, leur accès serait d'autant plus simple et moins coûteux que des monocytes humains.

L'emploi d'autres types de VE d'origine sanguine tels que les VE dérivées d'érythrocytes ou de plaquettes pourraient être envisagées dans le cadre d'un traitement de saignement actif de par leur production à grand échelle plus accommodante que celle des VE d'origine monocyttaire. Cependant, les VE dérivées d'érythrocytes auraient plutôt un rôle dans l'activation de la voie intrinsèque de la cascade de coagulation contrairement aux VE dérivées de monocytes affines pour l'activation de la voie extrinsèque (Noubouossie *et al.*, 2020). Également, les VE d'origine plaquettaire ont été identifiées comme étant de bons agents thérapeutiques dans de nombreuses pathologies comme le choc hémorragique (Antich-Rosselló *et al.*, 2021). Cependant, ce pouvoir hémostatique n'est pas spécifique et demeure trop global pour venir cibler le saignement actif *a contrario* du potentiel hémostatique des VE monocytaires. En effet, cela a été confirmé par l'essai clinique multicentrique randomisé de phase 3 (PATCH) (abordé dans la première partie de l'introduction de ce manuscrit A. L'accident vasculaire cérébral) où la transfusion de plaquettes n'est finalement pas recommandée pour les patients atteints d'HIC (Baharoglu *et al.*, 2016).

D'autre part, une étude antérieure s'est penchée sur l'activité de VE dérivées de leucocytes au champ large dans le sang de patients et ont révélé que ces VE possédaient, en plus de leur caractère hémostatique, un potentiel fibrinolytique (Lacroix and Dignat-George, 2012). En effet, cette étude a découvert que les VE dérivées de leucocytes portent à leur surface l'urokinase et son récepteur leur conférant la capacité d'activer la plasmine (Lacroix and Dignat-George, 2012).

Compte tenu de ces résultats, nous devrions considérer que nos VE dérivées de monocytes peuvent aussi, éventuellement, activer la plasmine. Pour cela, nous pourrions donc les étudier dans des tests de quantification de l'activité de la plasmine afin de démontrer que nos VE n'ont pas d'activité fibrinolytique qui pourrait être délétère lors d'une hémorragie.

6. Translation vers la clinique ?

Les limites de nos travaux se trouvent aussi concernant la transposabilité aux études cliniques de phase 1. En effet, nos VE dérivées de monocytes ont pu être produites à grande échelle *via* des bioréacteurs. Cependant, afin que les doses injectables soient transposables à l'homme, il s'agirait de produire à plus grande échelle par batch. Pour ce faire, il serait pertinent d'utiliser des monocytes humains mis à disposition, de les stimuler de manière GMP-like *via* une force de cisaillement ou « *shear stress* ».

L'équipe de Grangier et collaborateurs a analysé les différentes stratégies à adopter dans la production de VE issues de différentes sources cellulaires et notamment cette méthode de *shear stress* (Grangier *et al.*, 2021). Il en a résulté que la méthode de culture de cellules dans des bioréacteurs à cuve agitée était la plus stratégique en termes de rendement final et de pureté. En effet, cette technique basée sur la culture de cellules adhérentes s'est même développée pour les cellules en suspension (Figure 44) (Grangier *et al.*, 2021). Ainsi, il serait intéressant de générer des VE dérivées de monocytes *via* cette méthode de *shear stress* afin de créer par la suite une biobanque de VE hémostatiques. De fait, dans la mesure où une partie infime des patients atteints d'HIC peuvent bénéficier de traitement lors de la phase précoce de l'HIC, cette éventualité permettrait ainsi de pouvoir stocker de manière stable les VE tout en pouvant être facilement utilisables.

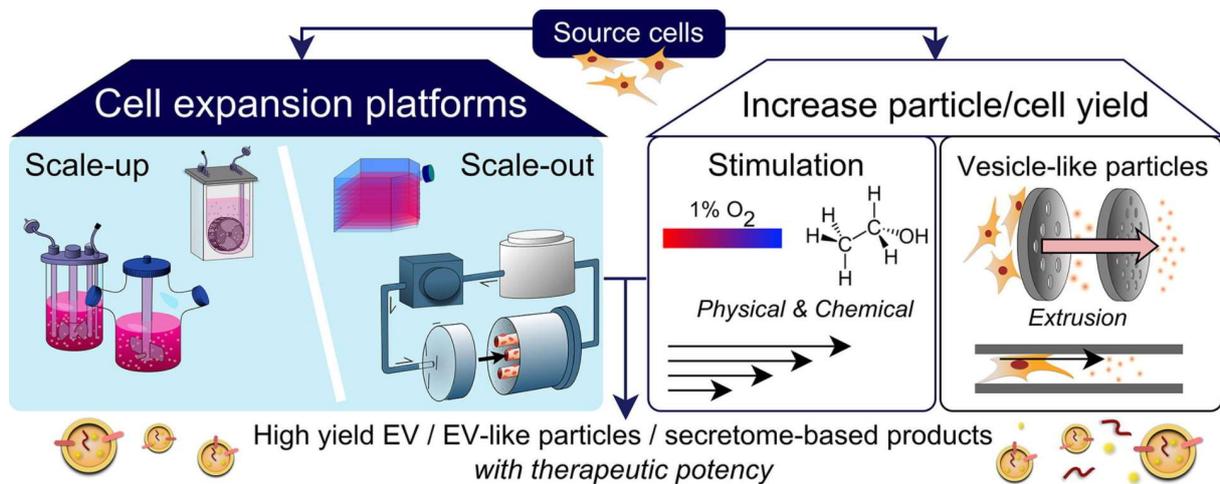


Figure 44 : Représentation schématique des avancées technologiques vers la production à grande échelle de vésicules extracellulaires issues de différentes sources cellulaires.

De manière intéressante, les résultats de notre publication « *Exogenous nanovesicles bearing tissue factor improve outcome in intracranial hemorrhage stroke models by acting as hemostatic patches* » ont mis en évidence cette méthode de production de cellules THP-1 par bioréacteur en *shear stress*. En effet, en collaboration avec le laboratoire Matières et Systèmes (MSC) de Paris, nous avons comparé nos VE monocytaires THP-1 générées par bioréacteur et stimulées au TNF avec le même type de VE générées par bioréacteur et stimulées par *shear stress*. Ainsi, nous avons pu démontrer que les taux de VE générées étaient similaires par les deux méthodes de production. Également, le potentiel hémostatique des VE monocytaires générées par *shear stress* a été évalué par des études *in vitro* de tests de mesure de coagulation dans le plasma et le sang total humain et par quantification protéique et s'est révélé être le même que nos VE générées par stimulation au TNF. Enfin, les VE produites par *shear stress* ont, tout comme nos VE, la capacité de réduire la croissance des hématomes et d'améliorer le devenir neurologique des animaux dans un modèle expérimental d'HIC. Ces expériences permettent donc de valoriser nos travaux pour une translation clinique.

7. Comorbidités et VE

Très récemment, après la pandémie qui a touché le monde entier durant l'année 2020, des études observationnelles rétrospectives ont été mises en place, notamment une étude qui a mis en évidence que la COVID-19 peut prédisposer les jeunes à l'HIC (Lawton *et al.*, 2021).

Lawton et collaborateurs ont regroupé des patients sans aucune comorbidité atteints d'HIC primaire en deux groupes, l'un avec 22 patients positifs à la COVID-19 et un autre avec 84 patients négatifs à la COVID-19. Leurs résultats montrent que les patients COVID positifs atteints d'HIC sont significativement plus jeunes et ont moins de facteurs de prédisposition que les sujets COVID négatifs avec HIC (Lawton *et al.*, 2021).

D'autre part, dans des études sur les hémorragies sous-arachnoïdiennes et des maladies à troubles hémorragiques, des taux élevés de VE-FT⁺ ont été retrouvés (Sanborn *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2019; Garabet *et al.*, 2020). Ces découvertes peuvent avoir un lien avec la génération/consommation de VE d'origine monocyttaire lors d'hémorragies.

En effet, une étude parue en 2009 a identifié que, dans un modèle expérimental de thrombose veineuse, le poids du thrombus formé corrèle négativement avec les taux de VE dérivées de monocytes et pas avec ceux des VE dérivées de plaquettes ou d'érythrocytes (Ramacciotti *et al.*, 2010). Ramacciotti et collaborateurs ont donc démontré que dans ce modèle, il y avait une consommation des VE d'origine monocyttaire suggérant ainsi que notre choix d'utiliser ce type de VE n'induirait aucun effet toxique ou létal dans notre modèle expérimental d'HIC (Ramacciotti *et al.*, 2010).

8. Thérapie cellulaire ou thérapie vésiculaire ?

Ces travaux de thèse nous amène également à se demander pourquoi utiliser les VE dérivées de monocytes plutôt que les monocytes eux-mêmes ?

Durant ces 20 dernières années, les thérapies cellulaires ont été étudiées et ont suscitées de nombreuses publications. Cependant, malgré ces efforts considérables, seules quelques thérapies cellulaires ont reçu l'approbation de mise sur le marché et/ou de la FDA. En effet, par rapport aux produits pharmaceutiques agissant comme des ligands pour des récepteurs spécifiques, le mécanisme d'action des thérapies cellulaires est beaucoup plus difficile à caractériser (Payne, Bear and Manjili, 2014). En outre, les VE possèdent quelques avantages distincts par rapport aux cellules :

(1) la possibilité d'une **production à grande échelle** à partir de cellules douées d'un fort potentiel d'expansion et pouvant permettre à partir d'une seule culture dans un bioréacteur de générer des lots homogènes pour des dizaines de patients ;

(2) l'existence de **test de fonctionnalité *in vitro*** (effet des VE dans des tests de coagulation, effet des VE sur la migration endothéliale) permettant une caractérisation fonctionnelle standardisée et l'étude des effets doses ;

(3) un **stockage et une stabilité à -80°C** permettant ainsi un stockage prolongé, sans perte d'efficacité à la décongélation (Vlassov *et al.*, 2012), du moins jusqu'à deux cycles (Akers *et al.*, 2016) et une utilisation à la demande ;

(4) **l'absence d'immunogénicité** en fonction du type cellulaire d'origine (Cervio *et al.*, 2015) avec l'utilisation possible de cellules allogéniques voire immortalisées sans immunosuppression, et donc une plus grande standardisation des modes de production et une réduction des coûts.

Ces différents avantages présentés font que le modèle de développement technico-économique des VE se rapproche de celui, mieux maîtrisé, d'un produit pharmaceutique. En conséquence, selon la réglementation, les VE ne sont pas classées dans la catégorie des médicaments de thérapie innovante mais dans celle des médicaments biologiques.

Comme précisé dans l'introduction de ce manuscrit, les VE ont déjà été testées dans de nombreux essais cliniques et, plus principalement, dans les maladies tumorales. Toutefois, l'utilisation des VE en phase clinique nécessite encore des ajustements tels que :

(1) la **standardisation des conditions de culture** des cellules-mères pour optimiser la fonctionnalité des VE produites ;

(2) la **définition des contrôles-qualité** conditionnant la libération des lots (nombre, taille, pureté, marqueurs). Ces critères devront, par conséquent, s'appuyer sur des travaux *in vivo* réalisés en amont sur des modèles animaux pertinents et visant notamment à étudier la toxicité, l'immunogénicité et la biodistribution des VE ;

(3) la **technique optimale de purification employée** est l'ultracentrifugation. Toutefois, elle n'est pas applicable en clinique où l'on envisage plutôt un schéma en plusieurs étapes pour dépler le milieu collecté en cellules flottantes et débris. De nouvelles techniques de séparation, faisant notamment appel à la microfluidique (Ingato *et al.*, 2016) sont cependant en cours de développement et devront s'adapter aux progrès prévisibles d'identification des sous-populations de VE ayant le plus fort effet thérapeutique et leurs marqueurs spécifiques (Kowal *et al.*, 2016) ;

4) la **dose optimale à administrer** ; elle reste à définir et il existe encore une certaine confusion concernant le nombre de VE équivalent (*Xu et al., 2016*);

(5) Le **mode d'administration**. En effet, dans la plupart des études expérimentales, les VE sont injectées par voie locale. Si cette voie garantit leur présence, du moins immédiate dans les zones à réparer, elle n'est pas exempte d'inconvénients, principalement dans leur caractère invasif et, de ce fait, la difficulté à répéter les administrations.

Parallèlement à ces normes standards, nous avons pu voir dans la première partie de l'introduction de ce manuscrit (A. L'accident vasculaire cérébral) que les tentatives de traitements hémostatiques dans l'hémorragie intracérébrale ont toutes échoué jusqu'à ce jour. En effet, l'essai clinique testant le FVIIa recombinant (jugé comme un agent hémostatique prometteur) chez des patients atteints d'HIC s'est révélé être un échec puisqu'il a été identifié comme non ciblé et lié à des risques thrombotiques sévères (*Diringer et al., 2008*). Il est donc primordial de déceler l'agent hémostatique idéal qui va posséder la capacité de cibler localement le site de saignement actif. En effet, comme nous avons pu le démontrer dans l'introduction de ce manuscrit (partie B. L'hémostase), l'agent hémostatique optimal doit être non immunogène, non toxique et biodégradable. Également, afin d'être efficace dans les saignements aigus, il doit être capable d'une administration intraveineuse immédiate, ciblée et spécifique au site pour éviter le risque de thromboembolie. Ainsi, compte tenu de toutes ces données sur les VE, et de nos résultats prometteurs, il serait question de penser à une possible translation clinique dans la mesure où toutes nos études répondent à la fois aux normes standards de translation clinique des VE en tant que *drug carriers* et aux caractéristiques de l'« hémostat idéal » dans le traitement des saignements aigus.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Cette étude avait pour but d'évaluer le potentiel thérapeutique des vésicules extracellulaires dérivées de monocytes dans un modèle expérimental d'hémorragie intracérébrale. Pour la première fois, nous démontrons dans le contexte de l'HIC, que des VE exogènes d'origine monocyttaire possèdent un effet pro-hémostatique. La présence de PSGL-1 et de FT à leur surface semble être essentielle pour leur potentiel hémostatique, soutenant que la capacité à s'accumuler sur les thrombus en développement en se liant à la P-Sélectine et d'activer la voie extrinsèque de la coagulation est obligatoire pour que les VE stoppent efficacement le saignement dans le contexte de l'HIC. Jusqu'à aujourd'hui, aucun essai clinique n'a révélé de traitement pour les patients atteints d'HIC. Nos travaux ont permis la découverte de ces VE à caractère hémostatique et ouvrent de nouvelles perspectives quant à la translation clinique de la thérapie vésiculaire. Le transfert à la clinique de ces résultats nécessitera des développements dans le domaine de la production de VE à grande échelle, tels que la sécrétion de VE dérivées de monocytes par le *shear stress* dans de grands bioréacteurs.

AUTRES TRAVAUX

TITLE

Transient ischemic attack induces selective serotonin reuptake inhibitors-resistant depressive-like behavior

AUTHORS

Dujarrier C., Potzcha F., Delépée R., Gauberti M., Martinez de Lizarrondo, Vivien D., Agin V.

ABSTRACT

Transient ischemic attack (TIA) is a form of stroke. It is defined as a brief episode of neurological dysfunctions whose focal symptoms regress in less than 24h without evidence of acute cerebral infarction in imaging. Strikingly, recent studies in humans have suggested the existence of chronic cognitive and emotional deficits, contradictory with the absence of long-lasting symptoms as described in its original definition. Thus, TIA is not just a transient event but also a disabling chronic disease that should be treated accordingly. In this study, we aimed to characterize the mechanisms underlying residual functional deficits in a TIA preclinical mouse model. TIA induction was performed by a 15min compression of the right middle cerebral artery (MCA). An operated control group without MCA compression was carried out to compare with experimental subjects. We examined the mice' phenotype one- and fourteen-weeks post-TIA with a range of behavioral tests assessing motricity, anxiety, depression and cognition. We next investigated the mechanisms relating TIA to long-term functional impairments using molecular, biochemical, brain imaging (conventional and molecular magnetic resonance imaging) and pharmacological approaches. We demonstrate that TIA induces depressive-like phenotype and cognitive impairments in mice on the chronic period, by a mechanism independent of inflammatory response.

Interestingly, the residual dysthymia and cognitive disturbances are associated with increased levels of 5-HT in the vascular (plasma) and parenchymal compartments (prefrontal cortex, hippocampus, hypothalamus), as well as a decrease of 5-HT in blood platelets. Finally, our data reveal that TIA mice are resistant to selective serotonin reuptake inhibitors (fluoxetine, duloxetine). Taken together, these results would suggest that blood platelet dysfunction after TIA may play a key role in the residual functional impairments and unresponsiveness to current antidepressant treatments. This study provides thus an innovative behavioral model to further characterize the molecular and cellular mechanisms underlying chronic disabilities induced by TIA and to test new therapeutic strategies.



Impact of Bradykinin Generation During Thrombolysis in Ischemic Stroke

Maxime Gauberti^{1,2}, Fanny Potzeka¹, Denis Vivien^{1,3} and Sara Martinez de Lizarondo^{1*}

¹ Normandie Univ, UNICAEN, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR-S U1237, "Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders" PHIND, Caen, France, ² Department of Diagnostic Imaging and Interventional Radiology, Centre Hospitalier Universitaire Côte de Nacre, Caen, France, ³ Department of Clinical Research, Centre Hospitalier Universitaire Caen, Caen, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Joost Meijers,
University of Amsterdam, Netherlands

Reviewed by:

Coen Maas,
University Medical Center Utrecht,
Netherlands

Heiko Herwald,
Lund University, Sweden

Jonas Emsley,
University of Nottingham,
United Kingdom

Robert Lindsay Medcalf,
Monash University, Australia

*Correspondence:

Sara Martinez de Lizarondo
smartinez@cyceron.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Hematology,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 19 March 2018

Accepted: 14 June 2018

Published: 03 July 2018

Citation:

Gauberti M, Potzeka F, Vivien D and
Martinez de Lizarondo S (2018)
Impact of Bradykinin Generation
During Thrombolysis in Ischemic
Stroke. *Front. Med.* 5:195.
doi: 10.3389/fmed.2018.00195

Ischemic stroke is one of the leading causes of death and disability worldwide. Current medical management in the acute phase is based on the activation of the fibrinolytic cascade by intravenous injection of a plasminogen activator (such as tissue-type plasminogen activator, tPA) that promotes restoration of the cerebral blood flow and improves stroke outcome. Unfortunately, the use of tPA is associated with deleterious effects such as hemorrhagic transformation, symptomatic brain edema, and angioedema, which limit the efficacy of this therapeutic strategy. Preclinical and clinical evidence suggests that intravenous thrombolysis generates large amounts of bradykinin, a peptide with potent pro-inflammatory, and pro-edematous effects. This tPA-triggered generation of bradykinin could participate in the deleterious effects of thrombolysis and is a potential target to improve neurological outcome in tPA-treated patients. The present review aims at summarizing current evidence linking thrombolysis, bradykinin generation, and neurovascular damage.

Keywords: contact phase, fibrinolysis, angioedema, inflammation, brain edema, blood-brain barrier, factor XII, kininogen

INTRODUCTION

Stroke represents the second leading cause of mortality in the world, the third leading cause of reduced disability-adjusted life years and is a major drain on public health-care funding (1). Most strokes are ischemic in nature (80%) and occur when an artery that supplies blood to the brain is blocked by a blood clot (2, 3). The aim of the initial medical management is to limit the extension of brain damage by recanalizing the occluded artery (4). To date, thrombolysis (injection of tissue-type plasminogen activator (tPA), sometimes combined with endovascular thrombectomy), is the only pharmacological treatment for acute ischemic stroke (5). It acts by activating an inactive zymogen, plasminogen, into its active form, plasmin, which is itself able to degrade fibrin, the main constituent of blood clots (6).

In clinical trials, intravenous tPA injection has been shown to improve neurological outcome when injected up to 4.5 h after the appearance of symptoms (7). Yet, tPA administration is not devoid of side effects (6, 8). For instance, when tPA is administered after 6 h, meta-analysis of clinical trials showed that it worsens the neurological outcome (9). Moreover, even when injected in the right therapeutic window, current evidence supports that tPA increases by up to 60% the

mortality of ischemic stroke patients in the first 7 days (8). This increased mortality is partly explained by an increased rate of hemorrhagic transformation. It has also been demonstrated that stroke patients treated with tPA present more severe brain edema, with malignant edema being 2.7 fold more frequent after tPA administration in patients with occlusion of the internal carotid artery (10). These data suggest that besides its beneficial effects on the cerebral blood flow, tPA administration also exerts deleterious effects on the neurovascular unit (11). Therefore, blockade of these deleterious effects may significantly improve the clinical efficacy of tPA mediated thrombolysis and increase its therapeutic window. However, to date, the mechanisms driving the deleterious effects of tPA remain poorly understood and probably include both plasmin-dependent (12) and plasmin-independent processes (11).

There is now compelling evidence supporting that tPA-induced bradykinin generation could be one of the drivers of the deleterious effects of tPA (13–15). Bradykinin is a potent pro-inflammatory and pro-edematous peptide, that is generated by proteolytic cleavage from its precursor high-molecular weight kininogen (HMWK) (16, 17). HMWK cleavage is classically triggered by the activation of the contact system, which is also composed of factor XII (FXII), factor XI (FXI), and plasma prekallikrein (PPK). The contact system is started by FXII binding to negatively charged surfaces such as platelet polyphosphate and mast cell heparin (18). Notably, there is a significant generation of bradykinin during thrombolysis in stroke patients (14, 19). Given the multiple roles for bradykinin in the neurovascular unit described so far including increase in BBB permeability, inflammatory cytokines upregulation, release of glutamate by astrocytes and microglial activation (all potential pathogenic players in ischemic stroke) (17), it is tempting to speculate that the generation of bradykinin triggered by tPA administration participates in its deleterious effects.

The aim of this present review is to summarize current evidence linking tPA administration, bradykinin generation, and neurovascular damage in stroke patients. In the first part of this review, we will present clinical evidence supporting the existence of deleterious effects of tPA on the neurovascular unit. Then, we will describe the molecular pathways linking tPA administration to bradykinin generation. Finally, we will recapitulate the most recent preclinical evidence on the effects of bradykinin in the ischemic brain.

THE EFFECTS OF TPA ON THE NEUROVASCULAR UNIT: CLINICAL EVIDENCE

Intravenous thrombolysis is now an established stroke treatment for patients presenting within 4.5 h after stroke onset (20). Indeed, large, multicenter, randomized, and controlled clinical trials demonstrated that intravenous tPA administration improves stroke outcome in this subset of patients (7). Although tPA is beneficial for most patients, there is a growing body of evidence that tPA may also harm, in particular when tPA is administered more than 6 h after symptom onset. It is therefore

tempting to speculate that the outcome after tPA administration in stroke patients depends on a balance between its beneficial and deleterious effects. Exhaustive literature reviews have been published on the preclinical effects of tPA on the neurovascular unit (6, 11, 21). Here, we will focus only on clinical evidence and extract the data that are relevant to the understanding of the pathophysiology of stroke in the context of tPA administration.

Beneficial Effects

Regarding the beneficial effects of tPA, they appear mainly dependent on its ability to promote arterial recanalization. For instance, in patients presenting occlusion of the termination of the internal carotid artery, in which the rate of recanalization is estimated to be <5% (22), the ICARO study (case-control study) demonstrated that there is no beneficial effect of tPA administration vs. placebo (10). Additionally, patients who recanalize after tPA administration have a far better outcome than patients without recanalization as demonstrated by a large number of studies (23). However, tPA seems also to benefit patients without visible arterial occlusion at presentation (24). Although this can be explained by the presence of distal microemboli not seen on angiography, we cannot exclude the existence of beneficial effects of tPA that are independent of its ability to promote arterial recanalization (25). These putative fibrinolysis-independent effects are relevant for the design of adjuvant treatments for tPA, since these treatments should aim at mitigating the deleterious effects of tPA without jeopardizing its beneficial effects.

Symptomatic Intracranial Hemorrhage

The main deleterious effects of tPA highlighted by clinical studies are symptomatic intracranial hemorrhage (sICH), symptomatic brain edema and angioedema. sICH is probably the most feared complication of tPA administration with a mortality rate approaching 50% (26). The risk of sICH after tPA administration ranges from 2 to 7% according to the definition used. Most of them occur within 24 h after tPA administration with a median time ranging from 5 to 10 h. sICH are related to the dose of tPA administered, as recently demonstrated in a randomized study comparing the standard dose of tPA (0.9 mg/kg) to a lower dose (0.6 mg/kg) that showed sICH rates of 2.1% vs. 1.0% respectively (27). In contrast, time from symptom onset to tPA administration is not significantly associated with sICH risk according to a large meta-analysis (28), although there is a trend for a higher risk when tPA administration is delayed (7, 9). Interestingly, an increased risk of sICH has also been demonstrated after administration of other plasminogen activators such as streptokinase or urokinase (29, 30). Since these plasminogen activators are structurally unrelated, this suggests that the pro-hemorrhagic effect of tPA is dependent on plasminogen activation. Reperfusion and subsequent reperfusion-injury do not seem to explain alone the pro-hemorrhagic effect of tPA since hemorrhage can occur in areas remote from the infarcted tissue (31) and in the absence of reperfusion (32). Given that human imaging studies demonstrated that breakdown of the blood brain barrier (BBB) precedes sICH (33), these data altogether suggest that tPA administration leads to BBB

breakdown and subsequent sICH by a plasminogen dependent mechanism. As a concomitant phenomenon, tPA administration induces a coagulopathy characterized by fibrinogen depletion and prolongation of prothrombin and partial thromboplastin times which may also increase the risk of sICH (34, 35).

Symptomatic Brain Edema

Symptomatic brain edema is a less known complication of tPA treatment, although its effect on mortality is significant (36). In the IST-3 trial for instance, 3% of tPA-treated patients (47/1515) died from symptomatic swelling of the ischemic lesion. Symptomatic brain edema is usually defined as a severe brain swelling with mass effect on imaging. The independent effects of tPA on brain edema are difficult to measure since the reperfusion achieved using tPA is associated with a reduced ischemic lesion size and therefore, a reduced brain swelling. In this regard, the case-control ICARO study that involved stroke patients with occlusion of the internal carotid artery is interesting, since the recanalization rate is expected to be <5% in this subset of patients, allowing to observe the effects of tPA almost independently of arterial recanalization (10). In this study involving 253 patients per group, the rate of fatal symptomatic brain edema (referred as malignant edema) was 8.3% in tPA-treated patients vs. 3.1% in controls ($p = 0.013$). As a comparison, the rate of fatal sICH was only 2.8% in tPA-treated patients, suggesting that the contribution of symptomatic brain edema to mortality is larger than sICH in this patient subset. In a cohort of 943 tPA-treated patients, Strbian et al. studied the parameters associated with the development of brain edema (36). They found imaging evidence of brain edema in 28% of tPA-treated patients and severe forms in 10%. The factors associated with edema development were higher baseline National Institutes of Health Stroke Scale, presence of hyperdense cerebral artery sign or early infarct signs, and longer treatment delays. Altogether, these data suggest that tPA administration promotes brain edema, especially in patients showing early sign of brain infarction on imaging and experiencing longer onset-to-tPA delays. Whether this pro-edema effect is dependent on plasminogen activation cannot be easily retrieved from clinical data.

Angioedema

Angioedema is a rare complication of tPA administration, occurring in ~2% of patients with ischemic stroke (37). It manifests usually as a hemi-oro-lingual edema during or shortly after tPA administration that can be life threatening. Angioedema is associated with the use of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, which is found in 45% of patients with angioedema (19). This finding unraveled bradykinin as the causative factor for tPA-induced angioedema. Indeed, ACE is not only able to process angiotensin into angiotensin-II, it is also responsible for the degradation of bradykinin. Thus, the plasma half-life of bradykinin is extended in patients taking ACE inhibitors, thereby increasing the plasmatic concentration in case of bradykinin generation, that can more easily reach a level triggering angioedema (38). Although the occurrence of angioedema does not significantly influence neurological outcome, patients with angioedema tend to have more sICH

and more malignant brain edema according to the largest series published so far (37). Overall, these clinical data support the following mechanism: tPA administration triggers bradykinin generation, which is itself able to promote angioedema, especially in patients taking ACE inhibitors. In line with the tendency for a higher incidence of sICH and malignant brain edema in patients presenting angioedema, it is tempting to speculate that the effects of tPA-induced bradykinin generation are not restricted to the occurrence of angioedema but also influence the evolution of the ischemic lesion in the brain.

MOLECULAR MECHANISMS OF BRADYKININ GENERATION AFTER TPA ADMINISTRATION

The first convincing evidence of bradykinin generation after tPA administration was published by Agostoni et al. They showed that intravenous administration of tPA or streptokinase in patients with acute myocardial infarction was associated with a cleavage of HMWK, the precursor of bradykinin (13). Interestingly, more HMWK was cleaved after streptokinase than after tPA administration, pointing toward plasmin as a key player in this mechanism, since it has been demonstrated that streptokinase generates more plasmin than tPA after injection (39). Later, the same results were obtained in ischemic stroke patients treated with tPA (14). To be able to interfere with the generation of bradykinin after tPA administration, it is therefore relevant to understand first how tPA generates plasmin and then, how plasmin generates bradykinin (40).

tPA-Induced Plasmin Generation

tPA cleaves plasminogen at its Arg561—Val562 peptide bond, into the active fibrinolytic enzyme, plasmin (41). Although tPA can activate plasminogen into plasmin in the plasma, its efficiency is 100 times higher in the presence of fibrin as a cofactor (42). This role for fibrin as a cofactor for plasminogen activation explains the relative fibrin specificity of tPA compared to streptokinase. This provides a mechanistic explanation for the above mentioned higher systemic generation of plasmin when streptokinase is used as a fibrinolytic agent. Moreover, this implies that, at the level of the thrombus which contains large amounts of fibrin, there is a massive generation of plasmin and therefore, a potentially intense generation of bradykinin. Accordingly, this locally generated bradykinin could act on the ischemic brain downstream of the occlusion site.

Plasmin-Induced Bradykinin Generation

The mechanism by which plasmin generates bradykinin is debated. The first described mechanism is based on the fact that plasmin is able to directly cleave HMWK and generates bradykinin *in vitro* (14, 19). This has been demonstrated using electrophoresis of HMWK after incubation with tPA, plasminogen, tPA plus plasminogen and plasmin. Whereas no cleavage occurred in the presence of tPA or plasminogen when added alone, a significant cleavage of HMWK occurred in the presence of plasmin or tPA plus plasminogen. This

cleavage was accompanied with bradykinin release as assessed by quantification of immunoreactive bradykinin. Although this direct mechanism is apparent *in vitro*, whether it occurs *in vivo* and participates in bradykinin generation after intravenous injection of tPA remains unknown.

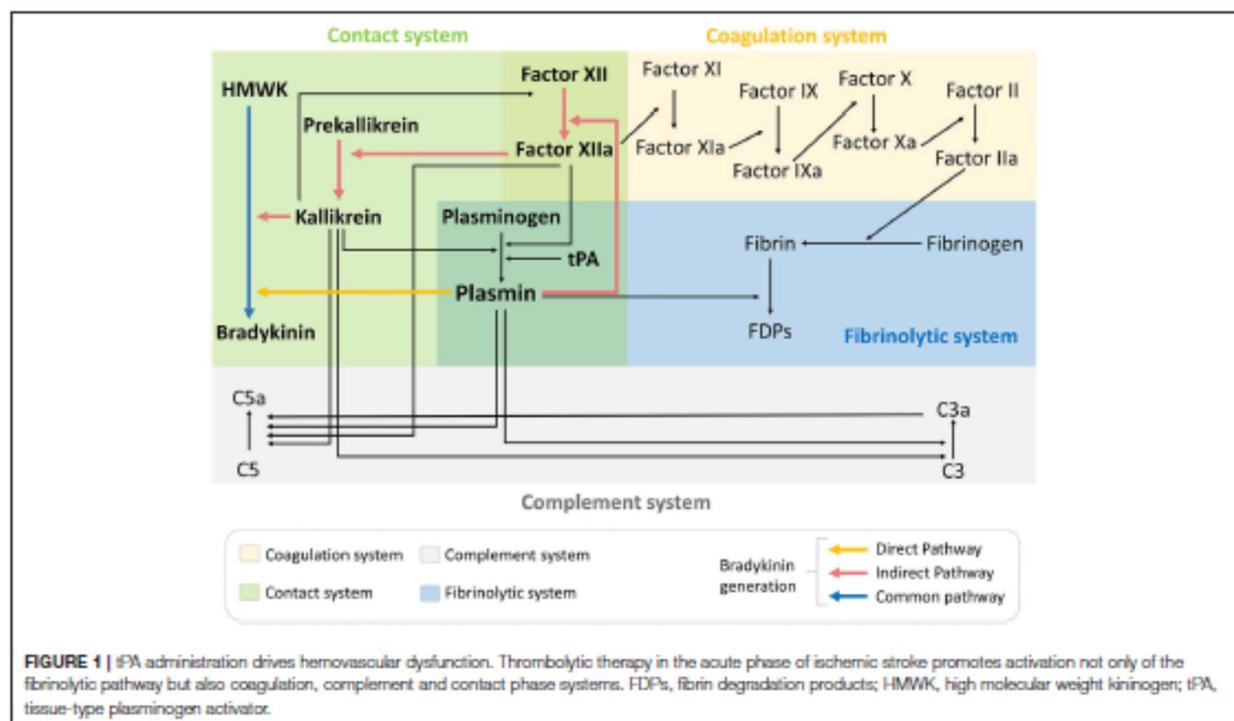
An alternative, indirect mechanism of bradykinin generation after plasmin formation has been described by Simão et al. They first observed that the incubation of human plasma with tPA leads to the formation of active plasma kallikrein (PKal), the enzyme of the contact phase responsible for "physiologic" HMWK cleavage (43). Interestingly, the increase in PKal activity after addition of tPA was lost in Factor XII (FXII) and plasminogen deficient plasma (15). A set of experiments allowed to dissect the complete cascade: tPA activates plasminogen into plasmin, plasmin activates FXII into FXIIa and finally, FXIIa activates plasma prekallikrein into PKal. In line with these *in vitro* findings, intravenous injection of tPA in mice leads to an increase in PKal activity. As expected, this increased PKal activity leads to a cleavage of HMWK. This indirect mechanism of bradykinin formation is probably the dominant mechanism after tPA administration, since tPA does not induce HMWK cleavage in FXII or plasma prekallikrein deficient mice, even if there is plasmin generation in these animals.

