



HAL
open science

Étude de la toxicité endothéliale de l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA) : implication des microvésicules endothéliales, de HMGB1 et de la PARP

Kahina Khacef

► To cite this version:

Kahina Khacef. Étude de la toxicité endothéliale de l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA) : implication des microvésicules endothéliales, de HMGB1 et de la PARP. Pharmacologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCB147 . tel-04462366

HAL Id: tel-04462366

<https://theses.hal.science/tel-04462366>

Submitted on 16 Feb 2024

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.

N° d'ordre

Année 2017

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

Ecole Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie et Imageries (mtci)

Laboratoire de Pharmacologie de la Circulation Cérébrale, EA4475

ETUDE DE LA TOXICITÉ ENDOTHÉLIALE DE L'ACTIVATEUR TISSULAIRE DU PLASMINOGENÈ RECOMBINANT (rt-PA) : IMPLICATION DES MICROVÉSICULES ENDOTHÉLIALES, DE HMGB1 ET DE LA PARP

Présentée par

Kahina KHACEF

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Spécialité : **Pharmacologie**

Dirigée par le Professeur Isabelle MARGAILL

Présentée et soutenue publiquement le 15 novembre 2017

Devant le jury composé de :

Pr Carine ALI

Pr Christine MARIE

Pr Vincent BEREZOWSKI

Pr Eduardo ANGLÈS-CANO

Dr Virginie BERAY-BERTHAT

Pr Isabelle MARGAILL

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Co-encadrant

Directrice de thèse

À ma mère et à mon père,

À mes sœurs,

À mon frère...

Remerciements

Cette thèse a été le fruit d'un travail d'équipe sans qui rien n'aurait pu aboutir. Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail et à ceux qui m'ont accompagné et m'ont soutenu pendant ces 3 années de doctorat. Résumer mes remerciements dans ces quelques lignes a été la tâche la plus difficile à réaliser.

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

À Mesdames les Professeurs Carine Ali et Christine Marie qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse et qui ont pris le temps d'examiner mon travail avec attention.

À Monsieur le Professeur Vincent Berezowski et Monsieur le Docteur Eduardo Anglès-Cano qui ont accepté de siéger dans ce jury en tant qu'examineur.

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

Pour m'avoir fait découvrir la recherche préclinique il y a 4 ans

Pour leur co-encadrement tout au long de ma thèse,

Pour leur grande disponibilité et leurs précieux conseils,

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

Pour les nombreuses relectures et corrections de l'ensemble de mes travaux.

Pour leur soutien et leurs encouragements,

Je leur exprime ma profonde reconnaissance.

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

Pour m'avoir acceptée dans son laboratoire et donné l'opportunité d'effectuer un travail de recherche dans un domaine passionnant.

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

Pour m'avoir accueillie au sein de son équipe durant les deux premières années de ma thèse et avoir permis la réalisation d'une belle collaboration dont les résultats sont des plus prometteurs.

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

Au Docteur Bruno Palmier, dit Abou Nakhla, je te remercie pour tes conseils, ton encadrement, ta disponibilité, ton aide, ton optimisme et ta gentillesse. J'ai tant appris à tes

cotés. Je ne trouve pas de mot assez fort pour exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Il n'y 'en a pas deux comme toi. Merci pour tout.

Au Docteur Min Yin, je te remercie pour ta disponibilité et ton aide. Merci de m'avoir initié à la cytométrie en flux. J'ai apprécié travailler avec toi.

Au Docteur Marie Garraud, j'ai eu le plaisir de te connaître durant ta dernière année de thèse qui n'est pas des plus facile je le comprends aujourd'hui. Merci pour ta gentillesse et tes conseils.

Au docteur Claire Leconte, je te remercie de m'avoir initié à la culture cellulaire. Merci pour tes nombreux conseils et encouragements.

Au technicien Bérard Coqueran Je te remercie d'avoir réalisé les modèles d'ischémie durant mes travaux de thèse.

À Gorgia Carlini, Tess Nicotra, Marzia Coccuzo et Marie Caillaud vous avez contribué à ce travail et je vous en remercie. J'espère que cela vous a ouvert l'appétit sur le monde de la recherche, et peut être serez-vous bientôt à ma place si ce n'est déjà fait !

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

À tous les membres de l'EA4475,

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

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

À Madame Nicole Croci, je te remercie pour ta gentillesse et ta bienveillance. Merci de te soucier de mon bien être et surtout de mon alimentation. Merci de penser à moi chaque midi et surtout merci pour ton aide durant la dernière étape stressante de la rédaction de la thèse.

A Madame Audrey Lestrugie, je te remercie pour ton aide et ta gentillesse. Merci de m'avoir sauvé de mes états d'hypoglycémie.

À toute l'équipe de Pharmacie Galénique, merci pour votre accueil. Vous m'avez accompagné lors de mes premiers pas dans le monde de l'enseignement et je vous en remercie.

Aux étudiants actuels du laboratoire

À la team KABYLE : le général Toufik je te remercie pour tes nombreux conseils, ta disponibilité et ta gentillesse, bon courage à toi. « La petite Célia », je souhaite que la séparation entre tes microglies et tes astrocytes se passe au mieux. Bon courage à toi pour cette dernière année.

Au trio de chouf/choc Clément-Rémi-Goeffroy, vous n'allez plus devoir me chercher des surnoms...je vous remercie pour votre bonne humeur et votre presque gentillesse...Bon courage à vous.

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

Mes italiennes Marti, Valéria, Isabella, chiara et la brésilienne Renata, merci d'avoir supporté mes humeurs, merci pour vos encouragements et pour tous ces moments partagés ensemble surtout les moments culinaires miam miam. Jung je te remercie pour ta gentillesse. Somy merci pour ta bonne humeur, je continue à utiliser toujours beaucoup plus d'eau pour mes manip... l'écologie ce n'est définitivement pas pour moi. Chahid, je te remercie pour les nombreux fous rires, je te souhaite beaucoup de réussite cette année. Camille, merci de ne pas m'avoir facturé tes heures de psychanalyse.

À Angelo et Roland, je vous remercie pour tous vos conseils et vos encouragements.

Je tiens également à remercier mes amis : **Rayou**, merci pour ton immense soutien, ta patience à m'écouter me plaindre et tes conseils. À ma **Lyly**, merci pour tes encouragements et ton amitié fidèle depuis 10 ans.

Je remercie sincèrement **ma famille : Mes sœurs (Meliza et Sonia)**, merci d'avoir été toujours là pour moi, de m'avoir supporté tout le long de mes études merci et de m'avoir donnée les plus adorables nièces au monde (Emmachou et Wardia). À mon **petit frère** (Tonton du bled) merci pour ton soutien et pour ta patience... À Mon beau-frère **Nadir**, merci pour ton soutien sans faille en toute circonstance. A mon beau-frère **Salim**, merci pour ta gentillesse et tes encouragements.

Enfin, je remercie ceux sans qui je ne serai pas ce que je suis aujourd'hui, **Mes parents**. Merci pour votre amour inconditionnel, votre soutien et votre infinie patience. Merci de m'avoir permis de faire ce dont j'avais envie et m'avoir donné un si bel exemple à suivre. Merci pour tous les nombreux sacrifices vous êtes ma motivation au quotidien, ma force, vous êtes mon tout...

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	3
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	7
<u>PREMIER CHAPITRE : LES ACCIDENTS VASCULAIRES CÉRÉBRAUX (AVC)</u>	7
I. Définition et épidémiologie des AVC.....	7
II. Les différents types d'AVC.....	9
1. AVC d'origine hémorragique	9
2. AVC d'origine ischémique (AVCi).....	9
III. Facteurs de risque des AVCi	11
1. Les facteurs de risque non modifiables	11
2. Les facteurs de risque modifiables	11
IV. Manifestations cliniques et prise en charge des AVCi.....	12
V. Physiopathologie de l'ischémie cérébrale.....	14
1. Evolution de la lésion après l'ischémie.....	14
2. Mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'ischémie	15
A) L'excitotoxicité	16
B) Stress oxydant et nitrant.....	16
C) L'inflammation	17
<u>DEUXIÈME CHAPITRE : LA THROMBOLYSE PAR LE rt-PA</u>	19
I. Structure et rôle biologique du t-PA	19
1. Structure du t-PA.....	19
2. Rôle biologique du t-PA.....	20
II. La thrombolyse par le rt-PA.....	22
1. Données cliniques	22
2. Toxicité du rt-PA.....	23
A) Toxicité vasculaire/endothéliale du rt-PA.....	23
B) Toxicité neuronale	26
III. Alternatives à la thrombolyse par le rt-PA	27
<u>TROISIÈME CHAPITRE : LES MICROVÉSICULES ENDOTHÉLIALES</u>	30
I. Structure, origine, biogenèse et clairance des microvésicules.....	31
1. Structure et origine des microvésicules	31

A)	Structure des microvésicules	31
B)	Caractéristiques différentielles des microvésicules et des autres vésicules extracellulaires.....	31
C)	Origines cellulaires des microvésicules	33
D)	Caractéristiques phénotypiques des microvésicules endothéliales (MVE).....	34
2.	Biogénèse des microvésicules	35
A)	Mécanisme général de vésiculation.....	35
B)	Mécanismes moléculaires particuliers à la vésiculation endothéliale	38
3.	Clairance des microvésicules.....	38
II.	Méthodes d'analyse des microvésicules	39
1.	La cytométrie en flux.....	40
2.	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) et test de capture en phase solide	41
3.	Microscopie électronique à transmission / à force atomique.....	41
4.	Tests fonctionnels.....	41
5.	Spectroscopie de corrélation photonique (Dynamic Light Scattering).....	42
III.	Rôles biologiques des microvésicules endothéliales	42
1.	Rôles bénéfiques	42
2.	Rôles délétères	44
A)	MVE et inflammation	44
B)	MVE et hémostase	45
C)	MVE et réactivité vasculaire.....	46
D)	MVE et angiogenèse	47
IV.	Microvésicules, système nerveux central (SNC) et AVC	48
1.	Microvésicules et SNC	48
2.	Microvésicules endothéliales et AVC	49
A)	Etudes expérimentales.....	49
B)	Etudes cliniques	50
<u>QUATRIÈME CHAPITRE : CHAPITRE HMGB1 (HIGH MOBILITY GROUP BOX1)</u>		54
I.	HMGB1 : structure et localisation	55
1.	Structure.....	56
2.	Localisation cellulaire, sécrétion et libération de HMGB1	57
A)	Localisations cellulaires de HMGB1	57
a.	Au niveau nucléaire	57
b.	Au niveau cytoplasmique.....	58
c.	Au niveau membranaire	59
B)	Mécanismes de sécrétion et de libération de HMGB1	59
a.	Sécrétion active	60

b. Libération passive	61
3. Modifications post-traductionnelles de HMGB1 : conséquences en termes de localisation et de fonction	63
A) L'acétylation	63
B) La poly(ADP-ribosyl)ation	64
C) La phosphorylation	64
D) Les réactions d'oxydo-réduction	64
E) La méthylation	66
II. Rôle de HMGB1 et récepteurs impliqués	66
1. Rôles de HMGB1	66
A) Médiateur de l'inflammation	66
B) Migration cellulaire et réparation tissulaire	67
2. Récepteurs cellulaires et voies de transduction impliquées dans les effets de HMGB1	69
A) Le récepteur RAGE	69
B) Les récepteurs TLR-2 et 4	69
III. HMGB1 et ischémie cérébrale	70
1. HMGB1 au cours de l'ischémie cérébrale	71
A) Expression et sécrétion post-ischémiques de HMGB1	71
B) Mécanismes de sécrétion de HMGB1 au cours de l'ischémie cérébrale	72
a. Au cours de la phase aiguë d'ischémie	72
b. Au cours de la phase subaiguë d'ischémie	73
2. Rôle de HMGB1 au cours de l'ischémie cérébrale	75
3. HMGB1, biomarqueur de l'inflammation post-ischémique en clinique ?	78
CINQUIÈME CHAPITRE : LA POLY(ADP-RIBOSE) POLYMÉRASE OU PARP	80
I. La PARP-1 : structure et fonction	80
1. Structure	80
2. Fonctionnement de la PARP	81
A) Synthèse des PARs	82
B) Dégradation des PARs	83
II. Rôle physiologique de la PARP	84
1. Réparation de l'ADN	84
2. Régulation de la transcription génique	86
3. Régulation du cycle cellulaire	86
III. PARP et ischémie cérébrale	87
1. Activation de la PARP à la suite de l'ischémie cérébrale	87
2. Rôle de la PARP dans l'ischémie cérébrale	88

3.	Mécanismes délétères de la PARP au cours de l'ischémie	90
A)	Théorie de la déplétion énergétique.....	90
B)	La mort cellulaire par apoptose ou par parthanatos	91
C)	PARP et inflammation	92
IV.	PARP et inflammation : une implication de HMGB1 ?.....	93
V.	PARP, rt-PA et ischémie cérébrale.....	94

BUT DU TRAVAIL 99

MATÉRIELS ET MÉTHODES 103

I.	Expérimentations <i>in vitro</i>	103
1.	Modèle <i>in vitro</i> de culture cellulaire	103
A)	Protocole de culture cellulaire	103
B)	Traitements des cellules	103
2.	Observation de la morphologie cellulaire	104
3.	Évaluation de la survie des cellules	104
4.	Évaluation de la mort cellulaire.....	105
5.	Dosage des microvésicules endothéliales (MVE)	105
A)	Isolation des microvésicules endothéliales.....	105
B)	Principe du dosage des MV par cytométrie en flux	106
C)	Marquage des MVE par l'annexine V et dosage par cytométrie en flux.....	107
a.	Principe du marquage.....	108
b.	Protocole de marquage	109
6.	Dosage des corps apoptotiques	109
a.	Principe du marquage.....	110
b.	Protocole de marquage	110
II.	Expérimentations <i>in vivo</i>	111
1.	Modèle d'ischémie cérébrale focale par voie endovasculaire	112
A)	Réalisation de l'ischémie chez la souris	112
B)	Protocole d'administration des agents pharmacologiques.....	114
III.	Evaluation de l'expression et de la sécrétion des protéines par Western Blot	114
1.	Préparation des échantillons.....	115
A)	Préparation des échantillons de cellules.....	115
B)	Concentration des milieux de culture	115
C)	Prélèvement et préparation des échantillons de tissus	116
a.	Prélèvement des échantillons de tissus.....	116
b.	Broyage des échantillons de tissu.....	117

D)	Prélèvement et préparation des échantillons de plasma	117
2.	Dosage des protéines	117
A)	Méthode EZQ	117
B)	Méthode BCA	118
3.	Electrophorèse des protéines et immuno-détection	118
A)	Electrophorèse	119
B)	Electrotransfert	119
C)	Blocage des sites non spécifiques et immunomarquage	119
D)	Révélation	120
a.	Révélation par chimioluminescence (ECL)	120
b.	Révélation par chimiofluorescence (ECF)	120
IV.	Dosages ELISA	121
1.	Protocole de dosage de HMGB1 dans le plasma	122
2.	Protocole de dosage du VEGF-A dans le plasma et dans les surnageants concentrés	122
V.	Etude de la localisation cellulaire de HMG1 par Immunocytoologie	123
1.	Préparation des échantillons	123
2.	Réalisation de l'immunocytoologie	123
VI.	Analyse statistique des résultats	125
	RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	129
	<u>PREMIÈRE PARTIE</u> : Etude <i>in vitro</i> de l'implication du rt-PA et de la plasmine dans la libération	
	des microvésicules endothéliales par les cellules bEnd.3.....	129
I.	Expériences préliminaires : Recherche d'une libération de MVE après stimulation des	
	cellules bEnd.3.....	131
1.	Recherche de l'effet du peroxyde d'hydrogène	131
a.	Protocole expérimental	131
b.	Résultats	131
•	Dosage des MVE	131
•	Mesure de la viabilité et de la mort cellulaire	132
•	Morphologie des cellules	133
c.	Discussion	133
2.	Recherche de l'effet du rt-PA	134
A)	Effet d'une gamme de rt-PA sur les cellules bEnd.3 synchronisées	134
a.	Protocole expérimental	134
b.	Résultats	134
•	Effet sur la morphologie	134
•	Dosage des MVE	135

•	Mesure de la viabilité et de la mort cellulaire	136
c.	Discussion	137
B)	Effet du rt-PA (40 µg/ml) sur les cellules bEnd.3 non synchronisées.....	137
a.	Protocole expérimental	137
b.	Résultats	138
•	Effet sur la morphologie	138
•	Dosage des MVE.....	138
•	Mesure de la viabilité et de la mort cellulaire	140
3.	Discussion	140
II.	Implication de la plasmine dans la production de MVE induite par le rt-PA (Article)	142
1.	Rappel des objectifs	142
2.	Article	143
3.	Résumé des principaux résultats.....	144
4.	Etude complémentaire : Recherche des corps apoptotiques dans le surnageant des cellules bEnd.3 traitées par le rt-PA.....	146
•	Dosage des MVE.....	146
•	Dosage des corps apoptotiques	147
III.	Perspectives <i>in vitro</i>	148
	DEUXIÈME PARTIE : Effet du rt-PA sur la protéine HMGB1	150
I.	Etudes <i>in vitro</i>	150
1.	Etude préliminaire : recherche d'un témoin positif de sécrétion de HMGB1 : <u>effet du LPS</u>	150
a.	Protocole expérimental	151
b.	Résultats	151
2.	Effet du rt-PA sur la sécrétion, l'expression et la localisation de HMGB1 dans les cellules bEnd.3 : <u>première partie</u>	152
A)	Etude de l'expression et de la sécrétion de HMGB1 après traitement par le rt-PA.....	152
a.	Protocole expérimental	153
b.	Résultats	154
B)	Effet d'une gamme de rt-PA sur l'expression et la sécrétion de HMGB1 à 24 heures.....	154
a.	Protocole expérimental	154
b.	Résultats	155
c.	Discussion	156
C)	Test de dégradation de HMGB1 par le rt-PA et rôle de la plasmine	158
a.	Protocole expérimental	158
b.	Résultats	159
c.	Discussion	159

D)	Etude de la localisation cellulaire de HMGB1 après traitement par le rt-PA par une technique d'immunocytochimie	160
a.	Protocole expérimental	160
b.	Résultats	160
c.	Discussion	161
3.	Effet du rt-PA sur la sécrétion, l'expression et la localisation de HMGB1 par les cellules bEnd.3 : <u>deuxième partie</u>	162
A)	Etude de l'effet d'une gamme de rt-PA sur l'expression et la sécrétion de HMGB1 à 24h	162
a.	Protocole expérimental	162
b.	Résultats	163
•	Evaluation de la sécrétion de HMGB1 dans les surnageants	163
•	Evaluation de l'expression de HMGB1 dans la fraction protéique soluble	163
•	Evaluation de l'expression de HMGB1 dans la fraction protéique insoluble	165
•	Evaluation de la cytotoxicité du rt-PA	166
c.	Discussion	166
B)	Etude de l'effet du rt-PA sur la localisation de HMGB1 par une technique d'immunocytochimie après perméabilisation cellulaire.....	167
a.	Protocole expérimental	167
b.	Résultats	168
C)	Implication de la PARP dans les effets du rt-PA sur la protéine HMGB1	169
a.	Recherche d'une production de PARs par les cellules bEnd.3	169
b.	Etude de l'effet d'une gamme de PJ34 sur les cellules bEnd.3 à 24h	170
c.	Discussion	172
d.	Etude de l'implication de la PARP dans les effets du rt-PA sur HMGB1	172
•	Evaluation de l'expression de HMGB1 dans la fraction protéique soluble	173
•	Evaluation de l'expression de HMGB1 dans la fraction protéique insoluble	174
•	Evaluation de la mort cellulaire.....	175
e.	Discussion	175
II.	Etudes <i>in vivo</i>	176
1.	Etude de l'effet du rt-PA sur la sécrétion de HMGB1 dans un modèle d'ischémie cérébrale endovasculaire permanent	176
a.	Protocole expérimental	176
b.	Résultats	177
2.	Etude de l'effet du rt-PA sur l'expression et la sécrétion de HMGB1 dans un modèle d'ischémie endovasculaire transitoire	178
a.	Protocole expérimental	178

b.	Résultats	179
•	Etude de l'effet du rt-PA sur la sécrétion plasmatique de HMGB1	179
•	Etude de l'effet du rt-PA sur l'expression de HMGB1 dans le cortex cérébral ipsilatéral	180
III.	Discussion	181
IV.	Etude complémentaire : Recherche de l'effet du rt-PA sur la sécrétion d'un autre facteur endothélial : le VEGF	185
1.	Etude <i>in vitro</i> de l'effet du rt-PA sur l'expression et la sécrétion de VEGF-A	186
a.	Protocole expérimental	186
b.	Résultats	186
2.	Etude de l'implication de la PARP dans la sécrétion de VEGF-A par les cellules bEnd.3	187
A)	Evaluation de la sécrétion du VEGF-A par Western Blot	187
a.	Protocole expérimental	187
b.	Résultats	188
B)	Evaluation de la sécrétion de VEGF-A dans les surnageants concentrés par une technique d'ELISA	189
a.	Protocole expérimental	189
b.	Résultats	189
3.	Evaluation de la sécrétion plasmatique du VEGF-A après ischémie cérébrale et traitement par le rt-PA	190
a.	Protocole expérimental	190
b.	Résultats	190
4.	Discussion	191
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	196
	ANNEXE.....	202
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	206

RÉSUMÉ

La thrombolyse par l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA) est actuellement le seul traitement pharmacologique approuvé dans la prise en charge des accidents vasculaires cérébraux d'origine ischémique. Cependant, sa fenêtre thérapeutique étroite (4h30) et ses nombreuses contre-indications limitent son utilisation. De plus, le rt-PA présente une toxicité vasculaire à l'origine de transformations hémorragiques (TH) responsables du décès précoce des patients. Notre équipe a retrouvé dans des modèles d'ischémie cérébrale réalisés chez la souris des TH spontanées qui sont aggravées par le rt-PA, et a montré l'implication de la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP) dans ces effets. Dans ce contexte, l'objectif de mon travail a été de préciser les mécanismes impliqués dans la toxicité vasculaire du rt-PA, et plus particulièrement au niveau endothélial ; je me suis ainsi intéressée à deux entités : les microvésicules endothéliales (MVE) qui sont des marqueurs particulièrement novateurs de la dysfonction endothéliale, et l'alarmine HMGB1 (High Mobility Group Box 1).