Besides activation of the contact phase and subsequent bradykinin generation, there is also a growing body of evidence suggesting that tPA administration induces a widespread hemovascular dysfunction also involving activations of the coagulation cascade and the complement system (Figure 1)

(44–46). All these biochemical cascades can participate in the deleterious effects of tPA on the neurovascular unit in the acute stroke settings.

BRADYKININ GENERATION AS A UNIFYING MECHANISM FOR THE EFFECTS OF TPA ON THE NEUROVASCULAR UNIT

Bradykinin is a nonapeptide (Arg¹-Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸-Arg⁹) released from HMWK after its cleavage. Bradykinin acts through two receptors: kinin 1 receptor (B1R) and kinin 2 receptor (B2R). It requires further processing to Des-Arg⁹-Bradykinin by peptidases (such as carboxypeptidase N) to act through B1R. B2R is almost ubiquitously expressed in the brain (including in the cerebral cortex) whereas B1R is inducible and overexpressed in pathological conditions. B1R and B2R have been described on all the main cellular cell types of the brain including neurons, astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and endothelial cells (47). Interestingly, both receptors are upregulated in the ischemic brain (17). Thus, it has been demonstrated that B1R and B2R are significantly overexpressed at the protein level as early as 4 h post-stroke onset in mice (48). It is therefore tempting to speculate that the effects of tPA-induced bradykinin generation on the neurovascular unit are time-dependent with a larger effect size when tPA administration is delayed. B2R activation has also been shown



to induce tPA release from endothelial cells, potentially further amplifying bradykinin generation (49).

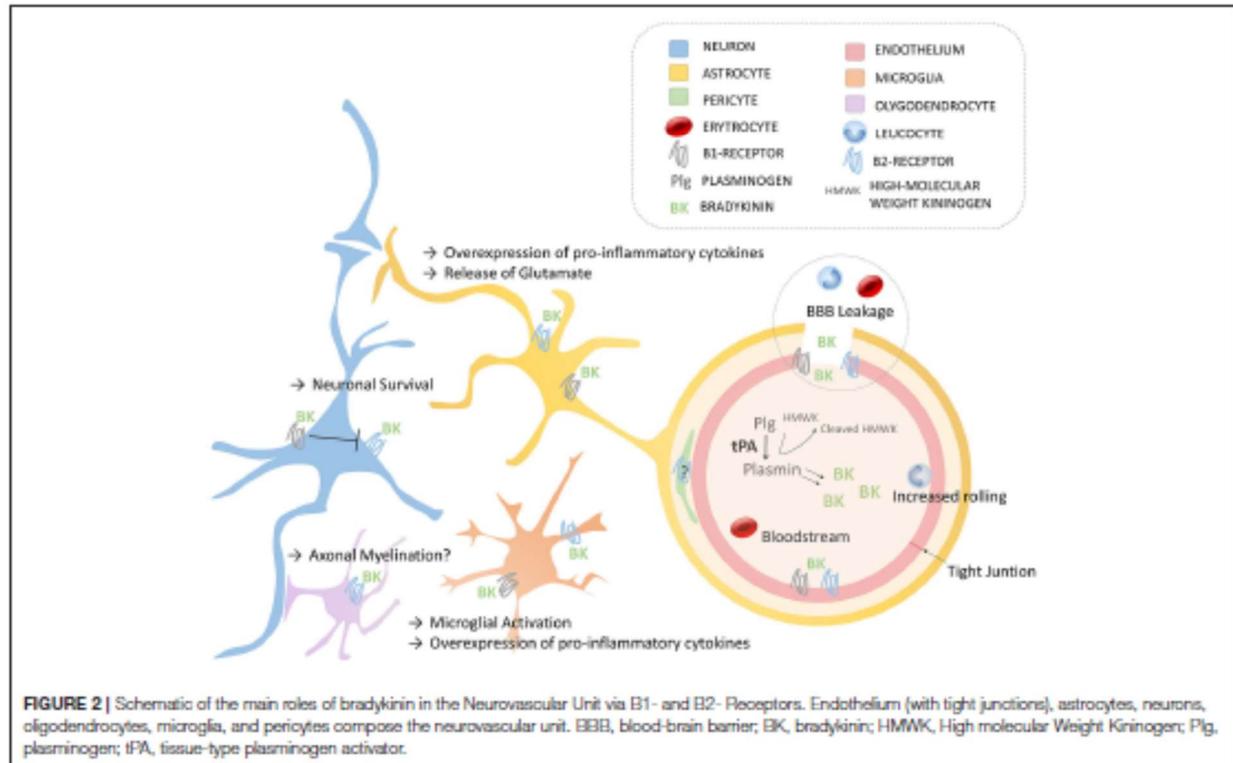
Contradictory Findings Regarding Bradykinin Impact in Stroke

The implication of the kallikrein-kinin system in neurological disorders has been recently reviewed (17). Here, we will focus mostly on the effects of bradykinin relevant to thrombolysis and stroke. The effects of endogenous bradykinin on the ischemic brain are numerous and the results of experimental studies are often contradictory (47). For instance, genetic deletion or pharmacological blockade of B2R has been shown to protect from stroke in a number of studies, mainly performed using the transient mechanical vascular occlusion model of stroke (filament) (50–52). In contrast, some studies reported the absence or even deleterious effects of B2R inhibition using similar experimental models (48, 53). In addition, intravenous injection or overexpression of tissue kallikrein (able to generate kallidin, a bradykinin analog, after cleavage of low-molecular kininogen) has beneficial effects in stroke, which are dependent on B2R activation (54, 55). Regarding B1R, the data are more homogenous since most studies described deleterious effects on ischemic lesion size, brain edema and post-stroke inflammation (48, 56–58). It is however difficult to isolate the contribution of bradykinin on each of these pathophysiological processes, since reduction of lesion size itself is associated with reduced

brain edema and inflammation. In this context and in the absence of experimental studies investigating the effects of bradykinin receptor blockade after tPA administration, we can only make hypotheses regarding the impact of bradykinin in the deleterious effects of tPA (Figure 2), as summarized thereafter.

Bradykinin Enhances BBB Permeability

The most documented effect of bradykinin on the neurovascular unit is an increase in the permeability of the BBB. From a mechanical point of view, bradykinin binding on either B1R or B2R promotes intracellular calcium release, leading to downregulation of claudin-5 (one of the main mediators of BBB integrity) and subsequent BBB leakage (17). Accordingly, B2R agonists (and to a lesser extent, B1R agonists) have been used as a mean to transiently increase BBB permeability for maximizing brain bioavailability of chemotherapeutic drugs (59, 60). In the context of stroke, this bradykinin-induced BBB leakage is considered deleterious since it allows macromolecules to reach the brain parenchyma, thereby promoting brain edema, and weakens the BBB, thereby increasing the risk of hemorrhagic transformation (61). In line with these hypotheses, in mice with thrombotic occlusion of the middle cerebral artery, tPA administration increases hemorrhage transformation, infarct volume and edema (15). Of note, these deleterious effects of tPA are prevented by a PKA1 inhibitor, pointing toward contact phase activation (and possibly bradykinin generation) as the



main pathophysiological player. This might explain why tPA-treated patients with angioedema, who supposedly generate more bradykinin, tend to have more sICH and more malignant brain edema (37). When tPA administration is delayed, the increased expression of bradykinin receptors by the ischemic brain might also explain the higher rate of symptomatic brain edema and the trend for a higher risk of hemorrhagic transformation (9, 36).

Pro-inflammatory Effects of Bradykinin

Beside increasing BBB permeability, bradykinin displays pro-inflammatory effects in the cerebral circulation (17). For instance, direct intra-carotid injection of bradykinin in gerbils induces an increased rolling of leukocytes and adhesion of platelets on the brain endothelium, an effect dependent on B2R (62). The mechanisms by which bradykinin mediates post-stroke inflammation is classically described as involving the activation of B2R (on endothelial cells, astrocytes, neurons, microglia), the release of arachidonic acid and the activation of cyclooxygenase (COX) enzymes (63–65). Bradykinin is also a potent stimulator of the expression of other inflammatory mediators such as cytokines and acts as a leucocyte chemoattractant (66). More recently, inhibition of B1R (but not B2R) has been shown to reduce post-ischemic inflammation in a transient middle cerebral artery occlusion model, in terms of proinflammatory cytokines expression and extent of brain invasion by immune cells (48), but these results can be biased by the dramatic reduction of ischemic lesion size in case of B1R inhibition. Overall, it is reasonable to assume that bradykinin has pro-inflammatory effects through both B1R and B2R activations (17). Bradykinin may also activate mast cells, that play a significant role in tPA-induced brain edema and hemorrhagic transformation (67, 68). All these bradykinin-mediated mechanisms could, at the very least, participate to the pro-inflammatory effects of tPA, as observed in several experimental studies (69). However, brain inflammation after stroke is a dual-edged sword, with inflammatory cascades stimulating deleterious but also potentially beneficial pathways, including post-injury repair processes (70). Thus, the net effect of additional bradykinin generation triggered by tPA-administration in the context of acute ischemic stroke is difficult to predict and could explain the Janus-faced nature of tPA in this context (6).

Bradykinin and Neuronal Cell Death

Bradykinin can also directly influence neuronal cell fate in the ischemic brain, as recently reviewed (71). In particular, B2R protects against neuronal cell death via multiple molecular mechanisms including anti-apoptotic, anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-autophagic, and anti-excitotoxic effects (excitotoxicity refers to the damage triggered by excessive stimulation of neurons by neurotransmitters). Bradykinin displays also a B2R dependent vasodilatory effect on brain microvessels that could improve cerebral perfusion and indirectly mitigate neuronal cell death (63). Thus, bradykinin-mediated

B2R activation may participate in the beneficial effects of tPA administration in patients without visible arterial occlusion (24). *In vitro* experiments suggest that there is a crosstalk between B1R and B2R during pro-excitotoxic challenges in neurons (72). It has been reported that bradykinin triggers a neuroprotective cascade via B2R activation in hippocampal neurons conferring protection against excitotoxicity. Notably, co-activation of B1R blocks this protective effect. Since carboxypeptidases allowing bradykinin processing and subsequent B1R activation are highly expressed in the brain (47), this suggests that the beneficial effects of B2R activation in stroke might be blocked by concomitant B1R activation after bradykinin processing. This suggests that B1R or carboxypeptidase blockade could promote neuroprotection, especially in the context of thrombolysis for acute ischemic stroke. Since B1R expression is induced by brain ischemia, this may also explain why the beneficial effects of tPA administration are larger when thrombolysis is performed in the first hours following stroke onset (9).

CONCLUSION AND THERAPEUTIC PERSPECTIVES

Even if there are probably several molecular effectors of the deleterious effects of tPA on the neurovascular unit in acute ischemic stroke, current pathophysiological knowledge suggests that bradykinin could be one of the most important players. In particular, the pro-inflammatory and pro-edematous effects of bradykinin could explain the increased incidence of sICH and symptomatic edema in tPA-treated patients. If true, angioedema would be only the tip of the iceberg of bradykinin effects in tPA-treated stroke patients. In line with this hypothesis, inhibition of bradykinin receptors or bradykinin processing peptidases could improve the efficacy of tPA and stroke outcome. The challenge resides in the adequate choice of the inhibitors in order to block the deleterious effects without jeopardizing the beneficial effects of bradykinin. The repercussion of such strategy could be large not only in acute ischemic stroke but also in other diseases where pharmacological thrombolysis is indicated including intraventricular brain hemorrhage, acute myocardial infarction, pulmonary embolism, and limb ischemia. This should also stimulate the development of new thrombolytic strategies that act independently of plasmin generation, such as a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13 (ADAMTS-13) or N-Acetylcysteine (73, 74).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

FUNDING

This work was supported by the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM).

REFERENCES

- Feigin VL, Norrving B, Mensah GA. Global burden of stroke. *Circ Res*. (2017) 120:439–48. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308413
- Sudlow CL, Warlow CP. Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types: results from an international collaboration. International stroke incidence collaboration. *Stroke* (1997) 28:491–9. doi: 10.1161/01.STR.28.3.491
- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* (2016) 133:447–54. doi: 10.1161/CIR.0000000000000366
- Moussaddy A, Demchuk AM, Hill MD. Thrombolytic therapies for ischemic stroke: triumphs and future challenges. *Neuropharmacology* (2018) 134(Pt B):272–9. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.11.010
- Broderick JP, Palesch YY, Demchuk AM, Yeatts SD, Khatri P, Hill MD, et al. Endovascular therapy after intravenous t-PA versus t-PA alone for stroke. *N Engl J Med*. (2013) 368:893–903. doi: 10.1056/NEJMoa1214300
- Vivien D, Gauberti M, Montagne A, Defer G, Touze E. Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence. *J Cereb Blood Flow Metab*. (2011) 31:2119–34. doi: 10.1038/jcbfm.2011.127
- Wardlaw JM, Murray V, Berge E, Del Zoppo G, Sandercock P, Lindley RL, et al. Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet* (2012) 379:2364–72. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60738-7
- Sandercock P, Wardlaw JM, Lindley RL, Dennis M, Cohen G, Murray G, et al. The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [IST-3]): a randomised controlled trial. *Lancet* (2012) 379:2352–63. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60768-5
- Lees KR, Bluhmki E, Von Kummer R, Brott TG, Toni D, Grotta JC, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet* (2010) 375:1695–703. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60491-6
- Paciaroni M, Balucani C, Agnelli G, Caso V, Silvestrelli G, Grotta JC, et al. Systemic thrombolysis in patients with acute ischemic stroke and Internal Carotid Artery occlusion: the ICARO study. *Stroke* (2012) 43:125–30. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.630624
- Docagne F, Parcq J, Lijnen R, Ali C, Vivien D. Understanding the functions of endogenous and exogenous tissue-type plasminogen activator during stroke. *Stroke* (2015) 46:314–20. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006698
- Niego B, Medcalf RL. Plasmin-dependent modulation of the blood-brain barrier: a major consideration during tPA-induced thrombolysis? *J Cereb Blood Flow Metab*. (2014) 34:1283–96. doi: 10.1038/jcbfm.2014.99
- Agostoni A, Gardinali M, Frangi D, Cafaro C, Conciato L, Sponzilli C, et al. Activation of complement and kinin systems after thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction. A comparison between streptokinase and recombinant tissue-type plasminogen activator. *Circulation* (1994) 90:2666–70. doi: 10.1161/01.CIR.90.6.2666
- Marcos-Contreras OA, Martinez De Lizarrondo S, Bardou I, Orset C, Pruvost M, Anfray A, et al. Hyperfibrinolysis increases blood-brain barrier permeability by a plasmin- and bradykinin-dependent mechanism. *Blood* (2016) 128:2423–34. doi: 10.1182/blood-2016-03-705384
- Simao F, Ustunkaya T, Clermont AC, Feener EP. Plasma kallikrein mediates brain hemorrhage and edema caused by tissue plasminogen activator therapy in mice after Stroke (2017) 129:2280–90. doi: 10.1182/blood-2016-09-740670
- Costa-Neto CM, Dillenburg-Pilla P, Heinrich TA, Parreira-E-Silva LT, Pereira MG, Reis RI, et al. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. *Int Immunopharmacol*. (2008) 8:135–42. doi: 10.1016/j.intimp.2007.08.003
- Nokkari A, Abou-El-Hassan H, Mechref Y, Mondello S, Kindy MS, Jaffa AA, et al. Implication of the kallikrein-kinin system in neurological disorders: quest for potential biomarkers and mechanisms. *Prog Neurobiol* (2018) 165:7:26–50. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.01.003
- Weidmann H, Heikus L, Long AT, Naudin C, Schluter H, Renne T. The plasma contact system, a protease cascade at the nexus of inflammation, coagulation and immunity. *Biochim Biophys Acta* (2017) 1864:2118–27. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.07.009
- Molinario G, Gervais N, Adam A. Biochemical basis of angioedema associated with recombinant tissue plasminogen activator treatment: an in vitro experimental approach. *Stroke* (2002) 33:1712–6. doi: 10.1161/01.STR.0000017284.77838.87
- Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* (2018) 49:e46–110. doi: 10.1161/STR.0000000000000158
- Fredriksson L, Lawrence DA, Medcalf RL. tPA modulation of the blood-brain barrier: a unifying explanation for the pleiotropic effects of tPA in the CNS. *Semin Thromb Hemost*. (2017) 43:154–68. doi: 10.1055/s-0036-1586229
- Bhatia R, Hill MD, Shobha N, Menon B, Bal S, Kochar P, et al. Low rates of acute recanalization with intravenous recombinant tissue plasminogen activator in ischemic stroke: real-world experience and a call for action. *Stroke* (2010) 41:2254–8. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.592535
- Zangerle A, Kiechl S, Spiegel M, Furtner M, Knoflach M, Werner P, et al. Recanalization after thrombolysis in stroke patients: predictors and prognostic implications. *Neurology* (2007) 68:39–44. doi: 10.1212/01.wnl.0000250341.38014.d2
- Lahoti S, Gokhale S, Caplan L, Michel P, Samson Y, Rosso C, et al. Thrombolysis in ischemic stroke without arterial occlusion at presentation. *Stroke* (2014) 45:2722–7. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.005757
- Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, et al. Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J Exp Med*. (2011) 208:1229–42. doi: 10.1084/jem.20101880
- Yaghi S, Willey JZ, Cucchiara B, Goldstein JN, Gonzales NR, Khatri P, et al. Treatment and outcome of hemorrhagic transformation after intravenous alteplase in acute ischemic stroke: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* (2017) 48:e343–61. doi: 10.1161/STR.00000000000000152
- Anderson CS, Robinson T, Lindley RL, Arima H, Lavados PM, Lee TH, et al. Low-Dose versus standard-dose intravenous alteplase in acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. (2016) 374:2313–23. doi: 10.1056/NEJMoa1515510
- Messe SR, Pervex MA, Smith EE, Siddique KA, Hellkamp AS, Saver JL, et al. Lipid profile, lipid-lowering medications, and intracerebral hemorrhage after tPA in get with the guidelines-stroke. *Stroke* (2013) 44:1354–9. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.671966
- Jaillard A, Cornu C, Durieux A, Moulin T, Boutitie F, Lees KR, et al. Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. The MAST-E study. MAST-E Group. *Stroke* (1999) 30:1326–32. doi: 10.1161/01.STR.30.7.1326
- Kidwell CS, Saver JL, Carneado J, Sayre J, Starkman S, Duckwiler G, et al. Predictors of hemorrhagic transformation in patients receiving intra-arterial thrombolysis. *Stroke* (2002) 33:717–24. doi: 10.1161/hs0302.104110
- Strbian D, Sairanen T, Meretoja A, Pitkanieni J, Putaala J, Salonen O, et al. Patient outcomes from symptomatic intracerebral hemorrhage after stroke thrombolysis. *Neurology* (2011) 77:341–8. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182267b8c
- Ogata J, Yutani C, Imakita M, Ishibashi-Ueda H, Saku Y, Minematsu K, et al. Hemorrhagic infarct of the brain without a reopening of the occluded arteries in cardioembolic stroke. *Stroke* (1989) 20:876–83. doi: 10.1161/01.STR.20.7.876
- Kim EY, Na DG, Kim SS, Lee KH, Ryoo JW, Kim HK. Prediction of hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke: role of diffusion-weighted imaging and early parenchymal enhancement. *AJNR Am J Neuroradiol*. (2005) 26:1050–5.
- Matosevic B, Knoflach M, Werner P, Pechlaner R, Zangerle A, Ruecker M, et al. Fibrinogen degradation coagulopathy and bleeding complications after stroke thrombolysis. *Neurology* (2013) 80:1216–24. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182897015
- Vandelli L, Marietta M, Gambini M, Cavazzuti M, Trenti T, Cenci MA, et al. Fibrinogen decrease after intravenous thrombolysis in ischemic stroke

- patients is a risk factor for intracerebral hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* (2015) 24:394–400. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2014.09.005
36. Strbian D, Meretoja A, Putaala J, Kaste M, Tatlisumak T. Cerebral edema in acute ischemic stroke patients treated with intravenous thrombolysis. *Int J Stroke* (2013) 8:529–34. doi: 10.1111/j.1747-4949.2012.00781.x
 37. Mysiimi E, Caparros E, Dequatre-Ponchelle N, Moulin S, Gautier S, Girardie P, et al. Orolingual angioedema during or after thrombolysis for cerebral ischemia. *Stroke* (2016) 47:1825–30. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.013334
 38. Hofman Z, De Maat S, Hack CE, Maas C. Bradykinin: inflammatory product of the coagulation system. *Clin Rev Allergy Immunol* (2016) 51:152–61. doi: 10.1007/s12016-016-8540-0
 39. Nagai N, Vanlinothout I, Collen D. Comparative effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, and staphylokinase on cerebral ischemic infarction and pulmonary clot lysis in hamster models. *Circulation* (1999) 100:2541–6. doi: 10.1161/01.CIR.100.25.2541
 40. De Maat S, Bjorkqvist J, Suffritti C, Wiesenecker CP, Nagtegaal W, Koekman A, et al. Plasmin is a natural trigger for bradykinin production in patients with hereditary angioedema with factor XII mutations. *J Allergy Clin Immunol* (2016) 138:1414–23.e1419. doi: 10.1016/j.jaci.2016.02.021
 41. Parry MA, Zhang XC, Bode I. Molecular mechanisms of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues. *Trends Biochem Sci* (2000) 25:53–9. doi: 10.1016/S0968-0004(99)01521-2
 42. Nesheim M, Walker J, Wang W, Botfa M, Horrevoets A, Bajzar L. Modulation of fibrin cofactor activity in plasminogen activation. *Ann NY Acad Sci* (2001) 936:247–60. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03513.x
 43. Schmaier AH. Assembly, activation, and physiologic influence of the plasma kallikrein/kinin system. *Int Immunopharmacol* (2008) 8:161–5. doi: 10.1016/j.intimp.2007.08.022
 44. Cap AP. Plasmin: a driver of hemovascular dysfunction. *Blood* (2016) 128:2375–6. doi: 10.1182/blood-2016-09-735720
 45. Zhao XJ, Larkin TM, Lauver MA, Ahmad S, Ducruet AF. Tissue plasminogen activator mediates deleterious complement cascade activation in stroke. *PLoS ONE* (2017) 12:e0180822. doi: 10.1371/journal.pone.0180822
 46. Irmischer S, Doring N, Halder LD, Jo EAH, Kopka I, Dunker C, et al. Kallikrein cleaves C3 and activates complement. *J Innate Immun* (2018) 10:94–105. doi: 10.1159/000484257
 47. Negraes PD, Trujillo CA, Pillat MM, Teng YD, Ulrich H. Roles of kinins in the nervous system. *Cell Transplant* (2015) 24:613–23. doi: 10.3727/096368915X687778
 48. Austinat M, Braeuning S, Pesquero JB, Brede M, Bader M, Stoll G, et al. Blockade of bradykinin receptor B1 but not bradykinin receptor B2 provides protection from cerebral infarction and brain edema. *Stroke* (2009) 40:285–93. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.526673
 49. Joseph K, Tholanikunnel BG, Kaplan AP. Cytokine and estrogen stimulation of endothelial cells augments activation of the prekallikrein-high molecular weight kininogen complex: implications for hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* (2017) 140:170–6. doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.032
 50. Zausinger S, Lumenta DB, Pruneau D, Schmid-Elsaesser R, Plesnila N, Baethmann A. Effects of LF 16-0687 Ms, a bradykinin B(2) receptor antagonist, on brain edema formation and tissue damage in a rat model of temporary focal cerebral ischemia. *Brain Res* (2002) 950:268–78. doi: 10.1016/S0006-8993(02)03053-6
 51. Groger M, Lebesgue D, Pruneau D, Rellon J, Kim SW, Nussberger J, et al. Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* (2005) 25:978–89. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600096
 52. Su J, Cui M, Tang Y, Zhou H, Liu L, Dong Q. Blockade of bradykinin B2 receptor more effectively reduces postischemic blood-brain barrier disruption and cytokines release than B1 receptor inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* (2009) 388:205–11. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.135
 53. Xia CE, Smith, RS Jr, Shen B, Yang ZR, Borlongan CV, Chao L, et al. Postischemic brain injury is exacerbated in mice lacking the kinin B2 receptor. *Hypertension* (2006) 47:752–61. doi: 10.1161/01.HYP.0000214867.35632.0e
 54. Tang Y, Shao Y, Su J, Zhou H, Liu L, Ren H, et al. The protein therapy of kallikrein in cerebral ischemic reperfusion injury. *Curr Med Chem* (2009) 16:4502–10. doi: 10.2174/092986709789760689
 55. Liu L, Liu H, Yang F, Chen G, Zhou H, Tang M, et al. Tissue kallikrein protects cortical neurons against hypoxia/reoxygenation injury via the ERK1/2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* (2011) 407:283–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.112
 56. Raslan F, Schwarz T, Meuth SG, Austinat M, Bader M, Renne T, et al. Inhibition of bradykinin receptor B1 protects mice from focal brain injury by reducing blood-brain barrier leakage and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* (2010) 30:1477–86. doi: 10.1038/jcbfm.2010.28
 57. Sang H, Liu L, Wang L, Qiu Z, Li M, Yu L, et al. Opposite roles of bradykinin B1 and B2 receptors during cerebral ischaemia-reperfusion injury in experimental diabetic rats. *Eur J Neurosci* (2016) 43:53–65. doi: 10.1111/ejn.13133
 58. Sang H, Qiu Z, Cai J, Lan W, Yu L, Zhang H, et al. Early increased bradykinin 1 receptor contributes to hemorrhagic transformation after ischemic stroke in type 1 diabetic rats. *Trans Stroke Res* (2017) 8:597–611. doi: 10.1007/s12975-017-0552-4
 59. Borlongan CV, Emerich DF. Facilitation of drug entry into the CNS via transient permeation of blood brain barrier: laboratory and preliminary clinical evidence from bradykinin receptor agonist, Cereport. *Brain Res Bull* (2003) 60:297–306. doi: 10.1016/S0361-9230(03)00043-1
 60. Cote J, Savard M, Neugebauer W, Fortin D, Lepage M, Gobeil F. Dual kinin B1 and B2 receptor activation provides enhanced blood-brain barrier permeability and anticancer drug delivery into brain tumors. *Cancer Biol Ther* (2013) 14:806–11. doi: 10.4161/cbt.25327
 61. Simao F, Feener EP. The effects of the contact activation system on hemorrhage. *Front Med* (2017) 4:121. doi: 10.3389/fmed.2017.00121
 62. Waldner MJ, Baethmann A, Uhl E, Lehmeberg J. Bradykinin-induced leukocyte- and platelet-endothelium interactions in the cerebral microcirculation. *Brain Res* (2012) 1448:163–9. doi: 10.1016/j.brainres.2012.02.010
 63. Sobey CG, Heistad DD, Faraci FM. Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels. *Stroke* (1997) 28:2290–4. discussion: 2295. doi: 10.1161/01.STR.28.11.2290
 64. Sarker MH, Hu DE, Fraser PA. Acute effects of bradykinin on cerebral microvascular permeability in the anaesthetized rat. *J Physiol* (2000) 528 (Pt 1):177–87. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00177.x
 65. Brian JE Jr, Faraci FM, Moore SA. COX-2-dependent delayed dilatation of cerebral arterioles in response to bradykinin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2001) 280:H2023–9. doi: 10.1152/ajpheart.2001.280.5.H2023
 66. Sobey CG. Bradykinin B2 receptor antagonism: a new direction for acute stroke therapy? *Br J Pharmacol* (2003) 139:1369–71. doi: 10.1038/sj.bjp.0705415
 67. Strbian D, Karjalainen-Lindsberg ML, Kovanen PT, Tatlisumak T, Lindsberg PJ. Mast cell stabilization reduces hemorrhage formation and mortality after administration of thrombolytics in experimental ischemic stroke. *Circulation* (2007) 116:411–8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655423
 68. Oschatz C, Maas C, Lecher B, Jansen T, Bjorkqvist J, Tradler T, et al. Mast cells increase vascular permeability by heparin-initiated bradykinin formation in vivo. *Immunity* (2011) 34:258–68. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.008
 69. Mehra A, Ali C, Parcq J, Vivien D, Docagne F. The plasminogen activation system in neuroinflammation. *Biochim Biophys Acta* (2016) 1862:395–402. doi: 10.1016/j.bbdis.2015.10.011
 70. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* (2011) 17:796–808. doi: 10.1038/nm.2399
 71. Ji B, Cheng B, Pan Y, Wang C, Chen J, Bai B. Neuroprotection of bradykinin/bradykinin B2 receptor system in cerebral ischemia. *Biomed Pharmacother* (2017) 94:1057–63. doi: 10.1016/j.biopha.2017.08.042
 72. Martins AH, Alves JM, Perez D, Carrasco M, Torres-Rivera W, Eterovic VA, et al. Kinin-B2 receptor mediated neuroprotection after NMDA excitotoxicity

- is reversed in the presence of kinin-B1 receptor agonists. *PLoS ONE* (2012) 7:e30755. doi: 10.1371/journal.pone.0030755
73. Denoerme E, Langhauser F, Desender L, Vandenbulcke A, Rottensteiner H, Plaimauer B, et al. ADAMTS13-mediated thrombolysis of t-PA-resistant occlusions in ischemic stroke in mice. *Blood* (2016) 127:2337–45. doi: 10.1182/blood-2015-08-662650
74. Martinez De Lizarrondo S, Gakuba C, Herbig BA, Repesse Y, Ali C, Denis CV, et al. Potent thrombolytic effect of N-acetylcysteine on arterial thrombi. *Circulation* (2017) 136:646–60. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027290

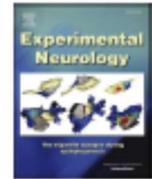
Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Gauberti, Potzeka, Vivien and Martinez de Lizarrondo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Neurology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexnr

Research paper

Single- and two- chain tissue type plasminogen activator treatments differentially influence cerebral recovery after stroke

Antoine Anfray^{a,1}, Camille Brodin^{a,1}, Antoine Drieu^a, Fanny Potzcha^a, Basile Dalarun^a,
Véronique Agin^a, Denis Vivien^{a,b,*}, Cyrille Oroet^{a,1}

^a Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PINND), Caen, France

^b CHU Caen, Department of Clinical Research, Caen University Hospital, Avenue de la Côte de Nacre, Caen, France



ARTICLE INFO

Keywords:
Fibrinolysis
Stroke
Thrombolysis
Tissue-type plasminogen activator

ABSTRACT

Tissue type Plasminogen Activator (tPA), named alteplase (Actilyse®) under its commercial form, is currently the only pharmacological treatment approved during the acute phase of ischemic stroke, used either alone or combined with thrombectomy. Interestingly, the commercial recombinant tPA (rtPA) contains two physiological forms of rtPA: the single chain rtPA (sc-rtPA) and the two-chains rtPA (tc-rtPA), with differential properties demonstrated *in vitro*. Using a relevant mouse model of thromboembolic stroke, we have investigated the overall effects of these two forms of rtPA when infused early after stroke onset (i.e. 20 min) on recanalization, lesion volumes, alterations of the integrity of the blood brain barrier and functional recovery. Our data reveal that there is no difference in the capacity of sc-rtPA and tc-rtPA to promote fibrinolysis and reperfusion of the tissue. However, compared to sc-rtPA, tc-rtPA is less efficient to reduce lesion volumes and to improve functional recovery, and is associated with an increased opening of the blood brain barrier. These data indicate better understanding of differential effects of these tPA forms might be important to ultimately improve stroke treatment.

1. Introduction

Tissue type Plasminogen Activator (tPA) is secreted by endothelial cells and promotes fibrinolysis via the conversion of fibrin-bound plasminogen into plasmin (Collen and Lijnen, 1991). Accordingly, recombinant tPA (rtPA; Actilyse® under its commercial form alteplase) is currently the only approved pharmacological treatment during the acute phase of ischemic stroke to promote recanalization and/or reperfusion of the tissue. It can be used either alone or combined with thrombectomy (Alberts et al., 2015). Despite its clear beneficial effect when administered early after stroke onset (4.5 h when used alone and 6 h when combined with thrombectomy) (Alberts et al., 2015), the overall benefits of rtPA treatment is probably not optimal due to side effects, including its ability to exacerbate alterations of the integrity of the blood brain barrier (BBB) (Yepes et al., 2003; Su et al., 2008) and its capacity to promote activation of N-Methyl-D-Aspartate receptors (NMDAR) (Nicole et al., 2001) inducing subsequent seizure (Alvarez et al., 2013) and excitotoxicity (Nicole et al., 2001; Teirka et al., 1995).

Although produced and secreted under a single chain form (sc-rtPA), sc-rtPA can be cleaved at the Arg275-Ile276 peptide bound to be converted into a two-chain form (tc-rtPA) (Wallén et al., 1982; Rijken and Collen, 1981). Sc- and tc- forms have similar thrombolytic properties in the presence of fibrin (Parcq et al., 2012), but some functions of tPA are specific of its single chain form, especially its ability to promote NMDAR signaling and excitotoxicity (Parcq et al., 2012). The commercial solution of rtPA used in clinic is mainly composed of sc-rtPA, but also contains tc-rtPA in varying proportions (Leyss et al., 2016). The goal of our study was to investigate the influence of the rtPA form (single or two-chain) when used during thrombolysis in a mouse model of thromboembolic stroke. Our data demonstrate a clear beneficial effect of sc-rtPA when injected early after stroke onset, including reduced lesion volumes and improved functional recovery. However, despite promotion of the recanalization, tc-rtPA was less efficient to reduce lesion volume and to improve functional recovery. Moreover, fibrinogen extravasation in the brain was more pronounced after treatment with tc-rtPA than with sc-rtPA. Altogether these data suggest that the two forms of rtPA

* Corresponding author at: INSERM UMR-S U1237 "Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders", University Caen Normandie, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), Bd Beaucquerel, BP5229, 14074 Caen, France.

E-mail address: vivien@cyceron.fr (D. Vivien).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113606>

Received 10 October 2020; Received in revised form 7 January 2021; Accepted 11 January 2021

Available online 13 January 2021

0014-4886/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

contained in alteplase differentially influence the outcome after ischemic stroke.

2. Material and methods

2.1. Animals

Experiments were performed on male Swiss mice (35–40 g; Janvier Labs, France) aged 8 to 10 weeks. All experiments were performed in accordance with the French ethical law (Decree 2013-118) and the European Communities Council guidelines (2010/63/EU) and were approved by institutional review board (French ministry of Research) and by the committee of Normandy (CENOMEXA) registered under the reference CENOMEXA-C2EA – 54 and received the agreement number #11028. All experiments were conducted following the ARRIVE guidelines. All experiments were performed blind with randomization and physiological parameters recorded individually (Suppl. Material Table 1) according to all applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals. Exclusion criteria were animal death (4 during MCAo surgery, 2 in Hepar, 1 in sc-rtPA and 1 in tc-rtPA groups), unsuccessful surgery, subcortical lesions, paw injuries (1 in the sc-rtPA group), non-optimal tissue fixation prior IHC (1 in sc-rtPA and 1 in tc-rtPA groups).

2.2. rtPA preparation

Sc-rtPA and tc-rtPA were prepared and characterized as previously reported (Parcq et al., 2012). Sc-rtPA and tc-rtPA were prepared from Actilyse® (Boehringer Ingelheim). Sc-rtPA was obtained by dialysis of the commercial solution in HEPES buffer (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 0.3 M, pH 7.4, Sigma-Aldrich) using dialysis cassettes (Slide-A-Lyzer® 10 K; ThermoScientific). Tc-rtPA was prepared by overnight incubation of Actilyse® with plasmin-coupled Sepharose 4B at 37 °C, followed by a 2 h incubation with aprotinin-coupled Sepharose 4B at room temperature to eliminate traces of free plasmin. Then, tc-rtPA was dialyzed in HEPES buffer (0.3 M, pH 7.4, Sigma-Aldrich) using same dialysis cassettes as for sc-rtPA preparation. Finally, sc-rtPA (i.e. dialyzed Actilyse®) and tc-rtPA preparations ratio were controlled by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 10% polyacrylamide gels) with coomassie blue staining for revelation. Then their respective fibrinolytic and amyolytic activities were checked by spectrozyme and stain free zymography assay. Finally, the absence of exogenous plasmin was controlled by zymography assay and specific immunoblotting against plasminogen/plasmin.

2.3. Zymography

sc-rtPA and tc-rtPA (10 nmol) were subjected to SDS electrophoresis (8% polyacrylamide gels, under non-reducing conditions). SDS was then exchanged with 2.5% Triton X-100. After washing off excess Triton X-100 with distilled water, the gel was carefully overlaid on a 1% agarose gel containing 1 mg/mL bovine fibrinogen, 100 nM plasminogen and 0.2 NIHU/mL of bovine thrombin. Zymograms were allowed to develop at 37 °C for 2 h and photographed using dark-ground illumination.

2.4. Clot lysis assay

Human plasma was collected and the euglobulin fractions, containing b- and g-globulins, were separated by dilution of one volume of chilled plasma in 20 volumes of chilled acetic acid 2.9 mM. After incubation at 4 °C for 15 min and centrifugation at 3000g for 10 min, the euglobulin fraction was precipitated, the supernatant discarded, and the precipitate resuspended in HEPES buffer (10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl). The euglobulin solution (100 mL) was supplemented with 15 mM calcium chloride and 10 IU/mL of the different sources of rtPA, and

the time to clot lysis was assessed by optical density (405 nm absorbance) at 37 °C.

2.5. Middle cerebral artery occlusion (MCAo)

MCAo were performed as previously described (Orset et al., 2007). Animals were anesthetized with isoflurane 5% and maintained with 2% isoflurane in a 70%/30% mixture of NO₂/O₂. Rectal temperature was controlled and maintained at 37±0.5 °C throughout the surgical procedure using a heating pad. Mice were placed in a stereotaxic frame, the skin between the right eye and ear was incised, the middle cerebral artery (MCA) was exposed through a small craniotomy (performed above MCA bifurcation) and the dura was excised. A micropipette was made with hematologic micropipettes (calibrated at 15 mm/μL; Assistant ref. 555/5; Hoecht, Sondheim-Rhoen, Germany) by using an electrophysiology puller (PC-10; Narishige) and filled with purified murine alpha-thrombin (0.05 mg; Stago BNL). The micropipette was introduced into the MCA lumen, and 1 μL of thrombin (1UI) was injected to induce *in situ* clot formation. The pipette was removed 10 min post occlusion (time required for clot stabilization). Pain management was ensured by anesthetic and analgesic coverage. Thus, after induction of the anesthesia using isoflurane (5% in a 70%/30% mixture of N₂O/O₂), buprenorphine was injected subcutaneously (0.1 mg/kg). Before the mouse positioning in the stereotaxic device, local anesthesia was performed by instillation of lidocaine (spray 10%) in both ears. During all the procedure anesthesia was maintained with isoflurane (2% in a 70%/30% mixture of N₂O/O₂). After the CBF recording, a last administration of buprenorphine was done before awakening.

2.6. Thrombolysis by sc-rtPA and tc-rtPA

A catheter was inserted into the tail vein to allow the intravenous administration (200 μL) of HEPES (0.3 M, pH 7.4, Sigma-Aldrich), sc-rtPA (10 mg/kg) or tc-rtPA (10 mg/kg), 10% bolus, 90% perfusion for 40 min, starting 20 min after the injection of alpha-thrombin.

2.7. Laser speckle flowmetry

After thrombin injection in the MCA, the pipette was left in place for 10 min and during this time, the efficacy of the occlusion was assessed using laser doppler flowmetry with an optic fiber placed above the MCA territory before and up to 10 min after MCA occlusion (MCAo). After pipette removal the laser speckle contrast imager (moorFLPI-2, Moor Instruments) was placed above the mouse skull. Images were acquired immediately after removing the pipette from the MCA, and until the end of the experiment (Sample: 1 Hz, exposure time: 20 ms, FOV = 6 mm × 11.3 mm, images resolution 752x500 pixels). Images were analyzed using the moorFLPIReviewV40 software (moorFLPI-2, Moor Instruments). For each hemisphere, an area was defined on the MCA territory. The % of CBF loss in the ipsilateral hemisphere compared to the contralateral hemisphere was calculated for this area, and the difference (delta, Δ) between the beginning of the monitoring (i.e. just after clot formation) and the end of the monitoring (i.e. after thrombolysis) was expressed.

2.8. Magnetic resonance imaging

Experiments were carried out on a Pharmascan 7 T/12 cm system using surface coils (Bruker, Germany). T2-weighted images were acquired using a multiecho multi-echo sequence: TE/TR 33 ms/2500 ms. Lesion sizes were quantified on these images using ImageJ software. T2*-weighted sequences were used to control if animals underwent hemorrhages events. Two-dimensional time-of-flight angiographies (TE/TR 12 ms/7 ms) were acquired and analyzed of the MCA angiogram were also performed to control the spontaneous recanalization of the arteries of the mice.

2.9. Functional recovery assessment by grip strength test

The grip strength test (BIOSEB, France) assess neuromuscular functions in mice by determining the strength displayed by the animal relative to the forepaw-grasping reflex. This behavioral test is relevant for stroke studies (Takeshita et al., 2017; Klicic et al., 2008) and a reference test to evaluate tasks related to the somatosensory cortex where the ischemic lesion is observed. In addition, with this test, each animal is its own control before and after stroke, allowing a longitudinal evaluation comparing left and right paws, without possibility of compensation and/or habituation. One functional test was performed to avoid enrichment effects of repeated stimulations. Mice, held by the tail, were dropped on a T-like-bar and gently removed by the experimenter. In this context of unilateral (right) ischemic lesion due to stroke, the individual strength of each forepaw was assessed with a wrench connected to the device, while a fake wrench (unconnected to the electronic device) was placed on the other side. Five tests per mouse per side were performed to reduce variabilities, with a 1-min rest between each assay to obtain the mean strength. Measurements were picked up the day before MCAo surgery (baseline acquisition) and following MCAo surgery at day 1, day 2, day 3 and day 7. Data were assessed in grams and converted in % of baseline in order to normalize each mouse with its own baseline values (=100%).

2.10. Immunohistochemistry

Mice were deeply anesthetized and submitted to transcardiac perfusion with heparinized-saline solution followed by a fixative solution containing 2% paraformaldehyde, 0.2% picric acid in phosphate buffer. Brains were cryoprotected (20% sucrose in veronal buffer, 24 h, 4 °C) and stored at -80 °C before cryostat sectioning. Horizontal brain sections (10 μm) were co-incubated with sheep anti-fibrinogen (1:10000) and rabbit anti-laminin (1:1500; Abcam 11,575) polyclonal antibodies overnight. Then, sections were incubated within anti sheep-CY3 and anti-rabbit-FITC (1:600; Jackson ImmunoResearch). Washed sections were coverlipped with anti-fade mounting medium containing DAPI. Epifluorescence images were digitally captured using a CoolSNAP™ camera and visualized with Metavue software (5.0) under a microscope (Leica DM600). The core of the lesion was appreciated based on the DAPI staining, the peri-infarct area was defined as the area just close to the core lesion area, over a distance of 200 μm, within the ipsilateral cortex on the same tissue section.

2.11. Statistical analyses

Results are presented in means ± SD (Fig. 1, 3, 4, 5). Statistical analysis was performed using Statistics® software. We first performed

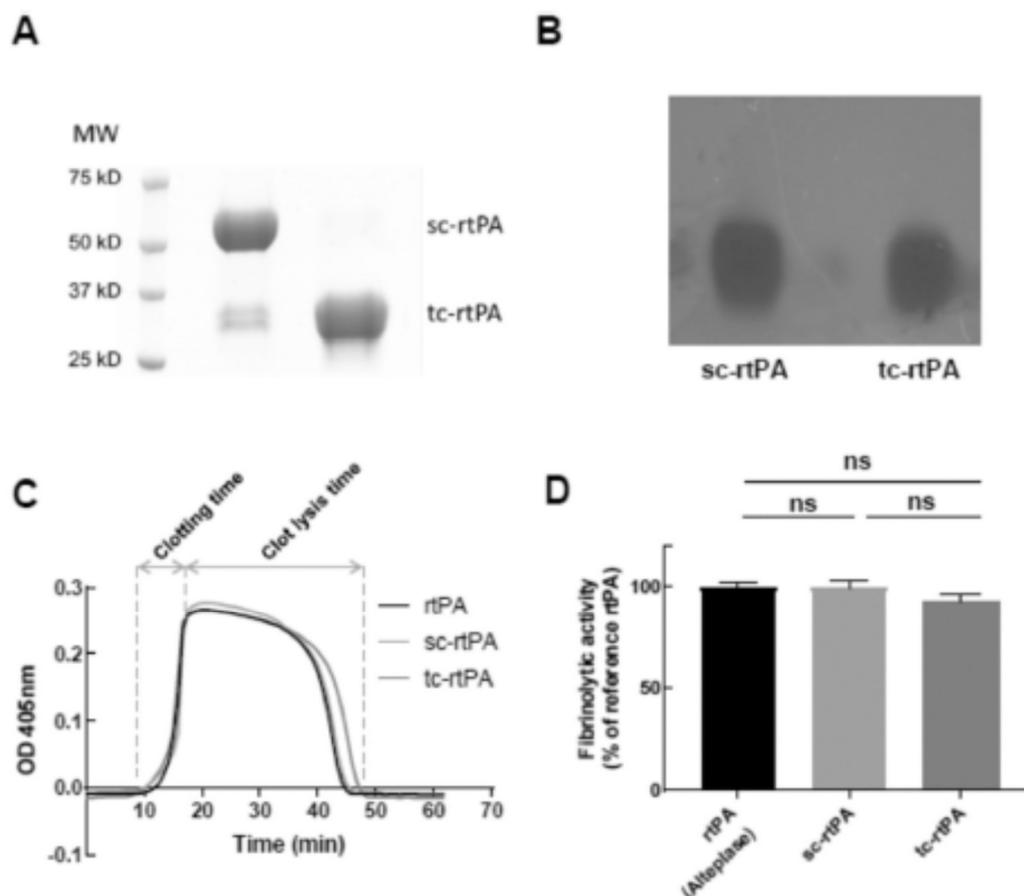


Fig. 1. sc-rtPA and tc-rtPA display a similar fibrinolytic activity.

A Electrophoresis with coomassie blue staining of the two forms of rtPA used, sc-rtPA (70 kDa) and tc-rtPA (35 kDa) MW – Molecular Weight. B Fibrin-agar containing plasminogen zymogram of sc-rtPA and tc-rtPA. C In-vitro clot lysis assay showing kinetics of clot turbidities in human plasma monitored at 405 nm following the addition of rPA, sc-rtPA or tc-rtPA. D Fibrinolytic activity of the two forms of rtPA normalized to an International Reference (IRP 98/714) using the half-time for clot lysis (ns = non-significant; Kruskal-Wallis by ranks (ns) followed by a post-hoc comparisons with Mann-Whitney tests (ns)).

for all samples Shapiro-Wilk tests to address or not their normality. When sample values did not achieve normality (Figs. 1, 3, 4), nonparametric analyses of variance (ANOVA) Kruskal-Wallis (KW) tests were applied to assess if samples were different, and if so, post-hoc comparisons with Mann-Whitney (MW) tests were performed (Figs. 1, 3, 4). When samples displayed normality, as in Fig. 5, parametric two-way ANOVA were performed to test for differences among the three groups over time. If significant differences were found, Bonferroni's multiple comparisons test as post-hoc were performed for intergroup comparisons and Student *t*-tests (dependent samples *t*-test) for intra-group analyses (Fig. 5). Lastly, for each figure, we performed Bonferroni adjustment to counteract the problem of multiple comparisons. Thereby, all values were considered statistically significant if $p \leq 0.01$. The tendency of an effect is discussed here when $p < 0.06$.

3. Results

3.1. *sc*-rtPA and *tc*-rtPA display similar fibrinolytic properties *in vitro*

The *sc*-rtPA and *tc*-rtPA used during all experiments were prepared from the commercial solution used in clinic (see Material & methods section). The purity of each preparation was controlled by electrophoresis (Fig. 1A), with the *sc*-rtPA preparation containing a small amount of *tc*-rtPA (less than 5%) due to its initial presence in the commercial solution (Leyss et al., 2016). The ability of the two forms of rtPA to promote the conversion of plasminogen into plasmin was controlled by zymography, showing similar activities (Fig. 1B). Their ability to initiate fibrinolysis were also controlled using clot lysis assay from human plasma (Fig. 1C–D), with no difference between the two forms of tPA. Using a pool of plasma samples from mice, our data also show that *sc*-rtPA and *tc*-rtPA display similar profiles of clots lysis (1 nM to 25 nM) (Suppl. Fig. 1).

3.2. Despite promoting recanalisation, *tc*-rtPA is less efficient than *sc*-rtPA to reduce lesion volumes after stroke

We have then investigated the influence of the two forms of rtPA used during thrombolysis on the outcome of mice after ischemic stroke. To do so, we subjected 51 mice to ischemic stroke that we then randomly separated into 3 groups receiving different treatments: HEPES, *sc*-rtPA and *tc*-rtPA. 24 h after ischemia, lesion volumes were assessed by MRI, and functional recovery was tested 7 days after ischemia by Grip test, before mice spontaneously recover. Brains were then collected and fibrinogen extravasation into the parenchyma was measured by IHC, close to the known peak of inflammatory process and BBB alteration (Fig. 2).

For this experiment, we used a thromboembolic ischemic stroke model previously described (Orset et al., 2007). In this model, thrombin is injected into the MCA to form a fibrin-enriched clot *in situ*. rtPA can be injected in the circulation afterwards to induce recanalization (10 mg/kg; 10% in bolus and 90% in infusion during a period of 40 min, as performed in clinic). rtPA infusion was started 20 min after thrombin injection (Fig. 3A), which correspond to the therapeutic window seen in clinic (Orset et al., 2016a). For all animals, a non-invasive recording of physiological parameters was performed (anesthesia, pO_2 , breath per min., hearth rate and temperature, see Table 1 in Supplemental material). The CBP after thrombin injection was controlled using laser doppler flowmetry, to make sure the decrease was consistent within each mouse (Fig. 3B). rtPA-induced recanalization and reperfusion was then assessed by using laser speckle contrast imaging, starting 10 min after the occlusion and during 40 min (Fig. 3C–E). Early injection of rtPA (*sc*-rtPA and *tc*-rtPA) improved the recanalization/reperfusion rate (+23.44% for *sc*-rtPA treated animals, $p = 0.01$; +13.95% for *tc*-rtPA treated animals, $p = 0.04$) when compared with the control group (HEPES), with no significant difference observed between *sc*-rtPA and *tc*-rtPA treated animals.

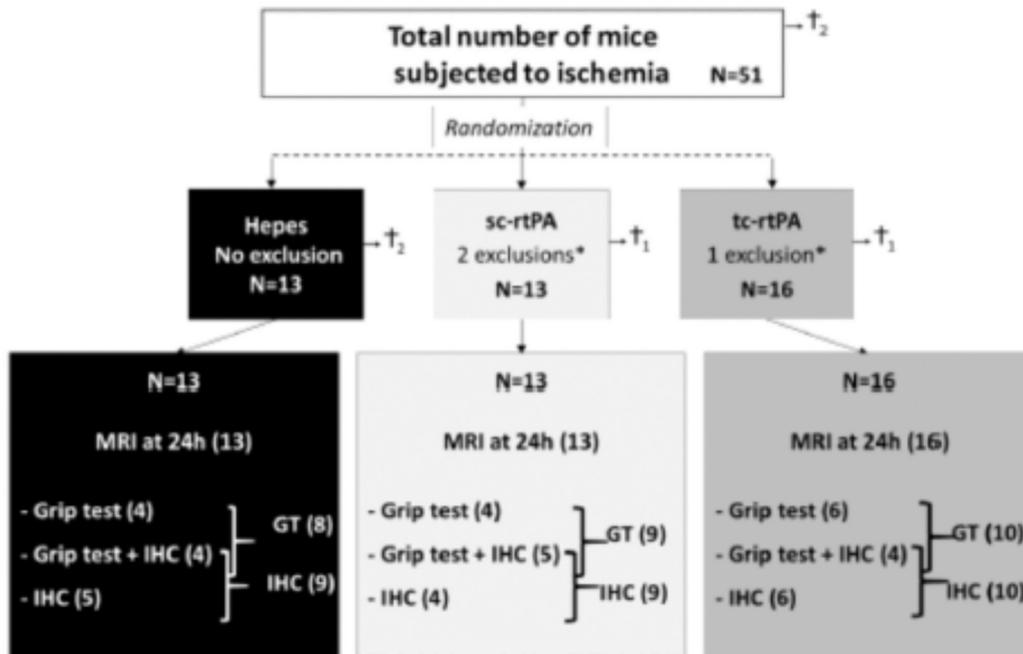


Fig. 2. Study design.

Schematic representation of the performed experiments. Animals subjected to cerebral ischemia were randomized into 3 groups prior treatments started 20 min after stroke onset ($n_h = 13$, $n_{sc} = 13$, $n_{tc} = 16$). Lesion volumes were assessed at 24 h post stroke onset by MRI (7 T); Functional recovery was assessed using unilateral grip strength test at D-1, D1, D2, D3, D7 post stroke onset ($n_h = 8$, $n_{sc} = 9$, $n_{tc} = 10$); Immunohistochemistry (IHC) were performed at D7 to assess the extravasation of vascular fibrinogen into the brain parenchyma ($n_h = 9$, $n_{sc} = 9$, $n_{tc} = 10$).

A. Anfray et al.

Experimental Neurology 338 (2021) 113606

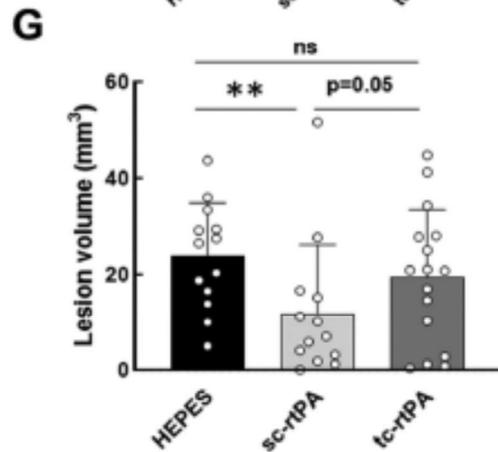
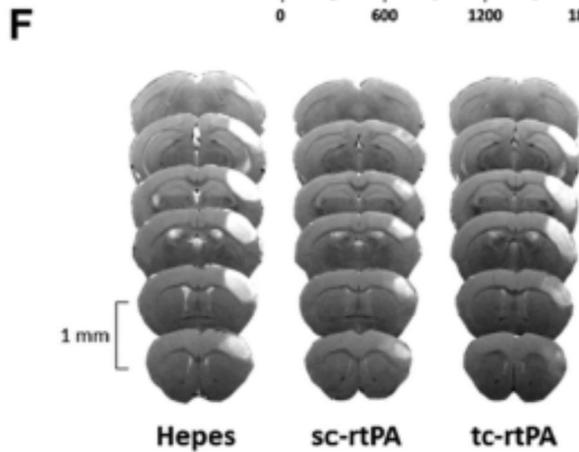
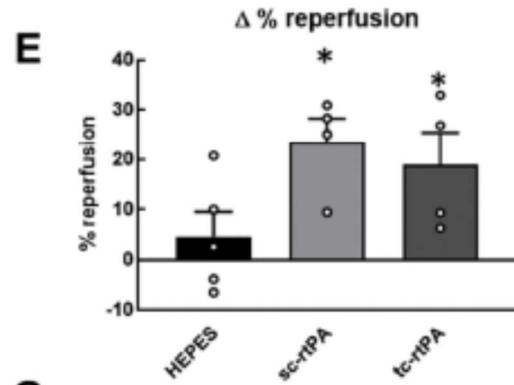
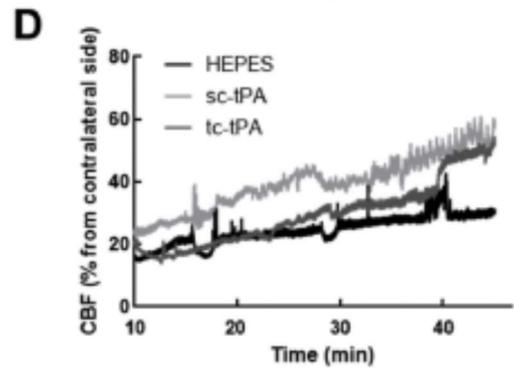
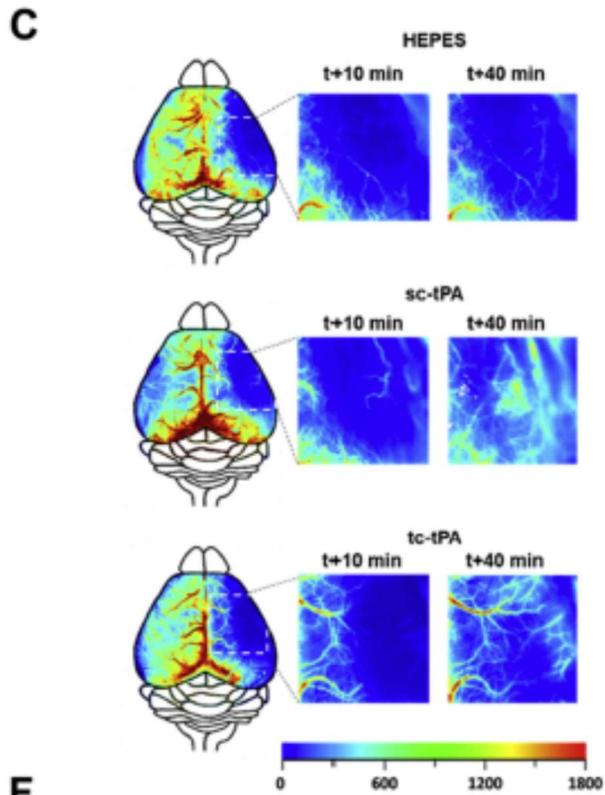
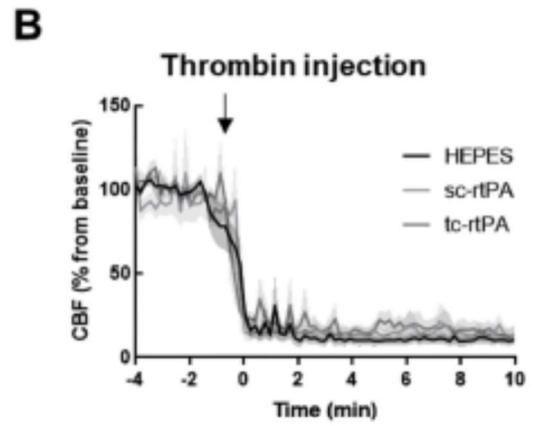
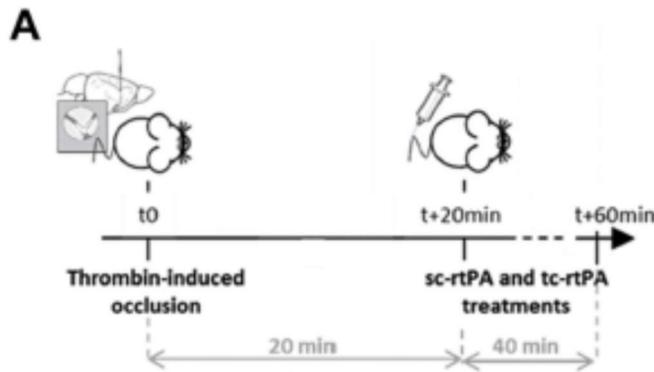


Fig. 3. Both sc-rtPA and tc-rtPA improve recanalization-reperfusion after thromboembolic stroke, but tc-rtPA is less efficient to reduce lesion volumes. **A** Experimental design. **B** Curve displaying laser doppler signal (expressed as a percent of the baseline) during thrombin injection showing the CBF drop ($n_b = 5$, $n_{sc} = 4$, $n_{tc} = 5$; mean \pm SD). **C** Laser speckle contrasted images obtained 10 min and 40 min after occlusion of the right MCA. The color scale represents CBF values (AU). **D** Representative CBF curves over time of each group extracted from laser speckle images, starting at $t + 10$ min after occlusion of the MCA. **E** Delta of the % of reperfusion between $t + 10$ min and $t + 40$ min. CBF signal measured in the ipsilateral side was expressed as a % of the CBFs on the contralateral side (Mean \pm SD, $n = 4/5$ per group; t-test; bonferroni adjustment $^*p \leq 0.01$). **F** Representative T2-weighted brain images of Hepes, sc-rtPA and tc-rtPA treated animals recorded at 24 h post stroke onset. **G** Box plots presenting lesion sizes at 24 h post stroke onset in Hepes ($n = 13$), sc-rtPA ($n = 13$) and tc-rtPA ($n = 16$) treated animals (10 mg/kg of rtPA started 20 min after arterial occlusion). * means significant versus Hepes, ns = non significant; Kruskal-Wallis by ranks followed by a post-hoc comparisons with Mann-Whitney tests; bonferroni adjustment $^{**}p \leq 0.01$).

Interestingly, treatment with sc-rtPA led to almost 50% reduction of lesion volumes measured 24 h after stroke onset (Fig. 3F-G; 23.89 mm³ for control animals, 11.93 mm³ for sc-rtPA treated animals, $p = 0.003$), whereas no significant reduction of the ischemic lesion volumes was observed for the tc-rtPA treated group when compared with the control group (19.46 mm³ for sc-rtPA treated animals, $p = 0.14$). No significant difference was observed between the sc-rtPA and tc-rtPA treated groups, despite a strong tendency ($p = 0.05$).

3.3. Tc-rtPA promotes accumulation of fibrinogen into the parenchyma following stroke

We then decided to investigate whether the lack of efficiency of tc-rtPA may be due to increased alterations of the integrity of the BBB. As fibrin(ogen) deposition in the parenchyma is associated with disruption of BBB homeostasis (Peterson et al., 2018), we thus analyzed the extravasation of circulating fibrinogen into the brain parenchyma of animals from HEPES ($n = 9$), sc-rtPA ($n = 9$) and tc-rtPA ($n = 10$) groups, in tissue sections harvested at 7 days post stroke onset. Immunohistochemistry of fibrinogen and corresponding images analyses (Fig. 4A) revealed an increased extravasation rate of fibrinogen in tc-rtPA treated animals in the peri-lesional areas when compared with control (Fig. 4B; +371.03%, $p = 0.01$) and when compared with sc-rtPA treated animals (Fig. 4B; +562.34%, $p = 0.01$). In the core of the lesion, extravasation of fibrinogen in tc-rtPA treated animals was also increased compared with control animals (Fig. 4B; +392.26%, $p = 0.007$).

3.4. Sc-rtPA, but not tc-rtPA, improves functional recovery post stroke

Assessment of the neurological deficits using grip test analysis for individual forepaws (Fig. 5A-B) revealed a clear strength deficit of the left forepaw in non-treated stroke animals group (Fig. 5C; Day 1-12.70%, $p = 0.01$; Day 2-9.95%, $p = 0.0025$; Day 3-9.85%, $p = 0.02$ and Day 7-2.83%, $p = 0.06$) with a spontaneous recovery of the left forepaw strength from day 1 to day 7 ($p = 0.01$). Interestingly, sc-rtPA treatment abolished this deficit (Fig. 5C; Day 1: $p = 0.05$; Day 2: $p = 0.02$; Day 3: $p = 0.07$; Day 7: $p = 0.08$) while tc-rtPA failed to reduce this deficit and possibly worsens it with no functional recovery at day 7 (Fig. 5C; Day 1-18.87%, $p = 0.00015$; Day 2-12.98%, $p = 0.0025$; Day 3-20.15%, $p = 0.00005$; Day 7-7.22%, $p = 0.0025$). At Day 3 specifically, sc-rtPA-treated mice have a better left grip strength ($p = 0.01$) compared to tc-rtPA-treated group. The global recovery profile analyses assessed during the week following MCAO (D1-D7) show that the sc-rtPA-treated mice have a higher left grip strength compared to tc-rtPA-treated group (Fig. 5D; $p = 0.003$; $p = 0.003$; $p = 0.740$).

Right forepaw grip strength assessment for sc-rtPA-treated mice showed a normal performance (Fig. 5E; Day 1 $p = 0.06$; Day 2 $p = 0.16$; Day 3 $p = 0.1$; Day 7 $p = 0.23$ compared to baseline). However, for non-treated group, compared to baseline, some deficits were observed for this ipsilateral paw at Day 2 and Day 7 (Fig. 5E; Day 1 $p = 0.03$; Day 2 $p = 0.01$; Day 3 $p = 0.11$; Day 7 $p = 0.005$ compared to baseline). In the same way, a transient deficit was observed for this ipsilateral paw for tc-rtPA-treated mice at day 3 post-ischemia, with a recovery perceptible on the seventh day (Fig. 5E; Day 1 $p = 0.07$; Day 2 $p = 0.09$; Day 3 $p = 0.0075$; Day 7 $p = 0.16$ compared to baseline). Here, the global recovery profile analyses assessed during the week following MCAO (D1-D7) does not show any difference between groups (Fig. 5F; $p = 0.005$; 0.106;

>0.999).

4. Discussion

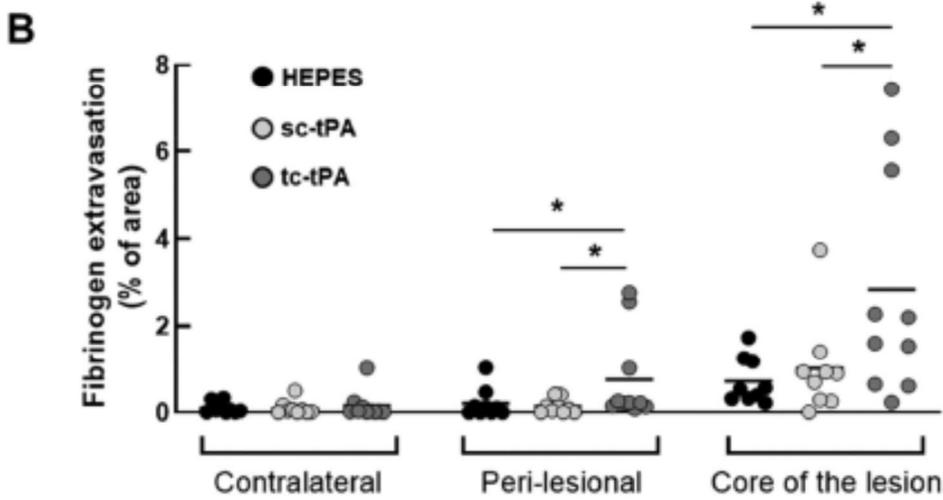
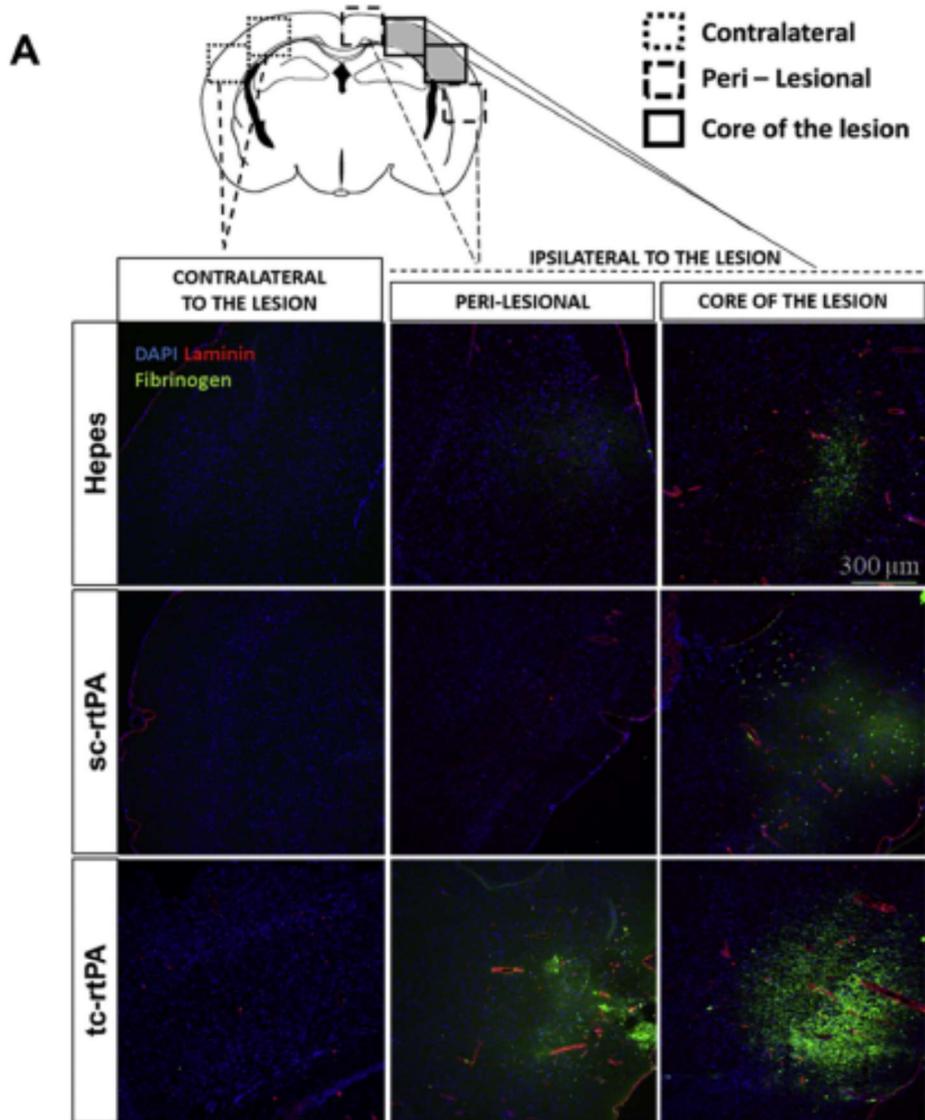
Pharmacological thrombolysis, stroke units and more recently thrombectomy have revolutionized acute stroke medical care. However, because of a too limited access to stroke units (including thrombectomy rooms and neuroradiologists), of a strict eligibility of patients to rtPA-induced thrombolysis (alone or combined with thrombectomy) and of a too low recanalization rate of rtPA-treated patients, only a small fraction of stroke patients has an overall benefit of the current treatments. Thus, it is still mandatory to improve the efficacy of pharmacological fibrinolysis.