Nous avons montré *in vitro* sur une lignée de cellules endothéliales cérébrales murines (bEnd.3) par cytométrie en flux que le rt-PA, à la concentration de 40 µg/ml entraîne, *via* la plasmine, une libération importante de microvésicules endothéliales. Nous avons également mis en évidence l'implication de la PARP et de la voie des p38 MAPK dans cette production de MVE. En ce qui concerne HMGB1, nos résultats montrent que le rt-PA n'induit pas sa sécrétion par les cellules bEnd.3, mais modifie son état de solubilité. Après rt-PA en effet HMGB1 disparaît de la fraction contenant les protéines solubles du cytoplasme et du noyau et se retrouve dans une fraction qui contient les protéines insolubles du noyau, telles que les histones, ce qui suggère que HMGB1 est alors très fortement liée à la chromatine. Par ailleurs, nous avons mis en évidence *in vivo* dans un modèle d'ischémie cérébrale endovasculaire transitoire chez la souris des taux plasmatiques élevés de HMGB1 après ischémie, taux qui ne sont pas augmentés par le traitement par le rt-PA.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux a mis en évidence une production plasmine dépendante de MVE par le rt-PA, qui pourrait être impliquée dans ses effets délétères au niveau endothélial et vasculaire. D'autre part, les conséquences du changement de la localisation de HMGB1 induit par le rt-PA nécessite plus d'investigations afin de déterminer son éventuelle implication dans ses effets délétères. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait d'associer au rt-PA des stratégies afin de limiter sa toxicité et d'augmenter sa fenêtre thérapeutique.

DISCIPLINE Neuropharmacologie

MOTS CLÉS

Accidents vasculaires cérébraux
Activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA)
bEnd.3

Ischémie cérébrale
Microvésicules endothéliales
HMGB1
Poly(ADP-ribose) Polymérase (PARP)

PUBLICATION ET COMMUNICATIONS

Publication en premier auteur

GARRAUD*^a M., KHACEF*^a K., VION^b A., LECONTE^a C., YIN^b M., RENARD^b J-M., MARCHAND-LEROUX^a C., BOULANGER^b C.M, MARGAILL^a I, BERAY-BERTHAT^a V. (2016) Recombinant tissue plasminogen activator enhances microparticle release from mouse brain-derived endothelial cells through plasmin. Journal of the neurological sciences., 370, 187-195.

^a Equipe de recherche "Pharmacologie de la Circulation Cérébrale" EA4475, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes., Paris, France.

^b INSERM, U970, Paris Cardiovascular Research Center, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité., Paris, France.

* These authors contributed equally to this work

Communications orales

GARRAUD*^a M., KHACEF*^a K., VION^b A., LECONTE^a C., YIN^b M., RENARD^b J-M., MARCHAND-LEROUX^a C., BOULANGER^b C.M, MARGAILL^a I, BERAY-BERTHAT^a V. (2016) Recombinant tissue plasminogen activator enhances microparticle release from mouse brain-derived endothelial cells through plasmin.

Journée annuelle de la Société Cerveau et Maladies Cérébrovasculaires (SCMC), 1 Juin 2016, Paris, France.

GARRAUD*^a M., KHACEF*^a K., VION^b A., LECONTE^a C., YIN^b M., RENARD^b J-M., MARCHAND-LEROUX^a C., BOULANGER^b C.M, MARGAILL^a I, BERAY-BERTHAT^a V. (2016) Recombinant tissue plasminogen activator enhances microparticle release from mouse brain-derived endothelial cells through plasmin.

Congrès « Federation of European Physiological Societies and the French Physiological Society (FEPS) », 29-31 Juillet 2016, UPMC-Campus des Cordeliers, Paris, France.

GARRAUD*^a M., KHACEF*^a K., VION^b A., LECONTE^a C., YIN^b M., RENARD^b J-M., MARCHAND-LEROUX^a C., BOULANGER^b C.M, MARGAILL^a I, BERAY-BERTHAT^a V. (2016) Recombinant tissue plasminogen activator enhances microparticle release from mouse brain-derived endothelial cells through plasmin.

Journées scientifiques de l'école doctorale « Médicament, Toxicologie, Chimie et Imagerie », 26 -27 Juin 2017, Université Paris Diderot, Paris, France.

Communications affichées

GARRAUD*^a M., KHACEF*^a K., VION^b A., LECONTE^a C., YIN^b M., RENARD^b J-M., MARCHAND-LEROUX^a C., BOULANGER^b C.M, MARGAILL^a I, BERAY-BERTHAT^a V. (2016) Recombinant tissue plasminogen activator enhances microparticle release from mouse brain-derived endothelial cells through plasmin.

Congrès des « Youngs Researchers In Life Science (YRLS) », Session : Neurosciences et Physiologie, 18-20 Mai 2016, Institut Pasteur, Paris, France.

GARRAUD*^a M., KHACEF*^a K., VION^b A., LECONTE^a C., YIN^b M., RENARD^b J-M., MARCHAND-LEROUX^a C., BOULANGER^b C.M, MARGAILL^a I, BERAY-BERTHAT^a V. (2016) Recombinant tissue plasminogen activator enhances microparticle release from mouse brain-derived endothelial cells through plasmin.

Journées scientifiques de l'école doctorale Médicament Toxicologie Chimie et Imagerie (mtci), 27 - 28 juin 2016, Paris, France.

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Les AVC, deuxième cause de mortalité dans le monde en 2015 (Données de l'organisation mondiale de la santé (OMS) (www.who.int)).	8
Figure 2 : « Time is brain » (d'après Saver, 2006)	13
Figure 3 : Evolution spatio-temporelle de la lésion post-ischémique (d'après Catanese et al., 2017)	15
Figure 4 : Évolution spatio-temporelle des principaux mécanismes d'ischémie cérébrale (d'après Dirnagl et al., 1999)	15
Figure 5 : Mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale (adaptée d'après Khoshnam et al., 2017)	17
Figure 6 : Mécanismes inflammatoires post-ischémiques (adaptée d'après Wang et al., 2007a)	18
Figure 7 : Structure du t-PA (d'après Acheampong et Ford, 2012)	20
Figure 8 : Fibrinolyse du caillot de fibrine par le rt-PA (adaptée d'après Gurman et al., 2015)	21
Figure 9 : Tailles des différentes vésicules extracellulaires (d'après György et al., 2011)	32
Figure 10 : A. Structure d'une microvésicule endothéliale (adaptée d'après Dignat-George et Boulanger, 2011), B. Différence de structure des MVE produites par les cellules activées ou en apoptose (adaptée d'après Markiewicz, 2013)	35
Figure 11 : Processus de vésiculation membranaire (adaptée d'après Hugel et al., 2005)	36
Figure 12 : Mécanisme de remodelage du cytosquelette lors de la vésiculation (adaptée selon Burger et al., 2013)	37
Figure 13 : Mécanismes de communication intercellulaire des MV (adaptée d'après Cocucci et al., 2009)	43
Figure 14 : Structure de la protéine HMGB1 (adaptée d'après Kang et al., 2014)	56
Figure 15 : Mécanismes de sécrétion et de libération de HMGB1 (adaptée d'après Yang et al., 2005)	60
Figure 16 : Modifications de la localisation de HMGB1 après nécrose et apoptose cellulaires et après activation des cellules inflammatoires (adaptée d'après Müller et al., 2001)	63
Figure 17 : Différentes formes redox de la protéine HMGB1 et les conséquences en terme de fonction cellulaire (adaptée d'après Singh et al., 2016)	65
Figure 18 : Rôles biologiques de la protéine HMGB1 (d'après Barnay-Verdier et al., 2009)	68

Figure 19 : Voies de transduction du signal induites par HMGB1 après fixation aux récepteurs RAGE et TLR-4 (d'après Huttunen et al., 1999 et Barnay-Verdier et al., 2009).....	70
Figure 20 : HMGB1 au cours des différentes phases de l'ischémie cérébrale (adaptée d'après Hayakawa et al., 2010).....	74
Figure 21 : Schéma représentatif de la structure de la PARP-1 (adaptée d'après Gupte et al., 2017) .	81
Figure 22 : Structure d'une molécule de NAD ⁺ et site de clivage par la PARP (d'après Curtin et Szabo, 2013).....	82
Figure 23 : La poly(ADP-ribosyl)ation : synthèse et dégradation des PARs, régénération du NAD ⁺ (adaptée d'après Heeres et Hergenrother, 2007).....	83
Figure 24 : Processus de réparation de l'ADN par la PARP..... (adaptée d'après De Vos et al., 2012 ; Lin, 2007).....	85
Figure 25 : Principaux inhibiteurs pharmacologiques de la PARP (d'après Curtin et Szabo, 2013).....	89
Figure 26 : Protocole de traitement des cellules bEnd.3	104
Figure 27 : Les différentes étapes d'isolation des microvésicules endothéliales.....	106
Figure 28 : Dot plot représentatif de calibration du cytomètre en flux utilisé..... pour le dosage des microvésicules endothéliales.	107
Figure 29 : Détection des microvésicules endothéliales par cytométrie en flux..... FS=forward Scatter ; FITC= fluoroisocyanate	108
Figure 30 : Détection des corps apoptotiques par cytométrie en flux..... après un marquage AnnV-APC/IP	110
Figure 31 : Modèle d'ischémie cérébrale focale endovasculaire (intraluminal) chez la souris.....	113
Figure 32 : Protocole d'administration du rt-PA à la suite de l'ischémie chez la souris.....	114
Figure 33 : Prélèvement des échantillons de tissu cérébral.....	116
Figure 34 : Les étapes de réalisation d'un marquage en immunocytologie.....	124
Figure 35 : Protocole de traitement par H ₂ O ₂ des cellules bEnd.3 synchronisées	131
Figure 36 : Effet du peroxyde d'hydrogène sur la libération des MVE par les cellules bEnd.3 après 24h d'incubation.....	132
Figure 37 : Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité (A) et la mort (B) des cellules bEnd.3 après 24h d'incubation.....	132
Figure 38 : Effet du peroxyde d'hydrogène sur la morphologie des cellules	133
Figure 39 : Protocole de traitement par une gamme de rt-PA des cellules bEnd.3 synchronisées.....	134
Figure 40 : Effet du rt-PA sur la morphologie des cellules	135

Figure 41 : Effet d'une gamme de rt-PA sur la libération de MVE par les cellules bEnd.3 synchronisées après 24h d'incubation	135
Figure 42 : Effet d'une rt-PA sur la viabilité (A) et la mort (B) des cellules bEnd.3	136
après 24h d'incubation.....	136
Figure 43 : Protocole de traitement par le rt-PA (40 µg/ml) des cellules bEnd.3 non synchronisées.	137
Figure 44 : Effet du rt-PA (40 µg/ml) sur la morphologie des cellules à 24 heures.....	138
Figure 45 : Effet du rt-PA (40 µg/ml) sur la libération des MVE par les cellules bEnd.3	139
après 24 heures d'incubation.....	139
Figure 46 : Effet du rt-PA (40 µg/ml) sur la viabilité (A) et la mort (B) des cellules bEnd.3.....	140
après 24h d'incubation.....	140
Figure 47 : Effet du rt-PA (40 µg/ml) sur la libération des MVE par les cellules bEnd.3	147
après 24 heures d'incubation.....	147
Figure 48 : Dots Plot représentatifs du marquage en cytométrie en flux des corps apoptotiques par l'Annexine-V (AnnV-APC) et l'iodure de propidium (IP).....	147
Figure 49 : Protocole de traitement des cellules bEnd.3 par le LPS	151
Figure 50 : Effet du LPS sur la sécrétion de HMGB1 par les cellules bEnd.3.	152
A) Western Blot représentatif ; B) Quantification de HMGB1	152
Figure 51 : Protocole d'étude de l'expression de HMGB1 après différents temps	153
de traitement par le rt-PA (40 µg/ml)	153
Figure 52 : Western Blot représentatif de l'expression de HMGB1 dans les cellules bEnd.3 à 24 heures après différentes durées de traitement par le rt-PA.....	154
Figure 53 : Protocole de traitement des cellules bEnd.3 par une gamme de rt-PA	155
Figure 54 : Effet d'une gamme de rt-PA sur l'expression de HMGB1 et de l'actine.....	155
dans la fraction protéique soluble.	155
Figure 55 : Test in vitro acellulaire : effet du rt-PA et de la plasmine sur la protéine HMGB1	158
Figure 56 : Effet du rt-PA et de la plasmine sur la protéine HMGB1.....	159
Figure 57 : Images d'immunofluorescence représentatives de l'effet d'une gamme de rt-PA sur la localisation de HMGB1 dans les cellules bEnd.3	161
Figure 58 : Protocole de traitement des cellules bEnd.3 par une gamme de rt-PA	162
Figure 59 : Effet d'une gamme de rt-PA sur la sécrétion de HMGB1 par les cellules bEnd.3.....	163
Figure 60 : Effet d'une gamme de rt-PA sur l'expression de HMGB1.....	164
dans la fraction protéique soluble des cellules bEnd.3 évaluée par Western Blot	164
Figure 61 : Effet d'une gamme de rt-PA sur l'expression de HMGB1.....	165

dans la fraction protéique insoluble	165
Figure 62 : Effet cytotoxique du rt-PA sur les cellules bEnd.3.....	166
A) Viabilité cellulaire (test MTT), B) Mort cellulaire (dosage LDH).....	166
Figure 63 : Images d'immunofluorescence représentatives de l'effet du rt-PA sur la localisation cellulaire de HMGB1 après perméabilisation des membranes cellulaires.....	168
Figure 64 : Protocole de l'effet dose/réponse du PJ34 sur la formation des PARs	169
après stimulation par H ₂ O ₂	169
Figure 65 : l'effet d'une gamme de PJ34 sur la formation des PARs après stimulation par H ₂ O ₂	170
Figure 66 : Effet d'une gamme de PJ 34 sur la viabilité et la mort des cellules bEnd.3.....	171
Figure 67 : Protocole de traitement des cellules par le rt-PA associé ou non au PJ34.....	173
Figure 68 : Implication de la PARP dans les effets du rt-PA sur HMGB1	174
dans la fraction protéique soluble	174
Figure 69 : Implication de la PARP dans les effets du rt-PA sur HMGB1	174
dans la fraction protéique insoluble	174
Figure 70 : Effet du rt-PA et du PJ34 sur la mort cellulaire	175
Figure 71 : Protocole d'étude de l'effet du rt-PA sur la sécrétion plasmatique de HMGB1.....	177
dans le modèle d'ischémie endovasculaire permanent.....	177
Figure 72 : Taux plasmatiques de HMGB1 après ischémie et traitement par le rt-PA.....	177
dans un modèle d'ischémie endovasculaire permanent.....	177
Figure 73 : Protocole d'étude de l'effet du rt-PA sur la sécrétion plasmatique et l'expression cérébrale de HMGB1.....	178
Figure 74 : Taux plasmatiques de HMGB1 après ischémie et traitement par le rt-PA.....	179
dans un modèle d'ischémie endovasculaire transitoire.....	179
Figure 75 : Expression de HMGB1 dans le cortex ipsilatéral après ischémie et traitement par le rt-PA	180
Figure 76 : Effet d'une gamme de rt-PA sur la sécrétion de VEGF-A par les cellules bEnd.3	187
Figure 77 : Protocole de traitement des cellules par le rt-PA associées ou non au PJ34	188
Figure 78 : Implication de la PARP dans la sécrétion du VEGF-A par les cellules bEnd.3	188
après traitement par le rt-PA	188
Figure 79 : Implication de la PARP dans la sécrétion de VEGF-A par les cellules bEnd.3	189
après traitement par le rt-PA	189
Figure 80 : Evaluation de la sécrétion plasmatique de VEGF-A par une technique d'ELISA.....	190
après ischémie et traitement par le rt-PA.....	190

Tableau 1 : Caractéristiques différentielles des vésicules extracellulaires.....	33
Tableau 2 : Etudes cliniques portant sur les MV à la suite d'accidents vasculaires cérébraux	53
Tableau 3 : Les différentes sources de HMGB1 au cours de l'ischémie cérébrale	72
Tableau 4 : Rôle de HMGB1 au cours de l'ischémie	77
Tableau 5 : Etudes cliniques concernant l'évolution des taux de HMGB1 à la suite d'un AVC	79
Tableau 8 : Pourcentage des corps apoptotiques marqués AnnV+ IP+ dans la fenêtre des évènements de taille microvésiculaire (< 1 µm)	148
Tableau 9 : Taux d'expression de HMGB1 dans la fraction protéique soluble exprimés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles	156

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3-AB	3-aminobenzamide
5-AIQ	5-aminoisoquinolinone
Ac	Anticorps
ACC	Artère carotide commune
ACE	Artère carotide externe
ACI	Artère carotide interne
ACM	Artère cérébrale moyenne
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AEM	Agence Européenne du Médicament
AGEs	Advanced Glycation Endproducts
AIF	Apoptosis inducing factor
AIT	Accident ischémique transitoire
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AMPA	Acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque.
Ang II	Angiotensine de type II
AnnV	Annexine V
ANOVA	Analyse de variance
APC	Allophycocyanin
APC	Activated Protein C
ApoE	Apolipoprotéine E
ARN (m)	Acide ribonucléique (messenger)
A-SMase	Acidshingomyelinase
ASSENT	Assessment of the safety and efficacy of a new thrombolytic
ATLANTIS	Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke
ATP	Adénosine triphosphate
AT₁R	Récepteurs de l'angiotensine de type II
AVC(i)	Accident vasculaire cérébral (ischémique)
BCA	Acide bichinoninique
bEnd.3	Lignée de cellules endothéliales cérébrale murines (brain endothelioma cell line)
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BRCT	Breast cancer type-1 C-terminus
BSA	Bovine Serum Albumine
CaMK IV	Calcium/calmoduline protéine kinase IV.
CI50	Concentration inhibant 50% de l'activité enzymatique
COX	Cyclo-oxygénase
CRP	Protéine C réactive
Cys	Cystéine
DAMP	Damage Associated Moleculat pattern
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DEL	Developmental endothelial locus
DHIQ	1,5-dihydroxyisoquinoline
DIAS	Desmoteplase In Acute Stroke
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique

DSC	Débit sanguin cérébral
DTNT	Door to needle time
ECASS	European cooperative acute stroke study
ECF	Enhanced chemi fluorescence
ECL	Enhanced chemi luminescence
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPCR	Récepteur endothélial à la protéine C
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
E-sélectine	Sélectine endothéliale
FDA	Food and Drug Administration
FK	Full Kill
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FS	forward scatter
FT	Facteur tissulaire
GP	Glycoprotéine
GILT	Gamma Interferon Inducible Lysosomal Thiol Reductase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HAECs	Human Aortic Endothelial Cells
HAS	Haute autorité de santé
HAT	Histone Acetyltransferases
HDAC	Histone Deacetylases
HIF-1	hypoxia inducible factor 1
HMEC	Human Microvascular Endothelial Cells
HMGB1	High mobility group box 1
HMVEC	Human Lung Microvascular Endothelial Cells
HPAEC	Human Pulmonary Artery Endothelial Cells
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HRP	Horseshoe peroxidase
HTA	Hypertension artérielle
i.a.	Intra-artérielle
IC	Ischémie cérébrale
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL	Interleukine
Ig	Immunoglobuline
i.p.	Intrapéritonéale
IP	Iodure de propidium
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
ISTH	Société internationale de thrombose et d'hémostase
i.v.	Intraveineux
kDa	Kilodalton
K1,2	Kringle 1, 2
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1
LBS	Lysine binding site
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LDH	Lactate déshydrogénase
LPC	Lysophosphatidylcholine
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	Low density lipoprotein receptor-related protein
L-sélectine	Sélectine leucocytaire
Mac-1	Macrophage antigen-1
MAPK	Mitogen associated protein kinase
MARH	Mono(ADP-ribose)protein hydrolase
MCP1	Monocyte chemoattractant protein 1

MEC	Matrice extra-cellulaire
MERCI	Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischemia
MIP	Macrophage inflammatory protein
MLC	Myosin Light Chain
MMP	Métalloprotéase de la matrice
MV	Microvésicules
MVE	Microvésicules endothéliale
MT1-MMP	Membrane-type 1 MMP.
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide
NaCl	Chlorure de sodium
NAD⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransférase
NF-κB	Nuclear factor kappa
NIHSS	National Institute of Health Stroke Score
NINDS	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
NK	Natural Killer
NLS	Nuclear localisation signal
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NMNAT	Nicotinamide mononucléoside adényltransférase
NO	Monoxyde d'azote
NOS (n/e/i)	NO synthase (neuronale/endothéliale/inductible)
NP-40	Nonidet P-40, (4-Nonylphenyl-polyethylene glycol)
NXY-059	Disufenton sodium (Cerovive)
O₂^{•-}	Anion superoxide
OGD	Oxygen Glucose deprivation
OH[•]	Radical hydroxyl
OMS	Organisation mondiale de la santé
ONOO⁻	Anion peroxydinitrite
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAR	Proteinase activated receptor
PARs	Poly(ADP-riboses)
PARG	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
PBM	PARs binding motif
PBS	Phosphate buffered saline (Tampon Phosphate)
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PJ34	N-(6-oxo-5,6-dihydro-phénanthridin-2-yl)-N,N-diméthylacétamide
PFA	Paraformaldéhyde
PKC	protéine kinase C
PMN	Polymorphonucléaire neutrophile
PBM	PARs binding motif
PFP	Platelet free plasma
PPP	Plasma Pauvre en Plaquette
PRR	Pattern Recognition Receptors
PS	Phosphatidylserine
P-sélectine	Sélectine plaquettaire
PSR	Récepteur de la phosphatidylsérine
PVDF	Polyvinylidene difluoride
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROS	Reactive oxygen species
RNS	Reactive Nitrogen Species
rt-PA	Activateur tissulaire du plasminogène recombinant
RAGE	Receptor for Glycation End product
sctPA	Single chain t-PA

sd	Standard deviation (écart type)
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SNC	Système nerveux central
SMTP7	Stachybotrys microspora phenol-7
SS	Side scatter
SSC – VB	Comités Scientifiques de Standardisation de Biologie Vasculaire
STS	Staurosporine
SVF	Sérum de veau fœtal
TAFI	Thrombin Activated Fibrinolysis Inhibitor
TBS	Tris buffer saline
tctPA	Two chain t-PA
TEMED	Tétraméthyl-éthylène-diamine
TH	Transformations hémorragiques
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TO	Témoins-opérés
TOAST	Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment
t-PA	Activateur tissulaire du plasminogène
TPBS	Tampon phosphate pH 7,4 contenant du tween 20®
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TSG101	Tumor susceptibility gene 101
TTBS	Tampon salin Tris/HCl contenant du tween 20®
UA	Unités arbitraires
UF	Unités de fluorescence
uPA	Urokinase type plasminogen activator
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VE-cadhérine	Vascular endothelial cadhérine
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein-1

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) touchent près de 16 millions de personnes dans le monde chaque année. D'après les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2015 les AVC représentaient la deuxième cause de mortalité dans le monde. En France, 100 000 à 145 000 cas d'AVC sont enregistrés chaque année, ce qui correspond à la survenue d'un AVC toutes les 4 minutes (Rapport HAS 2009 ; Lecoffre et al., 2017). Dans le cas d'un AVC d'origine ischémique (80 % des cas), la seule stratégie pharmacologique approuvée est la thrombolyse par le rt-PA, l'activateur du plasminogène recombinant. Or, moins de 2% des patients en bénéficient réellement en raison de sa fenêtre thérapeutique étroite et de ses nombreuses contre-indications. De plus, le rt-PA n'est pas efficace chez tous les patients (recanalisation artérielle partielle voire inexistante) et multiplie par 6 le risque de survenue de transformations hémorragiques (TH), ce qui constitue son principal inconvénient. Dans ce contexte, il s'avère primordial de rechercher des stratégies capables d'améliorer l'efficacité du rt-PA et de rendre la thrombolyse plus sûre. Au laboratoire, nous avons mis en évidence l'implication d'une enzyme, la poly(ADP-ribose)polymérase, dans les TH induites par le rt-PA. D'autres mécanismes peuvent être impliqués dans la toxicité vasculaire du rt-PA.