Endogenous tPA is synthesized as a single-chain protein (sc-tPA) and can be converted into a two-chain form (tc-tPA) by plasmin or kallikrein (Wallén et al., 1982) without affecting its fibrinolytic efficacy (Parcq et al., 2012). However, the sc-tPA is the only form capable to promote NMDAR-mediated harmful effects in vitro and in vivo (Parcq et al., 2012). Because the rtPA contained in the solution of alteplase used in clinic is a mix of the two forms of tPA (sc-rtPA and tc-rtPA), we decided to test whether purified sc-rtPA and tc-rtPA may display differential benefits in a preclinical model of thromboembolic stroke in mice with early rtPA mediated recanalization.

We used a thromboembolic ischemic stroke model (occlusive thrombi) in which a clot is formed by in situ injection of thrombin in the MCA (Orzet et al., 2007). This model is the best suited to study rtPA induced thrombolysis because of the generation of a fibrin-enriched clot. It reproduces the clinical features of rtPA thrombolysis, where early (20 min after occlusion) or late injection (180 min) of rtPA is beneficial or detrimental, respectively (Orzet et al., 2016a). We decided to treat animals at 20 min after stroke onset, a condition previously determined to be beneficial for rtPA treatment, based on a previously published meta-analysis (Orzet et al., 2016a), when used in its commercial form (Actilyse®). In this model, 10 mg/kg of human rtPA is used instead of 0.9 mg/kg in Human, because of the reported lower affinity (10 fold) of the human rtPA for the mouse plasminogen (Matsumoto et al., 2007; Lijnen et al., 1994). We cannot exclude that this high concentration of tPA could induce unexpected side effects, which is a limitation of our present study.

Our data revealed that despite similar fibrinolytic activities (Thellwell and Longstaff, 2007) (Fig. 1) and similar recanalization rates (Fig. 3C-E), the two forms of rtPA differentially influence the outcome after ischemic stroke. Indeed, although sc-rtPA is clearly beneficial in terms of ischemic lesion volumes and functional recovery when injected early after stroke onset, tc-rtPA failed to significantly reduce lesion volumes (Fig. 3F-G) and worsened functional recovery (Fig. 5).

Additional studies would be needed to understand what makes tc-rtPA less efficient to improve the outcome of mice after ischemic stroke. There was a tendency of finding larger lesion size (or less lesion size reduction) with tc-tPA treatment than after sc-tPA treatment. One explanation could be found around the rtPA effect on the BBB, because we found that tc-rtPA treatment led to an increase of the extravasation of fibrinogen 7 days after the stroke onset (Fig. 4). It would be interesting to determine from non-perfused tissues, whether the fibrin(nogen) deposits observed in the brain parenchyma, around vessels, also exist inside of the vessels. Our present immunostainings did not reveal such deposits, with the limitation that we used here perfused tissue sections.



Given our present data, we hypothesize that following thromboembolic stroke in rodents, sc-tPA promotes recanalization without further alteration of the homeostasis of the blood brain barrier, thus leading to reduced ischemic lesions, inflammation and improved functional outcomes. Tc-tPA also promotes recanalization, but with alteration of the homeostasis of the blood brain barrier, possibly leading to an exacerbation of the inflammatory processes, thus worsening ischemic lesions and outcomes.

It has already been shown that tPA can promote BBB opening through interaction with LRP receptor (Cheng et al., 2006), activation of PDGF-CC and PDGFR- α (Su et al., 2008), or activation of matrix metalloproteinase (Lijnen, 2001). Thus, it would be of interest to determine whether sc-rtPA and tc-rtPA may differentially bind with and activate LRP receptor, PDGF-CC or MMP, and have differential effects on the homeostasis of the BBB. In this context, it should be noted that tPA half-life in the blood is approximately 6 min (Barker-Carlson et al., 2002), and it is mostly cleared by hepatic cells through LRP receptors (Narita et al., 1995). Investigating a potential differential affinity of sc-rtPA and tc-rtPA for LRP receptors could also be important in the understanding of the differential effects of these two forms of tPA. It is also interesting to note that sc-rtPA and tc-rtPA were reported to differentially interact and form complexes with the two PA inhibitors, PAI-1 and neuroserpin (Barker-Carlson et al., 2002; Marco-Contreras et al., 2016). One additional important question to address would be the respective circulating half-lives of the two rtPA variants (sc-rtPA and tc-rtPA), in regards with their hepatic clearance mediated by LRP receptors (Narita et al., 1995). Finally, it would be interesting, in future studies, to further investigate the differential functions of sc-tPA and tc-tPA on the BBB, including actions on tight-junction integrity, transmigration of inflammatory cells or activation of PDGFR- α , for instance.

In our study, sc-rtPA treatment is clearly beneficial (50% reduction of the lesion volume; Fig. 3F–G). This could be seen paradoxical, since previous studies reported a deleterious effect of sc-rtPA during stroke, especially by promoting excitotoxicity through interaction with NMDAR (Nicole et al., 2001). However, its overall effect is beneficial, because the benefits from recanalization strongly overcome the detrimental effect of increased excitotoxicity when thrombolysis is carried out early (Orset et al., 2016b).

It was recently reported in a multicentric analysis performed from 1004 thrombolysed stroke patients (sc-tPA/(sc-tPA + tc-tPA) ratios ranged from 51% to 91%) that people injected with the higher ratio of sc-rtPA developed early seizures, but without influencing the functional

Fig. 4. tc-rtPA promotes extravasation of fibrinogen into the parenchyma.

A Representative immunohistochemistry images from contralateral and ipsilateral (peri lesional and in the core of the lesion) hemispheres to the lesion of animals treated with Heparin ($n = 9$), sc-rtPA ($n = 9$) and tc-rtPA ($n = 10$) performed at 7D post stroke onset. DAPI (blue), laminin (red) and fibrinogen (green) label nuclei, basal lamina and extravasated fibrinogen respectively. B Quantitative analyses of fibrinogen extravasation in % of area (* means significant versus tc-rtPA, ns = non significant; Kruskal-Wallis by ranks ($p = 0.04$) followed by a post-hoc comparisons with Mann-Whitney tests; bonferroni adjustment * $p \leq 0.01$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

outcome if injected in the 4.5 h therapeutic window for rtPA (Leyns et al., 2016). We did not observe any increase in seizure occurrence during our experiments, but we did not use specific monitoring to record them. A full-time monitoring of mice following stroke would be needed to explore this question. However, when patients received a higher ratio of tc-rtPA, the proportion of haemorrhagic transformations significantly increased (Leyns et al., 2016). This could be compared to our results showing an increased fibrinogen extravasation into the brain of tc-rtPA-treated mice (Fig. 4), but this would need further confirmation. Despite differences on the ratio of sc/tc-tPA received by patients of this study, they overall always received more sc-tPA than tc-tPA, attenuating the observed effect solely due to tc-rtPA.

Several structurally related eukaryotic or bacterial forms of plasminogen activators (PAs), potentially lacking the reported side effects of rtPA, have been tested in the context of stroke (Furlan et al., 2006). To the same aim, mutants of rtPA have been generated, leading to the development of tenecteplase (TNK), a rtPA mutant that displays a higher resistance to PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) (Keyt et al., 1994), a greater fibrin specificity, an enhanced half-life and a lack of interaction with NMDAR (rtPA binds the GluN1 subunit of NMDAR by a two sites system, whereas TNK displays a lower affinity than rtPA for GluN1 involving only a one site binding system) (Lopez-Atalaya et al., 2008). Its clinical benefits compared to rtPA are currently under investigation (Coutts et al., 2018). This also led to the generation of an optimized form of rtPA containing two points mutations: one to prevent its interaction with NMDAR (mutation within its kringle 2 domain) and one to prevent its processing into the two chain form (Parcq et al., 2013). However, in a study including 31 patients with acute carotid artery-territory ischemic stroke within 6 h from symptom onset, it was suggested that Duteplase (a tc-rtPA) was safe and beneficial for patients (Mori et al., 1992).

All these data propose that rtPA should be considered as a more complex molecule as initially reported, with two forms (sc-rtPA and tc-rtPA), both contained in the preparation of alteplase used in clinic, which may have differential functions. It is important to note that all these data (preclinical and clinical) were obtained performing rtPA treatment within the corresponding therapeutic windows for rodents and humans, meaning in conditions that are favourable for a beneficial effect of rtPA treatments. Otherwise, when delayed, rtPA treatments are well known to become deleterious both in animal models (Macrez et al., 2011) and in the clinical setting (Wardlaw et al., 2012). The effects of the two forms of rtPA could be different when thrombolysis is performed

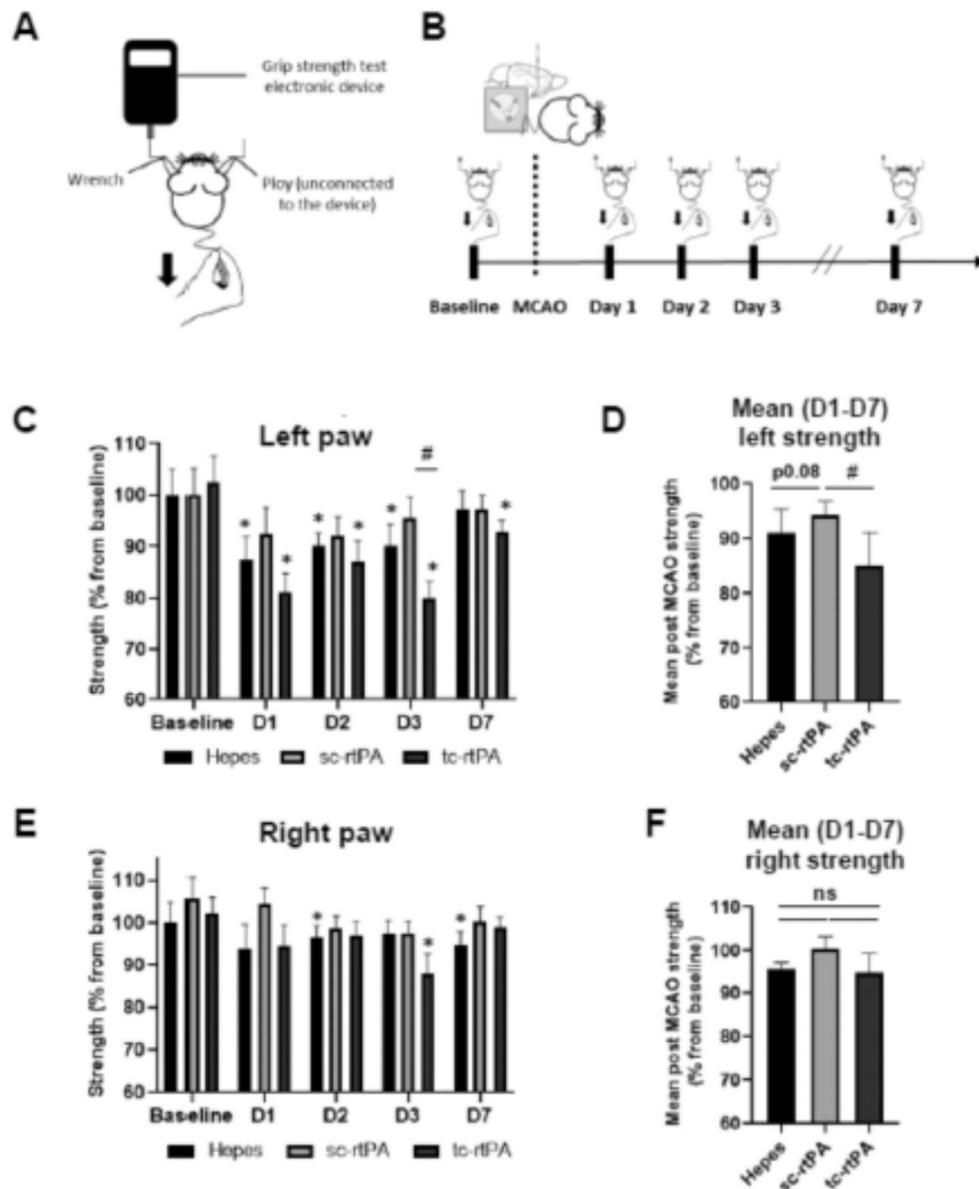


Fig. 5. sc-rtPA treatment rescues post stroke functional deficits, tc-rtPA worsens it.

A Descriptive schema of the improved strength measurement method called « Unilateral forepaw strength test ». Mice, holding by the tail, are dropping on a L-like bar and gently remove. Then, we assessed independently the right and left forepaw strength for each mouse. B Measurements were picked up before MCAO surgery D-1 and following MCAO surgery at D1, D2, D3 and D7. C Histogram representing the strength of left forepaws of animals treated with Hepes, sc-rtPA, and tc-rtPA at D-1, D1, D2, D3, D7. Data were assessed in grams and converted in % normalized for each mouse with the corresponding baseline values (D-1). Results are presented in mean \pm SD ($n = 8/9/10$); * means significant compared to baseline, # symbolizes an intergroup difference, ns = non-significant; parametric two-way ANOVA were performed to test for differences among the three groups over time. If significant differences were found, Bonferroni's multiple comparisons test as post-hoc comparisons were performed for intergroup comparisons and Student *t*-tests (dependent samples *t*-test) for intragroup analyses; bonferroni adjustment * $p \leq 0.01$). D Histogram representing the mean left forepaws strength profile assessed during the week following MCAO (D1-D7). Results are presented in mean \pm SD ($n = 8/9/10$); # symbolizes an intergroup difference, ns = non-significant; parametric two-way ANOVA were performed to test for differences among the three groups over time. If significant differences were found, Bonferroni's multiple comparisons test as post-hoc comparisons were performed. E Histogram representing strength of right forepaws of animals treated with Hepes, sc-rtPA, and tc-rtPA at D-1, D1, D2, D3, D7. Data were assessed in grams and converted in % normalized for each mouse with the corresponding baseline values (D-1). Results are presented in mean \pm SD ($n = 8/9/10$); * means significant compared to baseline, # symbolizes an intergroup difference, ns = non-significant; parametric two-way ANOVA were performed to test for differences among the three groups over time. If significant differences were found, Bonferroni's multiple comparisons test as post-hoc comparisons were performed for intergroup comparisons and Student *t*-tests (dependent samples *t*-test) for intragroup analyses; bonferroni adjustment * $p \leq 0.01$). F Histogram representing the mean right forepaws strength profile assessed during the week following MCAO (D1-D7). Results are presented in mean \pm SD ($n = 8/9/10$); # symbolizes an intergroup difference, ns = non-significant; parametric two-way ANOVA were performed to test for differences among the three groups over time. If significant differences were found, Bonferroni's multiple comparisons test as post-hoc comparisons were performed.

late after stroke onset. It would also be interesting to further investigate how and at which rate the sc-rtPA can be converted into tc-rtPA after its injection into the circulation, either early or late after stroke onset.

In conclusion, clinical and preclinical data demonstrate that the impact of rtPA administration in stroke patients may be dependent of the form of rtPA used (sc-rtPA versus tc-rtPA) and that these differential functions goes beyond degradation of the fibrin clot, offering opportunities for improving the safety and efficacy of this treatment by targeting the forms of rtPA.

Authors contributions

Study design: D. Vivien, A. Anfray, V. Agin and C. Orset. Conducting experiments and acquiring data: A. Anfray, C. Brodin, A. Drieu, B. Dalarun, and F. Potzha. Analyzing data: A. Anfray, D. Vivien, C. Orset, C. Brodin and F. Potzha. Writing the manuscript: D. Vivien, A. Anfray, C. Brodin and C. Orset.

Sources of funding

This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Caen Normandie University, the Regional Council of Lower Normandy and the European Union "FP7-PEOPLE-2013-ITN - Marie-Curie Action": Initial Training Networks » (N°607962). This work was also supported by the RHU MARVELOUS (ANR-16-RHUS-0009) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" operated by the French National Research Agency (ANR).

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declaration of Competing Interest

Denis Vivien is co-author of the patent N° WO02013134710A1 for a mutant form of tPA.

All others authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

No special acknowledgments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113606>.

References

Alberts, M.J., Shang, T., Magadan, A., 2015. Endovascular therapy for acute ischemic stroke: dawn of a new era. *JAMA Neurol.* 72, 1101–1103.

Alvarez, V., Rossetti, A.O., Papavasileiou, V., Michel, P., 2013. Acute seizures in acute ischemic stroke: does thrombolysis have a role to play? *J. Neurol.* 260, 55–61.

Barker-Carlson, K., Lawrence, D.A., Schwartz, B.S., 2002. Acyl-enzyme complexes between tissue-type plasminogen activator and neuroserpin are short-lived in vitro. *J. Biol. Chem.* 277, 46852–46857.

Cheng, T., Petraglia, A.L., Li, Z., Thiyyagarajan, M., Zhong, Z., Wu, Z., et al., 2006. Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nat. Med.* 12, 1278–1285.

Collen, D., Lijnen, H.R., 1991. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78, 3114–3124.

Coutts, S.B., Berge, E., Campbell, B.C., Muir, K.W., Parsons, M.W., 2018. Tenecteplase for the treatment of acute ischemic stroke: a review of completed and ongoing randomized controlled trials. *Int. J. Stroke* 13 (9), 885–892 (1747493018790024).

Furlan, A.J., Eyding, D., Albers, G.W., Al-Rawi, Y., Lees, K.R., Rowley, H.A., et al., 2006. Dose escalation of desmoteplase for acute ischemic stroke (DEDAS): evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset. *Stroke* 37, 1227–1231.

Keyt, B.A., Paoli, N.F., Refino, C.J., Berlean, L., Nguyen, H., Chow, A., et al., 1994. A faster-acting and more potent form of tissue plasminogen activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3670–3674.

Kilic, E., Kilic, U., Bacigaluppi, M., Guo, Z., Abdallah, N.B., Wolfer, D.P., et al., 2008. Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. *J. Pineal Res.* 45, 142–148.

Leys, D., Hommet, Y., Jacquet, C., Moulin, S., Sibon, I., Mas, J.-L., et al., 2016. Proportion of single-chain recombinant tissue plasminogen activator and outcome after stroke. *Neurology* 87, 2416–2426.

Lijnen, H.R., 2001. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb. Haemost.* 86, 324–333.

Lijnen, H.R., Van Hoef, B., Beelen, V., Collen, D., 1994. Characterization of the murine plasma fibrinolytic system. *Eur. J. Biochem.* 224, 863–871.

Lopez-Atalaya, J.P., Roussel, B.D., Levrat, D., Pareq, J., Nicole, O., Hommet, Y., et al., 2008. Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1212–1221.

Macrez, R., Obiang, P., Gauberti, M., Roussel, B., Baron, A., Pareq, J., et al., 2011. Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke* 42, 2515–2522.

Marcos-Contreras, O.A., Martínez de Lizarrondo, S., Bardou, I., Orset, C., Pruvost, M., Anfray, A., et al., 2016. Hyperfibrinolysis increases blood-brain barrier permeability by a plasmin- and bradykinin-dependent mechanism. *Blood* 128, 2423–2434.

Matsuo, O., Lijnen, H.R., Ueshima, S., Kojima, S., Smyth, S.S., 2007. A guide to murine fibrinolytic factor structure, function, assays, and genetic alterations. *J. Thromb. Haemost.* 5, 680–689.

Mori, E., Yoneda, Y., Tabuchi, M., Yoshida, T., Ohkawa, S., Ohsumi, Y., et al., 1992. Intravenous recombinant tissue plasminogen activator in acute carotid artery territory stroke. *Neurology* 42, 976–982.

Narla, M., Bu, G., Herz, J., Schwartz, A.L., 1995. Two receptor systems are involved in the plasma clearance of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo. *J. Clin. Invest.* 96, 1164–1168.

Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margail, I., Carniellet, P., MacKenzie, E.T., et al., 2001. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat. Med.* 7, 59–64.

Orset, C., Macrez, R., Young, A.R., Panthou, D., Angles-Cano, E., Maubert, E., et al., 2007. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 38, 2771–2778.

Orset, C., Haelewyn, B., Allan, S.M., Ansar, S., Campos, F., Cho, T.H., et al., 2016a. Efficacy of alteplase in a mouse model of acute ischemic stroke: a retrospective pooled analysis. *Stroke* 47, 1312–1318.

Orset, C., Haelewyn, B., Allan, S.M., Ansar, S., Campos, F., Cho, T.H., et al., 2016b. Efficacy of alteplase in a mouse model of acute ischemic stroke: a retrospective pooled analysis. *Stroke* 47, 1312–1318.

Pareq, J., Bertrand, T., Montagne, A., Baron, A.F., Macrez, R., Billard, J.M., et al., 2012. Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death Differ.* 19, 1983–1991.

Pareq, J., Bertrand, T., Baron, A.F., Hommet, Y., Angles-Cano, E., Vivien, D., 2013. Molecular requirements for safer generation of thrombolytics by bioengineering the tissue-type plasminogen activator A chain. *J. Thromb. Haemost.* 11, 539–546.

Petersen, M.A., Rys, J.K., Alamosglou, K., 2018. Fibrinogen in neurological disease: mechanisms, imaging and therapeutics. *Nat. Rev. Neurol.* 19, 283–301.

Rijken, D.C., Collen, D., 1981. Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J. Biol. Chem.* 256, 7035–7041.

Su, E.J., Fredriksson, L., Geyer, M., Folestad, E., Cale, J., Andrae, J., et al., 2008. Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat. Med.* 14, 731–737.

Takeshita, H., Yamamoto, K., Nozato, S., Inagaki, T., Tsuchimochi, H., Shirai, M., et al., 2017. Modified forelimb grip strength test detects aging-associated physiological decline in skeletal muscle function in male mice. *Sci. Rep.* 7 <https://doi.org/10.1038/srep42323>.

Thelwell, C., Longstaff, C., 2007. The regulation by fibrinogen and fibrin of tissue plasminogen activator kinetics and inhibition by plasminogen activator inhibitor 1. *J. Thromb. Haemost.* 5, 804–811.

Tsirkis, S.E., Gualandris, A., Amaral, D.G., Strickland, S., 1995. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 377, 340–344.

Wallén, P., Bergsdorf, N., Rånby, M., 1982. Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 719, 318–328.

Wardlaw, J.M., Murray, V., Beege, E., del Zoppo, G., Sanderson, P., Lindley, R.L., et al., 2012. Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet* 379, 2364–2372.

Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, E.G., Bugge, T.H., Strickland, D.K., Lawrence, D.A., 2003. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J. Clin. Invest.* 112, 1533–1540.

BIBLIOGRAPHIE

- Abid, K. A. *et al.* (2013) 'Which factors influence decisions to transfer and treat patients with acute intracerebral haemorrhage and which are associated with prognosis? A retrospective cohort study', *BMJ Open*. *BMJ Open*, 3(12). doi: 10.1136/bmjopen-2013-003684.
- de Abreu, R. C. *et al.* (2020) 'Native and bioengineered extracellular vesicles for cardiovascular therapeutics', *Nature Reviews Cardiology*. *Nat Rev Cardiol*, pp. 685–697. doi: 10.1038/s41569-020-0389-5.
- Adams, J. D., Jones, S. and Brost, B. C. (2001) 'Development of antibodies to topical bovine thrombin after abdominal hysterectomy: A case report', *Journal of Reproductive Medicine for the Obstetrician and Gynecologist*. *J Reprod Med*, 46(10), pp. 909–912. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11725736/> (Accessed: 13 October 2021).
- Aharon, A. and Brenner, B. (2009) 'Microparticles, thrombosis and cancer', *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, pp. 61–69. doi: 10.1016/j.beha.2008.11.002.
- Ahmed, S. R. *et al.* (2011) 'Prostaglandin D₂ Regulates CD4 + Memory T Cell Trafficking across Blood Vascular Endothelium and Primes These Cells for Clearance across Lymphatic Endothelium', *The Journal of Immunology*. *J Immunol*, 187(3), pp. 1432–1439. doi: 10.4049/jimmunol.1100299.
- Akers, J. C. *et al.* (2016) 'Optimizing preservation of extracellular vesicular miRNAs derived from clinical cerebrospinal fluid', *Cancer Biomarkers*. *Cancer Biomark*, 17(2), pp. 125–132. doi: 10.3233/CBM-160609.
- Al-Horani, R. (2015) 'Serpins Regulation of Fibrinolytic System: Implications for Therapeutic Applications in Cardiovascular Diseases', *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 12(2), pp. 91–125. doi: 10.2174/1871525712666141106095927.
- Al-Nedawi, K. *et al.* (2008) 'Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells', *Nature Cell Biology*. *Nat Cell Biol*, 10(5), pp. 619–624. doi: 10.1038/ncb1725.
- Al-Nedawi, K. *et al.* (2009) 'Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(10), pp. 3794–3799. doi: 10.1073/pnas.0804543106.
- Al-Shahi Salman, R. *et al.* (2018) 'Absolute risk and predictors of the growth of acute spontaneous intracerebral haemorrhage: a systematic review and meta-analysis of individual patient data', *The Lancet Neurology*. *Lancet Publishing Group*, 17(10), pp. 885–894. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30253-9.
- Alam, H. B. *et al.* (2005) 'Hemorrhage control in the battlefield: Role of new hemostatic agents', *Military Medicine*. *Mil Med*, 170(1), pp. 63–69. doi: 10.7205/MILMED.170.1.63.
- Ali, S. F. *et al.* (2013) 'Paradoxical association of smoking with in-hospital mortality among patients admitted with acute ischemic stroke', *Journal of the American Heart Association*. *J Am Heart Assoc*, 2(3). doi: 10.1161/JAHA.113.000161.
- Aliotta, J. M. *et al.* (2007) 'Alteration of Marrow Cell Gene Expression, Protein Production, and Engraftment into Lung by Lung-Derived Microvesicles: A Novel Mechanism for Phenotype Modulation', *STEM CELLS*. *Stem Cells*, 25(9), pp. 2245–2256. doi: 10.1634/stemcells.2007-0128.
- Aliotta, J. M. *et al.* (2012) 'Stable cell fate changes in marrow cells induced by lung-derived microvesicles', *Journal of Extracellular Vesicles*. *J Extracell Vesicles*, 1(1). doi: 10.3402/jev.v1i0.18163.
- Alqadri, S. L. and Qureshi, A. I. (2012) 'Management of Acute Hypertensive Response in Patients with Intracerebral Hemorrhage', *Current Atherosclerosis Reports*. *Curr Atheroscler Rep*, 14(4), pp. 322–327. doi: 10.1007/s11883-012-0255-y.
- Alvarez-Erviti, L. *et al.* (2011) 'Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted

- exosomes', *Nature Biotechnology*. Nat Biotechnol, 29(4), pp. 341–345. doi: 10.1038/nbt.1807.
- EL Andaloussi, S. *et al.* (2013) 'Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities', *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5), pp. 347–357. doi: 10.1038/nrd3978.
- Andaluz, N., Zuccarello, M. and Wagner, K. R. (2002) 'Experimental animal models of intracerebral hemorrhage', *Neurosurgery Clinics of North America*. Neurosurg Clin N Am, 13(3), pp. 385–393. doi: 10.1016/S1042-3680(02)00006-2.
- Anderson, C. S. *et al.* (2010) 'Effects of early intensive blood pressure-lowering treatment on the growth of hematoma and perihematomal edema in acute intracerebral hemorrhage: The intensive blood pressure reduction in acute cerebral haemorrhage trial (INTERACT)', *Stroke*. Stroke, 41(2), pp. 307–312. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.561795.
- Anderson, C. S. *et al.* (2013) 'Rapid Blood-Pressure Lowering in Patients with Acute Intracerebral Hemorrhage', *New England Journal of Medicine*. N Engl J Med, 368(25), pp. 2355–2365. doi: 10.1056/NEJMoa1214609.
- Angelillo-Scherrer, A. (2012) 'Leukocyte-Derived Microparticles in Vascular Homeostasis', *Circulation Research*. Edited by C. Weber and S. Mause. Circ Res, 110(2), pp. 356–369. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233403.
- Annabi, N. *et al.* (2014) 'Surgical materials: Current challenges and nano-enabled solutions', *Nano Today*. Nano Today, pp. 574–589. doi: 10.1016/j.nantod.2014.09.006.
- Anselmo, A. C. *et al.* (2014) 'Platelet-like nanoparticles: Mimicking shape, flexibility, and surface biology of platelets to target vascular injuries', *ACS Nano*. ACS Nano, 8(11), pp. 11243–11253. doi: 10.1021/nn503732m.
- Antich-Rosselló, M. *et al.* (2021) 'Platelet-derived extracellular vesicles for regenerative medicine', *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). doi: 10.3390/ijms22168580.
- Apostolaki-Hansson, T. *et al.* (2021) 'Prognosis of Intracerebral Hemorrhage Related to Antithrombotic Use', *Stroke*. Stroke, 52(3), pp. 966–974. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.030930.
- Appelros, P., Stegmayr, B. and Terént, A. (2009) 'Sex Differences in Stroke Epidemiology', *Stroke*. Stroke, 40(4), pp. 1082–1090. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.540781.
- Ariesen, M. J. *et al.* (2003) 'Risk Factors for Intracerebral Hemorrhage in the General Population', *Stroke*. Stroke, 34(8), pp. 2060–2065. doi: 10.1161/01.STR.0000080678.09344.8D.
- Arima, H. *et al.* (2010) 'Effects of Perindopril-Based Lowering of Blood Pressure on Intracerebral Hemorrhage Related to Amyloid Angiopathy', *Stroke*. Stroke, 41(2), pp. 394–396. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.563932.
- Aronowski, J. and Zhao, X. (2011) 'Molecular Pathophysiology of Cerebral Hemorrhage', *Stroke*. Stroke, 42(6), pp. 1781–1786. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.596718.
- Asada, Y. *et al.* (2020) 'Pathophysiology of atherothrombosis: Mechanisms of thrombus formation on disrupted atherosclerotic plaques', *Pathology International*. Pathol Int, pp. 309–322. doi: 10.1111/pin.12921.
- Van Asch, C. J. J. *et al.* (2013) 'External validation of the secondary intracerebral hemorrhage score in the Netherlands', *Stroke*. Stroke, 44(10), pp. 2904–2906. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002386.
- 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', *Lancet Neurol*, 9(2), pp. 167–176. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70340-0.