Au cours de ma thèse j'ai donc étudié la toxicité vasculaire du rt-PA, et en particulier ses effets au niveau endothélial. Dans un premier temps, je me suis intéressée aux microvésicules endothéliales qui sont des marqueurs et des acteurs de la dysfonction endothéliale particulièrement novateurs. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr Boulanger (INSERM-U970, Paris-Centre de Recherche Cardiovasculaire). Dans un second temps je me suis intéressée à la protéine HMGB1 (High Mobility Group Box 1), une DAMPs « Damage Associated Molecular Patterns » dite « alarmine » qui joue un rôle dans l'inflammation post-ischémique et qui exerce des effets délétères au niveau endothélial et au niveau de la barrière hémato-encéphalique après l'ischémie. J'ai également étudié l'implication de la PARP dans les effets du rt-PA sur ces deux entités. Mes travaux comprennent un volet *in vitro* réalisé sur une lignée de cellules endothéliales cérébrales murines, les bEnd.3, et un volet *in vivo* réalisé dans un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

PREMIER CHAPITRE : LES ACCIDENTS VASCULAIRES CÉRÉBRAUX (AVC)

I. Définition et épidémiologie des AVC

Selon l'OMS, "Un AVC est un déficit brutal et spontané d'une fonction cérébrale focale ou globale sans d'autres causes apparentes qu'une cause vasculaire. Les symptômes doivent durer plus de 24 heures. L'évolution peut se faire vers la régression totale ou partielle des déficits fonctionnels, ou vers la mort" (www.who.int).

Cette définition implique l'existence d'une lésion cérébrale secondaire à une lésion vasculaire sous-jacente. Le vaisseau impliqué est presque toujours une artère qui va soit se rompre et provoquer une hémorragie soit, plus fréquemment, s'occlure et entraîner un défaut d'irrigation, ce qui aboutit à un infarctus cérébral. Sont exclues de cette définition les complications vasculaires des traumatismes crâniens (hématomes sous et extraduraux).

L'AVC est une urgence médicale absolue qui nécessite d'appeler le Samu (15) ou le numéro d'urgence européen (112) pour une prise en charge immédiate.

Les données épidémiologiques présentées ci-dessous proviennent des rapports de la Haute Autorité de santé (HAS), de l'OMS, et des trois registres épidémiologiques français, dijonnais, brestois et lillois.

L'AVC est une pathologie fréquente, grave et invalidante. Selon l'OMS, le nombre de décès imputables aux maladies cardio-vasculaires est estimé à 17,5 millions, soit 31 % de la mortalité mondiale totale. Parmi ces décès, on estime que 7,4 millions sont dus à une cardiopathie coronarienne et **6,7 millions à un accident vasculaire cérébral** (statistiques de 2012). En 2015, ce pourcentage a considérablement augmenté, ainsi sur 56,4 millions de décès survenus dans le monde, plus de la moitié (54%) sont dus en premier lieu aux cardiopathies ischémiques et en second lieu aux accidents vasculaires cérébraux (figure 1) (www.who.int).

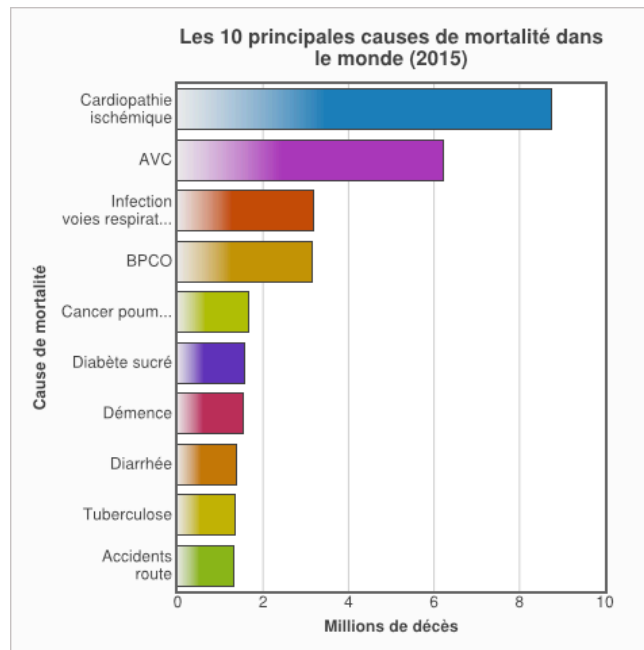


Figure 1 : Les AVC, deuxième cause de mortalité dans le monde en 2015 (Données de l'organisation mondiale de la santé (OMS) (www.who.int)).

Actuellement, en France l'incidence annuelle des AVC est de 1,6 à 2,4 pour 1 000 personnes, soit 100 000 à 145 000 AVC par an (un AVC toutes les 4 minutes) (Rapport HAS 2009 ; Lecoffre et al., 2017). Avec 40 000 morts, l'AVC est en France :

- ✚ La première cause de handicap acquis avec des patients qui gardent des séquelles lourdes,
- ✚ La troisième cause de mortalité après les cancers et les maladies cardio-vasculaires (10%),
- ✚ La 1ère cause de mortalité chez les femmes et la troisième chez les hommes,
- ✚ La deuxième cause de déclin intellectuel,
- ✚ La deuxième cause de démence (après la maladie d'Alzheimer).

L'incidence des AVC est fortement liée à l'âge. Elle est de 0,1 à 0,3 pour 1 000 par an chez les sujets de moins de 45 ans, et de 12 à 20 pour 1 000 chez les sujets âgés de 75 à 84 ans. L'âge moyen de survenue des AVC est de 70 ans chez l'homme et de 75 ans chez la femme (Rapport HAS 2009 ; Lecoffre et al., 2017).

Les taux de mortalité de cette pathologie présentés dans les différents rapports de l'HAS (Rapport HAS 2009) et du Ministère français de la santé de 2009 (Fery-Lemonnier, 2009) sont élevés : 15 à 20 % au terme du premier mois et 50 % après cinq années pour les infarctus cérébraux. Parmi les survivants, trois quarts des victimes garderont des séquelles définitives dont 1/3 deviendra dépendant, 1/4 ne reprendra jamais d'activité professionnelle et 25 à 50% souffriront de dépression au moins au cours de la 1^{ère} année suivant l'AVC (Pinoit et al., 2006).

En ce qui concerne le risque de récurrence des AVC, les données épidémiologiques indiquent des taux de 1% à 4% durant le premier mois, de 7 à 13 % durant la première année et de 40% dans les 10 ans qui suivent l'AVC (Hartmann et al., 2001 ; Mohan et al., 2009).

D'un point de vue économique, le coût total des soins des patients en France en 2007 s'élevait à 5,3 milliards ce qui correspondait à 3% du budget de la santé. Ce montant représenterait actuellement 7% du budget total de la santé.

II. Les différents types d'AVC

Il existe deux types d'AVC : l'AVC hémorragique et l'AVC ischémique (Adams et al., 1993).

1. AVC d'origine hémorragique

L'AVC hémorragique représente 20% des cas d'AVC. Il est provoqué par la rupture d'un vaisseau sanguin intracérébral entraînant une hémorragie. Le sang se répand et endommage le tissu cérébral aux alentours. Les causes les plus fréquentes de cette rupture sont une malformation vasculaire ou une élévation brutale de la tension artérielle. La localisation de l'hématome permet de distinguer deux types d'AVC hémorragiques :

- **l'AVC avec hémorragie intracérébrale** qui s'observe lorsqu'une artéiole située dans le cerveau se rompt, le sang se répand alors directement dans le tissu cérébral.
- **l'AVC avec hémorragie méningée** ou sous-arachnoïdienne qui se traduit par une diffusion du sang dans les espaces méningés, c'est-à-dire les espaces situés entre le cerveau et le crâne.

2. AVC d'origine ischémique (AVCi)

Les AVC ischémiques (AVCi) représentent 80% des AVC. Ils résultent de l'obstruction, partielle ou totale, d'une artère par un caillot, formé localement ou provenant du cœur et ayant migré dans une artère cérébrale. Cette obstruction a pour conséquence de réduire l'irrigation sanguine dans une zone cérébrale et donc de priver partiellement le cerveau en oxygène et glucose. Dans 70% des cas d'AVCi, le territoire irrigué par l'artère carotide est touché ; l'artère sylvienne, encore appelée artère cérébrale moyenne (ACM), est impliquée dans 95% de ces AVCi « carotidiens » (Bogousslavsky et al., 1988).

Le caillot qui obstrue les vaisseaux peut avoir plusieurs origines. Pour se faire, la classification TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) utilisée dans la plupart des études cliniques sur les **AVC ischémiques** permet de définir cinq types d'AVC ischémique (Adams *et al.*, 1993). Bien que dans certains cas la cause de ce caillot ne peut être déterminée, le plus couramment il résulte :

- d'une athérosclérose (50% des cas) qui se définit comme le dépôt d'une plaque (athérome) sur la paroi des artères. Cela peut engendrer des lésions artérielles (sclérose), la diminution du diamètre interne du vaisseau, voire son obstruction totale ;
- d'une embolie dont les points de départ sont principalement les cavités du cœur (20% des cas) ;
- d'une micro-angiopathie qui se traduit par une lacune des vaisseaux sanguins de petit calibre (25 % des cas) ;
- de façon plus rare d'une vascularite, d'une affection hématologique, ou encore d'une coagulopathie ;
- Les AVC d'origine indéterminée ;

Les deux derniers types d'AVC constituent 5% des AVC ischémiques (Warlow *et al.*, 2003).

Il arrive que l'accident vasculaire ne dure que quelques dizaines de seconde ou quelques minutes : on parle alors d'**accident ischémique transitoire (AIT)**. Ce dernier, se présente comme un épisode bref de dysfonction neurologique, provoque des symptômes qui durent moins d'une heure. Cependant, un AIT peut être annonciateur d'un AVC, mais son diagnostic est malheureusement souvent postérieur à l'AVC lui-même.

La thématique de ma thèse portant sur les accidents vasculaires cérébraux d'origine ischémique, la suite des rappels bibliographiques concernera uniquement ce type d'AVC nommé également ischémie cérébrale.

III. Facteurs de risque des AVCi

Les facteurs de risque des AVCi sont regroupés dans deux différentes catégories, les facteurs non modifiables et modifiables (voir pour revue Béjot *et al.*, 2009 ; Goldstein *et al.*, 2011).

1. Les facteurs de risque non modifiables

Ces facteurs de risque incluent :

- ❖ l'âge : l'incidence des AVC augmente avec l'âge, ainsi, après 55 ans, le risque d'AVC double à chaque décennie ;
- ❖ le sexe : l'incidence des AVC est plus élevée chez l'homme que chez la femme. Néanmoins, du fait de l'espérance de vie supérieure chez les femmes, le nombre absolu d'AVC est plus important chez les femmes que chez les hommes ;
- ❖ l'origine ethnique : l'incidence des AVCi serait deux fois plus élevée chez les populations africaines et hispaniques que chez les caucasiens. Des facteurs socio-économiques et culturels pourraient être à l'origine des différences dans la prévalence des facteurs de risque observées au sein de ces populations, ainsi que des variations génétiques non encore identifiées ;
- ❖ Les antécédents familiaux paternel ou maternel : ils multiplient par deux le risque de survenue d'un AVCi.

2. Les facteurs de risque modifiables

L'identification des facteurs de risques modifiables représente le seul moyen de prévenir la survenue (prévention primaire) ou la récurrence (prévention secondaire) d'un AVCi.

Ces facteurs de risques, responsables d'environ 90% des AVCi, comprennent :

- ❖ l'hypertension artérielle (HTA), qui représente le facteur de risque le plus fréquemment retrouvé (35 % des AVC). L'HTA multiplie le risque de survenue d'un AVCi par quatre, pour les deux sexes et quel que soit l'âge. En France, 7 millions de personnes sont hypertendues. D'autres facteurs souvent associés à l'HTA et bien documentés peuvent également être impliqués tels que le diabète de type 2 et l'hypercholestérolémie ;
- ❖ les pathologies cardiaques, en particulier la fibrillation auriculaire, prédisposent également aux AVC ;
- ❖ le tabagisme est également un facteur de risque reconnu ;

- ❖ d'autres facteurs tels que la sédentarité, l'obésité, la consommation excessive d'alcool, la contraception et le traitement hormonal substitutif sont également d'importants facteurs de risque ;
- ❖ enfin, les facteurs sociaux, économiques et culturels, tels que, le vieillissement des populations, la pauvreté et le stress sont à prendre en considération. Ils peuvent constituer une cause indirecte d'AVC dans la mesure où ils sont capables d'induire ou d'aggraver certains des facteurs exposés précédemment.

IV. Manifestations cliniques et prise en charge des AVCi

Le tableau clinique d'un AVC ischémique est très varié car il dépend du territoire cérébral touché. Les symptômes associés sont parfois très peu caractéristiques. Parmi ces symptômes peuvent être observés :

- des **troubles de la conscience** : stupeur, coma, confusion, agitation, voire des crises d'épilepsie ;
- des **troubles de la vision** pouvant se manifester par une réduction du champ visuel, une diminution ou une perte de la vision mono- ou binoculaire ;
- des **troubles du langage**, notamment des troubles de l'élocution, une perte brutale de la parole ;
- des **troubles de la motricité** avec une paralysie ou une perte de sensibilité, le plus souvent unilatérale, au niveau d'un membre, du visage ou du corps.

Ces symptômes peuvent apparaître de manière isolée ou combinée, parfois accompagnés de céphalées, de vertiges, de nausées ou de vomissements. L'échelle NIHSS (National Institute of Health Stroke Scale) a été mise en place afin d'évaluer différents critères cliniques et d'attribuer ainsi un score appréciant la gravité de l'AVCi.

Afin de limiter les séquelles et d'instaurer très rapidement un traitement approprié, une prise en charge précoce et adaptée des patients est nécessaire. En effet, comme l'illustre l'expression de Saver « Time is brain » (Saver et al., 2006), chaque minute qui s'écoule après un AVCi engendre la perte de 1,9 millions de neurones, de 14 milliards de synapses et de 12 km de fibres myélinisées (figure 2).



Figure 2 : « Time is brain » (d'après Saver, 2006)

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

La prise en charge des patients victimes d'AVC est donc influencée par un facteur crucial qui est le temps. Il représente le principal obstacle pour une mise en place rapide du traitement. Ainsi, dans les services d'urgence, l'imagerie par scanner, plus souvent disponible que l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique), permet de déterminer la nature de l'AVC, ischémique ou hémorragique. L'IRM permet d'évaluer l'étendue de la zone ischémisée et de la zone de pénombre qui peut être potentiellement sauvée.

De ce fait, la prise en charge de l'AVCi présente cinq points essentiels qui sont les suivants :

- 1) En fonction des résultats de l'imagerie, une thrombolyse par l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (ou rt-PA) est très rapidement instaurée. Le rt-PA représente aujourd'hui le seul traitement pharmacologique autorisé pour le traitement des AVCi. Hormis de nombreuses contre-indications (cf annexe page 202), l'obstacle principal à son utilisation est la fenêtre thérapeutique très étroite puisque d'après son AMM, le rt-PA doit être administré selon les pays dans les 3 heures ou 4,5 heures qui suivent les premiers symptômes. Ce délai semble extrêmement court au regard des difficultés de diagnostic et de prise en charge. Bonnaud et collaborateurs ont montré qu'en France, moins de 40% des patients présentant un AVC arrivent aux urgences dans les 3 heures qui suivent les premiers symptômes (Bonnaud et al., 2005). L'ensemble de ces données explique qu'aujourd'hui, moins de 2% des patients bénéficient d'une thrombolyse (Cronin, 2010 ; Mahagne et al., 2008).
- 2) Une surveillance de la pression artérielle, des fréquences cardiaque et respiratoire et de la saturation en oxygène sont nécessaires. D'autres variables telles que la température et la glycémie sont également mesurées et contrôlées.

3) A court terme, une prévention des complications neurologiques telles que l'œdème cérébral, l'augmentation de la pression intracrânienne et l'épilepsie ainsi que des complications générales (embolie pulmonaire, thrombose veineuse) est mise en place.

4) Une rééducation adaptée des patients (kinésithérapie, orthophonie, ergothérapie) s'est montrée efficace, d'autant plus qu'elle est initiée précocement après l'AVC.

5) Enfin, une prévention secondaire des récurrences est essentielle et passe par l'instauration de règles hygiéno-diététiques et d'un traitement chronique adapté à la cause de l'AVC. L'American Heart Association, l'American Stroke Association et l'European Stroke Organization préconisent ainsi le contrôle de l'HTA, de la glycémie, de la cholestérolémie, l'arrêt du tabagisme et la prise en charge des éventuelles pathologies cardiaques. En termes de traitement médicamenteux, l'instauration d'un traitement anti-thrombotique/antiagrégant plaquettaire (aspirine à faible dose (75-325 mg/jour), clopidogrel (75 mg/jour) ou association aspirine/dipyridamole) recommandée par l'HAS diminue fortement la menace de récurrence.

V. Physiopathologie de l'ischémie cérébrale

1. Evolution de la lésion après l'ischémie

Le cerveau est l'organe qui, proportionnellement à sa masse (2% de la masse corporelle), consomme le plus d'oxygène et de glucose, ce qui le rend particulièrement sensible aux variations du débit sanguin. Au cours de l'ischémie, la chute de débit sanguin qui s'opère permet de distinguer deux régions (voir pour revue Fisher et al., 2012 ; Catanese et al., 2017, figure 3).

Le cœur de l'ischémie, dont la chute de débit sanguin atteint des valeurs inférieures à 7ml/100 g/min (les valeurs normales étant de 50 à 60 ml/100g/min), est caractérisée par une activité nécrotique importante qui entraîne des dommages tissulaires irréversibles (Mehta et al., 2007).

La zone de pénombre, située en périphérie du cœur de la lésion, présente quant à elle une chute du débit sanguin comprise entre 7 et 17 ml /100 g/min. Hossmann a décrit cette zone comme une région qui présente un déficit d'irrigation mais dont le métabolisme énergétique reste préservé (Hossmann et al., 1994). Ginsberg et Pulsinelli ont modifié cette définition, et ont suggérés que le métabolisme énergétique dans cette zone pourrait être compromis par intermittence (Ginsberg et Pulsinelli et al., 1994).

En effet, dans cette zone, les cellules sont en souffrance mais leur métabolisme est encore actif grâce au débit sanguin résiduel. Cette zone présente cependant un dysfonctionnement électrique, énergétique et de synthèse. Ainsi, si une reperfusion du tissu s'opère rapidement après l'ischémie, les cellules de la zone de pénombre pourront survivre et retrouver une activité normale. Dans le cas d'une absence de reperfusion ou d'une reperfusion tardive, ces cellules vont mourir, ce qui entraînera une extension de la lésion de manière irréversible dans cette zone de pénombre. Ainsi, la zone de pénombre représente la cible tissulaire qu'il est possible de sauver après reperfusion par le rt-PA.