- 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*. *Lancet Neurol*, 9(2), pp. 167–176. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70340-0.
- Augustin, H. G., Kozian, D. H. and Johnson, R. C. (1994a) 'Differentiation of endothelial cells: Analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes', *BioEssays*. *Bioessays*, pp. 901–906. doi: 10.1002/bies.950161208.
- Augustin, H. G., Kozian, D. H. and Johnson, R. C. (1994b) 'Differentiation of endothelial cells: Analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes', *BioEssays*. *Bioessays*, pp. 901–906. doi: 10.1002/bies.950161208.
- Auriel, E. *et al.* (2012) 'Characteristic distributions of intracerebral hemorrhage-Associated diffusion-weighted lesions', *Neurology*. *Neurology*, 79(24), pp. 2335–2341. doi: 10.1212/WNL.0b013e318278b66f.
- Ayers, L. *et al.* (2019) 'Clinical requirements for extracellular vesicle assays', *Journal of Extracellular Vesicles*. *J Extracell Vesicles*. doi: 10.1080/20013078.2019.1593755.
- Babu, M. *et al.* (2015) 'Differential Promoter Methylation of Macrophage Genes Is Associated with Impaired Vascular Growth in Ischemic Muscles of Hyperlipidemic and Type 2 Diabetic Mice: Genome-Wide Promoter Methylation Study', *Circulation Research*. *Circ Res*, 117(3), pp. 289–299. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306424.
- Baharoglu, M. I. *et al.* (2016) 'Platelet transfusion versus standard care after acute stroke due to spontaneous cerebral haemorrhage associated with antiplatelet therapy (PATCH): a randomised, open-label, phase 3 trial', *The Lancet*. *Lancet*, 387(10038), pp. 2605–2613. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30392-0.
- Bai, Q., Liu, J. and Wang, G. (2020) 'Ferroptosis, a Regulated Neuronal Cell Death Type After Intracerebral Hemorrhage', *Frontiers in Cellular Neuroscience*. *Front Cell Neurosci*, 14. doi: 10.3389/fncel.2020.591874.
- Baietti, M. F. *et al.* (2012) 'Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes', *Nature Cell Biology*. *Nat Cell Biol*, 14(7), pp. 677–685. doi: 10.1038/ncb2502.
- Baj-Krzyworzeka, M. *et al.* (2002) 'Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells', *Experimental Hematology*. *Exp Hematol*, 30(5), pp. 450–459. doi: 10.1016/S0301-472X(02)00791-9.
- Baj-Krzyworzeka, M. *et al.* (2006) 'Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes', *Cancer Immunology, Immunotherapy*. *Cancer Immunol Immunother*, 55(7), pp. 808–818. doi: 10.1007/s00262-005-0075-9.
- Baj-Krzyworzeka, M. *et al.* (2007) 'Tumour-derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes', *Immunology Letters*. *Immunol Lett*, 113(2), pp. 76–82. doi: 10.1016/j.imlet.2007.07.014.
- Balami, J. S. and Buchan, A. M. (2012) 'Complications of intracerebral haemorrhage', *The Lancet Neurology*, 11(1), pp. 101–118. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70264-2.
- van Balkom, B. W. M. *et al.* (2019) 'Proteomic Signature of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Small Extracellular Vesicles', *Proteomics*. *Wiley-VCH Verlag*, 19(1–2). doi: 10.1002/PMIC.201800163.
- Baulch, J. E. *et al.* (2016) 'Cranial grafting of stem cell-derived microvesicles improves cognition and reduces neuropathology in the irradiated brain', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(17), pp. 4836–4841. doi: 10.1073/pnas.1521668113.

- Behrens, A. M. *et al.* (2014) 'Blood-aggregating hydrogel particles for use as a hemostatic agent', *Acta Biomaterialia*. *Acta Biomater*, 10(2), pp. 701–708. doi: 10.1016/j.actbio.2013.10.029.
- Behrouz, R. *et al.* (2016) 'Risk of intracerebral hemorrhage in HIV/AIDS: a systematic review and meta-analysis', *Journal of NeuroVirology*. *J Neurovirol*, 22(5), pp. 634–640. doi: 10.1007/s13365-016-0439-2.
- Béjot, Y. *et al.* (2018) 'Increasing early ambulation disability in spontaneous intracerebral hemorrhage survivors', *Neurology*. NLM (Medline), 90(23), pp. e2017–e2024. doi: 10.1212/WNL.0000000000005633.
- Bekendam, R. H. *et al.* (2018) 'Protein disulfide isomerase regulation by nitric oxide maintains vascular quiescence and controls thrombus formation', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. *J Thromb Haemost*, 16(11), pp. 2322–2335. doi: 10.1111/jth.14291.
- Bellingham, S. A. *et al.* (2012) 'Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases?', *Frontiers in Physiology*. *Front Physiol*, 3 MAY. doi: 10.3389/fphys.2012.00124.
- Benharash, P., Bongard, F. and Putnam, B. (2005) 'Use of recombinant factor VIIa for adjunctive hemorrhage control in trauma and surgical patients', *American Surgeon*. *Am Surg*, 71(9), pp. 776–780. doi: 10.1177/000313480507100917.
- Bertram, J. P. *et al.* (2009) 'Intravenous hemostat: Nanotechnology to halt bleeding', *Science Translational Medicine*. *Sci Transl Med*, 1(11). doi: 10.1126/scitranslmed.3000397.
- Beslow, L. A. *et al.* (2010) 'Predictors of outcome in childhood intracerebral hemorrhage: A prospective consecutive cohort study', *Stroke*. *Stroke*, 41(2), pp. 313–318. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.568071.
- Betapudi, V. *et al.* (2016) 'Novel role for p56/Lck in regulation of endothelial cell survival and angiogenesis', *FASEB Journal*. *FASEB J*, 30(10), pp. 3515–3526. doi: 10.1096/fj.201500040.
- Bhatia, H. S. *et al.* (2016) 'Rice bran derivatives alleviate microglia activation: possible involvement of MAPK pathway', *Journal of Neuroinflammation*. *J Neuroinflammation*, 13(1), p. 148. doi: 10.1186/s12974-016-0615-6.
- Bhattathiri, P. S. *et al.* (2006) 'Intraventricular hemorrhage and hydrocephalus after spontaneous intracerebral hemorrhage: results from the STICH trial', in *Brain Edema XIII*. Vienna: Springer-Verlag, pp. 65–68. doi: 10.1007/3-211-30714-1_16.
- Bianchini, E. P. *et al.* (2021) 'Serpins in Hemostasis as Therapeutic Targets for Bleeding or Thrombotic Disorders', *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. *Front Cardiovasc Med*, 7. doi: 10.3389/fcvm.2020.622778.
- Bifulco, K. *et al.* (2013) 'A urokinase receptor-derived peptide inhibiting VEGF-dependent directional migration and vascular sprouting', *Molecular Cancer Therapeutics*. *Mol Cancer Ther*, 12(10), pp. 1981–1993. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0077.
- Bloemen, S. *et al.* (2016) 'Inverted erythrocyte membranes demonstrate β 2GPI-antiphospholipid antibody interactions and membrane crosslinking', *Thrombosis Research*. *Thromb Res*, 146, pp. 89–94. doi: 10.1016/j.thromres.2016.09.004.
- Bobrie, A. *et al.* (2011) 'Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses', *Traffic*. *Traffic*, pp. 1659–1668. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x.
- Bode, M. F. and Mackman, N. (2016) 'A combined deficiency of tissue factor and PAR-4 is associated with fatal pulmonary hemorrhage in mice', *Thrombosis Research*. *Thromb Res*, 146, pp. 46–50. doi: 10.1016/j.thromres.2016.08.023.
- Bonnard, T. *et al.* (2014) 'Abdominal aortic aneurysms targeted by functionalized polysaccharide microparticles: A new tool for SPECT imaging', *Theranostics*, 4(6), pp. 592–603. doi: 10.7150/thno.7757.

- Boon, G. D. (1993) 'An overview of hemostasis', in *Toxicologic Pathology*. Toxicol Pathol, pp. 170–179. doi: 10.1177/019262339302100209.
- Bos, M. J. *et al.* (2007) 'Decreased Glomerular Filtration Rate Is a Risk Factor for Hemorrhagic But Not for Ischemic Stroke', *Stroke*. Stroke, 38(12), pp. 3127–3132. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.489807.
- Boulanger, M. *et al.* (2016) 'Association between diabetes mellitus and the occurrence and outcome of intracerebral hemorrhage', *Neurology*. Neurology, 87(9), pp. 870–878. doi: 10.1212/WNL.0000000000003031.
- Boulanger, M. *et al.* (2019) 'Diffusion-Weighted Imaging Hyperintensities in Subtypes of Acute Intracerebral Hemorrhage: Meta-Analysis', *Stroke*. Stroke, 50(1), pp. 135–142. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.021407.
- Bravo-Pérez, C., Vicente, V. and Corral, J. (2019) 'Management of antithrombin deficiency: an update for clinicians', *Expert Review of Hematology*. Expert Rev Hematol, pp. 397–405. doi: 10.1080/17474086.2019.1611424.
- Broderick, J. P. *et al.* (1993) 'Intracerebral hemorrhage more than twice as common as subarachnoid hemorrhage', *Journal of Neurosurgery*. J Neurosurg, 78(2), pp. 188–191. doi: 10.3171/jns.1993.78.2.0188.
- Broos, K. *et al.* (2011) 'Platelets at work in primary hemostasis', *Blood Reviews*. Blood Rev, 25(4), pp. 155–167. doi: 10.1016/j.blre.2011.03.002.
- Brott, T. *et al.* (1997) 'Early Hemorrhage Growth in Patients With Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. Stroke, 28(1), pp. 1–5. doi: 10.1161/01.STR.28.1.1.
- Brouwers, H. B. *et al.* (2012) 'CTA Spot Sign Predicts Hematoma Expansion in Patients with Delayed Presentation After Intracerebral Hemorrhage', *Neurocritical Care*. Neurocrit Care, 17(3), pp. 421–428. doi: 10.1007/s12028-012-9765-2.
- Bugge, T. H. *et al.* (1996) 'Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(13), pp. 6258–6263. doi: 10.1073/pnas.93.13.6258.
- Butcher, K. S. *et al.* (2004) 'Perihematomal edema in primary intracerebral hemorrhage is plasma derived', *Stroke*. Stroke, 35(8), pp. 1879–1885. doi: 10.1161/01.STR.0000131807.54742.1a.
- Butcher, K. S. *et al.* (2013) 'The intracerebral hemorrhage acutely decreasing arterial pressure trial', *Stroke*. Stroke, 44(3), pp. 620–626. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.000188.
- Butenas, S., Van't Veer, C. and Mann, K. G. (1999) '"Normal" thrombin generation', *Blood*, 94(7), pp. 2169–2178. doi: 10.1182/blood.v94.7.2169.419k22_2169_2178.
- Cai, Z. *et al.* (2012) 'Activated T Cell Exosomes Promote Tumor Invasion *via* Fas Signaling Pathway', *The Journal of Immunology*. J Immunol, 188(12), pp. 5954–5961. doi: 10.4049/jimmunol.1103466.
- Campello, E. *et al.* (2011) 'Endothelial, platelet, and tissue factor-bearing microparticles in cancer patients with and without venous thromboembolism', *Thrombosis Research*. Thromb Res, 127(5), pp. 473–477. doi: 10.1016/j.thromres.2011.01.002.
- Camussi, G. *et al.* (2011) 'Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells.', *American journal of cancer research*. e-Century Publishing Corporation, 1(1), pp. 98–110. Available at: /pmc/articles/PMC3180104/ (Accessed: 22 July 2021).
- Carlow, D. A. *et al.* (2009) 'PSGL-1 function in immunity and steady state homeostasis', *Immunological Reviews*. Immunol Rev, pp. 75–96. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00797.x.

- Carmeliet, P. *et al.* (1996) 'Role of tissue factor in embryonic blood vessel development', *Nature*. *Nature*, 383(6595), pp. 73–75. doi: 10.1038/383073a0.
- Carpenter, A. B. *et al.* (2021) 'Use of emerging technologies to enhance the treatment paradigm for spontaneous intraventricular hemorrhage', *Neurosurgical Review*. *Neurosurg Rev*. doi: 10.1007/s10143-021-01616-z.
- Catar, R. *et al.* (2021) 'Transcriptional regulation of thrombin-induced endothelial vegf induction and proangiogenic response', *Cells*. *Cells*, 10(4). doi: 10.3390/cells10040910.
- Catieau, B. *et al.* (2018) 'Endothelial cell surface limits coagulation without modulating the antithrombin potency', *Thrombosis Research*. *Thromb Res*, 167, pp. 88–95. doi: 10.1016/j.thromres.2018.05.019.
- Cerletti, C. *et al.* (2012) 'Platelet-leukocyte interactions in thrombosis', *Thrombosis Research*. Pergamon, 129(3), pp. 263–266. doi: 10.1016/J.THROMRES.2011.10.010.
- Cervio, E. *et al.* (2015) 'Exosomes for intramyocardial intercellular communication', *Stem Cells International*. *Stem Cells Int*. doi: 10.1155/2015/482171.
- Cesarman-Maus, G. and Hajjar, K. A. (2005) 'Molecular mechanisms of fibrinolysis', *British Journal of Haematology*. *Br J Haematol*, 129(3), pp. 307–321. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x.
- Chapin, J. C. and Hajjar, K. A. (2015) 'Fibrinolysis and the control of blood coagulation', *Blood Reviews*, 29(1), pp. 17–24. doi: 10.1016/j.blre.2014.09.003.
- Chaput, N. and Théry, C. (2011) 'Exosomes: Immune properties and potential clinical implementations', *Seminars in Immunopathology*. *Semin Immunopathol*, pp. 419–440. doi: 10.1007/s00281-010-0233-9.
- Chargaff, E. and West, R. (1946) 'THE BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF THE THROMBOPLASTIC PROTEIN OF BLOOD', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 166(1), pp. 189–197. doi: 10.1016/S0021-9258(17)34997-9.
- Chen, C.-J. *et al.* (2017) 'Alcohol use and risk of intracerebral hemorrhage', *Neurology*. *Neurology*, 88(21), pp. 2043–2051. doi: 10.1212/WNL.0000000000003952.
- Chen, C. W. *et al.* (2018) 'Sustained release of endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicles from shear-thinning hydrogels improves angiogenesis and promotes function after myocardial infarction', *Cardiovascular Research*. *Cardiovasc Res*, 114(7), pp. 1029–1040. doi: 10.1093/cvr/cvy067.
- Cheng, A. L. *et al.* (2013) 'Susceptibility-weighted imaging is more reliable than T2*-weighted gradient-recalled echo mri for detecting microbleeds', *Stroke*. *Stroke*, 44(10), pp. 2782–2786. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002267.
- Cheung, W. F. *et al.* (1996) 'Identification of the endothelial cell binding site for factor IX', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(20), pp. 11068–11073. doi: 10.1073/pnas.93.20.11068.
- Chivet, M. *et al.* (2012) 'Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system', *Frontiers in Physiology*. *Front Physiol*, 3 MAY. doi: 10.3389/fphys.2012.00145.
- Choi, N.-K. *et al.* (2008) 'Nonaspirin Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Hemorrhagic Stroke Risk', *Stroke*. *Stroke*, 39(3), pp. 845–849. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.497040.
- Chou, J. *et al.* (2004) 'Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation', *Blood*. *Blood*, 104(10), pp. 3190–3197. doi: 10.1182/blood-2004-03-0935.
- Chuo, S. T. Y., Chien, J. C. Y. and Lai, C. P. K. (2018) 'Imaging extracellular vesicles: Current and emerging

methods', *Journal of Biomedical Science*. J Biomed Sci. doi: 10.1186/s12929-018-0494-5.

Ciccone, A. *et al.* (2013) 'Continuous versus intermittent physiological monitoring for acute stroke', *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Cochrane Database Syst Rev. doi: 10.1002/14651858.CD008444.pub2.

Cines, D. B. *et al.* (1998) 'Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders', *Blood*. Content Repository Only!, pp. 3527–3561. doi: 10.1182/blood.V91.10.3527.

Clayton, A. *et al.* (2007) 'Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2', *Cancer Research*. Cancer Res, 67(15), pp. 7458–7466. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3456.

Clayton, A. *et al.* (2008) 'Human Tumor-Derived Exosomes Down-Modulate NKG2D Expression', *The Journal of Immunology*. J Immunol, 180(11), pp. 7249–7258. doi: 10.4049/jimmunol.180.11.7249.

Clemmens, H. and Lambert, D. W. (2018) 'Extracellular vesicles: Translational challenges and opportunities', *Biochemical Society Transactions*. Biochem Soc Trans, 46(5), pp. 1073–1082. doi: 10.1042/BST20180112.

Cocucci, E. and Meldolesi, J. (2015) 'Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles', *Trends in Cell Biology*. Trends Cell Biol, 25(6), pp. 364–372. doi: 10.1016/j.tcb.2015.01.004.

Cohen, C. T., Turner, N. A. and Moake, J. L. (2020) 'Production and control of coagulation proteins for factor X activation in human endothelial cells and fibroblasts', *Scientific Reports*. Sci Rep, 10(1). doi: 10.1038/s41598-020-59058-4.

Del Conde, I., Shrimpton, Corie N, *et al.* (2005) 'Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation', *Blood*, 106(5), pp. 1604–1611. doi: 10.1182/blood-2004-03-1095.

Del Conde, I., Shrimpton, Corie N., *et al.* (2005) 'Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation', *Blood*. Blood, 106(5), pp. 1604–1611. doi: 10.1182/blood-2004-03-1095.

Contera, S., De La Serna, J. B. and Tetley, T. D. (2021) 'Biotechnology, nanotechnology and medicine', *Emerging Topics in Life Sciences*. Emerg Top Life Sci, pp. 551–554. doi: 10.1042/ETLS20200350.

Cordonnier, C. *et al.* (2018) 'Intracerebral haemorrhage: current approaches to acute management', *The Lancet*. Lancet, pp. 1257–1268. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31878-6.

Corradetti, B. *et al.* (2020) 'Extracellular Vesicles Derived From Platelets, Red Blood Cells, and Monocyte-Like Cells Differ Regarding Their Ability to Induce Factor XII-Dependent Thrombin Generation'. doi: 10.3389/fcell.2020.00298.

Cucchiara, B. *et al.* (2008) 'Hematoma growth in oral anticoagulant related intracerebral hemorrhage', *Stroke*. Stroke, 39(11), pp. 2993–2996. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.520668.

Cucurull, E. and Gharavi, A. E. (1997) 'Thrombomodulin: a new frontier in lupus research?', *Clinical and experimental rheumatology*. Clin Exp Rheumatol, pp. 1–4. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9093765/> (Accessed: 22 October 2021).

Curtis, A. M. *et al.* (2013) 'Endothelial microparticles: Sophisticated vesicles modulating vascular function', *Vascular Medicine*. Vasc Med, 18(4), pp. 204–214. doi: 10.1177/1358863X13499773.

D'Alessandro, E. *et al.* (2018) 'Tissue factor (:Factor VIIa) in the heart and vasculature: More than an envelope', *Thrombosis Research*. Thromb Res, 168, pp. 130–137. doi: 10.1016/j.thromres.2018.06.020.

- Dahlbäck, B. (2000) 'Blood coagulation', *Lancet*. Lancet, pp. 1627–1632. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02225-X.
- Dai, J. *et al.* (2020) 'Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy', *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Signal Transduct Target Ther. doi: 10.1038/s41392-020-00261-0.
- Darbousset, R. *et al.* (2014) 'P2X1 expressed on polymorphonuclear neutrophils and platelets is required for thrombosis in mice', *Blood*. Blood, 124(16), pp. 2575–2585. doi: 10.1182/blood-2014-04-571679.
- Dastur, C. K. and Yu, W. (2017) 'Current management of spontaneous intracerebral haemorrhage', *Stroke and Vascular Neurology*. Stroke Vasc Neurol, pp. 21–29. doi: 10.1136/svn-2016-000047.
- Delcourt, C. *et al.* (2017) 'Intracerebral hemorrhage location and outcome among INTERACT2 participants', *Neurology*. Neurology, 88(15), pp. 1408–1414. doi: 10.1212/WNL.0000000000003771.
- Delgado Almandoz, Josser E. *et al.* (2010) 'Practical scoring system for the identification of patients with intracerebral hemorrhage at highest risk of harboring an underlying vascular etiology: The secondary intracerebral hemorrhage score', *American Journal of Neuroradiology*. AJNR Am J Neuroradiol, 31(9), pp. 1653–1660. doi: 10.3174/ajnr.A2156.
- Delgado Almandoz, Josser E *et al.* (2010) 'The spot sign score in primary intracerebral hemorrhage identifies patients at highest risk of in-hospital mortality and poor outcome among survivors', *Stroke*, 41(1), pp. 54–60. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.565382.
- Van Deun, J. *et al.* (2017) 'EV-TRACK: Transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research', *Nature Methods*. Nat Methods, pp. 228–232. doi: 10.1038/nmeth.4185.
- Devan, W. J. *et al.* (2013) 'Heritability Estimates Identify a Substantial Genetic Contribution to Risk and Outcome of Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. Stroke, 44(6), pp. 1578–1583. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.000089.
- Diacovo, T. G. *et al.* (1996) 'Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules', *Science*. Science, 273(5272), pp. 252–255. doi: 10.1126/science.273.5272.252.
- Diamant, M. *et al.* (2004) 'Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?', *Eur. J. Clin. Invest.*, 34(6), pp. 392–401. doi: 10.1111/j.1365-2362.2004.01355.x.
- Dickhout, A. and Koenen, R. R. (2018) 'Extracellular Vesicles as Biomarkers in Cardiovascular Disease; Chances and Risks', *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. Front Cardiovasc Med, 5. doi: 10.3389/fcvm.2018.00113.
- Dinkla, S. *et al.* (2016) 'Platelet microparticles inhibit IL-17 production by regulatory T cells through P-selectin', *Blood*. Blood, 127(16), pp. 1976–1986. doi: 10.1182/blood-2015-04-640300.
- Diringer, M. N. *et al.* (2008) 'Risk of thromboembolic events in controlled trials of rFVIIa in spontaneous intracerebral hemorrhage', *Stroke*. Stroke, 39(3), pp. 850–856. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.493601.
- Divani, A. A. *et al.* (2019) 'Blood Pressure Variability Predicts Poor In-Hospital Outcome in Spontaneous Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. Stroke, 50(8), pp. 2023–2029. doi: 10.1161/STROKEAHA.119.025514.
- Dowlathshahi, D. *et al.* (2012) 'Poor prognosis in warfarin-associated intracranial hemorrhage despite anticoagulation reversal', *Stroke*. Stroke, 43(7), pp. 1812–1817. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.652065.
- Drake, T. A., Morrissey, J. H. and Edgington, T. S. (1989) 'Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis.', *The American journal of pathology*. Am J Pathol, 134(5), pp. 1087–97. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2719077/> (Accessed: 21 August 2021).

- Duan, X. *et al.* (2016) 'Intracerebral Hemorrhage, Oxidative Stress, and Antioxidant Therapy', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, pp. 1–17. doi: 10.1155/2016/1203285.
- Dumas, S. J. *et al.* (2021) 'Phenotypic diversity and metabolic specialization of renal endothelial cells', *Nature Reviews Nephrology*. *Nat Rev Nephrol*, pp. 441–464. doi: 10.1038/s41581-021-00411-9.
- Duong, C. N. *et al.* (2020) 'Interference with ESAM (endothelial cell-selective adhesion molecule) plus vascular endothelial-cadherin causes immediate lethality and lung-specific blood coagulation', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 40(2), pp. 378–393. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313545.
- Duque, P. *et al.* (2020) 'Pathophysiological response to trauma-induced coagulopathy: A comprehensive review', *Anesthesia and Analgesia*. *Anesth Analg*, pp. 654–664. doi: 10.1213/ANE.0000000000004478.
- Dvorak, H. F. *et al.* (1981) 'Tumor shedding and coagulation', *Science*. *Science*, 212(4497), pp. 923–924. doi: 10.1126/science.7195067.
- Egorina, E. M. *et al.* (2005) 'Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor: Application to intersubject variability', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(7), pp. 1493–1498. doi: 10.1161/01.ATV.0000168413.29874.d7.
- Eken, C. *et al.* (2008) 'Polymorphonuclear Neutrophil-Derived Ectosomes Interfere with the Maturation of Monocyte-Derived Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*. *J Immunol*, 180(2), pp. 817–824. doi: 10.4049/jimmunol.180.2.817.
- Ellis-Behnke, R. G. *et al.* (2006) 'Nano hemostat solution: immediate hemostasis at the nanoscale', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. *Nanomedicine*, 2(4), pp. 207–215. doi: 10.1016/j.nano.2006.08.001.
- Elsharkasy, O. M. *et al.* (2020) 'Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how?', *Advanced Drug Delivery Reviews*. *Adv Drug Deliv Rev*, pp. 332–343. doi: 10.1016/j.addr.2020.04.004.
- Emmanouilidou, E. *et al.* (2010) 'Cell-produced α -synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival', *Journal of Neuroscience*. *J Neurosci*, 30(20), pp. 6838–6851. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010.
- Epstein, N. E. (2014) 'Tisseel utilized as hemostatic in spine surgery impacts time to drain removal and length of stay', *Surgical Neurology International*. *Surg Neurol Int*, 5(7Supplement), pp. S354–S361. doi: 10.4103/2152-7806.139668.
- Escudier, B. *et al.* (2005) 'Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: Results of the first phase 1 clinical trial', *Journal of Translational Medicine*. *J Transl Med*, 3(1). doi: 10.1186/1479-5876-3-10.
- Falati, S. *et al.* (2002) 'Real-time *in vivo* imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse', *Nature Medicine*. *Nat Med*, 8(10), pp. 1175–1180. doi: 10.1038/nm782.
- Falati, S. *et al.* (2003) 'Accumulation of Tissue Factor into Developing Thrombi *In vivo* Is Dependent upon Microparticle P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 and Platelet P-Selectin', *The Journal of Experimental Medicine*, 197(11), pp. 1585–1598. doi: 10.1084/jem.20021868.
- Falcone, G. J. *et al.* (2013) 'Predictors of hematoma volume in deep and lobar supratentorial intracerebral hemorrhage', *JAMA Neurology*. *JAMA Neurol*, 70(8), pp. 988–994. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.98.
- Farndale, R. W. *et al.* (2003) 'Collagen-platelet interactions: recognition and signalling', *Biochemical*

- Society Symposia*. Edited by J. Saklatvala, H. Nagase, and G. Salvesen. *Biochem Soc Symp*, 70(70), pp. 81–94. doi: 10.1042/bss0700081.
- Favretto, G. *et al.* (2019) 'Endothelial Microparticles in Uremia: Biomarkers and Potential Therapeutic Targets', *Toxins*. *Toxins* (Basel), 11(5), p. 267. doi: 10.3390/toxins11050267.
- Feigin, V. L. *et al.* (2016) 'Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013', *The Lancet Neurology*. Elsevier, 15(9), pp. 913–924. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30073-4.
- Feldmann, E. *et al.* (2005) 'Major Risk Factors for Intracerebral Hemorrhage in the Young Are Modifiable', *Stroke*. *Stroke*, 36(9), pp. 1881–1885. doi: 10.1161/01.STR.0000177480.62341.6b.
- Fernández-Mendivil, C. *et al.* (2021) 'Protective role of microglial HO-1 blockade in aging: Implication of iron metabolism', *Redox Biology*. *Redox Biol*, 38. doi: 10.1016/j.redox.2020.101789.
- Ferrari do Outeiro-Bernstein, M. A. *et al.* (2002) 'A recombinant NH₂-terminal heparin-binding domain of the adhesive glycoprotein, thrombospondin-1, promotes endothelial tube formation and cell survival: A possible role for syndecan-4 proteoglycan', *Matrix Biology*. *Matrix Biol*, 21(4), pp. 311–324. doi: 10.1016/S0945-053X(02)00010-0.
- Fiebach, J. B. *et al.* (2004) 'Stroke Magnetic Resonance Imaging Is Accurate in Hyperacute Intracerebral Hemorrhage: A Multicenter Study on the Validity of Stroke Imaging', *Stroke*. *Stroke*, 35(2), pp. 502–506. doi: 10.1161/01.STR.0000114203.75678.88.
- Fischer, R. S. *et al.* (2019) 'Filopodia and focal adhesions: An integrated system driving branching morphogenesis in neuronal pathfinding and angiogenesis', *Developmental Biology*. *Dev Biol*, pp. 86–95. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.08.015.
- FISHER, C. M. (1971) 'PATHOLOGICAL OBSERVATIONS IN HYPERTENSIVE CEREBRAL HEMORRHAGE', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 30(3), pp. 536–550. doi: 10.1097/00005072-197107000-00015.
- Fishman, A. P. (1982) 'ENDOTHELIUM: A DISTRIBUTED ORGAN OF DIVERSE CAPABILITIES', *Annals of the New York Academy of Sciences*. *Ann N Y Acad Sci*, 401(1), pp. 1–8. doi: 10.1111/j.1749-6632.1982.tb25702.x.
- Flaherty, M. L. *et al.* (2005) 'Racial Variations in Location and Risk of Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 36(5), pp. 934–937. doi: 10.1161/01.STR.0000160756.72109.95.
- Flaherty, M. L. *et al.* (2006) 'Location and Outcome of Anticoagulant-Associated Intracerebral Hemorrhage', *Neurocritical Care*. *Neurocrit Care*, 5(3), pp. 197–201. doi: 10.1385/NCC:5:3:197.
- Flaherty, M. L. *et al.* (2008) 'Warfarin use leads to larger intracerebral hematomas', *Neurology*. *Neurology*, 71(14), pp. 1084–1089. doi: 10.1212/01.wnl.0000326895.58992.27.
- Flibotte, J. J. *et al.* (2004) 'Warfarin, hematoma expansion, and outcome of intracerebral hemorrhage', *Neurology*. *Neurology*, 63(6), pp. 1059–1064. doi: 10.1212/01.WNL.0000138428.40673.83.
- Foerch, C. *et al.* (2006) 'Pretreatment with antiplatelet agents is not independently associated with unfavorable outcome in intracerebral hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 37(8), pp. 2165–2167. doi: 10.1161/01.STR.0000231842.32153.74.
- Fogelholm, R. *et al.* (2005) 'Long term survival after primary intracerebral haemorrhage: A retrospective population based study', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76(11), pp. 1534–1538. doi: 10.1136/jnnp.2004.055145.
- Folsom, A. R. *et al.* (2012) 'Risk of intraparenchymal hemorrhage with magnetic resonance imaging-defined leukoaraiosis and brain infarcts', *Annals of Neurology*. *Ann Neurol*, 71(4), pp. 552–559. doi:

10.1002/ana.22690.

Fournier, A. P. *et al.* (2017) 'Prediction of disease activity in models of multiple sclerosis by molecular magnetic resonance imaging of P-selectin', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 114(23), pp. 6116–6121. doi: 10.1073/pnas.1619424114.

Franco, C. *et al.* (2020) 'A new hybrid immunocapture bioassay with improved reproducibility to measure tissue factor-dependent procoagulant activity of microvesicles from body fluids', *Thrombosis Research*. Pergamon, 196, pp. 414–424. doi: 10.1016/j.thromres.2020.09.020.

Franke, C. L. *et al.* (1992) 'Prognostic factors in patients with intracerebral haematoma', *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 55(8), pp. 653–657. doi: 10.1136/jnnp.55.8.653.

Fuh, K. F. *et al.* (2021) 'Fluid flow exposure promotes epithelial-to-mesenchymal transition and adhesion of breast cancer cells to endothelial cells', *Breast Cancer Research*. Breast Cancer Res, 23(1), p. 97. doi: 10.1186/s13058-021-01473-0.

Fung, C. *et al.* (2012) 'Decompressive Hemicraniectomy in Patients With Supratentorial Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. Stroke, 43(12), pp. 3207–3211. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.666537.

Fung, C. *et al.* (2016) 'Effect of Decompressive Craniectomy on Perihematomal Edema in Patients with Intracerebral Hemorrhage', *PLOS ONE*. Edited by N. Etmnan. PLoS One, 11(2), p. e0149169. doi: 10.1371/journal.pone.0149169.

Furie, B. and Furie, B. C. (2004) 'Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation', *Trends in Molecular Medicine*. Trends Mol Med, 10(4), pp. 171–178. doi: 10.1016/j.molmed.2004.02.008.

Furie, B., Furie, B. C. and Flaumenhaft, R. (2001) 'A journey with platelet P-selectin: The molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion', *Thrombosis and Haemostasis*. Schattauer GmbH, 86(1), pp. 214–221. doi: 10.1055/S-0037-1616219.

Gaberel, T. *et al.* (2014) 'Urokinase versus Alteplase for intraventricular hemorrhage fibrinolysis', *Neuropharmacology*. Neuropharmacology, 85, pp. 158–165. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.05.001.

Gaberel, T., Magheru, C. and Emery, E. (2012) 'Management of non-traumatic intraventricular hemorrhage', *Neurosurgical Review*. Neurosurg Rev, 35(4), pp. 485–495. doi: 10.1007/s10143-012-0399-9.

Gailani, D. and Broze, G. (1991) 'Factor XI activation in a revised model of blood coagulation', *Science*. Science, 253(5022), pp. 909–912. doi: 10.1126/science.1652157.

Gaist, D. *et al.* (2017) 'Statins and the Risk of Intracerebral Hemorrhage in Patients With Previous Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack', *Stroke*. Stroke, 48(12), pp. 3245–3251. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019141.

Gale, A. J. (2011) 'Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis', *Toxicologic Pathology*. Toxicol Pathol, pp. 273–280. doi: 10.1177/0192623310389474.

Gao, X. *et al.* (2018) 'Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy', *Science Translational Medicine*. Sci Transl Med, 10(444). doi: 10.1126/scitranslmed.aat0195.

Garabet, L. *et al.* (2020) 'Increased microvesicle-associated thrombin generation in patients with immune thrombocytopenia after initiation of thrombopoietin receptor agonists', *Platelets*. Platelets, 31(3), pp. 322–328. doi: 10.1080/09537104.2019.1639655.

- Garcia-Rodriguez, L. A. *et al.* (2013) 'Antithrombotic drugs and risk of hemorrhagic stroke in the general population', *Neurology*. *Neurology*, 81(6), pp. 566–574. doi: 10.1212/WNL.0b013e31829e6ffa.
- Garcia, J. H. and Ho, K. L. (1992) 'Pathology of hypertensive arteriopathy.', *Neurosurgery clinics of North America*, pp. 497–507. doi: 10.1016/s1042-3680(18)30641-7.
- Garg, R. K. *et al.* (2012) 'Blood pressure reduction, decreased diffusion on MRI, and outcomes after intracerebral hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 43(1), pp. 67–71. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.629493.
- Garnier, E. *et al.* (2021) 'Factor XII protects neurons from apoptosis by epidermal and hepatocyte growth factor receptor-dependent mechanisms', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. *J Thromb Haemost*, 19(9), pp. 2235–2247. doi: 10.1111/jth.15414.
- Gatti, S. *et al.* (2011) 'Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury', *Nephrology Dialysis Transplantation*. *Nephrol Dial Transplant*, 26(5), pp. 1474–1483. doi: 10.1093/ndt/gfr015.
- Gauberti, M. *et al.* (2013) 'Ultra-sensitive molecular MRI of vascular cell adhesion molecule-1 reveals a dynamic inflammatory penumbra after strokes', *Stroke*, 44(7), pp. 1988–1996. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.000544.
- Gauberti, M., P. Fournier, A., *et al.* (2018) 'Molecular magnetic resonance imaging (mMRI)', in *Methods in Molecular Biology*. *Methods Mol Biol*, pp. 315–327. doi: 10.1007/978-1-4939-7531-0_19.
- Gauberti, M., Fournier, A. P., *et al.* (2018) 'Molecular Magnetic Resonance Imaging of Endothelial Activation in the Central Nervous System', *Theranostics*. *Theranostics*, 8(5), pp. 1195–1212. doi: 10.7150/thno.22662.
- Gauberti, M. and Martinez de Lizarrondo, S. (2021) 'Molecular MRI of Neuroinflammation: Time to Overcome the Translational Roadblock', *Neuroscience*. Pergamon, pp. 30–36. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.08.016.
- Gebel, J. M. and Broderick, J. P. (2000) 'INTRACEREBRAL HEMORRHAGE', *Neurologic Clinics*. *Neurol Clin*, 18(2), pp. 419–438. doi: 10.1016/S0733-8619(05)70200-0.
- Gerner, S. T. *et al.* (2018) 'Association of prothrombin complex concentrate administration and hematoma enlargement in non-vitamin K antagonist oral anticoagulant-related intracerebral hemorrhage', *Annals of Neurology*. *Ann Neurol*, 83(1), pp. 186–196. doi: 10.1002/ana.25134.
- Giansily-Blaizot, M. and Schved, J.-F. (2017) 'Recombinant human factor VIIa (rFVIIa) in hemophilia: mode of action and evidence to date', *Therapeutic Advances in Hematology*. *Ther Adv Hematol*, 8(12), pp. 345–352. doi: 10.1177/2040620717737701.
- Gieseler, F. *et al.* (2018) 'Heterogeneity of microvesicles from cancer cell lines under inflammatory stimulation with TNF- α ', *Cell Biology International*. *Cell Biol Int*, 42(11), pp. 1533–1544. doi: 10.1002/cbin.11040.
- Gillum, T. *et al.* (2017) 'Exercise does not increase salivary lymphocytes, monocytes, or granulocytes, but does increase salivary lysozyme', *Journal of Sports Sciences*. *J Sports Sci*, 35(13), pp. 1294–1299. doi: 10.1080/02640414.2016.1221522.
- Gimbrone, M. A., Cotran, R. S. and Folkman, J. (1974) 'Human vascular endothelial cells in culture: Growth and DNA synthesis', *Journal of Cell Biology*. *J Cell Biol*, 60(3), pp. 673–684. doi: 10.1083/jcb.60.3.673.
- Giri, H. *et al.* (2021) 'Thrombomodulin is essential for maintaining quiescence in vascular endothelial cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(11). doi: 10.1073/pnas.2022248118.

- Gokhale, S., Caplan, L. R. and James, M. L. (2015) 'Sex Differences in Incidence, Pathophysiology, and Outcome of Primary Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 46(3), pp. 886–892. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.007682.
- Goldberg, J., Raabe, A. and Bervini, D. (2018) 'Natural history of brain arteriovenous malformations: systematic review', *Journal of Neurosurgical Sciences*. *J Neurosurg Sci*, 62(4), pp. 437–443. doi: 10.23736/S0390-5616.18.04452-1.
- Gore, J. M. *et al.* (1991) 'Intracerebral hemorrhage, cerebral infarction, and subdural hematoma after acute myocardial infarction and thrombolytic therapy in the Thrombolysis in Myocardial Infarction Study. Thrombolysis in Myocardial Infarction, Phase II, pilot and clinical trial.', *Circulation*. *Circulation*, 83(2), pp. 448–459. doi: 10.1161/01.CIR.83.2.448.
- Gould, S. J. and Raposo, G. (2013) 'As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles', *Journal of Extracellular Vesicles*. *J Extracell Vesicles*, 2(1), p. 20389. doi: 10.3402/jev.v2i0.20389.
- Grangier, A. *et al.* (2021) 'Technological advances towards extracellular vesicles mass production', *Advanced Drug Delivery Reviews*. *Adv Drug Deliv Rev*. doi: 10.1016/j.addr.2021.113843.
- Gray, C. R. W. (1990) 'On the coagulation of the blood: An elaboration of Lord Lister's hypothesis and the four-factor model of Morawitz', *Medical Hypotheses*. *Med Hypotheses*, 33(1), pp. 63–68. doi: 10.1016/0306-9877(90)90086-T.
- Gross, B. A., Jankowitz, B. T. and Friedlander, R. M. (2019) 'Cerebral Intraparenchymal Hemorrhage: A Review', *JAMA - Journal of the American Medical Association*. *JAMA*, pp. 1295–1303. doi: 10.1001/jama.2019.2413.
- Gross, P. L. (2005) 'Leukocyte-versus microparticle-mediated tissue factor transfer during arteriolar thrombus development', *Journal of Leukocyte Biology*. *J Leukoc Biol*, 78(6), pp. 1318–1326. doi: 10.1189/jlb.0405193.
- Gurevich, D. B. *et al.* (2021) 'Endothelial Heterogeneity in Development and Wound Healing', *Cells*. *Cells*, 10(9), p. 2338. doi: 10.3390/cells10092338.
- Ha, H. J. *et al.* (2018) 'Structure of natural variant transglutaminase 2 reveals molecular basis of gaining stability and higher activity', *PLoS ONE*. *PLoS One*, 13(10). doi: 10.1371/journal.pone.0204707.
- Hackam, D. G. *et al.* (2011) 'Statins and Intracerebral Hemorrhage', *Circulation*. *Circulation*, 124(20), pp. 2233–2242. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.055269.
- Hackam, D. G. and Mrkobrada, M. (2012) 'Selective serotonin reuptake inhibitors and brain hemorrhage: A meta-analysis', *Neurology*. *Neurology*, 79(18), pp. 1862–1865. doi: 10.1212/WNL.0b013e318271f848.
- Haga, H. *et al.* (2017) 'Extracellular vesicles from bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against murine hepatic ischemia/reperfusion injury', *Liver Transplantation*. *Liver Transpl*, 23(6), pp. 791–803. doi: 10.1002/lt.24770.
- Hald, S. M. *et al.* (2021) 'Trends in Incidence of Intracerebral Hemorrhage and Association With Antithrombotic Drug Use in Denmark, 2005-2018', *JAMA Network Open*. *JAMA Netw Open*, 4(5), p. e218380. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.8380.
- Hanley, D. 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), pp. 1228–1237. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30234-4.
- Hanley, D. 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*. *Lancet*, 389(10069), pp. 603–611. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32410-2.
- Hanley, D. F. *et al.* (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*. *Lancet*, 393(10175), pp. 1021–1032. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30195-3.
- Hao, Y. *et al.* (2021) 'Promotion or inhibition of extracellular vesicle release: Emerging therapeutic opportunities', *Journal of Controlled Release*. *J Control Release*. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.10.019.
- Harding, C., Heuser, J. and Stahl, P. (1983) 'Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes.', *Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press, 97(2), pp. 329–339. doi: 10.1083/JCB.97.2.329.
- Hardy, J. F. (2001) 'Pharmacological strategies for blood conservation in cardiac surgery: Erythropoietin and antifibrinolytics', *Canadian Journal of Anesthesia*, 48(4 SUPPL.). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11336434/> (Accessed: 13 October 2021).
- Harris, E. D. and Krane, S. M. (1974) 'Collagenases', *New England Journal of Medicine*. *N Engl J Med*, 291(13), pp. 652–661. doi: 10.1056/NEJM197409262911305.
- Hart, R. G. *et al.* (2000) 'Aspirin for the Primary Prevention of Stroke and Other Major Vascular Events', *Archives of Neurology*. *Arch Neurol*, 57(3), p. 326. doi: 10.1001/archneur.57.3.326.
- Hassouna, H. I. (2009) 'Thrombophilia and hypercoagulability', *Medical Principles and Practice*. *Med Princ Pract*, pp. 429–440. doi: 10.1159/000235891.
- He, J. *et al.* (1998) 'Aspirin and Risk of Hemorrhagic Stroke', *JAMA*. *JAMA*, 280(22), p. 1930. doi: 10.1001/jama.280.22.1930.
- He, L. *et al.* (2008) 'Vascular dermatan sulfate regulates the antithrombotic activity of heparin cofactor II', *Blood*. *Blood*, 111(8), pp. 4118–4125. doi: 10.1182/blood-2007-12-127928.
- Hemphill, J. C. *et al.* (2015a) 'Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 46(7), pp. 2032–2060. doi: 10.1161/STR.0000000000000069.
- Hemphill, J. C. *et al.* (2015b) 'Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 46(7), pp. 2032–2060. doi: 10.1161/STR.0000000000000069.
- Henriksen, J. R. *et al.* (2015) 'Remote Loading of 64Cu²⁺ into Liposomes without the Use of Ion Transport Enhancers', *ACS Applied Materials and Interfaces*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 7(41), pp. 22796–22806. doi: 10.1021/acsami.5b04612.
- Herrmann, I. K., Wood, M. J. A. and Fuhrmann, G. (2021) 'Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform', *Nature Nanotechnology*, pp. 748–759. doi: 10.1038/s41565-021-00931-2.
- Heuberger, D. M. *et al.* (2019) 'Thrombin cleaves and activates the protease-activated receptor 2 dependent on thrombomodulin co-receptor availability', *Thrombosis Research*. *Thromb Res*, 177, pp. 91–101. doi: 10.1016/j.thromres.2019.02.032.
- Hidalgo, A. *et al.* (2007) 'Complete Identification of E-Selectin Ligands on Neutrophils Reveals Distinct Functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44', *Immunity*. *Immunity*, 26(4), pp. 477–489. doi: 10.1016/j.immuni.2007.03.011.
- Hoffman, M. and Monroe, D. M. (2001) 'The action of high-dose factor VIIa (FVIIa) in a cell-based model of hemostasis', *Seminars in Hematology*. *Semin Hematol*, 38(4 Suppl 12), pp. 6–9. doi: 10.1016/S0037-1963(01)90140-4.
- Holcomb, J. B. *et al.* (1999) 'Dry fibrin sealant dressings reduce blood loss, resuscitation volume, and

- improve survival in hypothermic coagulopathic swine with grade V liver injuries', *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care*. *J Trauma*, 47(2), pp. 233–242. doi: 10.1097/00005373-199908000-00002.
- Holnthoner, W. *et al.* (2017) 'Endothelial Cell-derived Extracellular Vesicles Size-dependently Exert Procoagulant Activity Detected by Thromboelastometry', *Scientific Reports*. *Sci Rep*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-03159-0.
- Holder, E. G. (1899) 'BLOOD DUST OR BLOOD GRANULES: A NEW CONSTITUENT OF THE BLOOD?', *The Lancet*. Elsevier, 154(3972), p. 1015. doi: 10.1016/S0140-6736(01)59201-6.
- Hoshino, A. *et al.* (2015) 'Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis', *Nature*. *Nature*, 527(7578), pp. 329–335. doi: 10.1038/nature15756.
- Howard, G. *et al.* (2013) 'Risk Factors for Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 44(5), pp. 1282–1287. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.000529.
- Hoylaerts, M. *et al.* (1982) 'Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin.', *The Journal of biological chemistry*. *J Biol Chem*, 257(6), pp. 2912–9. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7199524/> (Accessed: 21 August 2021).
- Hu, Y. *et al.* (2020) 'Human milk triggers coagulation *via* tissue factor-exposing extracellular vesicles', *Blood Advances*. American Society of Hematology, pp. 6274–6282. doi: 10.1182/bloodadvances.2020003012.
- Hu, Y., Thaler, J. and Nieuwland, R. (2021) 'Extracellular Vesicles in Human Milk', *Pharmaceuticals*, 14(10), p. 1050. doi: 10.3390/ph14101050.
- Huang, F. *et al.* (2014) 'The use of tranexamic acid to reduce blood loss and transfusion in major orthopedic surgery: A meta-analysis', *Journal of Surgical Research*. *J Surg Res*, 186(1), pp. 318–327. doi: 10.1016/j.jss.2013.08.020.
- Huebsch, L. B. and Harker, L. A. (1981) 'Disorders of platelet functions. Mechanisms, diagnosis and management', *Western Journal of Medicine*. BMJ Publishing Group, 134(2), pp. 109–127. Available at: </pmc/articles/PMC1272531/?report=abstract> (Accessed: 11 October 2021).
- Hullin-Matsuda, F. *et al.* (2016) 'Probing phosphoethanolamine-containing lipids in membranes with duramycin/cinnamycin and aegerolysin proteins', *Biochimie*. *Biochimie*, pp. 81–90. doi: 10.1016/j.biochi.2016.09.020.
- Huynh, T. J. *et al.* (2013) 'Spot sign number is the most important spot sign characteristic for predicting hematoma expansion using first-pass computed tomography angiography: Analysis from the PREDICT study', *Stroke*. *Stroke*, 44(4), pp. 972–977. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.000410.
- Hvatum, M., Hovig, T. and Prydz, H. (1969) 'Studies on tissue thromboplastin--electron micrography.', *Thrombosis et diathesis haemorrhagica*. *Thromb Diath Haemorrh*, 21(2), pp. 223–31. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5769050/> (Accessed: 21 August 2021).
- Iakhiaev, A. V., Rezaie, A. R. and Idell, S. (2007) 'Thrombomodulin-mediated catabolism of protein C by pleural mesothelial and vascular endothelial cells', *Thrombosis and Haemostasis*, 98(3), pp. 627–634. doi: 10.1160/TH07-03-0223.
- Iancu, E. M. and Kandalaf, L. E. (2020) 'Challenges and advantages of cell therapy manufacturing under Good Manufacturing Practices within the hospital setting', *Current Opinion in Biotechnology*. *Curr Opin Biotechnol*, pp. 233–241. doi: 10.1016/j.copbio.2020.05.005.
- Ikeda, G. *et al.* (2021) 'Mitochondria-Rich Extracellular Vesicles From Autologous Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Restore Energetics of Ischemic Myocardium', *Journal of the American College of*

Cardiology. *J Am Coll Cardiol*, 77(8), pp. 1073–1088. doi: 10.1016/j.jacc.2020.12.060.

Ingato, D. *et al.* (2016) 'Good things come in small packages: Overcoming challenges to harness extracellular vesicles for therapeutic delivery', *Journal of Controlled Release*. *J Control Release*, pp. 174–185. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.09.016.

Jackson, C. A. and Sudlow, C. L. M. (2006) 'Is hypertension a more frequent risk factor for deep than for lobar supratentorial intracerebral haemorrhage?', *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 77(11), pp. 1244–1252. doi: 10.1136/jnnp.2006.089292.

Jaffe, E. A. *et al.* (1973) 'Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria', *Journal of Clinical Investigation*. *J Clin Invest*, 52(11), pp. 2745–2756. doi: 10.1172/JCI107470.

James, M. L., Warner, D. S. and Laskowitz, D. T. (2008) 'Preclinical Models of Intracerebral Hemorrhage: A Translational Perspective', *Neurocritical Care*. *Neurocrit Care*, 9(1), pp. 139–152. doi: 10.1007/s12028-007-9030-2.

Jamwal, S. and Sharma, S. (2018) 'Vascular endothelium dysfunction: a conservative target in metabolic disorders', *Inflammation Research*. *Inflamm Res*, pp. 391–405. doi: 10.1007/s00011-018-1129-8.

Jang, Y. Y. *et al.* (2004) 'Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion', *Nature Cell Biology*. *Nat Cell Biol*, 6(6), pp. 532–539. doi: 10.1038/ncb1132.

Jeong, W. K. *et al.* (2005) 'Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes', *Clinical Cancer Research*, 11(3), pp. 1010–1020. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15709166/> (Accessed: 1 September 2021).

Jing, B. *et al.* (2021) 'Hydrophobic insertion-based engineering of tumor cell-derived exosomes for SPECT/NIRF imaging of colon cancer', *Journal of Nanobiotechnology*. *J Nanobiotechnology*, 19(1). doi: 10.1186/s12951-020-00746-8.

Jingxia, G. *et al.* (2004) 'Experimental study on the PAR-1 expression around hemotoma following intracerebral hemorrhage in rats', *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 24(3), pp. 266–268. doi: 10.1007/BF02832008.

Johnsen, K. B. *et al.* (2018) 'On the use of liposome controls in studies investigating the clinical potential of extracellular vesicle-based drug delivery systems – A commentary', *Journal of Controlled Release*. *J Control Release*, pp. 10–14. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.11.002.

Johnsen, S. P. *et al.* (2003) 'Nonaspirin Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Risk of Hospitalization for Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 34(2), pp. 387–391. doi: 10.1161/01.STR.0000054057.11892.5B.

Johnston, S. C. *et al.* (2018) 'Clopidogrel and Aspirin in Acute Ischemic Stroke and High-Risk TIA', *New England Journal of Medicine*. *N Engl J Med*, 379(3), pp. 215–225. doi: 10.1056/NEJMoa1800410.

Johnstone, R. M. *et al.* (1987) 'Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes).', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 262(19), pp. 9412–9420. doi: 10.1016/S0021-9258(18)48095-7.

Jolink, W. M. T. *et al.* (2015) 'Time trends in incidence, case fatality, and mortality of intracerebral hemorrhage', *Neurology*, 85(15), pp. 1318–1324. doi: 10.1212/WNL.0000000000002015.

Kamerkar, S. *et al.* (2017) 'Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer', *Nature*. *Nature*, 546(7659), pp. 498–503. doi: 10.1038/nature22341.

Kang, M. *et al.* (2021) 'Biodistribution of extracellular vesicles following administration into animals: A systematic review', *Journal of Extracellular Vesicles*. doi: 10.1002/jev2.12085.

- Kappelmayer, J. and Nagy, B. (2017) 'The Interaction of Selectins and PSGL-1 as a Key Component in Thrombus Formation and Cancer Progression'. doi: 10.1155/2017/6138145.
- Karibe, H. *et al.* (2001) 'Hepatitis C virus (HCV) infection as a risk factor for spontaneous intracerebral hemorrhage: hospital based case-control study', *Journal of Clinical Neuroscience*. J Clin Neurosci, 8(5), pp. 423–425. doi: 10.1054/jocn.2001.0811.
- Karpman, D. *et al.* (2015) 'Complement interactions with blood cells, endothelial cells and microvesicles in thrombotic and inflammatory conditions', *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Adv Exp Med Biol, 865, pp. 19–42. doi: 10.1007/978-3-319-18603-0_2.
- Katayama, Y. *et al.* (2003) 'PSGL-1 participates in E-selectin-mediated progenitor homing to bone marrow: Evidence for cooperation between E-selectin ligands and $\alpha 4$ integrin', *Blood*. Blood, 102(6), pp. 2060–2067. doi: 10.1182/blood-2003-04-1212.
- Kazui, S. *et al.* (1996) 'Enlargement of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. Stroke, 27(10), pp. 1783–1787. doi: 10.1161/01.STR.27.10.1783.
- Kerfoot, S. M. and Kubes, P. (2002) 'Overlapping Roles of P-Selectin and $\alpha 4$ Integrin to Recruit Leukocytes to the Central Nervous System in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis', *The Journal of Immunology*. J Immunol, 169(2), pp. 1000–1006. doi: 10.4049/jimmunol.169.2.1000.
- Khachigian, L. M. *et al.* (1997) 'Egr-1 is activated in endothelial cells exposed to fluid shear stress and interacts with a novel shear-stress-response element in the PDGF A-chain promoter', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 17(10), pp. 2280–2286. doi: 10.1161/01.ATV.17.10.2280.
- Khan, Z. *et al.* (2018) 'Spot Sign in Acute Intracerebral Hemorrhage in Magnetic Resonance Imaging', *Neurologist*. Neurologist, pp. 104–107. doi: 10.1097/NRL.0000000000000178.
- Kidwell, C. S. (2004) 'Comparison of MRI and CT for Detection of Acute Intracerebral Hemorrhage', *JAMA*. JAMA, 292(15), p. 1823. doi: 10.1001/jama.292.15.1823.
- Kidwell, C. S. *et al.* (2011) 'Hyperacute injury marker (HARM) in primary hemorrhage: A distinct form of CNS barrier disruption', *Neurology*. Neurology, 77(19), pp. 1725–1728. doi: 10.1212/WNL.0b013e318236ef46.
- Kieffer, J. D. *et al.* (2001) 'Neutrophils, monocytes, and dendritic cells express the same specialized form of PSGL-1 as do skin-homing memory t cells: Cutaneous lymphocyte antigen', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Biochem Biophys Res Commun, 285(3), pp. 577–587. doi: 10.1006/bbrc.2001.5230.
- Kikuchi, S. *et al.* (2019) 'Involvement of Extracellular Vesicles in Vascular-Related Functions in Cancer Progression and Metastasis', *International Journal of Molecular Sciences*. Int J Mol Sci, 20(10), p. 2584. doi: 10.3390/ijms20102584.
- Kim, Y. *et al.* (2018) 'Microparticles from stored red blood cells promote a hypercoagulable state in a murine model of transfusion', *Surgery (United States)*. Surgery, 163(2), pp. 423–429. doi: 10.1016/j.surg.2017.09.028.
- Kirchhofer, D. and Nemerson, Y. (1996) 'Initiation of blood coagulation: The tissue factor/factor VIIa complex', *Current Opinion in Biotechnology*. Curr Opin Biotechnol, 7(4), pp. 386–391. doi: 10.1016/S0958-1669(96)80112-1.
- Koh, Y.-C. *et al.* (2018) 'Chemopreventive Effects of Phytochemicals and Medicines on M1/M2 Polarized Macrophage Role in Inflammation-Related Diseases', *International Journal of Molecular Sciences*. Int J Mol Sci, 19(8), p. 2208. doi: 10.3390/ijms19082208.

- Kooijmans, S. A. A. *et al.* (2016) 'PEGylated and targeted extracellular vesicles display enhanced cell specificity and circulation time', *Journal of Controlled Release*. *J Control Release*, 224, pp. 77–85. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.01.009.
- Korenevskii, A. V. *et al.* (2018) 'Mass-Spectrometric Analysis of Proteome of Microvesicles Produced by NK-92 Natural Killer Cells', *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. *Bull Exp Biol Med*, 165(4), pp. 564–571. doi: 10.1007/s10517-018-4214-7.
- Kowal, J. *et al.* (2016) 'Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(8), pp. E968–E977. doi: 10.1073/pnas.1521230113.
- Kreimer, S. *et al.* (2015) 'Mass-spectrometry-based molecular characterization of extracellular vesicles: Lipidomics and proteomics', *Journal of Proteome Research*. *J Proteome Res*, 14(6), pp. 2367–2384. doi: 10.1021/pr501279t.
- Krenzlin, H., Frenz, C., *et al.* (2020) 'High CSF thrombin concentration and activity is associated with an unfavorable outcome in patients with intracerebral hemorrhage', *PLOS ONE*. Edited by T. S. Anthony. *PLoS One*, 15(11), p. e0241565. doi: 10.1371/journal.pone.0241565.
- Krenzlin, H., Gresser, E., *et al.* (2020) 'The Cerebral Thrombin System Is Activated after Intracerebral Hemorrhage and Contributes to Secondary Lesion Growth and Poor Neurological Outcome in C57Bl/6 Mice', *Journal of Neurotrauma*. *J Neurotrauma*, 37(12), pp. 1481–1490. doi: 10.1089/neu.2019.6582.
- Krishnamurthi, R. V. *et al.* (2014) 'The global burden of hemorrhagic stroke: a summary of findings from the {GBD} 2010 study', *Glob Heart*, 9(1), pp. 101–106. doi: 10.1016/j.gheart.2014.01.003.
- Kummer, L. *et al.* (2020) 'Vascular Signaling in Allogenic Solid Organ Transplantation – The Role of Endothelial Cells', *Frontiers in Physiology*, p. 443. doi: 10.3389/fphys.2020.00443.
- Kurth, T. *et al.* (2003) 'Smoking and the Risk of Hemorrhagic Stroke in Men', *Stroke*. *Stroke*, 34(5), pp. 1151–1155. doi: 10.1161/01.STR.0000065200.93070.32.
- Labovitz, D. L. *et al.* (2005) 'The incidence of deep and lobar intracerebral hemorrhage in whites, blacks, and Hispanics', *Neurology*. *Neurology*, 65(4), pp. 518–522. doi: 10.1212/01.wnl.0000172915.71933.00.
- Lachenal, G. *et al.* (2011) 'Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity', *Molecular and Cellular Neuroscience*. *Mol Cell Neurosci*, 46(2), pp. 409–418. doi: 10.1016/j.mcn.2010.11.004.
- Lacroix, R. and Dignat-George, F. (2012) 'Microparticles as a circulating source of procoagulant and fibrinolytic activities in the circulation', *Thrombosis Research*. *Pergamon*, 129(SUPPL. 2), pp. S27–S29. doi: 10.1016/J.THROMRES.2012.02.025.
- Lai, C. P. *et al.* (2014) 'Dynamic Biodistribution of Extracellular Vesicles *in vivo* Using a Multimodal Imaging Reporter', *ACS Nano*. *ACS Nano*, 8(1), pp. 483–494. doi: 10.1021/nn404945r.
- Lai, R. C., Chen, T. S. and Lim, S. K. (2011) 'Mesenchymal stem cell exosome: A novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease', *Regenerative Medicine*. *Regen Med*, pp. 481–492. doi: 10.2217/rme.11.35.
- Lammie, G. A. (2002) 'Hypertensive cerebral small vessel disease and stroke', in *Brain Pathology*. *Brain Pathol*, pp. 358–370. doi: 10.1111/j.1750-3639.2002.tb00450.x.
- Landmann, H. (1973) 'Studies on the mechanism of action of synthetic antifibrinolytics. A comparison with the action of derivatives of benzamidine on the fibrinolytic process', *THROMB.DIATHES.HAEMORRH.*, 29(2), pp. 253–275. doi: 10.1055/s-0038-1647769.

- Lane, D. A., Philippou, H. and Huntington, J. A. (2005) 'Directing thrombin', *Blood*. *Blood*, pp. 2605–2612. doi: 10.1182/blood-2005-04-1710.
- Langhorne, P. *et al.* (2013) 'Stroke unit care benefits Patients with intracerebral hemorrhage: Systematic review and meta-analysis', *Stroke*. *Stroke*, 44(11), pp. 3044–3049. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.001564.
- Lara, F. A. *et al.* (2009) 'On the Fate of Extracellular Hemoglobin and Heme in Brain', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29(6), pp. 1109–1120. doi: 10.1038/jcbfm.2009.34.
- Larsen, J. B. and Hvas, A. M. (2021) 'Thrombin: A Pivotal Player in Hemostasis and beyond', *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. *Semin Thromb Hemost*, pp. 759–774. doi: 10.1055/s-0041-1727116.
- Larson, M. C. *et al.* (2012) 'Phosphatidylethanolamine is externalized at the surface of microparticles', *Biochimica et biophysica acta*. *NIH Public Access*, 1821(12), pp. 1501–1507. doi: 10.1016/J.BBALIP.2012.08.017.
- Larsson, S. C. *et al.* (2016) 'Differing association of alcohol consumption with different stroke types: a systematic review and meta-analysis', *BMC Medicine*. *BMC Med*, 14(1), p. 178. doi: 10.1186/s12916-016-0721-4.
- Lashof-Sullivan, M. *et al.* (2016) 'Hemostatic Nanoparticles Improve Survival Following Blunt Trauma even after 1 Week Incubation at 50 °C', *ACS Biomaterials Science and Engineering*. *ACS Biomater Sci Eng*, 2(3), pp. 385–392. doi: 10.1021/acsbiomaterials.5b00493.
- Lashof-Sullivan, M. M. *et al.* (2014) 'Intravenously administered nanoparticles increase survival following blast trauma', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(28), pp. 10293–10298. doi: 10.1073/pnas.1406979111.
- Lashof-Sullivan, M., Shoffstall, A. and Lavik, E. (2013) 'Intravenous hemostats: Challenges in translation to patients', *Nanoscale*. *Nanoscale*, pp. 10719–10728. doi: 10.1039/c3nr03595f.
- Lawton, M. T. *et al.* (2021) 'Coronavirus disease 2019 (COVID-19) can predispose young to Intracerebral hemorrhage: a retrospective observational study', *BMC Neurology*, 21(1). doi: 10.1186/s12883-021-02109-8.
- Lee, S.-M. *et al.* (2013) 'Caffeine-Containing Medicines Increase the Risk of Hemorrhagic Stroke', *Stroke*. *Stroke*, 44(8), pp. 2139–2143. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.674077.
- Lee, Y., El Andaloussi, S. and Wood, M. J. A. (2012) 'Exosomes and microvesicles: Extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy', *Human Molecular Genetics*. *Hum Mol Genet*, 21(R1). doi: 10.1093/hmg/dds317.
- Lemarchant, S. *et al.* (2014) 'tPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury', *Neurobiology of Disease*. *Neurobiol Dis*, 66, pp. 28–42. doi: 10.1016/j.nbd.2014.02.005.
- Lener, T. *et al.* (2015) 'Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – an ISEV position paper', *Journal of Extracellular Vesicles*. *J Extracell Vesicles*, 4(1), p. 30087. doi: 10.3402/jev.v4.30087.
- Lenzini, S. *et al.* (2020) 'Matrix mechanics and water permeation regulate extracellular vesicle transport', *Nature Nanotechnology*. *Nat Nanotechnol*, pp. 217–223. doi: 10.1038/s41565-020-0636-2.
- Lewis, L. J. *et al.* (1973) 'Replication of human endothelial cells in culture', *Science*. *Science*, 181(4098), pp. 453–454. doi: 10.1126/science.181.4098.453.
- Li, K.-Y. *et al.* (2021) 'Newly Diagnosed Leptospirosis and Subsequent Hemorrhagic Stroke', *Stroke*.

- Stroke, 52(3), pp. 913–921. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.029998.
- Li, M. *et al.* (2021) 'Interleukin-35 inhibits lipopolysaccharide-induced endothelial cell activation by downregulating inflammation and apoptosis', *Experimental Cell Research*. Exp Cell Res, 407(2). doi: 10.1016/j.yexcr.2021.112784.
- Li, N. *et al.* (2013) 'Temporal pattern of cytotoxic edema in the perihematomal region after intracerebral hemorrhage: A serial magnetic resonance imaging study', *Stroke*. Stroke, 44(4), pp. 1144–1146. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.000056.
- Li, Y. J. *et al.* (2020) 'Emerging strategies for labeling and tracking of extracellular vesicles', *Journal of Controlled Release*. J Control Release, pp. 141–159. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.08.056.
- Lin, Y. *et al.* (2020) 'Phosphoproteomic analysis of protease-activated receptor-1 biased signaling reveals unique modulators of endothelial barrier function', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 117(9), pp. 5039–5048. doi: 10.1073/pnas.1917295117.
- Liu, C. *et al.* (2006) 'Murine Mammary Carcinoma Exosomes Promote Tumor Growth by Suppression of NK Cell Function', *The Journal of Immunology*. J Immunol, 176(3), pp. 1375–1385. doi: 10.4049/jimmunol.176.3.1375.
- Liu, D.-Z. *et al.* (2010) 'Blood-brain barrier breakdown and repair by Src after thrombin-induced injury', *Annals of Neurology*. Ann Neurol, 67(4), pp. 526–533. doi: 10.1002/ana.21924.
- Liu, J. *et al.* (2011) 'Hyperglycemia-induced cerebral hematoma expansion is mediated by plasma kallikrein', *Nature Medicine*. Nat Med, 17(2), pp. 206–210. doi: 10.1038/nm.2295.
- Lo, W. D. *et al.* (2013) 'Outcomes in children with hemorrhagic stroke', *Archives of Neurology*. JAMA Neurol, 70(1), pp. 66–71. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.577.
- Loggini, A. *et al.* (2021) 'Inversion of T Waves on Admission is Associated with Mortality in Spontaneous Intracerebral Hemorrhage', *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. J Stroke Cerebrovasc Dis, 30(6). doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.105776.
- Lomax, C. and Traub, O. (2009) 'Topical thrombins: Benefits and risks', *Pharmacotherapy*. Pharmacotherapy. doi: 10.1592/phco.29.pt2.8S.
- Long, A. T. *et al.* (2016) 'Contact system revisited: An interface between inflammation, coagulation, and innate immunity', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. J Thromb Haemost, pp. 427–437. doi: 10.1111/jth.13235.
- López-López, J. A. *et al.* (2017) 'Oral anticoagulants for prevention of stroke in atrial fibrillation: systematic review, network meta-analysis, and cost effectiveness analysis', *BMJ*. BMJ, 359, p. j5058. doi: 10.1136/bmj.j5058.
- Louise, C. B. and Obrig, T. G. (1994) 'Human renal microvascular endothelial cells as a potential target in the development of the hemolytic uremic syndrome as related to fibrinolysis factor expression, *in vitro*', *Microvascular Research*. Microvasc Res, 47(3), pp. 377–387. doi: 10.1006/mvre.1994.1030.
- Louveau, A., Harris, T. H. and Kipnis, J. (2015) 'Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege', *Trends in Immunology*. Trends Immunol, pp. 569–577. doi: 10.1016/j.it.2015.08.006.
- Luo, Z., Wang, S. and Zhang, S. (2011) 'Fabrication of self-assembling d-form peptide nanofiber scaffold d-EAK16 for rapid hemostasis', *Biomaterials*. Biomaterials, 32(8), pp. 2013–2020. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.11.049.
- Maas, M. B. *et al.* (2013) 'Surveillance neuroimaging and neurologic examinations affect care for intracerebral hemorrhage', *Neurology*. Neurology, 81(2), pp. 107–112. doi:

10.1212/WNL.0b013e31829a33e4.

Macdonald, R. L. and Schweizer, T. A. (2017) 'Spontaneous subarachnoid haemorrhage', *The Lancet*. Elsevier, 389(10069), pp. 655–666. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30668-7.

Mack, M. *et al.* (2000) 'Transfer of the chemokine receptor {CCR5} between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection', *Nat. Med.*, 6(7), pp. 769–775. doi: 10.1038/77498.

Mackman, N. *et al.* (1993) 'Murine tissue factor gene expression *in vivo*. Tissue and cell specificity and regulation by lipopolysaccharide.', *The American journal of pathology*. Am J Pathol, 143(1), pp. 76–84. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8317556/> (Accessed: 23 August 2021).

Mackman, N. (2009) 'The many faces of tissue factor', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7, pp. 136–139. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03368.x.

Magaki, S. *et al.* (2021) 'Charcot–Bouchard aneurysms revisited: clinicopathologic correlations', *Modern Pathology*. Mod Pathol. doi: 10.1038/s41379-021-00847-1.