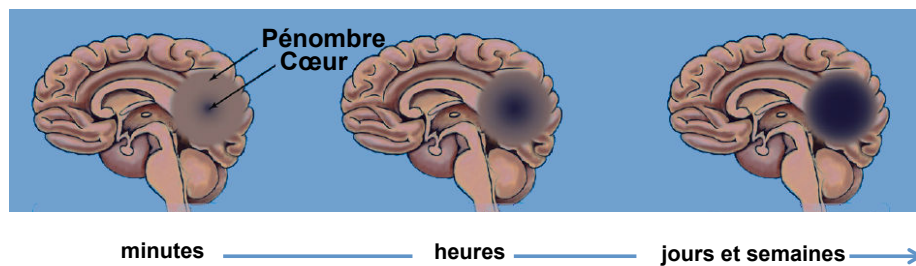


Figure 3 : Evolution spatio-temporelle de la lésion post-ischémique (d'après Catanese et al., 2017)

2. Mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'ischémie

La lésion cérébrale d'origine ischémique est le résultat d'une cascade d'évènements se succédant dans le temps et dans l'espace (voir pour revues Pinard et Engrand, 1999 ; Durukan et Tatlisumak, 2007 ; Brouns et De Deyn, 2009 ; Khoshnam et al., 2017). Très rapidement, dans les premières minutes qui suivent l'AVC et la déplétion énergétique, intervient le mécanisme d'excitotoxicité, suivi du stress oxydant, puis, plus tardivement, de la phase d'inflammation (Dirnagl *et al.*, 1999, figure 4).

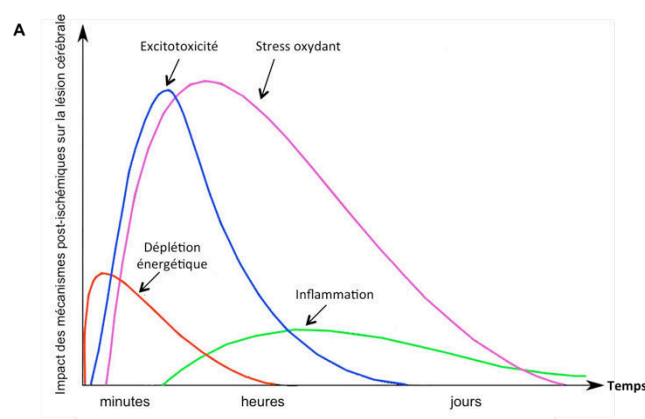


Figure 4 : Évolution spatio-temporelle des principaux mécanismes d'ischémie cérébrale (d'après Dirnagl et al., 1999)

A) L'excitotoxicité

Au cours de l'ischémie, la chute brutale du débit sanguin et donc des apports en oxygène et glucose au cerveau entraîne au niveau cellulaire, une défaillance de la phosphorylation oxydative, et donc de la synthèse mitochondriale d'ATP. Ceci affecte le fonctionnement des canaux ioniques ATP-dépendants, notamment des pompes Na^+/K^+ et Ca^{2+} ; une dépolarisation de la membrane plasmique est alors observée, ce qui déclenche la libération accrue de neuromédiateurs, en particulier de glutamate, principal acide aminé excitateur. Cette libération accrue associée à un défaut de recapture du glutamate par les transporteurs provoque son accumulation dans le milieu extracellulaire. Le glutamate se fixe ensuite à ses récepteurs qui sont de deux types : métabotropique et ionotropique.

Il existe trois sous-types de récepteurs ionotropiques : les récepteurs kaïnate, les récepteurs AMPA (acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque) et les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-Aspartate) (Gielen et al., 2010), les récepteurs NMDA étant les plus impliqués au cours de l'ischémie cérébrale. En effet, l'activation de ces récepteurs par le glutamate accroît l'entrée du Na^+ et du Ca^{2+} dans la cellule, ce qui favorise l'entrée d'eau dans la cellule et la formation d'un œdème cytotoxique observé à un stade précoce après induction de l'ischémie (Dirnagl et al., 1999). Par ailleurs, l'augmentation des taux de calcium intracellulaire conduit à l'activation d'enzymes calcium dépendantes telles que la calpaïne, les endonucléases, la NO-synthase neuronale (NOSn ou NOS-1), la phospholipase A2, les cyclo-oxygénases (COX-1,-2) et la xanthine oxydase. L'ensemble de ces événements excitotoxiques signent le point de départ d'autres processus délétères post-ischémiques (stress oxydant et inflammation), et conduit également à la mort de la cellule par nécrose (Durukan et Taltisumak, 2007) (figure 5).

B) Stress oxydant et nitrant

Le stress oxydant et le stress nitrant sont observés lorsque la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote surpasse les capacités de neutralisation par les systèmes endogènes antioxydants enzymatiques (glutathion peroxydase, superoxyde dismutase et catalase) ou non enzymatiques (glutathion, vitamines E et C) (Chen et al., 2011). Ces radicaux libres oxydants et nitrants incluent notamment l'anion superoxyde (O_2^-), le monoxyde d'azote (NO), les radicaux

hydroxyl (OH⁻) auxquels on associe le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et enfin les anions peroxytrinitres (ONOO⁻) issus de la combinaison des radicaux O₂⁻ et ·NO (Pinard et Engrand, 1999).

Au cours de l'ischémie, le taux de radicaux libres est excessivement élevé. Les mécanismes impliqués dans leurs formations sont l'excitotoxicité médiée par les récepteurs NMDA, l'excès d'afflux de Ca²⁺ dans la cellule, le dysfonctionnement mitochondrial, l'activation de la NO-synthase neuronale et des COX et enfin l'infiltration des monocytes/macrophages.

Ainsi, le stress oxydant post-ischémique induit une peroxydation des lipides membranaires, une oxydation des protéines cellulaires, une augmentation du calcium intracellulaire, des lésions structurelles du cytosquelette et des cassures de l'ADN, ce qui participe à la mort cellulaire (figure 5).

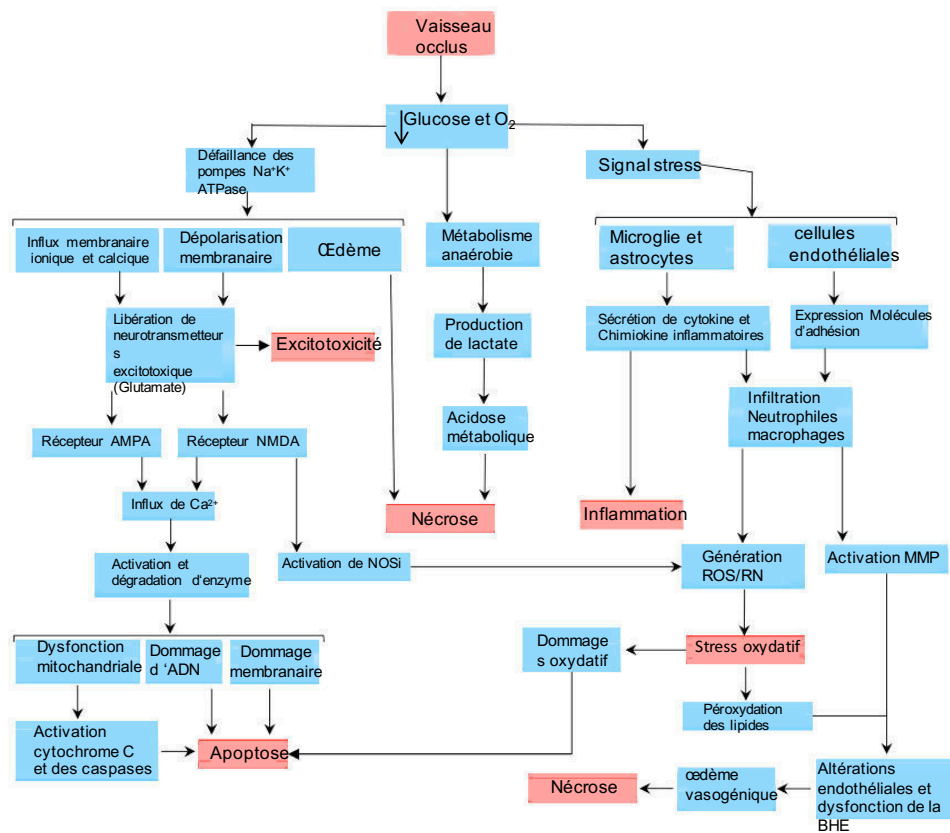


Figure 5 : Mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale (adaptée d'après Khoshnam et al., 2017)

C) L'inflammation

Contrairement aux processus physiopathologiques décrit précédemment, l'inflammation est un processus dont l'installation est plus tardive, puisqu'elle est en partie une conséquence directe de l'excitotoxicité, du stress oxydant et de la nécrose cellulaire (figure 5 et 6). Elle est caractérisée par une activation de facteurs de transcription tels que HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) et NF-κB

(nuclear factor- κ B), qui entraînent une augmentation de la synthèse de NO et de l'expression de la COX-2, ainsi qu'une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF et l'IL1- β (Dirnagl et al., 1999). Ces dernières sont impliquées dans l'activation de la microglie, elle-même productrice de cytokines.

L'ensemble des cytokines libérées induit l'expression de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales, notamment ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1), et les P- et E-sélectines. Ces molécules permettent l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium, ce qui entraîne leur infiltration au sein du parenchyme cérébral.

Quelques heures après l'ischémie, les polynucléaires neutrophiles sont les premiers à arriver dans le tissu ischémié. Ils sont suivis par les monocytes après quelques jours (Durukan et Taltisumak, 2007).

Les leucocytes infiltrés ainsi que la microglie sont des réservoirs importants de médiateurs pro-inflammatoires tels que les métalloprotéases de la matrice (MMP), la NOS inductible (NOSi ou NOS-2) et la COX-2. Ils ont également la capacité de libérer d'autres types de cytokines, dites alarmines dont la protéine HMGB1. Libérées entre autres par les cellules nécrosées, HMGB1 exerce de plus un effet chimiokine favorisant le recrutement de cellules de l'immunité au niveau de la lésion.

Ces différents événements pro-inflammatoires participent à la formation de l'œdème cérébral, à l'apparition d'hémorragies et à la maturation de la lésion après ischémie.

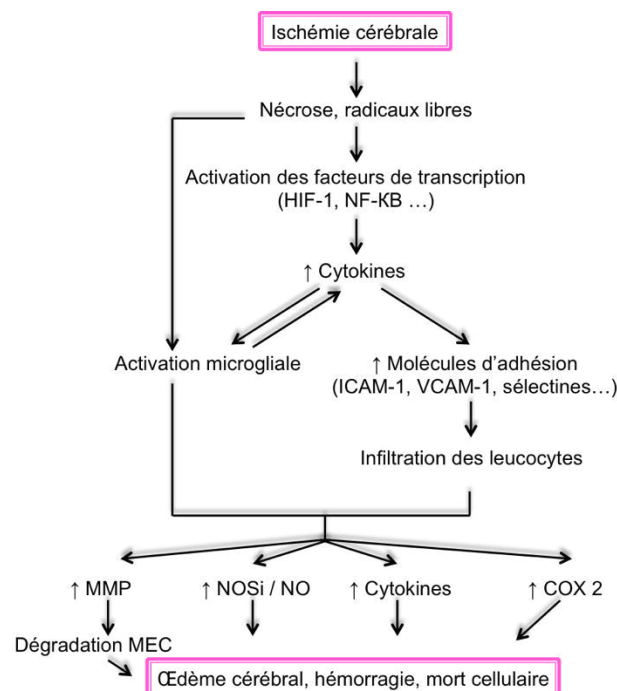


Figure 6 : Mécanismes inflammatoires post-ischémiques (adaptée d'après Wang et al., 2007a)

HIF-1 : hypoxia inducible factor 1 ; NF- κ B : nuclear factor- κ B ; ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1 ; VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1 ; MMP : métalloprotéases de la matrice ; NOSi : NO synthase inductible ; COX2 : cyclooxygénase de type2 ; MEC : matrice extracellulaire.

DEUXIÈME CHAPITRE : LA THROMBOLYSE PAR LE rt-PA

La thrombolyse par l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA) ou altéplase, commercialisé sous le nom d'Actilyse®, représente actuellement le seul traitement pharmacologique autorisé dans la prise en charge thérapeutique des AVCi. Le rt-PA est administré dans le but de lyser le caillot à l'origine de l'ischémie cérébrale et par conséquent de permettre une reperfusion du tissu ischémié (voir pour revue Vivien et al., 2011).

I. Structure et rôle biologique du t-PA

1. Structure du t-PA

Au niveau cellulaire, le t-PA, qui est la forme endogène du rt-PA, est stocké dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, mais également dans de petits granules de stockage contenus dans les cellules endothéliales et les neurones, et de manière plus controversée, dans les cellules gliales (Kruithof et Dunoyer-Geindre, 2014).

Le t-PA est une glycoprotéine synthétisée dans la cellule et qui est libérée dans le milieu extracellulaire sous forme de sct-PA (« single chain t-PA ») car composé d'une seule chaîne polypeptidique de 69 kDa (527 acides aminés). Le sct-PA contient 5 domaines comme l'illustre la figure 7 (Vivien et al., 2011) : Le domaine « Finger » appelé également le domaine fibronectine est impliqué dans la liaison du t-PA à la fibrine et la formation du complexe avec le plasminogène (Kagitani et al., 1985), il permet également l'interaction du t-PA avec divers récepteurs notamment les récepteurs LRP (Low Density Lipoprotein Receptrot Related Protein) et Annexine II (Bu et al., 1992 ; Hajjar et al., 1994). Le second domaine est le domaine « EGF » (Epidermal Growth factor) qui stabilise le site catalytique du t-PA et qui est impliqué, avec le domaine « Finger », dans la clairance hépatique du t-PA (Bu et al., 1994). La suite de la séquence comprend les domaines « Kringle 1 et 2 » caractérisés par la présence d'une séquence LBS (Lysine Binding Domain) qui n'est cependant fonctionnelle qu'au niveau de Kringle 2. Ce site LBS situé sur le Kringle 2 permet la liaison du t-PA à avec le plasminogène comme le domaine Finger. Il lui permet également de se lier à des récepteurs tels que le PDGF-CC (Platelet Derived Growth Factor-CC) et les récepteurs NMDA (Hebert et al., 2016). Les quartes domaines (Finger, EGF, K1 et K2) forment la chaîne lourde du t-PA. La chaîne, dite « chaîne légère », contient le domaine protéasique qui porte le site actif. Ces deux chaînes se

séparent lorsque le sct-PA libéré dans le milieu extracellulaire est clivé par la plasmine en tct-PA (« two-chain t-PA »). Elles restent tout de même reliées par un pont disulfure (Vivien et al., 2011 ; Hebert et al., 2016) (figure 7).

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

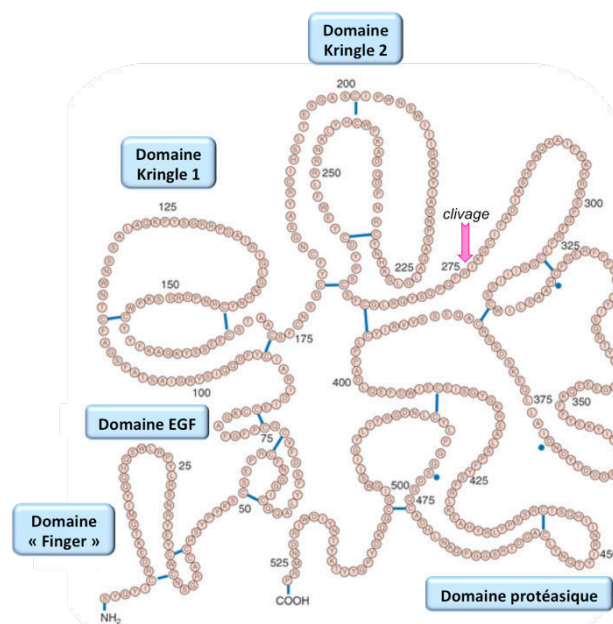


Figure 7 : Structure du t-PA (d'après Acheampong et Ford, 2012)

La flèche indique le site de clivage permettant la conversion du sct-PA (simple chaîne) en tct-PA (double chaîne).

2. Rôle biologique du t-PA

L'équilibre hémostatique est maintenu grâce à deux systèmes la fibrinolyse et la coagulation. La fibrinolyse consiste en une cascade d'activation d'enzymes protéolytiques dont la finalité est la dégradation du caillot de fibrine. Le t-PA, est une sérine protéase qui clive et transforme le plasminogène (proenzyme inactive) en plasmine (sérine protéase active). La plasmine ainsi générée est capable de dégrader les polymères de fibrine insolubles (figure 8).

Notons que le t-PA libéré en conditions physiologiques participe à diverses fonctions telles que la plasticité synaptique, la migration neuronale et l'angiogenèse (voir pour revue (Kruithof et Dunoyer-Geindre, 2014) mais son rôle principal concerne son implication dans la fibrinolyse.

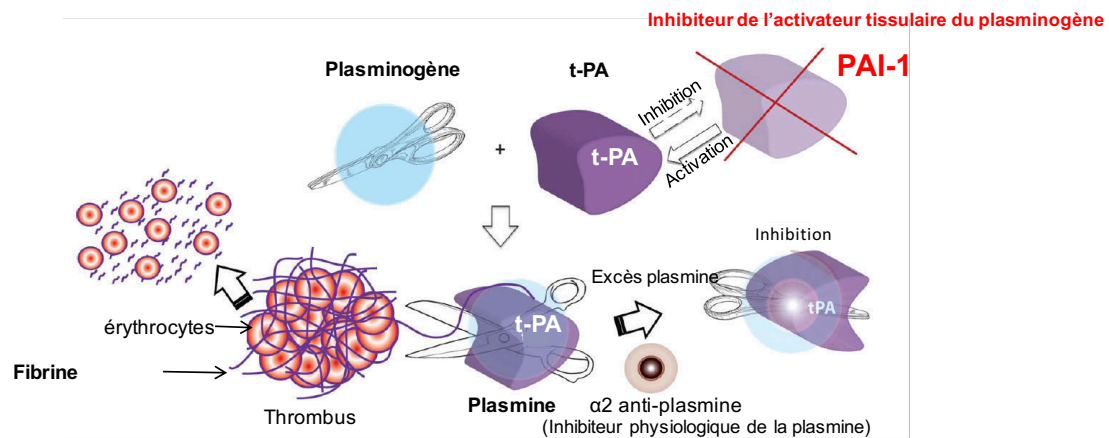


Figure 8 : Fibrinolyse du caillot de fibrine par le rt-PA (adaptée d'après Gurman et al., 2015)

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

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

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

II. La thrombolyse par le rt-PA

1. Données cliniques

La thrombolyse par le rt-PA a d'abord été utilisée dans le traitement de l'infarctus du myocarde avec une autorisation d'utilisation en 1987 puis pour l'embolie pulmonaire en 1990. Ce n'est qu'en 1996 que la FDA a autorisé son utilisation pour le traitement des AVCi.

Une des études cliniques clés réalisée un an auparavant ayant permis l'évaluation de l'efficacité du rt-PA dans cette indication est l'étude NINDS (National Institute of Neurological Disorders and Stroke). Cette étude avait montré que l'administration du rt-PA (0,9 mg/ml, bolus de 10% de la dose suivi d'une perfusion de 60 minutes) 3 heures après l'ischémie améliorait l'état neurologique des patients à 24 heures et l'effet était encore plus significatif à 3 mois post-ischémie. Suite aux résultats de cette première étude, l'étude ATLANTIS (Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke) a été lancée afin d'évaluer l'effet du rt-PA avec une fenêtre thérapeutique plus large. Cependant, les résultats ne montraient aucun effet bénéfique du rt-PA administré au-delà de 3 heures après l'ischémie. Cette étude a même mis en évidence une augmentation des hémorragies intracérébrales dites transformations hémorragiques (TH). En Europe, l'Agence Européenne du Médicament (AEM) a tout d'abord autorisé l'utilisation du rt-PA dans une fenêtre thérapeutique de 3 heures après ischémie suite aux résultats de deux essais cliniques ECASS I et II (European Cooperative Acute Stroke Study). Suite à un troisième essai clinique ECASS III réalisé entre 2003 et 2007, le délai d'administration a été élargi à 4h30.

En France, le rt-PA est aujourd'hui commercialisé sous le nom d'Actilyse® par le laboratoire Boehringer. Il est administré à la dose de 0,9 mg/ml (bolus de 10 % puis perfusion durant 60 minutes) dans un délai de 4h30 à partir de l'apparition des symptômes d'un AVC ischémique. Cependant, son utilisation est limitée puisque moins de 2% des patients bénéficient réellement d'une thrombolyse par le rt-PA (Mahagne et al., 2008 ; Cronin et al., 2010) notamment à cause de ses multiples contre-indications et d'une prise en charge souvent tardive des patients.

Par ailleurs, même si le patient remplit toutes les conditions d'éligibilité à une thrombolyse par le rt-PA, le traitement peut ne pas être efficace. En effet, il a été montré que seuls 22 à 30% des patients traités par le rt-PA présentent une recanalisation complète ; pour 23 à 48 % des patients, la recanalisation n'est que partielle, et chez 22 et 41 % des patients, aucune recanalisation n'est observée (Christou et al., 2000 ; Alexandrov et Grotta, 2002 ; Rubiera et al., 2005 ; Saqqur et al.,

2007). Enfin, l'administration de rt-PA peut ne pas être totalement bénéfique notamment en raison de la toxicité neuronale et vasculaire que présente ce thrombolytique.