Mangano, D. T. *et al.* (2007) 'Mortality associated with aprotinin during 5 years following coronary artery bypass graft surgery', *Journal of the American Medical Association*. JAMA, 297(5), pp. 471–479. doi: 10.1001/jama.297.5.471.

Manning, L. *et al.* (2014) 'Blood pressure variability and outcome after acute intracerebral haemorrhage: A post-hoc analysis of INTERACT2, a randomised controlled trial', *The Lancet Neurology*. Lancet Neurol, 13(4), pp. 364–373. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70018-3.

Mannucci, P. M. (1998) 'Hemostatic Drugs', *New England Journal of Medicine*. N Engl J Med, 339(4), pp. 245–253. doi: 10.1056/nejm199807233390407.

Mannucci, P. M., And, D. B. and Cattaneo, M. (1992) 'Patterns of development of tachyphylaxis in patients with haemophilia and von Willebrand disease after repeated doses of desmopressin (DDAVP)', *British Journal of Haematology*. Br J Haematol, 82(1), pp. 87–93. doi: 10.1111/j.1365-2141.1992.tb04598.x.

Martini, S. R. *et al.* (2012) 'Risk factors for intracerebral hemorrhage differ according to hemorrhage location', *Neurology*. Neurology, 79(23), pp. 2275–2282. doi: 10.1212/WNL.0b013e318276896f.

Martins, P. D. C. *et al.* (2007) 'P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 27(5), pp. 1023–1029. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.140442.

Matuk, R. *et al.* (2021) 'The role of salivary vesicles as a potential inflammatory biomarker to detect traumatic brain injury in mixed martial artists', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 11(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-021-87180-4.

Mayer, S. A. *et al.* (2005) 'Safety and feasibility of recombinant factor VIIa for acute intracerebral hemorrhage', *Stroke*. Stroke, 36(1), pp. 74–79. doi: 10.1161/01.STR.0000149628.80251.b8.

Mayer, S. A. (2007) 'Recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage', *Stroke*, 38(2 PART 2), pp. 763–767. doi: 10.1161/01.STR.0000254499.46122.22.

Mayer, S. A. *et al.* (2008) 'Efficacy and Safety of Recombinant Activated Factor VII for Acute Intracerebral Hemorrhage for the FAST Trial Investigators*', 20(15), pp. 2127–2137.

Mayer, S. A. and Rincon, F. (2005) 'Treatment of intracerebral haemorrhage', *Lancet Neurology*. Elsevier, pp. 662–672. doi: 10.1016/S1474-4422(05)70195-2.

McCarthy, S. A. *et al.* (1991) 'Heterogeneity of the endothelial cell and its role in organ preference of

- tumour metastasis', *Trends in Pharmacological Sciences*. Trends Pharmacol Sci, pp. 462–467. doi: 10.1016/0165-6147(91)90637-8.
- McEver, R. P. (2015) 'Selectins: Initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall', *Cardiovascular Research*. Cardiovasc Res, pp. 331–339. doi: 10.1093/cvr/cvv154.
- McEver, R. P., Moore, K. L. and Cummings, R. D. (1995) 'Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions', *Journal of Biological Chemistry*. J Biol Chem, pp. 11025–11028. doi: 10.1074/jbc.270.19.11025.
- McKee, C. and Chaudhry, G. R. (2017) 'Advances and challenges in stem cell culture', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier, pp. 62–77. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.051.
- McKinney, J. S. and Kostis, W. J. (2012) 'Statin Therapy and the Risk of Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. Stroke, 43(8), pp. 2149–2156. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.655894.
- McVey, M. J. *et al.* (2021) 'Platelet extracellular vesicles mediate transfusion-related acute lung injury by imbalancing the sphingolipid rheostat', *Blood*. Blood, 137(5), pp. 690–701. doi: 10.1182/blood.2020005985.
- Mehanny, M., Lehr, C. M. and Fuhrmann, G. (2021) 'Extracellular vesicles as antigen carriers for novel vaccination avenues', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Adv Drug Deliv Rev, pp. 164–180. doi: 10.1016/j.addr.2021.03.016.
- Mendelow, A. D. *et al.* (2005) 'Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial intracerebral haematomas in the {International} {Surgical} {Trial} in {Intracerebral} {Haemorrhage} ({STICH}): a randomised trial', *Lancet*, 365(9457), pp. 387–397. doi: 10.1016/S0140-6736(05)17826-X.
- Mendelow, A. D. *et al.* (2013) 'Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial lobar intracerebral haematomas (STICH II): a randomised trial', *The Lancet*. Lancet, 382(9890), pp. 397–408. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60986-1.
- Menon, R. S. *et al.* (2012) 'Predictors of highly prevalent brain ischemia in intracerebral hemorrhage', *Annals of Neurology*. Ann Neurol, 71(2), pp. 199–205. doi: 10.1002/ana.22668.
- Meretoja, A. *et al.* (2020) 'Tranexamic acid in patients with intracerebral haemorrhage (STOP-AUST): a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial', *The Lancet Neurology*. Lancet Neurol, 19(12), pp. 980–987. doi: 10.1016/S1474-4422(20)30369-0.
- Millan-Orge, M. *et al.* (2021) 'Influence of dietary intervention on microvascular endothelial function in coronary patients and atherothrombotic risk of recurrence', *Scientific Reports*. Sci Rep, 11(1), p. 20301. doi: 10.1038/s41598-021-99514-3.
- Miller Fisher, C. (2003) 'Hypertensive cerebral hemorrhage. Demonstration of the source of bleeding', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. J Neuropathol Exp Neurol, 62(1), pp. 104–107. doi: 10.1093/jnen/62.1.104.
- Min, H. *et al.* (2016) 'Alternatively activated brain-infiltrating macrophages facilitate recovery from collagenase-induced intracerebral hemorrhage', *Molecular Brain*. Mol Brain, 9(1). doi: 10.1186/s13041-016-0225-3.
- Mitra, D. *et al.* (1997) 'Thrombotic thrombocytopenic purpura and sporadic hemolytic-uremic syndrome plasmas induce apoptosis in restricted lineages of human microvascular endothelial cells', *Blood*. Content Repository Only!, 89(4), pp. 1224–1234. doi: 10.1182/blood.v89.4.1224.
- Modery-Pawlowski, C. L. *et al.* (2013) '*In vitro* and *in vivo* hemostatic capabilities of a functionally integrated platelet-mimetic liposomal nanoconstruct', *Biomaterials*. Biomaterials, 34(12), pp. 3031–

3041. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.045.

Momi, S. *et al.* (2021) 'Matrix metalloproteinase-2 on activated platelets triggers endothelial PAR-1 initiating atherosclerosis', *European Heart Journal*. Eur Heart J. doi: 10.1093/eurheartj/ehab631.

Monroe, D. M. and Hoffman, M. (2009) 'The Coagulation Cascade in Cirrhosis', *Clinics in Liver Disease*. Clin Liver Dis, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.cld.2008.09.014.

Montagne, A. *et al.* (2012) 'Ultra-sensitive molecular MRI of cerebrovascular cell activation enables early detection of chronic central nervous system disorders', *NeuroImage*. Neuroimage, 63(2), pp. 760–770. doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.07.018.

Moore, K. L. *et al.* (1995) 'P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin', *Journal of Cell Biology*. J Cell Biol, 128(4), pp. 661–671. doi: 10.1083/jcb.128.4.661.

Moore, K. L. (1998) 'Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1', *Leukemia and Lymphoma*. Leuk Lymphoma, pp. 1–15. doi: 10.3109/10428199809058377.

Morey, A. F. *et al.* (2001) 'Treatment of grade 4 renal stab wounds with absorbable fibrin adhesive bandage in a porcine model', *Journal of Urology*, 165(3), pp. 955–958. doi: 10.1016/S0022-5347(05)66583-4.

Morotti, A. *et al.* (2020) 'Noncontrast CT markers of intracerebral hemorrhage expansion and poor outcome: A meta-analysis', *Neurology*. Neurology, 95(14), pp. 632–643. doi: 10.1212/WNL.0000000000010660.

Morrison, C. A. (2013) 'The prehospital treatment of the bleeding patient - Dare to dream', *Journal of Surgical Research*. J Surg Res, pp. 246–247. doi: 10.1016/j.jss.2011.12.022.

Moulin, S. *et al.* (2016) 'Dementia risk after spontaneous intracerebral haemorrhage: a prospective cohort study', *Lancet Neurol*, 15(8), pp. 820–829. doi: 10.1016/S1474-4422(16)00130-7.

Moullaali, T. J. *et al.* (2019) 'Blood pressure control and clinical outcomes in acute intracerebral haemorrhage: a preplanned pooled analysis of individual participant data', *The Lancet Neurology*. Lancet Neurol, 18(9), pp. 857–864. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30196-6.

Muller, W. A. (2014) 'How endothelial cells regulate transmigration of leukocytes in the inflammatory response', *American Journal of Pathology*, 184(4), pp. 886–896. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.12.033.

Murai, Y. *et al.* (1998) 'Magnetic resonance imaging-documented extravasation as an indicator of acute hypertensive intracerebral hemorrhage', *Journal of Neurosurgery*. J Neurosurg, 88(4), pp. 650–655. doi: 10.3171/jns.1998.88.4.0650.

Muralidharan-Chari, V. *et al.* (2009) 'ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles', *Current Biology*. Curr Biol, 19(22), pp. 1875–1885. doi: 10.1016/j.cub.2009.09.059.

Murphy, D. E. *et al.* (2021) 'Natural or synthetic RNA delivery: A stoichiometric comparison of extracellular vesicles and synthetic nanoparticles', *Nano Letters*. Nano Lett, 21(4), pp. 1888–1895. doi: 10.1021/acs.nanolett.1c00094.

Murthy, S. B. *et al.* (2017) 'Outcomes after intracerebral hemorrhage from arteriovenous malformations', *Neurology*. Neurology, 88(20), pp. 1882–1888. doi: 10.1212/WNL.0000000000003935.

Myers, D. D. *et al.* (2003) 'P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis', *Journal of Vascular Surgery*. J Vasc Surg, 38(5), pp. 1075–1089. doi: 10.1016/S0741-5214(03)01033-4.

Myles, P. S. *et al.* (2017) 'Tranexamic Acid in Patients Undergoing Coronary-Artery Surgery', *New*

- England Journal of Medicine*. N Engl J Med, 376(2), pp. 136–148. doi: 10.1056/nejmoa1606424.
- Naidech, A. M. *et al.* (2009) 'Platelet activity and outcome after intracerebral hemorrhage', *Annals of Neurology*. Ann Neurol, 65(3), pp. 352–356. doi: 10.1002/ana.21618.
- Narahara, N. *et al.* (1994) 'Polar expression of tissue factor in human umbilical vein endothelial cells', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Arterioscler Thromb, 14(11), pp. 1815–1820. doi: 10.1161/01.ATV.14.11.1815.
- Nemerson, Y. (1968) 'The phospholipid requirement of tissue factor in blood coagulation', *Journal of Clinical Investigation*. J Clin Invest, 47(1), pp. 72–80. doi: 10.1172/JCI105716.
- Neubauer, K. and Zieger, B. (2021) 'Endothelial cells and coagulation', *Cell and Tissue Research*. Cell Tissue Res. doi: 10.1007/s00441-021-03471-2.
- Nevo, N. *et al.* (2019) 'Heparanase Level in the Microcirculation as a Possible Modulator of the Metastatic Process', *The American Journal of Pathology*. Am J Pathol, 189(8), pp. 1654–1663. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.04.019.
- Niada, S. *et al.* (2021) 'Proteomic analysis of extracellular vesicles and conditioned medium from human adipose-derived stem/stromal cells and dermal fibroblasts', *Journal of Proteomics*. J Proteomics, 232. doi: 10.1016/j.jprot.2020.104069.
- van Niel, G. and Raposo, G. (2018) 'Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles', *Nature Publishing Group*, 19. doi: 10.1038/nrm.2017.125.
- Nilsson, O. G. *et al.* (2002) 'Prediction of death in patients with primary intracerebral hemorrhage: A prospective study of a defined population', *Journal of Neurosurgery*. J Neurosurg, 97(3), pp. 531–536. doi: 10.3171/jns.2002.97.3.0531.
- Nishinaga, M. and Shimada, K. (1994) 'Heparan sulfate proteoglycan of endothelial cells: homocysteine suppresses anticoagulant active heparan sulfate in cultured endothelial cells', *Rinsho byori. The Japanese journal of clinical pathology*, 42(4), pp. 340–345. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8176841/> (Accessed: 22 October 2021).
- Norfolk, D. R. and Seghatchian, J. (2000) 'Pharmacological therapies to minimise platelet transfusion', in *Transfusion Science*. Transfus Sci, pp. 149–153. doi: 10.1016/S0955-3886(00)00040-0.
- Noria, S. *et al.* (2004) 'Assembly and Reorientation of Stress Fibers Drives Morphological Changes to Endothelial Cells Exposed to Shear stress', *American Journal of Pathology*. Am J Pathol, 164(4), pp. 1211–1223. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63209-9.
- Norman, K. E. *et al.* (1995) 'Leukocyte rolling *in vivo* is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1', *Blood*. Content Repository Only!, 86(12), pp. 4417–4421. doi: 10.1182/blood.v86.12.4417.bloodjournal86124417.
- Noubouossie, D. F. *et al.* (2020) 'Red blood cell microvesicles activate the contact system, leading to factor IX activation *via* 2 independent pathways', *Blood*. Blood, 135(10), pp. 755–765. doi: 10.1182/blood.2019001643.
- Nourshargh, S. and Alon, R. (2014) 'Leukocyte Migration into Inflamed Tissues', *Immunity*. Immunity, pp. 694–707. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.008.
- O'Connell, N. M. *et al.* (2003) 'Recombinant FVIIa in the management of uncontrolled hemorrhage', *Transfusion*. Transfusion, 43(12), pp. 1711–1716. doi: 10.1046/j.0041-1132.2003.00577.x.
- O'Donnell, M. J. *et al.* (2010) 'Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study', *The Lancet*. Lancet, 376(9735), pp. 112–123. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60834-3.

- Oeinck, M. *et al.* (2013) 'Dynamic cerebral autoregulation in acute intracerebral hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 44(10), pp. 2722–2728. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.001913.
- Oelze, B. *et al.* (2021) 'The inflammatory signalling mediator TAK1 mediates lymphocyte recruitment to lipopolysaccharide-activated murine mesenchymal stem cells through interleukin-6', *Molecular and Cellular Biochemistry*. *Mol Cell Biochem*, 476(10), pp. 3655–3670. doi: 10.1007/s11010-021-04180-8.
- Offenbacher, H. *et al.* (1996) 'MR of cerebral abnormalities concomitant with primary intracerebral hematomas', *American Journal of Neuroradiology*, 17(3), pp. 573–578. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8881257/> (Accessed: 5 October 2021).
- Ohwaki, K. *et al.* (2004) 'Blood pressure management in acute intracerebral hemorrhage: Relationship between elevated blood pressure and hematoma enlargement', *Stroke*. *Stroke*, 35(6), pp. 1364–1367. doi: 10.1161/01.STR.0000128795.38283.4b.
- Ohyama, H. *et al.* (2001) 'Thrombin inhibition attenuates neurodegeneration and cerebral edema formation following transient forebrain ischemia', *Brain Research*. *Brain Res*, 902(2), pp. 264–271. doi: 10.1016/S0006-8993(01)02354-X.
- Okauchi, M. *et al.* (2010) 'Deferoxamine Treatment for Intracerebral Hemorrhage in Aged Rats', *Stroke*. *Stroke*, 41(2), pp. 375–382. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.569830.
- Okugawa, Y. *et al.* (2000) 'Increased plasma levels of tissue factor pathway inhibitor-activated factor X complex in patients with disseminated intravascular coagulation', *American Journal of Hematology*, 65(3), pp. 210–214. doi: 10.1002/1096-8652(200011)65:3<210::AID-AJH6>3.0.CO;2-P.
- Oleinik, A. *et al.* (2009) 'CT angiography for intracerebral hemorrhage does not increase risk of acute nephropathy', *Stroke*. *Stroke*, 40(7), pp. 2393–2397. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.546127.
- Olivot, J. M. *et al.* (2010) 'MRI profile of the perihematomal region in acute intracerebral hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 41(11), pp. 2681–2683. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.590638.
- Osterud, B. (2012) 'Tissue factor in blood cells and endothelial cells', *Frontiers in Bioscience*. *Front Biosci (Elite Ed)*, E4(1), p. 289. doi: 10.2741/376.
- Osterud, B. and Rapaport, S. I. (1977) 'Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), pp. 5260–5264. doi: 10.1073/pnas.74.12.5260.
- Ovbiagele, B. *et al.* (2013) 'Association of Chronic Kidney Disease With Cerebral Microbleeds in Patients With Primary Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 44(9), pp. 2409–2413. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.001958.
- Owens, A. P. and MacKman, N. (2011) 'Microparticles in hemostasis and thrombosis', *Circulation Research*. *Circ Res*, pp. 1284–1297. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233056.
- Owens Johnson, C. *et al.* (2019) 'Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016'. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30034-1.
- Palabrica, T., Lobb, R., Furie, B. C., Aronovitz, M., Benjamin, C., Hsu, Y.-M., *et al.* (1992) 'Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated *in vivo* by P-selectin on adherent platelets', *Nature*. *Nature*, 359(6398), pp. 848–851. doi: 10.1038/359848a0.
- Palabrica, T., Lobb, R., Furie, B. C., Aronovitz, M., Benjamin, C., Hsu, Y. M., *et al.* (1992) 'Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated *in vivo* by P-selectin on adherent platelets', *Nature*. *Nature*, 359(6398), pp. 848–851. doi: 10.1038/359848a0.
- Palmisano, G. *et al.* (2012) 'Characterization of Membrane-shed Microvesicles from Cytokine-stimulated β -Cells Using Proteomics Strategies', *Molecular & Cellular Proteomics*. *Mol Cell Proteomics*,

11(8), pp. 230–243. doi: 10.1074/mcp.M111.012732.

Palta, S., Saroa, R. and Palta, A. (2014) 'Overview of the coagulation system', *Indian Journal of Anaesthesia*. Indian J Anaesth, pp. 515–523. doi: 10.4103/0019-5049.144643.

Pan, B.-T. and Johnstone, R. M. (1983) 'Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: Selective externalization of the receptor', *Cell*. Cell, 33(3), pp. 967–978. doi: 10.1016/0092-8674(83)90040-5.

Pan, J. *et al.* (2015) 'Malibatol A regulates microglia M1/M2 polarization in experimental stroke in a PPAR γ -dependent manner', *Journal of Neuroinflammation*. J Neuroinflammation, 12(1), p. 51. doi: 10.1186/s12974-015-0270-3.

Participants*, T. H. S. A. I. (HEADS) R. *et al.* (2018) 'Unmet Needs and Challenges in Clinical Research of Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. Lippincott Williams & WilkinsHagerstown, MD, 49(5), pp. 1299–1307. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019541.

Pasi, M. *et al.* (2020) 'Long-term functional decline of spontaneous intracerebral haemorrhage survivors', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 92(3). doi: 10.1136/jnnp-2020-324741.

Patel, D. B. *et al.* (2017) 'Impact of cell culture parameters on production and vascularization bioactivity of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles', *Bioengineering & Translational Medicine*. Bioeng Transl Med, 2(2), pp. 170–179. doi: 10.1002/btm2.10065.

Pawlak, K., Pawlak, D. and Mysliwiec, M. (2008) 'Effects of long-term erythropoietin therapy on fibrinolytic system in haemodialyzed patients', *Thrombosis Research*. Thromb Res, 121(6), pp. 787–791. doi: 10.1016/j.thromres.2007.07.017.

Pawlinski, R. *et al.* (2004) 'Role of tissue factor and protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia', *Blood*. Blood, 103(4), pp. 1342–1347. doi: 10.1182/blood-2003-09-3051.

Payne, K. K., Bear, H. D. and Manjili, M. H. (2014) 'Adoptive cellular therapy of cancer: Exploring innate and adaptive cellular crosstalk to improve anti-tumor efficacy', *Future Oncology*. Future Oncol, pp. 1779–1794. doi: 10.2217/fon.14.97.

Pegtel, D. M. *et al.* (2010) 'Functional delivery of viral miRNAs *via* exosomes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 107(14), pp. 6328–6333. doi: 10.1073/pnas.0914843107.

Peinado, H. *et al.* (2012) 'Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET', *Nature Medicine*. Nat Med, 18(6), pp. 883–891. doi: 10.1038/nm.2753.

Van Pelt, D. R. *et al.* (1994) 'Hematologic emergencies', *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. Vet Clin North Am Small Anim Pract. doi: 10.1016/S0195-5616(94)50132-3.

Peng, Z. *et al.* (2019) 'Endothelial Response to Pathophysiological Stress', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, pp. e233–e243. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312580.

Periyah, M. H. *et al.* (2015) 'Chitosan scaffold enhances growth factor release in wound healing in von Willebrand disease', *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. e-Century Publishing Corporation, 8(9), pp. 15611–15620. Available at: /pmc/articles/PMC4658944/ (Accessed: 12 October 2021).

Petersen, L. C. *et al.* (2005) 'Characterization of recombinant murine factor VIIa and recombinant murine tissue factor: A human-murine species compatibility study', *Thrombosis Research*, 116(1), pp.

75–85. doi: 10.1016/j.thromres.2004.11.003.

Pezzini, A. *et al.* (2013) 'Obesity and the Risk of Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 44(6), pp. 1584–1589. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.000069.

Phan, T. G. *et al.* (2019) 'Meta-Analysis of Accuracy of the Spot Sign for Predicting Hematoma Growth and Clinical Outcomes', *Stroke*. *Stroke*, 50(8), pp. 2030–2036. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.024347.

Poitevin, S. *et al.* (2007) 'Monocyte IL-10 produced in response to lipopolysaccharide modulates thrombin generation by inhibiting tissue factor expression and release of active tissue factor-bound microparticles', *Thrombosis and Haemostasis*, 97(04), pp. 598–607. doi: 10.1160/TH06-11-0622.

Poon, M. T. C., Fonville, A. F. and Salman, R. A. S. (2014) 'Long-term prognosis after intracerebral haemorrhage: Systematic review and meta-analysis', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. BMJ Publishing Group, 85(6), pp. 660–667. doi: 10.1136/JNNP-2013-306476.

Posma, J. J. N., Posthuma, J. J. and Spronk, H. M. H. (2016) 'Coagulation and non-coagulation effects of thrombin', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. *J Thromb Haemost*, pp. 1908–1916. doi: 10.1111/jth.13441.

Potolicchio, I. *et al.* (2005) 'Proteomic Analysis of Microglia-Derived Exosomes: Metabolic Role of the Aminopeptidase CD13 in Neuropeptide Catabolism', *The Journal of Immunology*. *J Immunol*, 175(4), pp. 2237–2243. doi: 10.4049/jimmunol.175.4.2237.

Powers, W. J. *et al.* (2001) 'Autoregulation of cerebral blood flow surrounding acute (6 to 22 hours) intracerebral hemorrhage', *Neurology*. *Neurology*, 57(1), pp. 18–24. doi: 10.1212/WNL.57.1.18.

Prabhakaran, S. and Naidech, A. M. (2012) 'Ischemic brain injury after intracerebral hemorrhage: A critical review', *Stroke*. *Stroke*, pp. 2258–2263. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.655910.

Qiao, L. *et al.* (2020) 'Tumor cell-derived exosomes home to their cells of origin and can be used as Trojan horses to deliver cancer drugs', *Theranostics*. *Theranostics*, 10(8), pp. 3474–3487. doi: 10.7150/thno.39434.

Quesenberry, P. J. and Aliotta, J. M. (2010) 'Cellular phenotype switching and microvesicles', *Advanced Drug Delivery Reviews*. *Adv Drug Deliv Rev*, pp. 1141–1148. doi: 10.1016/j.addr.2010.06.001.

Quinsey, N. S. *et al.* (2004) 'Antithrombin: in control of coagulation', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(3), pp. 386–389. doi: 10.1016/S1357-2725(03)00244-9.

Qureshi, A. I. *et al.* (2001) 'Spontaneous intracerebral hemorrhage', *N. Engl. J. Med.*, 344(19), pp. 1450–1460. doi: 10.1056/NEJM200105103441907.

Qureshi, A. I. *et al.* (2005) 'A prospective multicenter study to evaluate the feasibility and safety of aggressive antihypertensive treatment in patients with acute intracerebral hemorrhage', *Journal of Intensive Care Medicine*. *J Intensive Care Med*, 20(1), pp. 34–42. doi: 10.1177/0885066604271619.

Qureshi, A. I. *et al.* (2010) 'Effect of systolic blood pressure reduction on hematoma expansion, perihematomal edema, and 3-month outcome among patients with intracerebral hemorrhage: Results from the antihypertensive treatment of acute cerebral hemorrhage study', *Archives of Neurology*. *Arch Neurol*, 67(5), pp. 570–576. doi: 10.1001/archneurol.2010.61.

Qureshi, A. I. *et al.* (2016) 'Intensive {Blood}-{Pressure} {Lowering} in {Patients} with {Acute} {Cerebral} {Hemorrhage}', *N. Engl. J. Med.*, 375(11), pp. 1033–1043. doi: 10.1056/NEJMoa1603460.

Qureshi, A. I., Mendelow, A. D. and Hanley, D. F. (2009) 'Intracerebral haemorrhage', *The Lancet*, 373(9675), pp. 1632–1644. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60371-8.

- R.Vandendries, E., Furie, Barbara and Furie, Bruce (2004) 'Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis', *Thrombosis and Haemostasis*. *Thromb Haemost*, 92(09), pp. 459–466. doi: 10.1160/TH04-05-0306.
- Raiborg, C. and Stenmark, H. (2009) 'The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins', *Nature*. *Nature*, pp. 445–452. doi: 10.1038/nature07961.
- Rak, J. and Guha, A. (2012) 'Extracellular vesicles - vehicles that spread cancer genes', *BioEssays*. *Bioessays*, 34(6), pp. 489–497. doi: 10.1002/bies.201100169.
- Ramacciotti, E. *et al.* (2010) 'P-selectin/ PSGL-1 Inhibitors versus enoxaparin in the resolution of venous thrombosis: A meta-analysis', *Thrombosis Research*. *Thromb Res*, 125(4), pp. e138–e142. doi: 10.1016/j.thromres.2009.10.022.
- Raposo, G. *et al.* (1996) 'B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles.', *Journal of Experimental Medicine*. *J Exp Med*, 183(3), pp. 1161–1172. doi: 10.1084/jem.183.3.1161.
- Raposo, G. and Stoorvogel, W. (2013) 'Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends', *Journal of Cell Biology*. *J Cell Biol*, 200(4), pp. 373–383. doi: 10.1083/jcb.201211138.
- Ratajczak, J. *et al.* (2006) 'Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication', *Leukemia*, 20(9), pp. 1487–1495. doi: 10.1038/sj.leu.2404296.
- Ratajczak, M. Z. *et al.* (2012) 'Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: Can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies', *Leukemia*. *Leukemia*, pp. 1166–1173. doi: 10.1038/leu.2011.389.
- Rauch, U. *et al.* (2000) 'Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor.', *Blood*, 96(1), pp. 170–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10891447>.
- Reymond, N. *et al.* (2012) 'Cdc42 promotes transendothelial migration of cancer cells through β 1 integrin', *Journal of Cell Biology*. *J Cell Biol*, 199(4), pp. 653–668. doi: 10.1083/jcb.201205169.
- Rezaie, A. R. (1998) 'Rapid activation of protein C by factor Xa and thrombin in the presence of polyanionic compounds', *Blood*, 91(12), pp. 4572–4580. doi: 10.1182/blood.v91.12.4572.
- Ribe, A. R. *et al.* (2020) 'Statins and Risk of Intracerebral Hemorrhage in Individuals With a History of Stroke', *Stroke*. *Stroke*, 51(4), pp. 1111–1119. doi: 10.1161/STROKEAHA.119.027301.
- Ritter, M. A. *et al.* (2005) 'Role of cerebral amyloid angiopathy in intracerebral hemorrhage in hypertensive patients', *Neurology*. *Neurology*, 64(7), pp. 1233–1237. doi: 10.1212/01.WNL.0000156522.93403.C3.
- Rivera-Nieves, J. *et al.* (2006) 'Critical role of endothelial P-selectin glycoprotein ligand 1 in chronic murine ileitis', *Journal of Experimental Medicine*. *J Exp Med*, 203(4), pp. 907–917. doi: 10.1084/jem.20052530.
- Rixe, J. *et al.* (2009) 'Radiation dose exposure of computed tomography coronary angiography: Comparison of dual-source, 16-slice and 64-slice CT', *Heart*. *Heart*, 95(16), pp. 1337–1342. doi: 10.1136/hrt.2008.161018.
- Robbins, P. D. and Morelli, A. E. (2014) 'Regulation of immune responses by extracellular vesicles', *Nature Reviews Immunology*. *Nat Rev Immunol*, 14(3), pp. 195–208. doi: 10.1038/nri3622.
- Rohde, E., Pachler, K. and Gimona, M. (2019) 'Manufacturing and characterization of extracellular vesicles from umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for clinical testing', *Cytotherapy*. *Cytotherapy*, pp. 581–592. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.12.006.
- Roier, S. *et al.* (2015) 'A basis for vaccine development: Comparative characterization of Haemophilus

- influenzae outer membrane vesicles', *International Journal of Medical Microbiology*. Int J Med Microbiol, 305(3), pp. 298–309. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.12.005.
- Romero, J. M. *et al.* (2013) 'Prospective validation of the computed tomographic angiography spot sign score for Intracerebral hemorrhage', *Stroke*. Stroke, 44(11), pp. 3097–3102. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002752.
- Rosand, J. *et al.* (2004) 'The Effect of Warfarin and Intensity of Anticoagulation on Outcome of Intracerebral Hemorrhage', *Archives of Internal Medicine*. Arch Intern Med, 164(8), pp. 880–884. doi: 10.1001/archinte.164.8.880.
- Rosen, E. D. *et al.* (1997) 'Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding', *Nature*. Nature, 390(6657), pp. 290–294. doi: 10.1038/36862.
- Rosenberg, G. A. *et al.* (1990) 'Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats.', *Stroke*. Stroke, 21(5), pp. 801–807. doi: 10.1161/01.STR.21.5.801.
- Rosenblum, W. I. (2003) 'Cerebral hemorrhage produced by ruptured dissecting aneurysm in military aneurysm', *Annals of Neurology*. Ann Neurol, 54(3), pp. 376–378. doi: 10.1002/ana.10664.
- Rossi, F. M. V. *et al.* (2005) 'Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1', *Nature Immunology*. Nat Immunol, 6(6), pp. 626–634. doi: 10.1038/ni1203.
- Roura, S. and Bayes-Genis, A. (2019) 'Toward Standardization of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles for Therapeutic Use: A Call for Action', *Proteomics*. Wiley-VCH Verlag, 19(1–2). doi: 10.1002/PMIC.201800397.
- Roy, M. T., Gallardo, M. and Estelrich, J. (1998) 'Influence of size on electrokinetic behavior of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine lipid vesicles', *Journal of Colloid and Interface Science*, 206(2), pp. 512–517. doi: 10.1006/jcis.1998.5715.
- Ryan, J. *et al.* (1992) 'Tumor necrosis factor-induced endothelial tissue factor is associated with subendothelial matrix vesicles but is not expressed on the apical surface', *Blood*, 80(4), pp. 966–974. doi: 10.1182/blood.v80.4.966.966.
- Saad, J. and Schoenberger, L. (2019) *Physiology, Platelet Activation, StatPearls*. StatPearls Publishing. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482478/> (Accessed: 11 October 2021).
- Sacco, S. *et al.* (2009) 'Incidence and 10-Year Survival of Intracerebral Hemorrhage in a Population-Based Registry', *Stroke*. Stroke, 40(2), pp. 394–399. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.523209.
- Sacco, S. *et al.* (2013) 'Migraine and Hemorrhagic Stroke', *Stroke*. Stroke, 44(11), pp. 3032–3038. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002465.
- Saha, P. *et al.* (2021) 'Bioengineering of Extracellular Vesicles: Exosome-Based Next-Generation Therapeutic Strategy in Cancer', *Bioengineering*. Bioengineering (Basel), 8(10), p. 139. doi: 10.3390/bioengineering8100139.
- Saito, J., Ishikawa, Y. and Yokoyama, U. (2020) 'Role of Tissue-Type Plasminogen Activator in Remodeling of the Ductus Arteriosus', *Circulation Reports*. Circ Rep, 2(4), pp. 211–217. doi: 10.1253/circrep.cr-20-0015.
- Sakamoto, Y. *et al.* (2013) 'Systolic blood pressure after intravenous antihypertensive treatment and clinical outcomes in hyperacute intracerebral hemorrhage: The stroke acute management with urgent risk-factor assessment and improvement-intracerebral hemorrhage study', *Stroke*. Stroke, 44(7), pp. 1846–1851. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.001212.
- Sanborn, M. R. *et al.* (2012) 'Temporal dynamics of microparticle elevation following subarachnoid hemorrhage: Laboratory investigation', *Journal of Neurosurgery*. J Neurosurg, 117(3), pp. 579–586. doi:

10.3171/2012.6.JNS111163.

Sapp, R. M. *et al.* (2019) 'The effects of moderate and high-intensity exercise on circulating markers of endothelial integrity and activation in young, healthy men', *Journal of Applied Physiology*. *J Appl Physiol* (1985), 127(5), pp. 1245–1256. doi: 10.1152/jappphysiol.00477.2019.

Schindlbeck, K. A. *et al.* (2016) 'Spot Sign in Acute Intracerebral Hemorrhage in Dynamic T1-Weighted Magnetic Resonance Imaging', *Stroke*. *Stroke*, 47(2), pp. 417–423. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011570.

Schippers, A. *et al.* (2021) 'MAdCAM-1/ α 4 β 7 Integrin-Mediated Lymphocyte/Endothelium Interactions Exacerbate Acute Immune-Mediated Hepatitis in Mice', *CMGH*. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 11(4), pp. 1227–1250.e1. doi: 10.1016/j.jcmgh.2020.12.003.

Scott, G. *et al.* (2018) 'Minocycline reduces chronic microglial activation after brain trauma but increases neurodegeneration', *Brain*. *Brain*, 141(2), pp. 459–471. doi: 10.1093/brain/awx339.

Seiffge, D. J., Meinel, T., *et al.* (2021) 'Recanalisation therapies for acute ischaemic stroke in patients on direct oral anticoagulants', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 92(5), pp. 534–541. doi: 10.1136/jnnp-2020-325456.

Seiffge, D. J., Wilson, D., *et al.* (2021) 'Small vessel disease burden and intracerebral haemorrhage in patients taking oral anticoagulants', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 92(8), pp. 805–814. doi: 10.1136/jnnp-2020-325299.

Semeraro, F. *et al.* (2009) 'Tissue factor-expressing monocytes inhibit fibrinolysis through a TAFI-mediated mechanism, and make clots resistant to heparins', *Haematologica*. *Haematologica*, 94(6), pp. 819–826. doi: 10.3324/haematol.2008.000042.

Serres, S. *et al.* (2011) 'VCAM-1-targeted magnetic resonance imaging reveals subclinical disease in a mouse model of multiple sclerosis', *The FASEB Journal*. *FASEB J*, 25(12), pp. 4415–4422. doi: 10.1096/fj.11-183772.

Serres, S. *et al.* (2012) 'Molecular MRI enables early and sensitive detection of brain metastases', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(17), pp. 6674–6679. doi: 10.1073/pnas.1117412109.

Shao, Z., Tu, S. and Shao, A. (2019) 'Pathophysiological Mechanisms and Potential Therapeutic Targets in Intracerebral Hemorrhage', *Frontiers in Pharmacology*. *Front Pharmacol*, 10. doi: 10.3389/fphar.2019.01079.

Sharma, T. *et al.* (2021) 'Thrombin generation abnormalities in commonly encountered platelet function disorders', *International Journal of Laboratory Hematology*. *Int J Lab Hematol*. doi: 10.1111/ijlh.13638.

Shattil, S. J. and Bennett, J. S. (1981) 'Platelets and their membranes in hemostasis. Physiology and pathophysiology', *Annals of Internal Medicine*. *Ann Intern Med*, pp. 108–118. doi: 10.7326/0003-4819-94-1-108.

Shehata, M. M. *et al.* (2019) 'Bacterial outer membrane vesicles (OMVs)-based dual vaccine for influenza a H1N1 virus and MERS-CoV', *Vaccines*. *Vaccines (Basel)*, 7(2). doi: 10.3390/vaccines7020046.

Shimizu, Y. *et al.* (2011) 'Chronic Kidney Disease and Drinking Status in Relation to Risks of Stroke and Its Subtypes', *Stroke*. *Stroke*, 42(9), pp. 2531–2537. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.600759.

Sidhu, A. *et al.* (2004) 'The role of alpha-synuclein in both neuroprotection and neurodegeneration', *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1035, pp. 250–270. doi: 10.1196/annals.1332.016.

Silvera, S. *et al.* (2005) 'Spontaneous intracerebral hematoma on diffusion-weighted images: Influence

- of T2-shine-through and T2-blackout effects', *American Journal of Neuroradiology*, pp. 236–241. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15709118/> (Accessed: 5 October 2021).
- Simhadri, V. R. *et al.* (2008) 'Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function', *PLoS ONE*. *PLoS One*, 3(10). doi: 10.1371/journal.pone.0003377.
- Skog, J. *et al.* (2008) 'Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers', *Nature Cell Biology*. *Nat Cell Biol*, 10(12), pp. 1470–1476. doi: 10.1038/ncb1800.
- Somiya, M., Yoshioka, Y. and Ochiya, T. (2018) 'Biocompatibility of highly purified bovine milk-derived extracellular vesicles', *Journal of Extracellular Vesicles*. *J Extracell Vesicles*, 7(1). doi: 10.1080/20013078.2018.1440132.
- Song, J. *et al.* (2021) 'Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury involves functional tryptase/PAR-2 signaling in liver sinusoidal endothelial cell population', *International Immunopharmacology*. *Int Immunopharmacol*, 100. doi: 10.1016/j.intimp.2021.108052.
- Sook Kim-Han, J. *et al.* (2006) 'Perihematomal Mitochondrial Dysfunction After Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 37(10), pp. 2457–2462. doi: 10.1161/01.STR.0000240674.99945.4e.
- Soult, M. C. *et al.* (2014) 'Outer membrane vesicles alter inflammation and coagulation mediators', *Journal of Surgical Research*. *J Surg Res*, 192(1), pp. 134–142. doi: 10.1016/j.jss.2014.05.007.
- Sovershaev, M. A. *et al.* (2012) 'Evidence for direct transfer of tissue factor from monocytes to platelets in whole blood', *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 23(4), pp. 345–350. doi: 10.1097/MBC.0b013e328350bf2f.
- Sprague, D. L. *et al.* (2008) 'Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: Unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles', *Blood*. *Blood*, 111(10), pp. 5028–5036. doi: 10.1182/blood-2007-06-097410.
- Sprigg, N. *et al.* (2018) 'Tranexamic acid for hyperacute primary IntraCerebral Haemorrhage (TICH-2): an international randomised, placebo-controlled, phase 3 superiority trial', *The Lancet*. *Lancet*, 391(10135), pp. 2107–2115. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31033-X.
- Sprügel, M. I. *et al.* (2018) 'Antiplatelet therapy in primary spontaneous and oral Anticoagulation - Associated intracerebral hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 49(11), pp. 2621–2629. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.021614.
- Stam, J. *et al.* (2021) 'Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods', *Journal of Chromatography B*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1169, p. 122604. doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122604.
- Staykov, D. *et al.* (2011) 'Natural course of perihemorrhagic edema after intracerebral hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, pp. 2625–2629. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.618611.
- Stein, M. *et al.* (2012) 'Intracerebral Hemorrhage in the Very Old', *Stroke*. *Stroke*, 43(4), pp. 1126–1128. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.644716.
- Steiner, T. *et al.* (2014) 'European Stroke Organisation (ESO) Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage', *International Journal of Stroke*. *Int J Stroke*, 9(7), pp. 840–855. doi: 10.1111/ijs.12309.
- Stern, D. *et al.* (1985) 'An endothelial cell-dependent pathway of coagulation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(8), pp. 2523–2527. doi: 10.1073/pnas.82.8.2523.
- Stewart, R. J., Kashour, T. S. and Marsden, P. A. (1996) 'Vascular endothelial platelet endothelial

adhesion molecule-1 (PECAM-1) expression is decreased by TNF-alpha and IFN-gamma. Evidence for cytokine-induced destabilization of messenger ribonucleic acid transcripts in bovine endothelial cells.', *The Journal of Immunology*, 156(3).

Stojanovic, A. *et al.* (2021) 'Increased Expression of Extracellular Vesicles Is Associated With the Procoagulant State in Patients With Established Rheumatoid Arthritis', *Frontiers in Immunology*. *Front Immunol*, 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.718845.

Sturgeon, J. D. *et al.* (2007) 'Risk Factors for Intracerebral Hemorrhage in a Pooled Prospective Study', *Stroke*. *Stroke*, 38(10), pp. 2718–2725. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.487090.

Subramaniam, S. *et al.* (2006) 'Unexpected posthemorrhagic hydrocephalus in patients treated with rFVIIa', *Neurology*. *Neurology*, 67(6), p. 1096. doi: 10.1212/01.wnl.0000237321.60852.e7.

Sugg, R. M. *et al.* (2006) 'Myocardial injury in patients with intracerebral hemorrhage treated with recombinant factor VIIa', *Neurology*. *Neurology*, 67(6), pp. 1053–1055. doi: 10.1212/01.wnl.0000239154.51331.c4.

SUN, J. *et al.* (2021) 'Anti-inflammatory and Anti-thrombotic Efficacy of Targeted Ultrasound Microbubbles on LPS-induced HUVEC Cells', *Anticancer Research*. *Anticancer Res*, 41(10), pp. 4761–4769. doi: 10.21873/anticancer.15291.

Van Swieten, J. C. *et al.* (1988) 'Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients', *Stroke*. *Stroke*, 19(5), pp. 604–607. doi: 10.1161/01.STR.19.5.604.

Szatanek, R. *et al.* (2017) 'The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization', *International Journal of Molecular Sciences*. *Int J Mol Sci*, 18(6), p. 1153. doi: 10.3390/ijms18061153.

Takahashi, H. *et al.* (2016) 'Intracerebral Hematoma Occurring during Warfarin Versus Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulant Therapy', *American Journal of Cardiology*. *Am J Cardiol*, 118(2), pp. 222–225. doi: 10.1016/j.amjcard.2016.04.034.

Tan, J. L. *et al.* (2018) 'Amnion Epithelial Cell-Derived Exosomes Restrict Lung Injury and Enhance Endogenous Lung Repair', *Stem Cells Translational Medicine*. *Stem Cells Transl Med*, 7(2), pp. 180–196. doi: 10.1002/sctm.17-0185.

Tan, X. *et al.* (2014) 'Mesenchymal Stem Cell-Derived Microparticles: A Promising Therapeutic Strategy', *International Journal of Molecular Sciences*. *Int J Mol Sci*, 15(8), pp. 14348–14363. doi: 10.3390/ijms150814348.

Tauro, B. J. *et al.* (2013) 'Two Distinct Populations of Exosomes Are Released from LIM1863 Colon Carcinoma Cell-derived Organoids', *Molecular & Cellular Proteomics*. *Mol Cell Proteomics*, 12(3), pp. 587–598. doi: 10.1074/mcp.M112.021303.

Taylor, F. B. (1994) 'Studies on the inflammatory-coagulant axis in the baboon response to E. coli: regulatory roles of proteins C, S, C4bBP and of inhibitors of tissue factor.', *Progress in clinical and biological research*, pp. 175–194. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7831358/> (Accessed: 22 October 2021).

Tejima, E. *et al.* (2007) 'Astrocytic Induction of Matrix Metalloproteinase-9 and Edema in Brain Hemorrhage', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27(3), pp. 460–468. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600354.

Tesselaar, M. E. T. *et al.* (2007) 'Microparticle-associated tissue factor activity: A link between cancer and thrombosis?', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. *J Thromb Haemost*, 5(3), pp. 520–527. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02369.x.

Théry, C., Witwer, Kenneth W, *et al.* (2018) 'Minimal information for studies of extracellular vesicles

- 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines', *Journal of Extracellular Vesicles*. *J Extracell Vesicles*, 7(1), p. 1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- Théry, C., Witwer, Kenneth W., *et al.* (2018) 'Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines', *Journal of Extracellular Vesicles*. *J Extracell Vesicles*, 7(1). doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- Théry, C., Ostrowski, M. and Segura, E. (2009) 'Membrane vesicles as conveyors of immune responses', *Nature Reviews Immunology*. *Nat Rev Immunol*, pp. 581–593. doi: 10.1038/nri2567.
- Thippabhotla, S., Zhong, C. and He, M. (2019) '3D cell culture stimulates the secretion of *in vivo* like extracellular vesicles', *Scientific Reports*. *Sci Rep*, 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-49671-3.
- Thompson, B. B. *et al.* (2010) 'Prior antiplatelet therapy and outcome following intracerebral hemorrhage: A systematic review', *Neurology*. *Neurology*, 75(15), pp. 1333–1342. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181f735e5.
- Thrift, A. G. *et al.* (1996) 'Risk Factors for Cerebral Hemorrhage in the Era of Well-Controlled Hypertension', *Stroke*. *Stroke*, 27(11), pp. 2020–2025. doi: 10.1161/01.STR.27.11.2020.
- Thulborn, K. R. (2012) 'My starting point: The discovery of an NMR method for measuring blood oxygenation using the transverse relaxation time of blood water', *NeuroImage*. *Neuroimage*, pp. 589–593. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.09.070.
- Tian, J. *et al.* (2021) 'Contrast-enhanced ultrasound molecular imaging of activated platelets in the progression of atherosclerosis using microbubbles bearing the von Willebrand factor A1 domain', *Experimental and Therapeutic Medicine*. *Exp Ther Med*, 22(1). doi: 10.3892/etm.2021.10153.
- Timmers, L. *et al.* (2008) 'Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium', *Stem Cell Research*. *Stem Cell Res*, 1(2), pp. 129–137. doi: 10.1016/j.scr.2008.02.002.
- Toombs, C. F. *et al.* (1995) 'Pretreatment with a blocking monoclonal antibody to P-selectin accelerates pharmacological thrombolysis in a primate model of arterial thrombosis.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. *J Pharmacol Exp Ther*, 275(2), pp. 941–9. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7473186/> (Accessed: 23 August 2021).
- Toomey, J. R. *et al.* (1996) 'Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality', *Blood*. *Blood*, 88(5), pp. 1583–1587. doi: 10.1182/blood.v88.5.1583.1583.
- Toyoda, K. *et al.* (2005) 'Antiplatelet therapy contributes to acute deterioration of intracerebral hemorrhage', *Neurology*. *Neurology*, 65(7), pp. 1000–1004. doi: 10.1212/01.wnl.0000179178.37713.69.
- Toyoda, K. *et al.* (2010) 'Blood Pressure Levels and Bleeding Events During Antithrombotic Therapy', *Stroke*. *Stroke*, 41(7), pp. 1440–1444. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.580506.
- Tricarico, C., Clancy, J. and D'Souza-Schorey, C. (2017) 'Biology and biogenesis of shed microvesicles', *Small GTPases*, 8(4), pp. 220–232. doi: 10.1080/21541248.2016.1215283.
- Trinh-Trang-Tan, M. M. *et al.* (2010) 'Intercellular adhesion molecule-4 and CD36 are implicated in the abnormal adhesiveness of sickle cell SAD mouse erythrocytes to endothelium', *Haematologica*. *Haematologica*, 95(5), pp. 730–737. doi: 10.3324/haematol.2009.017392.
- Tripisciano, C. *et al.* (2017) 'Different Potential of Extracellular Vesicles to Support Thrombin Generation: Contributions of Phosphatidylserine, Tissue Factor, and Cellular Origin', *Scientific Reports*. *Sci Rep*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-03262-2.

- Triplett, D. A. (2000) 'Coagulation and bleeding disorders: Review and update', in *Clinical Chemistry*, pp. 1260–1269. doi: 10.1093/clinchem/46.8.1260.
- Tropea, B. I. *et al.* (1996) 'Hypertension-enhanced monocyte adhesion in experimental atherosclerosis', *Journal of Vascular Surgery. J Vasc Surg*, 23(4), pp. 596–605. doi: 10.1016/S0741-5214(96)80038-3.
- Tseng, C.-H. *et al.* (2015) 'Increased Risk of Intracerebral Hemorrhage Among Patients With Hepatitis C Virus Infection', *Medicine*. *Medicine (Baltimore)*, 94(46), p. e2132. doi: 10.1097/MD.0000000000002132.
- Uppar, A. *et al.* (2021) 'Surgical outcomes of Supra- Infra Tentorial Extradural Hematoma (SIEDH): A retrospective study from a single institution', *Clinical Neurology and Neurosurgery*. Elsevier, 200, p. 106369. doi: 10.1016/J.CLINEURO.2020.106369.
- Urbanelli, L. *et al.* (2016) 'Extracellular Vesicles as New Players in Cellular Senescence', *International Journal of Molecular Sciences*. *Int J Mol Sci*, 17(9), p. 1408. doi: 10.3390/ijms17091408.
- Valadi, H. *et al.* (2007) 'Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells', *Nature Cell Biology*. *Nat Cell Biol*, 9(6), pp. 654–659. doi: 10.1038/ncb1596.
- Vanderboor, C. M. *et al.* (2019) 'Proteinase-Activated Receptor 4 (PAR4) Activation Triggers Cell Membrane Blebbing through RhoA and β -arrestin', *bioRxiv*. doi: 10.1101/746677.
- Varnum, M. M. and Ikezu, T. (2012) 'The Classification of Microglial Activation Phenotypes on Neurodegeneration and Regeneration in Alzheimer's Disease Brain', *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 60(4), pp. 251–266. doi: 10.1007/s00005-012-0181-2.
- Veenstra, A. A., Tang, J. and Kern, T. S. (2013) 'Antagonism of CD11b with Neutrophil Inhibitory Factor (NIF) Inhibits Vascular Lesions in Diabetic Retinopathy', *PLoS ONE*. *PLoS One*, 8(10). doi: 10.1371/journal.pone.0078405.
- Vella, L. J. *et al.* (2007) 'Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing', *Journal of Pathology*. *J Pathol*, 211(5), pp. 582–590. doi: 10.1002/path.2145.
- Venkatasubramanian, C. *et al.* (2011) 'Natural history of perihematomal edema after intracerebral hemorrhage measured by serial magnetic resonance imaging', *Stroke*. *Stroke*, 42(1), pp. 73–80. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.590646.
- Villa, A. *et al.* (2021) 'Transplantation of autologous extracellular vesicles for cancer-specific targeting', *Theranostics*. *Theranostics*, 11(5), pp. 2034–2047. doi: 10.7150/thno.51344.
- Vion, A.-C. *et al.* (2013) 'Shear stress Regulates Endothelial Microparticle Release', *Circulation Research*. *Circ Res*, 112(10), pp. 1323–1333. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300818.
- Vion, A. C. *et al.* (2013) 'Shear stress regulates endothelial microparticle release', *Circulation Research*. *Circ Res*, 112(10), pp. 1323–1333. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300818.
- Vlassov, A. V. *et al.* (2012) 'Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. *Biochim Biophys Acta*, pp. 940–948. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.03.017.
- Vulto, A. G. and Jaquez, O. A. (2017) 'The process defines the product: what really matters in biosimilar design and production?', *Rheumatology (Oxford, England)*. *Rheumatology (Oxford)*, pp. iv14–iv29. doi: 10.1093/rheumatology/kex278.
- Wada, R. *et al.* (2007) 'CT angiography "spot sign" predicts hematoma expansion in acute intracerebral hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 38(4), pp. 1257–1262. doi: 10.1161/01.STR.0000259633.59404.f3.

- Wagner, K. R. *et al.* (2003) 'Heme and Iron Metabolism: Role in Cerebral Hemorrhage', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23(6), pp. 629–652. doi: 10.1097/01.WCB.0000073905.87928.6D.
- Walcheck, B. *et al.* (1996) 'Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic *shear stress* involve L-selectin and PSGL-1: A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation on P-selectin *in vitro*', *Journal of Clinical Investigation*. *J Clin Invest*, 98(5), pp. 1081–1087. doi: 10.1172/JCI118888.
- Wan, S. *et al.* (2016) 'Microglia Activation and Polarization After Intracerebral Hemorrhage in Mice: the Role of Protease-Activated Receptor-1', *Translational Stroke Research*. *Transl Stroke Res*, 7(6), pp. 478–487. doi: 10.1007/s12975-016-0472-8.
- Wang, B. *et al.* (2010) '*In vitro* study of thrombin on tubule formation and regulators of angiogenesis', *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. *Clin Appl Thromb Hemost*, 16(6), pp. 674–678. doi: 10.1177/1076029609354332.
- Wang, G. *et al.* (2018) 'PPAR- γ Promotes Hematoma Clearance through Haptoglobin-Hemoglobin-CD163 in a Rat Model of Intracerebral Hemorrhage', *Behavioural Neurology*. *Behav Neurol*, 2018, pp. 1–7. doi: 10.1155/2018/7646104.
- Wang, J., Pendurthi, U. R. and Rao, L. V. M. (2017) 'Sphingomyelin encrypts tissue factor: ATP-induced activation of A-SMase leads to tissue factor decryption and microvesicle shedding', *Blood Advances*. *Blood Adv*, 1(13), pp. 849–862. doi: 10.1182/bloodadvances.2016003947.
- Wang, S. *et al.* (2016) 'Protective and detrimental effects of neuroectodermal cell-derived tissue factor in mouse models of stroke', *JCI Insight*. *JCI Insight*, 1(11). doi: 10.1172/jci.insight.86663.
- Weissleder, R. and Nahrendorf, M. (2015) 'Advancing biomedical imaging', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(47), pp. 14424–14428. doi: 10.1073/pnas.1508524112.
- Welsh, J. A. *et al.* (2020) 'Towards defining reference materials for measuring extracellular vesicle refractive index, epitope abundance, size and concentration', *Journal of Extracellular Vesicles*. *J Extracell Vesicles*. doi: 10.1080/20013078.2020.1816641.
- Wieckowski, E. U. *et al.* (2009) 'Tumor-Derived Microvesicles Promote Regulatory T Cell Expansion and Induce Apoptosis in Tumor-Reactive Activated CD8 + T Lymphocytes', *The Journal of Immunology*. *J Immunol*, 183(6), pp. 3720–3730. doi: 10.4049/jimmunol.0900970.
- Wijdicks, E. F. M. (2021) 'Charcot–Bouchard Dilatations (Aneurysms Miliare) and the Search for the Cause of Cerebral Hemorrhage', *Neurocritical Care*. *Neurocrit Care*, 34(3), pp. 1090–1093. doi: 10.1007/s12028-020-00924-4.
- Wiklander, O. P. B. *et al.* (2015) 'Extracellular vesicle *in vivo* biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting', *Journal of Extracellular Vesicles*. *J Extracell Vesicles*, 4(1), p. 26316. doi: 10.3402/jev.v4.26316.
- Wiklander, O. P. B. *et al.* (2019) 'Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles', *Sci Transl Med*, 11(492). doi: 10.1126/scitranslmed.aav8521.
- Wilkhu, J. S. *et al.* (2014) 'Consideration of the efficacy of non-ionic vesicles in the targeted delivery of oral vaccines', *Drug Delivery and Translational Research*. *Drug Deliv Transl Res*, 4(3), pp. 233–245. doi: 10.1007/s13346-013-0174-7.
- Wilson, D. *et al.* (2016) 'Volume and functional outcome of intracerebral hemorrhage according to oral anticoagulant type', *Neurology*. *Neurology*, 86(4), pp. 360–366. doi: 10.1212/WNL.0000000000002310.
- Wilson, D. *et al.* (2017) 'Outcome of intracerebral hemorrhage associated with different oral

- anticoagulants', *Neurology*. *Neurology*, 88(18), pp. 1693–1700. doi: 10.1212/WNL.0000000000003886.
- Witkowski, Marco *et al.* (2020) 'Vascular miR-181b controls tissue factor-dependent thrombogenicity and inflammation in type 2 diabetes', *Cardiovascular Diabetology*, 19(1). doi: 10.1186/s12933-020-0993-z.
- Wittstock, M. *et al.* (2021) 'Effects of insular involvement on functional outcome after intracerebral hemorrhage', *Acta Neurologica Scandinavica*. *Acta Neurol Scand*, 144(5). doi: 10.1111/ane.13496.
- Wolf, P. (1967) 'The nature and significance of platelet products in human plasma.', *British journal of haematology*. *Br J Haematol*, 13(3), pp. 269–88. doi: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x.
- Wong, G. K. C. *et al.* (2011) 'Computed tomographic angiography and venography for young or nonhypertensive patients with acute spontaneous intracerebral hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 42(1), pp. 211–213. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.592337.
- Woo, D. *et al.* (2002) 'Genetic and Environmental Risk Factors for Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 33(5), pp. 1190–1196. doi: 10.1161/01.STR.0000014774.88027.22.
- Woo, D. *et al.* (2004) 'Effect of Untreated Hypertension on Hemorrhagic Stroke', *Stroke*. *Stroke*, 35(7), pp. 1703–1708. doi: 10.1161/01.STR.0000130855.70683.c8.
- Woo, D. *et al.* (2013) 'Apolipoprotein E, Statins, and Risk of Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 44(11), pp. 3013–3017. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.001304.
- Wu, F., Liu, L. and Zhou, H. (2017) 'Endothelial cell activation in central nervous system inflammation', *Journal of Leukocyte Biology*. *J Leukoc Biol*, 101(5), pp. 1119–1132. doi: 10.1189/jlb.3ru0816-352rr.
- Wu, M. Y. *et al.* (2019) 'Syncope as initial presentation in an undifferentiated type acute myeloid leukemia patient with acute intracranial hemorrhage', *Brain Sciences*, 9(8). doi: 10.3390/brainsci9080207.
- Xi, G., Reiser, G. and Keep, R. F. (2002) 'The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective?', *Journal of Neurochemistry*. *J Neurochem*, 84(1), pp. 3–9. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01268.x.
- Xian, Y. *et al.* (2021) 'Clinical Characteristics and Outcomes Associated With Oral Anticoagulant Use Among Patients Hospitalized With Intracerebral Hemorrhage', *JAMA network open*. *JAMA Netw Open*, 4(2), p. e2037438. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.37438.
- Xiong, X.-Y., Liu, L. and Yang, Q.-W. (2016) 'Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke', *Progress in Neurobiology*. *Prog Neurobiol*, 142, pp. 23–44. doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.05.001.
- Xu, B. N. *et al.* (1993) 'Pathophysiology of brain swelling after acute experimental brain compression and decompression', *Neurosurgery*. *Neurosurgery*, 32(2), pp. 289–296. doi: 10.1227/00006123-199302000-00019.
- Xu, R. *et al.* (2016) 'Extracellular vesicle isolation and characterization: Toward clinical application', *Journal of Clinical Investigation*. *J Clin Invest*, pp. 1152–1162. doi: 10.1172/JCI81129.
- Yáñez-Mó, M. *et al.* (2015) 'Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions', *Journal of Extracellular Vesicles*. *J Extracell Vesicles*, 4(1), p. 27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066.
- Yang, G.-Y. *et al.* (1994) 'Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats', *Journal of Neurosurgery*. *J Neurosurg*, 81(1), pp. 93–102. doi: 10.3171/jns.1994.81.1.0093.
- Yang, M. *et al.* (2011) 'Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs

- into breast cancer cells', *Molecular Cancer*. Mol Cancer, 10. doi: 10.1186/1476-4598-10-117.
- You, R. X. *et al.* (1999) 'Ischemic stroke risk and passive exposure to spouses' cigarette smoking. {Melbourne} {Stroke} {Risk} {Factor} {Study} {{MERFS}} {Group}', *Am J Public Health*, 89(4), pp. 572–575. doi: 10.2105/ajph.89.4.572.
- Yu, S. *et al.* (2007) 'Tumor Exosomes Inhibit Differentiation of Bone Marrow Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*. J Immunol, 178(11), pp. 6867–6875. doi: 10.4049/jimmunol.178.11.6867.
- Yu, Y. *et al.* (2018) 'Extracellular vesicles from human saliva promote hemostasis by delivering coagulant tissue factor to activated platelets', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 16(6), pp. 1153–1163. doi: 10.1111/jth.14023.
- Zeev-Ben-Mordehai, T. *et al.* (2014) 'Extracellular Vesicles: A Platform for the Structure Determination of Membrane Proteins by Cryo-EM', *Structure*. Structure, 22(11), pp. 1687–1692. doi: 10.1016/j.str.2014.09.005.
- Zeng, W. *et al.* (2021) 'Elevated ZIPK is required for TNF- α -induced cell adhesion molecule expression and leucocyte adhesion in endothelial cells', *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 53(5), pp. 567–574. doi: 10.1093/abbs/gmab019.
- Zetter, B. R. (1997) 'On target with tumor blood vessel markers', *Nature Biotechnology*. Nat Biotechnol, 15(12), pp. 1243–1244. doi: 10.1038/nbt1197-1243.
- Zhang, B. *et al.* (2019) 'Targeting MAPK Pathways by Naringenin Modulates Microglia M1/M2 Polarization in Lipopolysaccharide-Stimulated Cultures', *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Front Cell Neurosci, 12. doi: 10.3389/fncel.2018.00531.
- Zhang, Y. *et al.* (2008) 'Blood pressure and clinical outcome among patients with acute stroke in Inner Mongolia, China', *Journal of Hypertension*. J Hypertens, 26(7), pp. 1446–1452. doi: 10.1097/HJH.0b013e328300a24a.
- Zhang, Zhen *et al.* (2017) 'Microglial Polarization and Inflammatory Mediators After Intracerebral Hemorrhage', *Molecular Neurobiology*. Mol Neurobiol, 54(3), pp. 1874–1886. doi: 10.1007/s12035-016-9785-6.
- Zhao, W. *et al.* (2020) 'Treatment of intracerebral hemorrhage: Current approaches and future directions', *Journal of the Neurological Sciences*. J Neurol Sci, 416, p. 117020. doi: 10.1016/j.jns.2020.117020.
- Zheng, H. *et al.* (2016) 'Mechanism and Therapy of Brain Edema after Intracerebral Hemorrhage', *Cerebrovascular Diseases*. Cerebrovasc Dis, 42(3–4), pp. 155–169. doi: 10.1159/000445170.
- Zhong, Y. *et al.* (2021) 'Application and outlook of topical hemostatic materials: a narrative review', *Annals of Translational Medicine*. Ann Transl Med, 9(7), pp. 577–577. doi: 10.21037/atm-20-7160.
- Zhou, J. *et al.* (2020) 'Compound heterozygous mutations identified in severe type I protein S deficiency impaired the secretion of protein S', *Journal of Clinical Pathology*. J Clin Pathol, 73(1), pp. 7–13. doi: 10.1136/jclinpath-2019-205956.
- Zhu, H. *et al.* (2019) 'Role and mechanisms of cytokines in the secondary brain injury after intracerebral hemorrhage', *Progress in Neurobiology*. Prog Neurobiol, 178, p. 101610. doi: 10.1016/j.pneurobio.2019.03.003.
- Zhu, X. *et al.* (2017) 'Comprehensive toxicity and immunogenicity studies reveal minimal effects in mice following sustained dosing of extracellular vesicles derived from HEK293T cells', *Journal of Extracellular Vesicles*. J Extracell Vesicles, 6(1). doi: 10.1080/20013078.2017.1324730.
- Zia, E. *et al.* (2007) 'Blood Pressure in Relation to the Incidence of Cerebral Infarction and Intracerebral

Hemorrhage', *Stroke*. *Stroke*, 38(10), pp. 2681–2685. doi: 10.1161/STROKEAHA.106.479725.

Ziff, O. J. *et al.* (2019) 'Statins and the risk of intracerebral haemorrhage in patients with stroke: systematic review and meta-analysis', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 90(1), pp. 75–83. doi: 10.1136/jnnp-2018-318483.

Zur, M. and Nemerson, Y. (1980) 'Kinetics of factor IX activation *via* the extrinsic pathway. Dependence of Km on tissue factor.', *The Journal of biological chemistry*. *J Biol Chem*, 255(12), pp. 5703–7. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7380833/> (Accessed: 23 August 2021).

Zwicker, J. I. *et al.* (2011) 'Tissue Factor–Bearing Microparticles and Thrombus Formation', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(4), pp. 728–733. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.200964.

RÉSUMÉ

L'hémorragie intracérébrale (HIC) est le sous-type d'AVC le plus grave. Stopper le saignement à l'aide d'agents pro-hémostatiques est une stratégie thérapeutique prometteuse qui demeure limitée par des effets secondaires graves tels qu'une thrombose incontrôlée. Dans la présente étude, nous avons développé une stratégie thérapeutique originale pour l'HIC basée sur l'administration de vésicules extracellulaires (VE) qui peuvent déclencher la cascade de coagulation spécifiquement au site du saignement actif. Nous avons d'abord généré de grandes quantités de VE à partir de monocytes THP-1 stimulés au TNF dans des bioréacteurs. Ces VE dérivées de monocytes présentaient une taille moyenne d'environ 300 nm, une activité du facteur tissulaire (FT) pro-hémostatique élevée réduisant le temps de coagulation de manière dose- et FT-dépendante et une expression élevée de la protéine de ciblage à leur surface (P-Selectin Glycoprotein Ligand 1, PSGL-1). Dans des modèles pré-cliniques d'HIC chez la souris, l'injection intraveineuse de VE dérivées de monocytes a amélioré les résultats de l'AVC de manière dose-dépendante. Les VE à 1mg/kg ont empêché la croissance des hématomes de 43% et amélioré le devenir neurologique à 24h par rapport aux souris témoins ($p < 0.01$, $n = 15$ /groupe). Ces effets étaient également présents dans des modèles plus sévères d'HIC (souris traitées à l'énoxaparine ou à la warfarine). Il est important de noter que l'effet bénéfique a été bloqué lors de l'utilisation d'anticorps bloquant le FT ou le PSGL-1, suggérant ainsi que l'activité pro-hémostatique et la capacité de cibler les dommages au niveau des vaisseaux cérébraux sont obligatoires pour l'efficacité thérapeutique des VE. Pour conclure, les VE exogènes dérivées de monocytes portant du FT et du PSGL-1 améliorent les résultats après une HIC induite par la collagénase en agissant comme des pansements hémostatiques intravasculaires.

Mots clés : HIC, VE, FT, PSGL-1, pansement, agents pro-hémostatiques

ABSTRACT

Intracerebral hemorrhage (ICH) is the most severe stroke subtype. Stopping the ongoing bleeding using pro-hemostatic agents is a promising therapeutic strategy that remains limited by serious side effects such as uncontrolled thrombosis. In the present study, we developed an original therapeutic strategy for ICH based on the administration of nanosized extracellular vesicles (EVs) that can trigger the coagulation cascade specifically at the site of active bleeding. We first generated large amounts of EVs from TNF-stimulated THP-1 monocytes in bioreactors. Those monocyte-EVs presented a mean size of around 300 nm, a high pro-hemostatic activity reducing the clotting time in a dose- and TF-dependent manner and a high expression of a targeting protein on their surface (P-Selectin Glycoprotein Ligand 1, PSGL-1). In preclinical models of ICH in mice, intravenous injection of mEVs improved stroke outcome in a dose-dependent manner. mEVs at 1 mg/kg prevented hematoma growth by 43% and improved neurological score at 24h compared to control mice ($p < 0.01$, $n = 15$ /group). These effects were also present in more severe models of ICH (enoxaparin or warfarin treated mice). Importantly, the beneficial effect was blocked when using antibodies blocking either TF or PSGL-1, suggesting that both the pro-coagulant activity and the ability to target damaged brain vessels are mandatory for the therapeutic efficacy of EVs. To conclude, exogenous mEVs bearing TF and PSGL-1 improve outcome after collagenase-induced ICH by acting as intravascular hemostatic patches.

Key words : ICH, EVs, TF, PSGL-1, patch, pro-hemostatic agents