2. Toxicité du rt-PA

Le rt-PA est capable de franchir la barrière hématoencéphalique (BHE), qu'elle soit intacte ou altérée par l'ischémie (Benchenane et al., 2005a, 2005b). Une fois dans le parenchyme cérébral, le rt-PA exerce une toxicité neuronale : il aggrave les phénomènes d'excitotoxicité post-ischémique en activant notamment les récepteurs NMDA (Nicole et al., 2001). Cette excitotoxicité associée au stress oxydant, à la mort cellulaire (apoptose et nécrose) et à l'activité inflammatoire post-ischémiques sont responsables d'effets délétères au niveau de l'unité neurovasculaire constituée non seulement de cellules endothéliales, mais également d'astrocytes, de péricytes, de neurones et de la matrice extracellulaire (Rosell et al., 2008). La conséquence directe de ces effets sur l'unité neurovasculaire est la perte de l'intégrité de la BHE et une augmentation de sa perméabilité, ce qui entraîne l'apparition d'un œdème et de transformations hémorragiques. Ainsi, les transformations hémorragiques qui peuvent être observées de façon spontanée à la suite d'un AVC ischémique, sont augmentées après une thrombolyse par le rt-PA. Cette augmentation du risque de survenue des TH représente aujourd'hui une des complications majeures de ce thrombolytique (Hacke et al., 2004).

En clinique, des études ont montré que le rt-PA pouvait augmenter de 6, 10 ou 20 fois le risque de survenue d'hémorragies chez les patients victimes d'AVCi (NINDS, 1995 ; Hacke et al., 2004 ; 2008). Ces hémorragies sont associées à un mauvais pronostic clinique. Il est en effet à noter qu'au cours de l'essai NINDS, un taux de mortalité de 75% chez les patients présentant des TH été observé à 3 mois. Cependant, aucune donnée clinique n'a encore mis en évidence une corrélation entre le délai d'administration du rt-PA et la fréquence ou la sévérité des TH (Hacke et al., 2004).

A) Toxicité vasculaire/endothéliale du rt-PA

Plusieurs mécanismes ont été identifiés comme étant impliqués dans l'altération de la BHE et l'apparition des transformations hémorragiques à la suite du traitement par le rt-PA (voir pour revue Wang et al., 2015 ; Suzuki et al., 2016 ; Turner et al., 2016 ; Kanazawa et al., 2017) :

- Une aggravation du stress oxydant initié à la suite de l'ischémie.

La reperfusion du tissu s'accompagne d'une augmentation de la production et de la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), responsables d'une altération de l'unité neurovasculaire (Gürsoy-Ozdemir et al., 2004 ; Brennan et al., 2009 ; Girouard et al., 2009). Les ERO ciblent plus particulièrement les cellules endothéliales, les péricytes, les cellules musculaires lisses et les astrocytes. Ainsi, après une thrombolyse par le rt-PA, il existerait une aggravation du stress oxydant qui participerait à l'altération de l'endothélium et à l'apparition de TH. De plus, le rt-PA augmenterait l'adhésion et la dégranulation des PMN, qui sont des sources de radicaux libres et de cytokines (Cuadrado et al., 2009 ; Montrucchio et al., 1996).

Plusieurs traitements antioxydants ont montré un effet neuroprotecteur dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale (voir pour revue Margail et al., 2005 ; Amaro et al., 2011). Ces stratégies antioxydantes visent à éliminer par chélation les radicaux libres, inhiber leur production ou augmenter leur dégradation. Quelques uns de ces composés ont été testés en association avec le rt-PA après l'ischémie. Le NXY-059 (Cerovive), un agent chélateur de radicaux libres, qui avait montré un effet neuroprotecteur prometteur dans les modèles d'ischémie (Lapchak et al., 2002) n'a malheureusement pas apporté d'effet bénéfique au cours des essais cliniques SAINT I et SAINT II avec ou sans rt-PA. L'analyse combinée des essais de SAINT I et SAINT II n'a pas montré d'effet sur la réduction des TH chez les patients (Diener et al., 2008). L'acide urique, un autre antioxydant, ayant montré des effets bénéfiques dans un modèle d'ischémie après traitement par le rt-PA, n'a cependant pas montré d'effets bénéfiques chez les patients (Romanos et al., 2007 ; Chamorro et al., 2014 ; Amaro et al., 2016). Enfin, dans l'essai PROTECT4.5 l'association de l'edaravone, un autre chélateur de radicaux libres, à la thrombolyse par le rt-PA a permis de diminuer les TH par rapport au rt-PA seul (Kimura et al., 2012 ; Yamaguchi et al., 2017).

➤ Une activation des MMP.

Le rt-PA provoque une activation des MMP qui peuvent non seulement dégrader la matrice extracellulaire mais également les protéines de jonction endothéliales telles que la claudine et l'occludine (Yang et al., 2007a ; Wechsler et al., 2011 ; Del Zoppo et al., 2013 ; Wang et al., 2015). Dans les modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale, il a été mis en évidence une augmentation de l'expression et de l'activité de plusieurs types de MMP dont les MMP-2 (gélatinase A), -3 (stromelysin-1), et -9 (gélatinase B) après administration de rt-PA (Sumii et Lo, 2002 ; Wang et al., 2004 ; Suzuki et al., 2011 ; Lenglet et al., 2014). De plus, l'inhibition des MMP a permis de diminuer

les TH induites par le rt-PA. En clinique, il a été mis en évidence une corrélation entre les taux plasmatiques de MMP-9 et la survenue de TH chez les patients traités par le rt-PA (Montaner et al., 2003). L'augmentation des MMP peut être induite par le rt-PA *via* différents mécanismes :

- ✚ Le rt-PA et la plasmine sont capables de cliver et donc d'activer directement les pro-MMP (Lijnen, 2001 ; Suzuki et al., 2007 ; Lukic-Panin et al., 2010).
 - ✚ Le rt-PA augmente l'adhésion et la dégranulation des PMN qui sont des réservoirs importants de MMP-9 (Cuadrado et al., 2009 ; Montrucchio et al., 1996).
 - ✚ Le rt-PA se lie aux récepteurs LRP-1 exprimés par les cellules endothéliales et entraîne ainsi une augmentation de l'expression et de l'activité des MMP (Wang et al., 2003 ; Yepes et al., 2003 ; Zhang et al., 2007a ; Suzuki et al., 2009).
- Une action pro-inflammatoire.

Le rt-PA active la microglie *via* le récepteur LRP et l'annexine II (Siao et al., 2002 ; Zhang et al., 2009). La microglie ainsi activée est à l'origine d'un chimiotactisme qui favorise le recrutement des monocytes (Sheehan et al., 2007). De plus, les microglies sont de véritables réservoirs de MMP-9 dont la sécrétion peut être induite par le rt-PA *via* le récepteur LRP (Del Zoppo et al., 2012). Le rt-PA favorise également l'expression des molécules d'adhérence ICAM-1, E- et P-sélectines *in vivo* après l'ischémie, ce qui favorise l'infiltration leucocytaire (Zhang et al., 1999).

- Une induction et une activation du facteur de remodelage vasculaire VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

Le VEGF participe à l'angiogenèse et au remodelage vasculaire en augmentant la prolifération et la migration des cellules endothéliales mais également l'hyperperméabilité vasculaire (Senger et al., 1996 ; Hermann et Zechariah, 2009). Il est aujourd'hui bien établi que le VEGF augmente la perméabilité de la BHE après ischémie (Zhang et al., 2000 ; Abumiya et al., 2005) en régulant notamment l'expression des protéines de jonction (Fischer et al., 2002). L'inhibition du VEGF à la suite de l'ischémie réduit en effet l'expression de la MMP-9, la dégradation des composants de la BHE et sa perméabilité, ainsi que les TH induites par le rt-PA (Kanazawa et al., 2011 ; Suzuki et al., 2015).

- Une potentialisation de l'apoptose *via* l'activation des caspases 8 et 9 qui activent à leur tour la caspase 3.

En effet, il a été montré que l'inhibition de l'activité des caspases induites par le rt-PA après traitement par la protéine C activée réduisait les TH (Liu et al., 2004 ; Cheng et al., 2006).

Au vu de cette toxicité vasculaire du rt-PA responsable de l'apparition des TH, il est nécessaire de caractériser des marqueurs biologiques qui permettront de détecter ces effets chez les patients. Même si l'imagerie par IRM reste le meilleur moyen d'apprécier ces TH, l'utilisation de biomarqueurs facilement dosables dans les liquides biologiques (plasma, sérum, urine) pourrait être particulièrement intéressante. Parmi les marqueurs étudiés, citons les taux plasmatiques de MMP-9, ceux de calcium fixé à la protéine cytoplasmique astrogliale S100B, de TAFI (Thrombin Activated Fibrinolysis Inhibitor), de PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1), de F2-isoprostanes (radicaux libres induisant la peroxydation de l'acide arachidonique au niveau neuronal). Cependant aucun de ces marqueurs n'a encore été validé en clinique (voir pour revue Wang et al., 2015).

B) Toxicité neuronale

La toxicité neuronale du rt-PA est aujourd'hui bien établie. Elle implique principalement la potentialisation de l'activation des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartat) provoquant un stress excitotoxique (voir pour revues Yepes et al., 2009 ; Kaur et al., 2004 ; Vivien et al., 2011 ; Chevilly et al., 2015 ; Docagne et al., 2015). En effet, au cours de l'ischémie cérébrale le rt-PA traverse la BHE et se retrouve dans le parenchyme cérébral (Benchenane et al., 2005a, 2005b). Il est alors capable d'interagir *via* son domaine « Kringle 2 » avec la sous unité GluN1 des récepteurs NMDA et entraîner son clivage, ce qui potentialise leur activation et par conséquent le phénomène excitotoxique (Nicole et al., 2001 ; Fernandez-Monreal et al., 2004 ; Kvajo et al., 2004). Paradoxalement, Samson et collaborateurs ont montré que l'activation des récepteurs NMDA par le t-PA sur les cultures de neurones corticaux ne nécessite pas un clivage de la sous unité GluN1 (Samson et al., 2008).

Par ailleurs, des études montrent que cet effet est plasmine indépendant (Samson et al., 2008 ; Echeverry et al., 2010 ; Parcq et al., 2012), alors que d'autres études suggèrent le contraire (Matys et al., 2003). La plasmine serait elle-même capable de cliver la sous unité GluN2A des récepteurs NMDA et ainsi augmenter sa fonction (Yuan et al., 2009).

Le rt-PA peut également potentialiser l'activation des récepteurs NMDA sans clivage de la sous unité GluN1 ou du plasminogène et cela en se fixant sur un autre type de récepteurs, les LRP1 (Low receptor Protein 1) (Samson et al., 2008). De plus, il a été montré que l'activation des récepteurs LRP1 et annexine II, entraîne une activation des cellules microgliales à l'origine d'une augmentation de la NOSi, ce qui enclenche une réaction inflammatoire contribuant ainsi à la neurotoxicité du rt-PA (Zhang et al., 2009 ; Siao et Tsirka, 2002).

III. Alternatives à la thrombolyse par le rt-PA

L'ensemble des données que nous venons de développer montre la complexité de la thrombolyse par le rt-PA pour le traitement d'un AVC ischémique. De plus, hormis le risque hémorragique, l'efficacité du rt-PA reste incertaine. Comme décrit précédemment, une absence de recanalisation est observée chez un tiers des patients. De plus, la recanalisation d'un vaisseau peut être associée à une hypoperfusion ou une absence de reperfusion. Cette hypoperfusion peut être la conséquence de phénomènes de réocclusion, qui selon Saqqur et collaborateur est retrouvé chez 30% des patients qui présentent une recanalisation après thrombolyse (Saqqur et al., 2007). Ainsi la formation de micro-thrombi secondaires peut être la conséquence d'une fragmentation du caillot par le rt-PA. Les fragments du caillot dits « emboles » peuvent migrer dans le réseau vasculaire en aval de l'occlusion et se loger dans des zones difficilement accessibles par le rt-PA (Jiang et al., 2000 ; Balami et al., 2013). Ces micro-thrombi peuvent également se former *in situ*. Quelle que soit leur origine, ces micro-thrombi entraînent des lésions tissulaires secondaires. Hormis les phénomènes de réocclusion, l'altération de la réactivité vasculaire (Cipolla et al., 2000 ; Nassar et al., 2004) et/ou la compression du vaisseau par un œdème peuvent influencer la qualité de la reperfusion tissulaire (Koudstaal et al., 1988 ; Ishiguro et al., 2010 ; Garcia Yébenes et al., 2011 ; Won et al., 2014 ; Zuo et al., 2014). L'ensemble de ces phénomènes peut ainsi expliquer l'inefficacité de la thrombolyse observée chez certains patients (Khatri et al., 2005 ; Dalkara et Arsava, 2012).

Actuellement, les principales stratégies de recherche visent d'une part à améliorer l'efficacité de la thrombolyse par le rt-PA (altéplase) et d'autre part à réduire ses effets délétères (transformations hémorragiques et toxicité neuronale). Par ailleurs, une autre alternative est le développement de nouveaux thrombolytiques (voir pour revue Gurman et al., 2015 ; Parsons et al., 2012 ; Albers et al., 2015) :

- Le ténecteplase présente une demi vie plus longue que l'alteplase (20-40 minutes), une meilleure spécificité d'action sur la fibrine et une plus grande résistance au PAI, inhibiteur endogène du t-PA. Il a été approuvé par la FDA pour le traitement de l'infarctus du myocarde en l'an 2000 (essais ASSENT2, Van de Werf et al., 1999). En ce qui concerne les AVC ischémiques, il a été montré dans un essai en phase IIb comparant le ténecteplase à l'alteplase un taux de reperfusion plus élevé avec le ténecteplase ainsi qu'une amélioration clinique à 24 heures et à 3 mois. Toutefois, le taux de transformations hémorragiques n'était pas modifié (Bivard et al., 2017).

- Le desmotéplase présente la durée de demi vie la plus longue (4 heures), une forte sélectivité pour la fibrine ainsi qu'une faible neurotoxicité. L'essai clinique en phase III DIAS4 (Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke) a montré que l'administration du desmotéplase en i.v bolus 90 µg/kg entre 3-9 heures après ischémie cérébrale n'était pas toxique, augmentait la recanalisation artérielle par rapport au placebo mais sans amélioration clinique associée. Le taux de transformations hémorragiques n'était cependant pas plus élevé que chez les patients ayant reçu le placebo (Von Kummer et al., 2016).

- Le Stachybotrys microspora phenol-7 (SMTP7) est un autre agent thrombolytique qui pourrait être un bon candidat en clinique. Il est extrait des microspores du champignon Stachybotrys. Il promeut la conversion du plasminogène en plasmine par l'urokinase, augmentant ainsi la thrombolyse dans les modèles d'ischémie chez le rongeur et le primate. Il diminue également la neuroinflammation et entraîne une réduction du volume d'infarctus, des TH, de la mortalité et du déficit neurologique (Miyazak et al., 2011 ; Ito et al., 2014 ; Sawada et al., 2014).

Par ailleurs, il existe des formes modifiées du t-PA dont le sc*-t-PA une forme non clivable de la chaîne simple, et le K2*-t-PA qui possède un domaine « Kringle 2 » modifié. La caractérisation de ces deux nouvelles formes de t-PA est particulièrement encourageante puisque ces formes présentent une neurotoxicité plus faible que celle du rt-PA tout en possédant une bonne activité fibrinolytique (Parcq et al., 2013).

Une autre stratégie ayant pour but d'améliorer l'efficacité de la thrombolyse par le rt-PA est son administration par voie intra-artérielle. Une méta-analyse a montré que le taux de recanalisation après administration par cette voie est beaucoup plus élevé que lors d'une administration

intraveineuse (Rha et Saver, 2007). Par ailleurs, une thrombolyse mécanique peut être envisagée en cas de contre-indication ou d'échec de la thrombolyse intraveineuse et/ou intra-artérielle (Khalessi et al., 2011). Son utilisation a été approuvée par la FDA aux Etats Unis en 2004, et en France elle est conseillée chez les patients non éligibles au rt-PA. Cette pratique présente cependant plusieurs inconvénients, notamment un risque infectieux, un risque hémorragique, de dissection du vaisseau, d'hématome voire de fragmentation du caillot (avec un risque de réocclusion) (Rha et Saver et al., 2007).

Un autre axe de recherche s'intéresse à l'association au rt-PA de molécules capables de réduire sa toxicité vasculaire et neuronale. Dans cette optique, plusieurs molécules ont été évaluées en préclinique dont des agents anti-oxydants comme l'edaravone, des inhibiteurs de MMP ou des anti-VEGF (voir pour revue Kanazawa et al., 2017).

Par ailleurs, afin de développer des stratégies efficaces, une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la toxicité du rt-PA est nécessaire. Dans les deux chapitres qui suivent, nous nous sommes focalisés sur deux entités qui pourraient être impliquées dans les effets délétères du rt-PA : tout d'abord, les microvésicules endothéliales (MVE) qui sont de plus en plus considérées comme des marqueurs et acteurs de la dysfonction endothéliale. Ensuite, HMGB1, une alarmine décrite comme une cytokine inflammatoire qui est impliquée dans l'inflammation post-ischémique et capable d'altérer la barrière hémato-encéphalique.

TROISIÈME CHAPITRE : LES MICROVÉSICULES ENDOTHÉLIALES

Les **microvésicules (MV)**, appelées également microparticules¹, sont des vésicules extracellulaires décrites pour la première fois par Chargaff et West en 1946 comme des précipités présents dans le plasma et possédant une activité procoagulante (Chargaff et al., 1946). Vingt ans plus tard, Wolf (1967) a identifié ces MV comme des poussières entourant les plaquettes sanguines activées, « Platelet Dust ». Ces poussières correspondaient à des fragments membranaires riches en phospholipides capables de servir de support à la génération de thrombine dans un plasma sans plaquette (Wolf, 1967). Les MV ont pendant longtemps été considérées comme de simples débris cellulaires inertes résultant de la destruction cellulaire ou du turnover dynamique de la membrane plasmique (Cocucci et al., 2009). Récemment, grâce aux avancées majeures des techniques de détection, la caractérisation de ces microvésicules a permis de mettre en évidence leurs diverses origines cellulaires mais surtout leurs multiples propriétés biologiques. En effet, de nombreux travaux ont montré leur rôle crucial dans la coagulation, l'inflammation, la vasoréactivité et l'angiogenèse (Morel et al., 2004). Elles ont donc suscité un grand intérêt, notamment dans l'étude des processus physiopathologiques des maladies cardiovasculaires et thromboemboliques, mais également des maladies neurologiques, cancéreuses et auto-immunes.

Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux microvésicules d'origine endothéliale (MVE) comme marqueurs de la lésion/souffrance endothéliale. Pour mieux comprendre l'intérêt de ces MVE, les dernières données sur la structure, la biogénèse et la clairance des microvésicules sont introduites dans un premier temps. Il s'ensuit un résumé des méthodes d'analyse disponibles à ce jour pour la détection et le dosage des MV. Le rôle biologique des microvésicules d'origine endothéliale est ensuite développé. Enfin, leur intérêt en tant que marqueur et acteur de la lésion endothéliale au cours des AVC est précisé dans une dernière partie.

¹ Récemment, la Société Internationale des Vésicules Extracellulaires (International Society for Extracellular Vesicles) a recommandé l'utilisation du terme « Vésicules membranaires » comme terme générique pour tout type de vésicules présentes dans l'espace extracellulaire (Witwer et al., 2013). Nous avons donc décidé de remplacer le terme « Microparticule », utilisé notamment dans notre publication, par le terme « Microvésicule » dans le présent manuscrit.

I. Structure, origine, biogenèse et clairance des microvésicules

1. Structure et origine des microvésicules

A) Structure des microvésicules

Les microvésicules (MV) sont des vésicules membranaires dont la taille est comprise entre 0,1 et 1 μm . Elles sont libérées dans le milieu extracellulaire par bourgeonnement de la membrane plasmique des cellules activées ou en apoptose ; les MV sont donc constituées d'une partie de la membrane et du contenu de la cellule dont elles sont issues. Les microvésicules sont anucléées, entourées d'une bicouche lipidique intègre, non perméable. Elles sont considérées comme de vrais réservoirs de molécules bioactives telles que des acides nucléiques (ADN, ARNm, micro-ARN), des protéines, membranaires ou non, (récepteurs, cytokines, enzymes), des lipides, ainsi que des organites cellulaires (voir pour revue : Taraboletti et al., 2002 ; Boulanger et al., 2006 ; Dignat-George et Boulanger, 2011 ; Morel et al., 2011).

Une des principales caractéristiques structurales des MV est l'expression au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique de certains phospholipides membranaires dont les phosphatidylsérines (PS, dont nous reparlerons notamment dans le paragraphe 2.A).

B) Caractéristiques différentielles des microvésicules et des autres vésicules extracellulaires

Les microvésicules constituent, avec les exosomes et les corps apoptotiques, un ensemble plus large appelé **vésicules extracellulaires** (figure 9). Les caractéristiques différentielles de ces trois types vésiculaires sont détaillées dans le tableau 1 (voir pour revue : Mause et al., 2010 ; György et al., 2011 ; Burger et al., 2013 ; Yin et al., 2015).

➤ Les exosomes

Les exosomes, dont la taille est comprise entre 30 et 100 nm, sont produits par endocytose et stockés dans des corps multivésiculaires d'environ 0,5 μm de taille. Ces corps multivésiculaires fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent leurs exosomes dans le milieu extracellulaire.

Les exosomes expriment différents marqueurs spécifiques dont les tétraspanines (CD9, CD63, CD81), LAMP1 (Lysosomal-associated membrane protein 1) et TSG101 (Tumor susceptibility gene 101). Leur

contenu vésiculaire est riche en lipides, protéines, ARN messagers, micro-ARN mais il est dépourvu d'ADN. Contrairement aux microvésicules, les exosomes expriment très faiblement les phosphatidylsérines sur le feuillet externe (tableau 1).

➤ Les corps apoptotiques

Avec une taille comprise entre 1 et 5 μm , les corps apoptotiques constituent les vésicules extracellulaires les plus grandes. Ils sont principalement formés au cours des phases tardives de la mort cellulaire programmée ou apoptose après déformation et fragmentation de l'ADN.

Outre les différents organites cellulaires issus de leur cellule d'origine (mitochondries, réticulum endoplasmique), les corps apoptotiques contiennent de l'ADN fragmenté (tableau 1). De plus, ils expriment fortement les phosphatidylsérines sur le feuillet externe de leur bicouche lipidique. Cette bicouche lipidique est, contrairement à celle des MV, une membrane perméable. Ainsi, l'utilisation de l'iodure de propidium (IP) permet de les différencier des microvésicules. L'iodure de propidium, un colorant capable de diffuser à l'intérieur des corps apoptotiques et de s'intercaler entre les bases nucléiques de l'ADN, permet donc le marquage des corps apoptotiques et leur détection en cytométrie (Hristov et al., 2004).

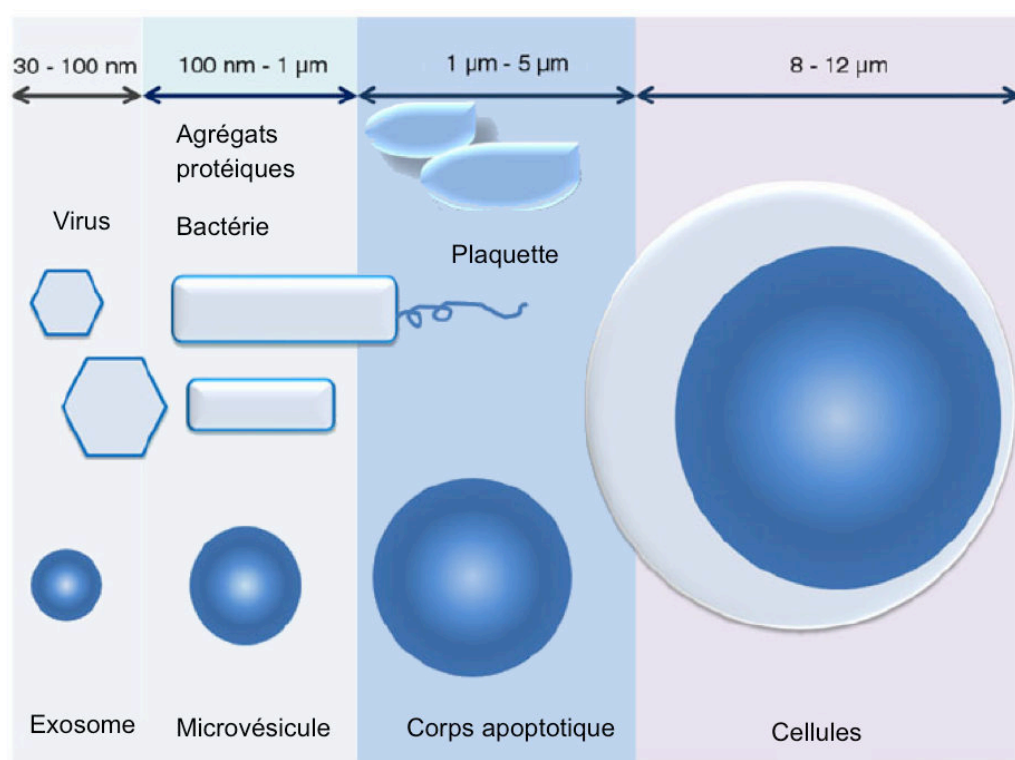


Figure 9 : Tailles des différentes vésicules extracellulaires (d'après György et al., 2011)

La taille des exosomes est équivalente à celle d'un virus. Les microvésicules ont une taille semblable à celle d'une bactérie ou d'agrégats de protéines. Les corps apoptotiques et les plaquettes présentent des tailles du même ordre de grandeur.

	Exosomes	Microvésicules	Corps apoptotiques
Taille	30 -100 nm	100 nm - 1 µm	1 µm -5 µm
Densité (g/ml)	1,16 - 1,28	1,04 -1,07	1,13 - 1,19
Origine	Fusion des corps multi-vésiculaires avec la membrane plasmique	Bourgeonnement de la membrane plasmique	Fragments cellulaires
Production	Constitutive et/ou activation cellulaire	Activation cellulaire et/ou apoptose précoce	Apoptose avancée
Composition	Protéines, ARN, microARN	Protéines, ARN, ADN, microARN, lipides	Organites cellulaires, protéines, ADN, ARN, microARN
Perméabilité membranaire	Membrane imperméable (IP négatif)	Membrane imperméable (IP négatif)	Membrane perméable (IP positif)
Marqueurs	Tétraspansines (CD9, CD63, CD81)	PS et marqueurs de la cellule d'origine	PS
Conditions d'isolation (Centrifugation)	> 100 000 g	20 000 g	16 000 g
Capacité de lier l'Annexine V	+/-	++	++

Tableau 1 : Caractéristiques différentielles des vésicules extracellulaires

IP : iodure de propidium ; PS : phosphatidylsérine.

C) Origines cellulaires des microvésicules

Différents types cellulaires sont capables de libérer des MV : les cellules sanguines telles que les plaquettes (les MV plaquettaires représenteraient plus de 80% des MV, Horstman et al., 1999 ; Flaumenhaft et al., 2009), les leucocytes, les érythrocytes (Tissot et al., 2010 ; Rautou et al., 2011a) mais aussi les cellules de l'unité vasculaire telles que les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Horstman et al., 1999 ; Rautou et al., 2011a ; Herring et al., 2013). Au niveau cérébral, les MV peuvent être libérées par les progéniteurs neuronaux, les neurones, les cellules microgliales, les astrocytes et les oligodendrocytes (Scolding et al., 1989 ; Bianco et al., 2005 ;

Marzesco et al., 2005 ; Fauré et al., 2006 ; Schiera et al., 2007 ; Bianco et al., 2009 ; Borgiani et al., 2012). Les MV libérées peuvent être retrouvées dans divers liquides biologiques : plasma, liquide céphalorachidien, salive, liquide synovial, bile, urine (voir pour revue Porro et al., 2015).

D) Caractéristiques phénotypiques des microvésicules endothéliales (MVE)

Il est aujourd'hui bien établi que la phosphatidylsérine (PS) est un marqueur clé de l'identification des MV. Sa fixation spécifique à l'annexine V permet aujourd'hui le dosage des MV par cytométrie en flux (Dignat-George et al., 2004). Il est toutefois à noter que certaines MV peuvent ne pas fixer l'AnnV+ comme cela a été observé chez les patients drépanocytaires ou insuffisants rénaux (Shet et al., 2003 ; Amabile et al., 2005). Les PS pourraient être engagées dans d'autres interactions moléculaires (voir pour revue Boulanger et al., 2006).

Au cours du bourgeonnement de la membrane plasmique, les MV libérées emportent avec elles une partie de la membrane plasmique ainsi qu'une fraction du contenu cellulaire. Aussi, un marquage est nécessaire pour l'identification de l'origine cellulaire des MV. En ce qui concerne les microvésicules endothéliales, outre les PS, elles expriment à leur surface toute une gamme de phospholipides et de lipides oxydés ainsi que de nombreuses protéines membranaires telles que la VE-cadhérine (CD144), PECAM-1 (CD31), ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106), l'endogline (CD105), la E-sélectine (CD 62E), la S-endo-1 (CD146) ou l' α V intégrine (CD51) (Dignat-George et Boulanger, 2011 ; figure 10A). La NO synthase endothéliale ainsi que des récepteurs VEGFR-2 ont également été identifiés à la surface des MVE (Leroyer et al., 2009).

En fonction du type de stimuli à l'origine de la vésiculation, certains phénotypes prédominent plus que d'autres : en condition d'apoptose, le nombre de MVE phénotypées PECAM-1 (CD31), endogline (CD105) et VE-cadhérine (CD144) est plus important que le nombre de MVE phénotypées ICAM-1 (CD54), E-sélectine (CD62E) et VCAM-1 (CD106) alors que dans les conditions d'activation cellulaire la tendance est inversée (Jimenez et al., 2003) (figure 10B). En ce qui concerne la E-sélectine, il a été montré qu'elle est exprimée par les MVE quelles que soient les conditions qui ont induit la vésiculation (Jimenez et al., 2003). Ainsi, la E-sélectine et la VE-cadhérine sont exprimées exclusivement par les MVE et peuvent donc être marquées pour identifier leur origine endothéliale (Dignat-George et Boulanger 2011).

Par ailleurs, d'autres études ont rapporté que les MVE générées à partir de cellules endothéliales apoptotiques expriment des taux plus élevés de phosphatidylsérines à leur surface par rapport à celles générées à partir de cellules activées et leur composition en phospholipides est différente (Huber et al., 2002 ; VanWijk et al., 2003). Ces données suggèrent qu'il existerait des mécanismes distincts de formation des MVE dans les cellules apoptotiques et dans les cellules activées (MacKman et al., 2011), et des études suggèrent que ces MVE auraient des fonctions différentes dans les maladies vasculaires (Rautou et al., 2011b ; Yong et al., 2013).

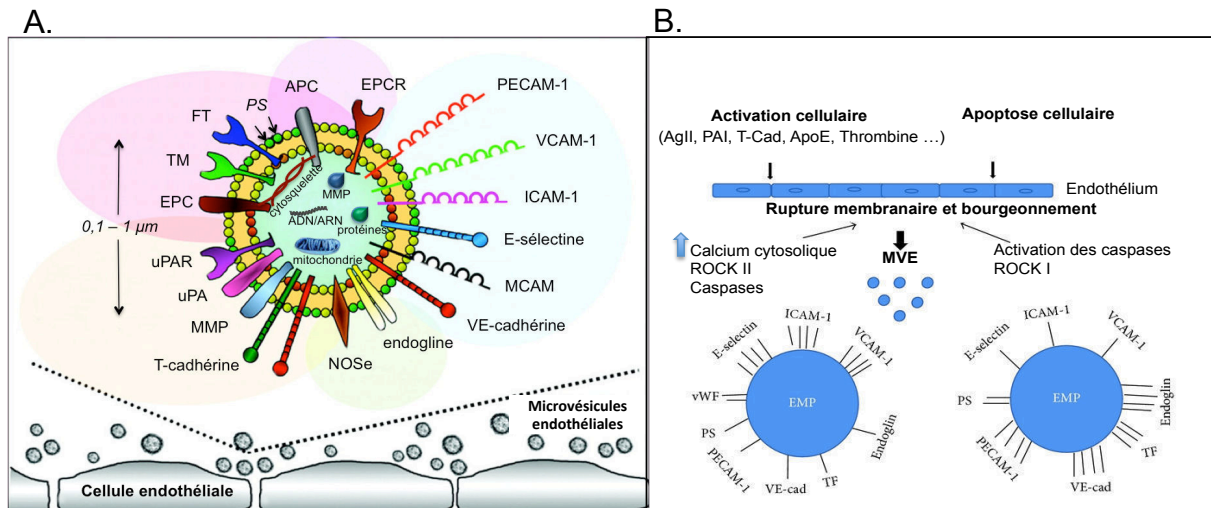


Figure 10 : A. Structure d'une microvésicule endothéliale (adaptée d'après Dignat-George et Boulanger, 2011), B. Différence de structure des MVE produites par les cellules activées ou en apoptose (adaptée d'après Markiewicz, 2013)

FT: facteur tissulaire ; PS: phosphatidylsérine ; APC: Protéine C activée ; EPCR: récepteur endothélial de la protéine C ; PECAM-1: molécule d'adhésion cellule plaquette-cellule endothéliale 1 ; VCAM-1: molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1 ; ICAM-1: molécule d'adhésion intercellulaire 1 ; E-sélectine: sélectine endothéliale ; MCAM: molécule d'adhésion cellulaire de mélanome ; VE cadhérine: cadhérine vasculaire endothéliale ; NOSe: NO synthase-endothéliale; Tcadhérine (« truncated-cadherin »): cadhérine-13 ; MMP: métalloprotéases de la matrice; uPA: activateur de plasminogène de type urokinase ; uPAR : récepteur de l'uPA ; EPC : protéine C endothéliale ; TM : thrombomoduline ; AgII : Angiotensine II, T-Cad : T- Cadherine ; PAI : inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 ; ApoE : Apolipoprotéine E ; ROCK I et II : Rho kinase activée ; PS: phosphatidylsérine ; APC :Protéine C activée VCAM-1 : molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1; vWF : facteur Von Willbrand.

2. Biogénèse des microvésicules

A) Mécanisme général de vésiculation

Les MV sont libérées par les cellules après un remaniement puis un bourgeonnement de la membrane plasmique. La réorganisation du cytosquelette et l'externalisation des phosphatidylsérines membranaires apparaissent aujourd'hui comme les deux principaux événements

à l'origine de ce remaniement membranaire menant au bourgeonnement. Les phosphatidylsérines sont des aminophospholipides présents majoritairement (voire exclusivement) dans le feuillet interne de la membrane plasmique des cellules à l'état quiescent. La distribution asymétrique des phosphatidylsérines et des autres phospholipides membranaires présents dans le feuillet interne (phosphatidyléthanolamine) et le feuillet externe (phosphatidylcholine et sphingomyéline) de la membrane plasmique est maintenue grâce à trois enzymes : les flippases, les floppases et les scramblases. Les flippases favorisent la translocation des phosphatidylsérines et phosphatidyléthanolamines contre leur gradient électrochimique vers le feuillet interne. Les floppases quant à elles catalysent le transport de la phosphatidylsérine vers l'extérieur et sont inactivées lorsque la cellule est au repos. Enfin, les scramblases facilitent le mouvement des phosphatidylsérines entre les deux feuillets membranaires.

Lorsque la cellule est activée ou en apoptose, les taux de calcium intracellulaire sont augmentés, ce qui entraîne une inhibition de l'activité des flippases et une augmentation simultanée de l'activité des floppases et des scramblases. L'asymétrie membranaire est alors perturbée et les phosphatidylsérines se retrouvent transloquées vers le feuillet externe de la membrane plasmique (figure 11).

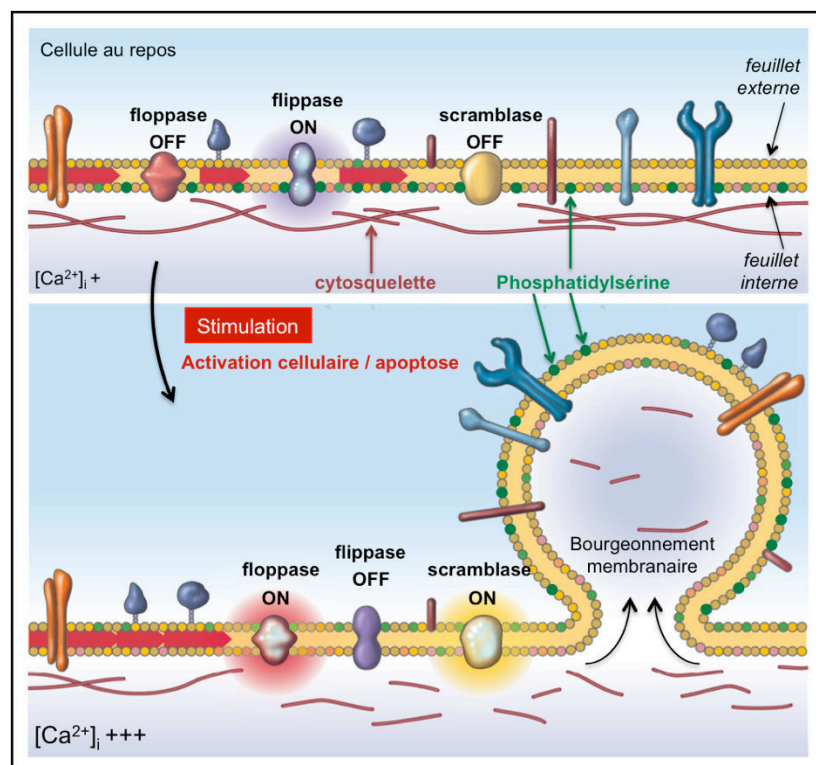


Figure 11 : Processus de vésiculation membranaire (adaptée d'après Hugel et al., 2005)

Les mécanismes moléculaires à l'origine de la formation des microvésicules sont encore très peu décrits. Toutefois il semblerait qu'il y'est une différence notable entre les processus impliqués dans microvésiculation des cellules activées et celles des cellules en apoptose. Néanmoins, les études *in vitro* ont mis en évidence l'implication d'enzymes protéolytiques dans le clivage des protéines du cytosquelette (actine, myosine et taline) initiant ainsi le bourgeonnement et la vésiculation de la membrane plasmique (voir pour revue Burger et al., 2013 ; Yun et al., 2016, figure 12).

Dans les cellules activées, la calpaïne, dont l'activation est directement liée à l'augmentation du taux de calcium intracellulaire, apparaît comme l'une des enzymes responsables de la libération des MV. (Coltel et al., 2006). En effet, la calpaïne, dégrade les filaments de taline et d'actine ce qui entraîne une réorganisation et dissociation du cytosquelette, un bourgeonnement membranaire et enfin une libération de microvésicules dans le milieu extracellulaire (Mause and Weber. 2010 ; Burger et al., 2013 ; Yun et al., 2016). Récemment il a été montré qu'une autre enzyme la transglutaminase-2, une enzyme qui catalyse la réticulation des protéines du cytosquelette, serait impliquée dans la libération des microvésicules par les cellules musculaires lisses activées (Van den Akker et al., 2012).

En ce qui concerne les cellules en phase précoce d'apoptose, la caspase-3 activée est l'enzyme responsable du clivage des ROCK1 (Rho associated Kinase I) et par conséquent leur activation. L'activation de ces kinases entraîne l'activation de la phosphorylation des chaînes légères de myosine (MLC) et de l'inactivation des phosphatases ce qui favorise le réarrangement et la contraction du cytosquelette puis la libération des MV (Coleman et al., 2001 ; Sebbagh et al., 2001 ; Mause and Weber. 2010).

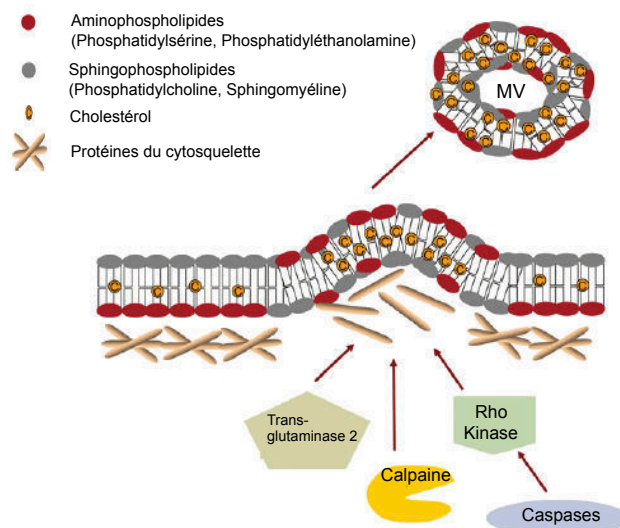


Figure 12 : Mécanisme de remodelage du cytosquelette lors de la vésiculation (adaptée selon Burger et al., 2013)

B) Mécanismes moléculaires particuliers à la vésiculation endothéliale

Les microvésicules endothéliales (MVE) sont libérées par des cellules endothéliales soumises à différents types de stimuli pro-inflammatoires (TNF, LPS, IL-1, CRP...) (Del Turco et al., 2007 ; Abid Hussein et al., 2007 ; Peterson et al., 2008 ; Brown et al., 2011 ; Devaraj et al., 2011), pro-coagulants (thrombine, inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) (Brodsky et al., 2002 ; Sapet et al., 2006 ; Peterson et al., 2008 ; Simoncini et al., 2009), pro-oxydants (irradiation ionisante, radicaux libres dérivés de l'oxygène, Szotowski et al., 2007) ainsi que d'autres stimuli tels que l'angiotensine II (voir pour revue Burger et al., 2011) ou la plasmine (Doeuvre et al., 2010). De plus, il a été montré *in vitro* que les conditions de stress induit par les forces de cisaillement du flux sanguin (shear stress) entraînent la libération de MVE (Vion et al., 2013).

En ce qui concerne les voies de signalisation impliquées dans la vésiculation, celles-ci diffèrent selon le type de stimuli qui mène à la vésiculation (figure 5). La thrombine par exemple, dont le mécanisme est le plus étudié, entraîne *in vitro* la libération de MVE *via* deux voies de signalisation distinctes. La première implique les Rho kinases au cours des phases d'activation cellulaire précoce. La thrombine en se fixant au récepteur PAR-1 exprimé à la surface des cellules endothéliales, entraîne non seulement une augmentation du calcium intracellulaire mais également l'activation de la caspase-2 en absence de toute activité apoptotique. Cette activation de la caspase-2 serait responsable du clivage et de l'activation des ROCK II. La deuxième voie de signalisation dépend d'évènements transcriptionnels impliquant la protéine TRAIL/ApoL2 et sa forme soluble (sTRAIL), une cytokine appartenant à la famille TNF. Les deux voies entraînent l'activation du facteur de transcription NF- κ B et la libération des MVE (Sapet et al., 2006 ; Simoncini et al., 2009).

Dans une autre étude, Curtis et collaborateurs (2009) ont mis en évidence l'implication d'une autre voie, celle de la p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) dans la libération de MVE après la stimulation des cellules endothéliales par le TNF (Curtis et al., 2009).

3. Clairance des microvésicules

Le processus d'élimination des MV est encore très peu élucidé à ce jour. L'activité phagocytaire des macrophages semble être une des principales voies de leur clairance. En effet, il a été montré *in vitro* que l'incubation de MV d'origine lymphocytaire avec des macrophages entraîne leur phagocytose (Distler et al., 2005). Le système de reconnaissance des phosphatidylsérines à la surface des MV joue

un rôle clé dans leur clairance aussi bien par les macrophages que par les autres types cellulaires : cellules endothéliales, épithéliales et les fibroblastes (Abdel-Monem et al., 2010). Il repose sur l'expression par ces cellules du récepteur aux phosphatidylsérines (PSR) qui en reconnaissant les PS permet la phagocytose des débris cellulaires et des MV (Fadok et al., 2000). De plus, ce récepteur exprimé à la surface des cellules endothéliales reconnaît l'annexine I exprimée à la surface des MV ce qui permet leur clairance par endocytose (Jansen et al., 2012). Ainsi toutes les cellules qui expriment ce récepteur sont capables d'éliminer les MV.

D'autres systèmes de reconnaissance des PS ont été mis en évidence et mettent en jeu des protéines telles que la lactadhérine (protéine soluble) ou la glycoprotéine B2 (exprimée à la surface des macrophages). Ces protéines peuvent lier à leurs extrémités d'une part les macrophages et d'autre part les MV par fixation aux PS, ce qui permet d'activer et de favoriser la phagocytose des MV par les macrophages (Dasgupta et al., 2009 ; Abdel-Monem et al., 2010). Une étude récente a montré qu'une autre glycoprotéine, DEL-1 (développement endothéliale locus 1), sécrétée par les cellules endothéliales, reconnaît et se lie aux PS. Le complexe DEL1-PS ainsi formé est reconnu par les intégrines ($\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$) et permet la clairance des MV plaquettaires par l'endothélium vasculaire (Dasgupta et al., 2012).

Les microvésicules circulantes sont éliminées à 45% par le foie (essentiellement par les cellules de Kupffer), à 23% par les os, à 10% par la peau, à 6% par les muscles, à 3% par la rate, et à 2% par les poumons (Willekens et al., 2005). En ce qui concerne leur cinétique d'élimination, les MV présentent une clairance rapide. Il existe cependant une différence notable entre leur clairance chez l'homme et chez l'animal. Chez l'homme, il a été montré que la transfusion d'un concentré de plaquettes d'aphérèse riche en MV augmentait le taux plasmatique de MV après la transfusion mais que ce taux baissait considérablement dans les 5 heures qui suivaient la transfusion (Rank et al., 2011). Chez l'animal, la clairance est plus rapide puisqu'il a été rapporté que les MV injectées chez le lapin, le rat ou la souris étaient éliminées en grande partie en 10 minutes (Willekens et al., 2005 ; Rand et al., 2006 ; Al Faraj et al., 2012).

II. Méthodes d'analyse des microvésicules

Comme décrit précédemment, les MV sont essentiellement retrouvés dans les liquides biologiques et au niveau des plaques d'athéroscléroses.

Les procédures de mesure des MV dans les différents milieux biologiques, ont fait l'objet de recommandations particulières établies dans le cadre des comités scientifiques de standardisation de

biologie vasculaire (SSC - VB) de la Société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH). Les recommandations de ces comités tendent à standardiser les étapes allant du prélèvement/récolte jusqu'à l'analyse des échantillons pour la mesure des MV, dans le but de minimiser les risques d'activation cellulaire *in vivo* et *in vitro* qui pourraient être à l'origine de la génération d'artefacts qui perturberaient le dosage des MV.

De ce fait, pour la mesure des MV *in vivo* dans le sang par exemple, le choix du mode de prélèvement, de l'anticoagulant et de la taille de l'aiguille sont des paramètres qu'il est important de contrôler. De même, il est important de réguler le temps écoulé entre le prélèvement et la première centrifugation et les conditions de conservation des échantillons que ce soit sur des échantillons prélevés *in vivo* ou *in vitro*. En ce qui concerne le protocole d'isolation des MV, il comprend une succession de centrifugations. La première est à faible vitesse et permet d'éliminer tous les contaminants cellulaires, la deuxième est à forte vitesse et permet d'isoler les MV (voir pour revue Mooberry et Key, 2015 ; Szatanek et al., 2015).

1. La cytométrie en flux

La cytométrie en flux est la technique la plus utilisée actuellement pour l'analyse quantitative des MV. C'est une méthode rapide, simple et spécifique. Le principe de détection repose sur l'utilisation d'un faisceau laser qui analyse les signaux optiques (diffraction, fluorescence) des différents constituants dans un échantillon (cellules, microvésicules, virus, billes de polymères...). Les signaux mesurés dépendent des propriétés optiques intrinsèques des constituants et permettent d'apprécier de manière indirecte la taille, la forme et leur structure spécifique. Le cytomètre permet de définir tout d'abord une population « d'évènements de type microvésiculaire » en fonction de leur taille (forward scatter ; FS) et de leur granulosité (side scatter ; SS). Dans cette zone, les MV seront mesurées grâce à la détection de la phosphatidylsérine révélée par un marquage à l'annexine V couplée à un fluorochrome, et/ou de marqueurs spécifiques de surface après fixation d'anticorps fluorescents (Jy et al., 2004).

Concernant les MVE, plusieurs marqueurs ou combinaison de marqueurs sont à présent utilisés en routine pour évaluer leur origine endothéliale : CD144 (VE-cadhérine), CD31+(PECAM-1)/CD41- (intégrine α IIb), CD105 (endogline), CD106 (VCAM-1), CD146 (S-endo-1), CD62E (E-sélectine). Il existe aujourd'hui des cytomètres performants de haute sensibilité tel que le cytomètre GalliosTM (Beckman Coulter).

Cette technique possède cependant des limites, notamment une faible résolution pour les éléments de très petite taille ($< 0,4 \mu\text{m}$) et une difficulté à détecter les éléments qui présentent une faible antigénicité (voir pour revue Erdbrügger et Lannigan, 2016 ; Wayne, 2016).

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

Le principe de ces deux tests est basé sur la capture des MV sur un support solide grâce à un couplage antigénique de l'annexine V avec la phosphatidylsérine ou avec d'autres antigènes spécifiques exprimés par les MV. Il existe également des tests hybrides qui permettent de combiner un test de capture en phase solide à la mesure de l'activité prothrombinase des MV. Ces différents tests offrent une possibilité d'analyse de nombreux échantillons à haut débit. Ils sont assez sensibles pour détecter des antigènes faiblement présents à la surface des MV et sont plus faciles d'utilisation que la cytométrie en flux (Kokawa et al., 1993 ; Osumi et al., 2001 ; Freyssinet, 2003 ; Nomura et al., 2009).

Cependant, ces tests ne fournissent aucune information sur la taille des MV mesurées ni de numération absolue des vésicules. De plus les interférences avec les antigènes solubles sont possibles et peuvent conduire à une surestimation des taux de MV.

3. Microscopie électronique à transmission / à force atomique

La microscopie électronique à transmission permet de visualiser les MV. La haute résolution de cette technique permet d'évaluer leur taille et leur morphologie. Il est également possible de mettre en évidence la présence de certains marqueurs par immunochimie. Cette technique ne permet cependant pas de quantifier les particules dans un échantillon.

La microscopie à force atomique apporte elle aussi de très bons renseignements quant à la taille et la morphologie des MV. Elle permet de visualiser la topographie de la surface des MV. Cette technique est dotée d'une très haute résolution (inférieure au nanomètre) assurant ainsi une analyse structurale très précise des MV (Leroy et al., 2007 ; Burger et al., 2011 ; Leong et al., 2011).

4. Tests fonctionnels

Les MV expriment à leur surface la phosphatidylsérine et le facteur tissulaire qui permettent tous les deux l'initiation de la cascade de coagulation. Par conséquent, certains tests fonctionnels consistent

à mesurer l'activité pro-coagulante des MV en évaluant la génération de thrombine. En revanche, ces tests ne permettent pas d'évaluer l'origine cellulaire des MV ni même leur nombre.

5. Spectroscopie de corrélation photonique (Dynamic Light Scattering)

Cette technique est utilisée pour déterminer le profil de distribution des tailles d'éléments vésiculaire entre 1 nm et 6 µm contenus dans une solution. Un laser monochromatique est appliqué sur l'échantillon, les particules contenues vont diffracter la lumière. La diffraction est fluctuante au cours du temps à cause des mouvements browniens dans l'échantillon. L'analyse du changement d'angle et de l'intensité de la diffraction permet de mesurer la taille des éléments. Cependant, cette méthode ne permet de déterminer ni l'origine cellulaire des éléments ni l'expression des phosphatidylsérines (Lawrie et al., 2009).

III. Rôles biologiques des microvésicules endothéliales

1. Rôles bénéfiques

Les microvésicules sont aujourd'hui considérées comme de véritables molécules bioactives jouant le rôle de messagers dans la communication intercellulaire et la signalisation intracellulaire. En effet, l'expression à leur surface de diverses protéines et lipides membranaires permet l'activation de récepteurs sur les cellules cibles, l'induction d'un signal intracellulaire et la modification de leurs réponses biologiques. Les MV peuvent également agir sur des cellules cibles *via* le transfert d'une partie de leur contenu vésiculaire (protéines, lipides, ADN, ARN et microARN). Ce transfert peut impliquer une simple interaction des membranes ou bien une fusion/internalisation des MV dans la cellule cible (figure 13). Une fois à l'intérieur de la cellule, les MV peuvent être prises en charge par le système endosomal, ce qui induit : 1) soit leur digestion par le système endo-lysosomal ; 2) soit leur fusion avec la membrane endosomale et la libération de leur contenu dans le cytoplasme (transfert horizontal) 3) soit leur relargage une nouvelle fois dans le milieu extracellulaire par trancystose (voir pour revue Cocucci et al. 2009).

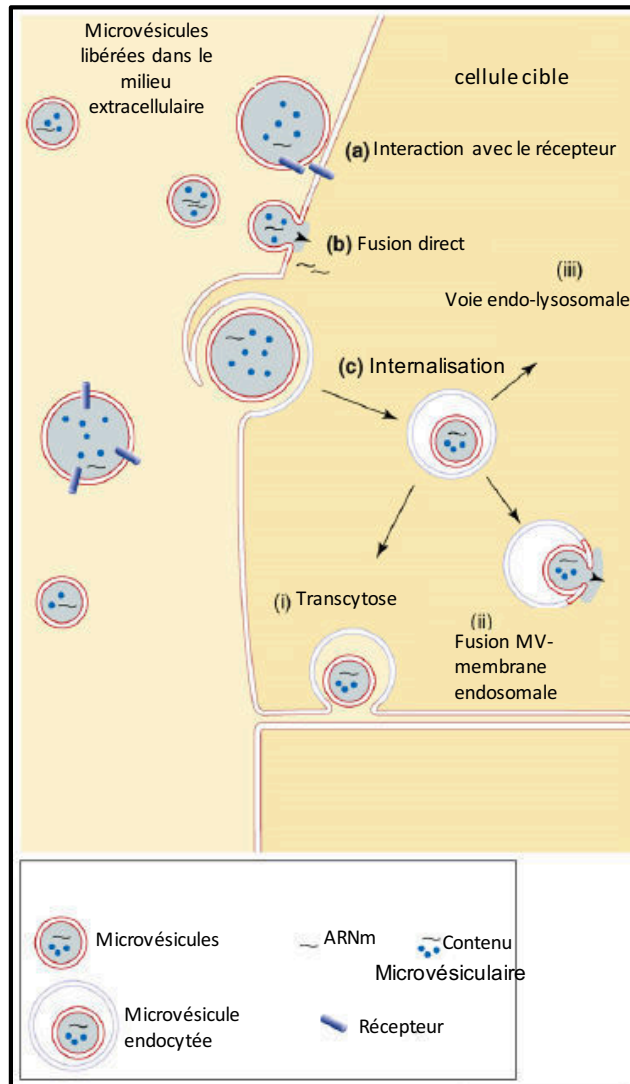


Figure 13 : Mécanismes de communication intercellulaire des MV (adaptée d'après Cocucci et al., 2009)

Les microvésicules peuvent non seulement exercer un effet paracrine sur les cellules mais peuvent également agir à distance *via* la circulation sanguine. Des études récentes montrent en effet que les MV libérées par les cellules du système nerveux central (neurones et cellules gliales) au cours du glioblastome étaient retrouvées dans la circulation sanguine périphérique, et pourraient donc agir sur les cellules endothéliales à la périphérie (Cocucci et al., 2009 ; Mause et Weber, 2010 ; Yun et al., 2016).

En ce qui concerne les microvésicules d'origine endothéliale, elles sont retrouvées dans le plasma d'individus sains à des taux circulants de 5 à 50 $\mu\text{g/ml}$ (Hoyer et al., 2010). Ces MVE jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie vasculaire, la régulation de la fonction endothéliale et la survie cellulaire.

En effet, des études *in vitro* et *in vivo* montrent que les MVE peuvent exercer non seulement une activité pro-coagulante *via* le facteur tissulaire qu'elles expriment mais aussi une activité fibrinolytique par la transformation du plasminogène en plasmine grâce au t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) et à l'u-PA (urokinase type plasminogen activator) qu'elles transportent (Lacroix et al., 2007 ; Doeuve et Angles-Cano, 2009).

Une autre étude rapporte que les cellules endothéliales activées libèrent des MV qui renferment de la caspase-3. La libération de ces MV permet alors la clairance de cette enzyme et empêche son accumulation dans la cellule et l'activation de l'apoptose (Abid Hussein et al., 2007). Sims et collaborateurs ont également montré que les cellules endothéliales libèrent des MV portant le complexe lytique C5b-9, ce qui semble permettre à ces cellules d'éviter la lyse cellulaire induite par le complément (Sims et Wiedmer, 1995).

Les MVE peuvent exercer d'autres effets cytoprotecteurs. Il a récemment été suggéré que les MVE exprimant l'EPCR (récepteur endothélial à la protéine C) contribuaient à l'effet protecteur de la protéine C activée (APC) au cours de la septicémie et dans l'AVC ischémique (Soriano et al., 2005 ; Kerschen et al., 2007).

2. Rôles délétères

Dans certaines conditions physiopathologiques, les cellules endothéliales peuvent répondre à des conditions de stress par une augmentation de la production de MVE. Ces MVE correspondent donc à des marqueurs de souffrance endothéliale.

Par ailleurs, grâce à leur contenu en molécules bioactives, ces MVE peuvent interagir avec des cellules cibles présentes dans leur microenvironnement ou à distance et constituent donc de véritables acteurs. Ainsi, les MVE sont impliquées dans des processus inflammatoires, dans la coagulation/thrombose, dans la vasoréactivité et dans l'angiogenèse.

A) MVE et inflammation

Une augmentation de la libération des MVE est observée au cours de différents types de pathologies inflammatoires telles que l'athérosclérose, le diabète ou les maladies auto-immunes (lupus érythémateux, sclérose en plaques etc...). Des médiateurs de l'inflammation tels que le TNF, l'interleukine-1 β ou la thrombine sont capables d'entraîner la production de MVE qui, une fois libérées, peuvent à leur tour exercer un effet inflammatoire notamment au niveau de l'endothélium.

Curtis et collaborateurs ont d'ailleurs montré que les cellules endothéliales traitées par le TNF libèrent des MVE dont les taux sont corrélés aux taux d'interleukine-6 secrétées (Curtis et al., 2009). De plus, l'incubation de ces MVE induites par le TNF avec des cellules endothéliales entraîne l'augmentation de la quantité d'ARNm d'ICAM-1 ainsi que de l'expression de ses formes solubles et membranaires (Curtis et al., 2009 ; Lee et al., 2014). Une autre étude a montré que des MVE isolées de plaques d'athérosclérose entraîne une augmentation de l'expression d'ICAM-1 par les cellules endothéliales et une augmentation de l'adhésion des monocytes (Rautou et al., 2011b).

Par ailleurs, les MV d'autres origines cellulaires peuvent également entraîner une inflammation au niveau endothélial. Il a été mis en évidence que les MV d'origine plaquettaire et leucocytaire induisent la sécrétion par les cellules endothéliales de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-8, et qu'elles augmentent l'expression d'ICAM-1, de VCAM-1 et de E-sélectine par ces cellules (Nomura et al., 2001).

A l'inverse, dans certaines conditions, un effet anti-inflammatoire des MV a été décrit au niveau endothélial. En effet, il a été mis en évidence que les MV libérées par les neutrophiles contiennent de l'annexine-1 qui inhiberait l'interaction *in vitro* et *in vivo* des leucocytes et des cellules endothéliales (Dalli et al., 2008). De plus, les MVE libérées après stimulation par la protéine C activée et qui expriment le récepteur à l'APC ont un effet anti-inflammatoire et augmentent la survie cellulaire (Perez-Casal et al., 2009).

B) MVE et hémostasie

Les MVE possèdent une activité pro-coagulante qu'elles exercent *via* deux entités moléculaires exprimées à leur surface. Le premier facteur correspond aux phosphatidylsérines (PS) externalisées sur le feuillet membranaire. Les PS peuvent fixer différents facteurs de coagulation et les assembler pour former le complexe ténase (association des facteurs VIIIa et IXab permettant l'activation du facteur X) et/ou le complexe prothrombinase (association des facteurs Va et Xa permettant l'activation de la prothrombine) afin de former la thrombine. La deuxième entité moléculaire correspond au facteur tissulaire (FT), initiateur de la voie extrinsèque de la coagulation. Les MV peuvent activer la coagulation directement *via* le facteur tissulaire et/ou indirectement en le transférant à d'autres cellules, ce qui leur permet d'acquérir une activité pro-coagulante. En effet il a été montré que les MVE exprimant le facteur tissulaire et des molécules d'adhérence endothéliales sont capables de stimuler l'expression ou le transfert du FT vers les monocytes. Le même mécanisme de transfert a été décrit pour les plaquettes et les leucocytes (voir pour revue Dignat-George et

Boulager, 2011). L'effet pro-coagulant des MVE leur confère une activité thrombogène. Leurs propriétés thrombogènes ont été tout d'abord mises en évidence *in vitro* : des MVE générées à partir de cellules HUVEC, exprimant fortement le facteur tissulaire, réduisaient considérablement le temps de coagulation d'un plasma normal (Abid Hussein et al., 2008). Biro et collaborateurs ont montré le même effet avec des MVE isolées du sang de patient ayant subi une chirurgie cardiaque pour le placement d'un bypass cardiopulmonaire (Biró et al., 2003). Dans les deux études, l'activité thrombogène a été confirmée *in vivo dans un modèle de stase veineuse chez le rat*. En effet, l'injection de ces MVE dans la veine pénienne dorsale entraînait la génération de thrombine et la formation d'un thrombus localisé dans la veine cave inférieure (Biró et al., 2003 ; Abid Hussein et al., 2008).

Les MVE participent également à l'agrégation plaquettaire grâce au facteur Von Willebrand qu'elles expriment à leur surface. Une étude a même montré que les agrégats plaquettaires ainsi formés étaient plus stables que ceux formés par le facteur seul (Jy et al., 2005). Les MVE apparaissent donc comme de véritables entités pouvant contribuer au risque de thrombose.

Paradoxalement, des études montrent que les MVE peuvent exprimer des récepteurs à la protéine C, la thrombomoduline ou encore l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, ce qui peut leur conférer une activité anticoagulante (Lacroix et Dignat-George, 2012). De plus, les MVE expriment les activateurs du plasminogène tels que le t-PA ou l'uPA et peuvent donc fixer le plasminogène et le transformer en plasmine ce qui leur permet d'exercer une activité fibrinolytique (Lacroix et al., 2012 ; Lacroix et Dignat-George, 2012).

Ces différentes données de la littérature s'accordent à confirmer que les MVE participent activement au maintien de l'homéostasie vasculaire, mais cet équilibre peut très vite être perturbé, notamment au cours de situations pathologiques.

C) MVE et réactivité vasculaire

Plusieurs études ont montré que les MVE pouvaient interagir avec l'endothélium vasculaire. Cette interaction se traduit souvent par une dysfonction endothéliale dont les MVE peuvent être la conséquence mais également la cause. Des taux élevés de MVE sont d'ailleurs retrouvés chez les patients atteints de pathologies affectant la fonction endothéliale telles que les insuffisants rénaux ou coronariens, les hypertendus ou encore les diabétiques (Amabile et al., 2005 ; Koga et al., 2005 ; Werner et al., 2006 ; Esposito et al., 2007). Par ailleurs, il a été montré que les MVE (VE-Cadhérine⁺) étaient inversement corrélées à l'amplitude de dilation induite par le flux sanguin dans l'artère

branchiale chez les patients insuffisant rénaux, coronariens ou diabétiques (Boulanger et al., 2008). Cette corrélation serait indépendante de l'âge des patients ou de leur pression artérielle. Ceci suggère que chez ces patients qui présentent des taux élevés de MVE, leurs artères sont moins capables de s'adapter à une variation du débit sanguin. De même il a été montré une corrélation des taux de MVE et de la rigidité artérielle chez les patients hémodialysés ou hyper-cholestérolémiques (Amabile et al., 2005 ; Boulanger et al., 2008).

Par ailleurs des études ont souligné le rôle du NO dans les effets des MVE sur le tonus vasculaire. En effet, le NO a des propriétés vasodilatatrices, antiplaquettaires et cytoprotectrices qui permettent la régulation de la fonction endothéliale (Boulanger et al., 2001). Il a été montré *in vitro* que l'incubation d'artères isolées avec des MVE provenant de plasma de patients présentant un syndrome coronarien, une insuffisance rénale terminale ou une pré-éclampsie entraîne une diminution de la production de NO, alors qu'aucun effet n'a été observé avec les MVE issues du plasma de volontaires sains (Boulanger et al., 2001 ; Amabile et al., 2005).

D'autre part, les MVE contribuent à la production d'anions superoxyde O_2^- par les cellules endothéliales. Ces anions entraînent un découplage de la NO synthase endothéliale et provoquent la transformation du NO en peroxynitrites, ce qui diminue sa disponibilité au niveau endothélial (Brodsky et al., 2004). Cet effet a été observé sur des anneaux d'aortes isolées de rat et exposés à des MVE. De plus, ces aortes perdaient rapidement la capacité de vasorelaxation induite par l'acétylcholine.

Ainsi l'augmentation du stress oxydant et la diminution du NO endothélial induits par les MVE limitent les propriétés vasculoprotectrices et anti-athérogène de l'endothélium et favorisent l'augmentation de la rigidité artérielle (voir pour revue Boulanger et al., 2008 ; Meziani et al., 2008).

D) MVE et angiogenèse

Les MV jouent également un rôle dans la régulation de l'angiogenèse. Il a été rapporté que les MV plaquettaires stimuleraient l'angiogenèse tandis que les MV d'origine endothéliale et lymphocytaire pourraient aussi bien stimuler ce processus que l'inhiber.

Dans un modèle d'ischémie de la patte chez la souris, Leroyer et collaborateurs ont montré que les MV majoritairement d'origine endothéliale pouvaient exercer un rôle pro-angiogénique en augmentant la revascularisation du tissu ischémié (Leroyer et al., 2009). De plus, il a été montré *in vitro* que les MVE sont capables d'induire la différenciation des progéniteurs endothéliaux en cellules endothéliales (Leroyer et al., 2009). Deregibus et collaborateurs ont décrit un processus de transfert

d'ARNm des MV vers les cellules endothéliales, processus permettant l'activation des mécanismes d'angiogenèse (Deregibus et al., 2007).

Ces propriétés angiogéniques peuvent également être expliquées par l'expression à la surface des MVE de facteurs protéolytiques tels que la plasmine, les MMP-2 et 9 ainsi que la MT1-MMP (membrane-type 1 MMP). La plasmine par exemple active les métalloprotéinases de la matrice qui, en dégradant la matrice extracellulaire, favorisent la migration des cellules endothéliales et la formation de nouvelles structures vasculaires (Taraboletti et al., 2002 ; Lacroix et al., 2007).

A côté de cet effet pro-angiogénique, il a été rapporté que les MVE exerceraient des effets anti-angiogéniques principalement *via* le stress oxydant par l'augmentation de la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Dans une étude *in vitro* il a en effet été montré que les fortes concentrations en MVE augmentaient la production de ROS et diminuaient la formation de nouveaux capillaires (Mezentsev et al., 2005).

IV. Microvésicules, système nerveux central (SNC) et AVC

1. Microvésicules et SNC

La libération de MV est décrite aujourd'hui non seulement comme un processus physiologique observé chez les individus sains mais également comme un processus délétère observé au cours de certaines pathologies, notamment des pathologies d'ordre neurovasculaire. Ainsi, il a été rapporté une augmentation des MV dans le sang et/ou le LCR au cours de la sclérose en plaque, de l'ischémie cérébrale et de la maladie d'Alzheimer (voir pour revue Horstman et al., 2007 et 2009 ; Doeuvre et al., 2009).

Il est aujourd'hui bien établi que les différents types cellulaires de l'unité neurovasculaire sont capables de libérer des MV : les neurones, les microglies, les oligodendrocytes, les cellules endothéliales, les astrocytes, mais aussi les cellules souches embryonnaires neuronales. Au niveau cérébral, les MV joueraient un rôle bénéfique dans le développement, l'activité synaptique et la réparation neuronale (Lai et Breakefield, 2012). En effet, des taux élevés de MV sont retrouvés dans le liquide céphalorachidien au cours du développement cérébral. Ces MV auraient pour origine les cellules souches neuronales. Elles exprimeraient des antigènes tels que la prominin-1 (CD133) qui participerait à la communication intercellulaire au cours de la différenciation de ces cellules souches (Marzesco, 2013). D'autres études rapportent que les MV peuvent transférer des ARN messagers et des microARN codants pour des facteurs de transcription pluripotents qui modifieraient le

phénotype cellulaire et contribueraient à la régulation des processus neuronaux (Ratajczak et al., 2006a et 2006b). Ces MV transféreraient également au niveau neuronal des enzymes telles que la β -galactosidase de la plaque du plancher (Floor Plate) au niveau du tube neural vers les axones au cours du développement (Campell et Peterson, 1993). De plus, Bakhti et collaborateurs ont montré que les MV libérées par les oligodendrocytes régulaient la myélinisation au cours de la maturation neuronale (Bakhti et al., 2011).

Ma thèse portant sur les atteintes endothéliales au cours de l'ischémie cérébrale, je me suis plus particulièrement intéressée aux microvésicules d'origine endothéliale au cours de cette pathologie.

2. Microvésicules endothéliales et AVC

A) Etudes expérimentales

Dans la littérature, très peu d'études concernant le rôle des MVE dans des modèles d'ischémie cérébrale ont été réalisées.

Récemment, l'équipe de Shock et collaborateurs ont mis en évidence dans un modèle d'ischémie cérébrale permanente par ligature de l'artère carotide commune chez le rat une augmentation de la libération des MV (AnnV+) et plus particulièrement des MV d'origine endothéliale (VE-cadhérine+) dans le plasma 72 heures après l'ischémie (Schock et al., 2014).

Dans une autre étude réalisée par la même équipe, l'incubation de ces MVE, isolées du sang des rats ischémiés, avec des cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales de rat entraîne une activation de l'apoptose et une augmentation de la perméabilité évaluée par une mesure de la résistance électrique trans-endothéliale (Edrissi et al., 2016). L'augmentation de la perméabilité impliquerait les caspase-3, le TNF et la voie des ROCK II.

Dans une autre étude, des MVE ont été isolées des surnageants de culture de cellules endothéliales soumises à des conditions OGD (Oxygen Glucose deprivation) qui miment *in vitro* les conditions d'ischémie cérébrale (Pan et al., 2016). Ces MVE ont ensuite été incubées avec un modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique (BHE), ce qui entraînait une augmentation de la perméabilité et une diminution de l'expression des protéines de jonction ZO-1 (Zonula-Occludens) et claudine-5. Cet effet a été confirmé *in vivo* par l'injection de ces MVE chez les souris ischémiées. Les résultats montraient que les MVE libérées dans les conditions OGD augmentaient non seulement la perméabilité de la BHE évaluée par l'extravasation du Bleu Evans mais aggravait également le volume lésion et le déficit neurologique (Pan et al., 2016).

Au vu de ces études, une meilleure caractérisation des MVE dans les modèles d'ischémie cérébrale serait intéressante. Leur profil de sécrétion ainsi que leur rôle nécessitent plus d'investigation dans ces modèles. D'autant plus que plusieurs études cliniques chez les patients victimes d'AVC ont mis en évidence des corrélations entre les taux circulants de MVE et la gravité des symptômes observés.

B) Etudes cliniques

En clinique, les études qui se sont intéressées aux microvésicules à la suite des accidents vasculaires cérébraux se sont surtout focalisées sur les MV d'origine plaquettaire et endothéliale (tableau 2).

C'est tout d'abord l'équipe de Ahn et collaborateurs qui a montré en cytométrie de flux que les microvésicules d'origine plaquettaire positives au marquage CD42 (GPIb) étaient augmentées dans le sang des patients victimes d'AVC à 10 jours (Lee et al., 1993). Toutefois cette étude n'a pas pu mettre en évidence de corrélation entre ces taux et le volume de la lésion ni la sévérité des signes cliniques. Ce résultat a ensuite été corroboré par deux études dans lesquelles les MV plaquettaires ont été détectées dans le sang grâce à un marquage CD61 (GPIIIa) et CD62P (P-sélectine) (Cherian et al., 2003 ; Pawelczyk et al., 2009). Les MV plaquettaires étaient augmentées à 7 jours post-ischémie et jusqu'à 6 mois (Cherian et al., 2003).

En ce qui concerne les MV d'origine endothéliale, en 2006, Simak et collaborateurs ont mis en évidence par cytométrie en flux une augmentation des MVE dans le sang des patients 37 heures après la survenue d'un AVC ischémique (Simak et al., 2006). Les patients étaient répartis dans différents groupes en fonction de la sévérité des signes cliniques évalués par l'échelle NIHSS (National Institute of Health and Stroke Scale). Le dosage en cytométrie a permis également de préciser leurs phénotypes. Tous les groupes présentaient des MVE positives au marquage des phosphatidylsérines (PS⁺). Dans le groupe de patients présentant un AVC modéré à sévère, trois phénotypes étaient augmentés : MVE Endogline positives (MVE E⁺) ; MVE VE-cadhérine positives (C⁺) ; MVE ICAM-1 positives (MVE I⁺). De plus, ces trois phénotypes (PS⁺ ; E⁺ et I⁺) étaient corrélés au volume de lésion et deux d'entre eux (E⁺ et C⁺) étaient corrélés aux symptômes cliniques évalués avec l'index de Barthel et le score de Rankin.

En 2007, dans une autre étude, il a été mis en évidence une augmentation des MVE phénotypées PECAM-1 positives (Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1, CD31⁺) et E-Sélectine positives (CD62E⁺) dans le sang de patients victimes d'AVC ischémique ou qui en présentaient tous les signes

sans lésion apparente (Williams et al., 2007). Dans cette étude, il a été montré grâce au calcul du ratio PECAM-1/E-Sélectine que ces MVE étaient libérées par les cellules activées (qui expriment majoritairement la E-sélectine) et non pas par les cellules en apoptose (qui expriment majoritairement PECAM-1, voir paragraphe I.1.D).

L'augmentation des MVE PECAM-1⁺, E-Sélectine⁺ et VE-cadherine⁺ chez les patients victimes d'AVC ischémique a été confirmé dans d'autres études (Jung et al., 2009 ; Li et Qin, 2015). Ces taux élevés corrélaient encore une fois avec le volume de lésion et la sévérité des signes cliniques. Ce résultat a également été observé chez les patients à risque de développer un accident ischémique mais également chez les patients présentant des hémorragies subarachnoïdiennes à risque de développer un vasospasme cérébral et par conséquent un AVC (Jung et al., 2009 ; Lackner., et al 2010). Jung et collaborateurs ont de plus montré que les taux de MVE étaient inversement corrélés avec le délai d'apparition d'un AVC ischémique.

Récemment, Chiva-Blanch et collaborateurs ont montré une augmentation des MV d'origine endothéliale, plaquettaire et leucocytaire chez les patients victimes d'AVC ischémique à 48 heures, 7 jours et 90 jours (Chiva-Blanch et al., 2016). Une corrélation intéressante entre l'étiologie de l'AVC et les phénotypes microvésiculaires a été mise en évidence. Ainsi les patients qui présentaient une occlusion des grosses artères présentaient des taux sanguins élevés de MV plaquettaires et leucocytaires. Toutefois, pour les autres étiologies (occlusion de petits vaisseaux, embolie cardiaque), aucune autre corrélation n'a été mise en évidence. Paradoxalement dans une autre étude il a été montré que les MV d'origine plaquettaire étaient plus élevées chez les patients qui présentaient une ischémie des petits vaisseaux (infarctus subcortical < 1,5 cm de diamètre, infarctus lacunaire, accident ischémique transitoire) par rapport à ceux qui présentaient une ischémie des gros vaisseaux (infarctus subcortical > 1,5 cm) (Lee et al., 1993). Enfin, dans deux autres études, aucune corrélation n'a été retrouvée entre le taux de MV plaquettaires ou endothéliales et l'étiologie de l'ischémie cérébrale (Cherian et al., 2003 ; Jung et al., 2009).

Au vu des résultats de ces différentes études cliniques, les MVE peuvent être considérées aujourd'hui comme de bons marqueurs biologiques des AVC. Contrairement aux autres biomarqueurs associés aux AVC (MMP-9, Protéine réactive-C, D-dimères...) qui peuvent être également le reflet d'un état inflammatoire ou d'un déséquilibre de l'hémostase, les MVE seraient spécifiques de lésions neurovasculaires au cours des AVC. Elles constituent non seulement une valeur prédictive chez les patients à haut risque de développer un AVC, mais aussi une valeur pronostique chez les patients à risque de développer des complications après un AVC ischémique (Simak et al.,

2006 ; Williams et al., 2007). De plus, plusieurs études cliniques montrent une corrélation de leurs taux avec la sévérité de l'accident ischémique (Jung et al., 2009 ; Lackner et al., 2010). Elles peuvent avoir donc une valeur diagnostique qui permettrait d'identifier et de prendre en charge très rapidement les patients présentant des lésions sévères. Les MVE pourraient même être utilisées pour stratifier les patients lors d'un traitement thrombolytique en phase aiguë d'AVC et ainsi pouvoir minimiser les effets délétères de ce traitement.

A côté de ce rôle de biomarqueur, les MVE sont également des acteurs qui peuvent jouer un rôle non seulement en amont de l'accident ischémique mais aussi en aval par l'aggravation de processus physiopathologiques. De ce fait, il est nécessaire de développer des approches thérapeutiques qui pourraient soit bloquer d'une part leur production, soit inhiber leur capacité d'interaction avec les cellules. Certains inhibiteurs de la libération des microvésicules ont été expérimentés principalement *in vitro* et parmi eux, les inhibiteurs de calpaïne (O'Connell et al., 2005 ; Abid Hussein et al., 2007). Toutefois, aucun inhibiteur n'a encore été testé chez l'animal. La deuxième approche consisterait à diminuer l'interaction cellules/MVE en bloquant leur adhésion notamment par l'utilisation d'inhibiteurs de la β_3 integrine par exemple (Essayagh et al., 2005). D'autres inhibiteurs moins spécifiques telles que les inhibiteurs de la P-sélectine ou d'ICAM-1 qui ont montré leur efficacité à inhiber l'adhésion leucocytaire *in vivo* dans un modèle d'ischémie cardiaque chez le rat pourraient avoir le même effet vis-à-vis des microvésicules (Fukushima et al., 2006). Enfin une augmentation de la clairance de ces microvésicules pourrait constituer une stratégie intéressante.

Toutefois, il faut prendre en compte que toutes les sous-populations de microvésicules ne sont pas délétères et en fonction de l'état physiopathologique de l'organisme elles peuvent être « amies » ou « ennemies ».

Pathologie	Origine cellulaire des MV	Milieu biologique	Moment du Prélèvement (↔ délai après antécédents ou symptômes)	Phénotypes des MV	Références
AVC ischémique	Plaquettaire	sang	< 10 jours	↑ CD42 ⁺	Lee et al., 1993
AVC ischémique	Plaquettaire	sang	≤ 7 jours puis entre 3 et 6 mois	↑ CD61 ⁺	Cherian et al., 2003
AVC ischémique	Endothéliale	sang	Médiane = 37h (18,5h - 51,8 h)	↑ CD105 ⁺ CD41a ⁻ CD45 ⁻ ↑ CD105 ⁺ CD144 ⁺ ↑ CD105 ⁺ PS ⁺ ↑ CD41a ⁻ ↑ CD105 ⁺ ↑ CD54 ⁺ CD45 ⁻	Simak et al., 2006
AVC ischémique	Endothéliale	sang	< 24 h	↑ CD31 ⁺	Williams et al., 2007
Phase chronique d'AVC ischémique	Plaquettaire	sang	> 3 mois	↑ CD42a ⁺	Shirafuji et al., 2008
AVC ischémique	Endothéliale	sang	Médiane = 2,8 jours (≤ 72 h - 6 jours)	↑ CD62E ⁺	Jung et al., 2009
AVC hémorragique (intra-parenchymateux)	MPS totales	sang, LCR	Lors de l'admission (sang) et de la chirurgie (sang et LCR) ↔ < 12 h	↑ Annexine V ⁺	Huang et al., 2009
AVC ischémique	Plaquettaire	sang	Au moment de l'admission	↑ CD42 ⁺	Kuriyama et al., 2010
Antécédents d'AVC ischémique	Plaquettaire	sang	Antécédents ≥ 3 mois	↑ CD61 ⁺ ↑ CD62P ⁺	Lukasik et al., 2010
AVC hémorragique (sous-arachnoïdien)	Endothéliale Plaquettaire	sang	Du 1 ^{er} au 15 ^{ème} jour	↑ CD105 ⁺ PS ⁺ ↑ CD62E ⁺ ↑ CD106 ⁺ ↑ CD41 ⁺	Lackner et al., 2010
AVC hémorragique (intra-parenchymateux)	MPS totales	sang	De l'admission jusqu'au 7 ^{ème} jour	↑ Annexine V ⁺	Dong et al., 2011
Antécédents d'AVC ischémique	Endothéliale	sang	Antécédents ≥ 3 mois	↑ CD62E ⁺	Lee et al., 2012
AVC ischémique	Endothéliale	sang	7 jours	↑ CD62E ⁺ ↑ CD144 ⁺ CD41a ⁻ ↑ CD31 ⁺ CD41a ⁻	Li et al., 2015
AVC ischémique	Endothéliales Plaquettaires Leucocytaires	sang	48 heures, 7 jours et 90 jours	↑ CD62P ⁺ ↑ CD146 ⁺ ↑ CD45 ⁺	Chiva-Blanch et al., 2016

Tableau 2 : Etudes cliniques portant sur les MV à la suite d'accidents vasculaires cérébraux

CD62E : E-sélectine ; CD61 : GPIIIa ; CD62P : P-sélectine ; CD42 : GPIb ; CD42a : GPIX ; CD31 : PECAM-1 ; CD105 : endogline ; CD41a : GPIIb ; CD45 : leukocyte common antigen ou LCA ; CD144 : VE-cadhérine ; CD54 : ICAM-1 ; CD106 : VCAM-1 ; CD146 : MCAM.

QUATRIÈME CHAPITRE : CHAPITRE HMGB1 (HIGH MOBILITY GROUP BOX1)

Au cours de l'ischémie cérébrale, l'hypoxie et la déplétion énergétique déclenchent des mécanismes délétères précoces, tels que l'excitotoxicité et le stress oxydant qui vont conduire à la formation de la lésion tissulaire initiale. Ces mécanismes sont suivis de processus secondaires et notamment d'une réaction inflammatoire qui s'accompagne d'une atteinte de l'unité neurovasculaire et en conséquence d'une rupture de la barrière hématoencéphalique (BHE). L'ensemble de ces mécanismes conduit à une mort cellulaire massive. Aussi, afin d'éliminer les nombreuses cellules mortes, des systèmes de clairance phagocytaire vont rapidement être activés. Cependant, avant qu'elles ne soient complètement éliminées, les cellules génèrent « un signal d'alarme » qui active les cellules adjacentes, immunitaires ou non. Ce signal d'alarme participe notamment au recrutement de cellules de l'inflammation au niveau du site de la lésion et promeut également la migration et la division cellulaire afin de remplacer les cellules mortes. Il est également généré par les cellules de l'inflammation elles-mêmes, ce qui permet d'amplifier le processus inflammatoire mis en place. Ces signaux d'alarme mettent en jeu des médiateurs appelés « alarmines » ou DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) dont le chef de file est la protéine HMGB1 (High Mobility Group Box1).

Au cours de ma thèse, j'ai recherché si la protéine HMGB1, considérée comme un marqueur de l'inflammation au cours l'ischémie, pouvait être impliquée dans la toxicité endothéliale du rt-PA *in vivo* et *in vitro*. Pour se faire, j'ai étudié l'effet du rt-PA sur la protéine HMGB1 *in vivo* dans des modèles d'ischémie cérébrale chez la souris et *in vitro* sur des cultures de cellules endothéliales. J'ai également recherché s'il existait une relation entre HMGB1 et l'enzyme PARP afin de mettre en évidence l'existence d'une cascade **rt-PA-PARP-HMGB1**.

Afin de mieux comprendre notre choix d'étudier la protéine HMGB1, quelques rappels bibliographiques sont nécessaires. Une première partie introductive comprend des rappels sur la structure, les modifications post-traductionnelles et la localisation cellulaire de HMGB1. Une deuxième partie porte sur le rôle biologique de la protéine et sur les différents récepteurs cellulaires impliqués. La troisième rassemble les données bibliographiques concernant HMGB1 au cours de l'ischémie cérébrale.

I. HMGB1 : structure et localisation

HMGB1 (High Mobility Group Box 1) appartient à la famille des protéines HMG qui constitue le principal groupe de protéines non histones associées à la chromatine. Cette superfamille comprend les protéines HMGB (High Mobility Group Box, anciennement HMG1 et 2), HMGN (High Mobility Group Nucleosome-binding, anciennement HMG 14, 17) et HMGA (High Mobility Group Box A, anciennement HMG I, (Bustin, 2001). Elles ont été initialement découvertes par H.M Goodwin et identifiées comme des composants majeurs de la chromatine présentant une forte mobilité sur gel électrophorétique (Goodwin et al., 1973). Seules les protéines de la sous-famille HMGB sont décrites comme des cytokines (Kang et al., 2014). Cette sous-famille contient entre autres les protéines HMGB1, 2, 3 et 4 :

- ✚ **HMGB1** est ubiquitaire, elle est exprimée à un niveau particulièrement élevé au niveau cellulaire (10^6 millions/cellule).
- ✚ **HMGB2** est limitée aux tissus lymphoïde et testiculaire chez les animaux adultes.
- ✚ **HMGB3** est restreinte aux cellules souches hématopoïétiques et embryonnaires.
- ✚ **HMGB4**, dont la découverte est plus récente, est exprimée majoritairement par les cellules germinales au niveau testiculaire et très faiblement au niveau du cerveau et des autres tissus (Catena et al., 2009).

HMGB1, 2 et 3 présentent plus 80% de similitude au niveau de leur séquence en acides aminés.

1. Structure

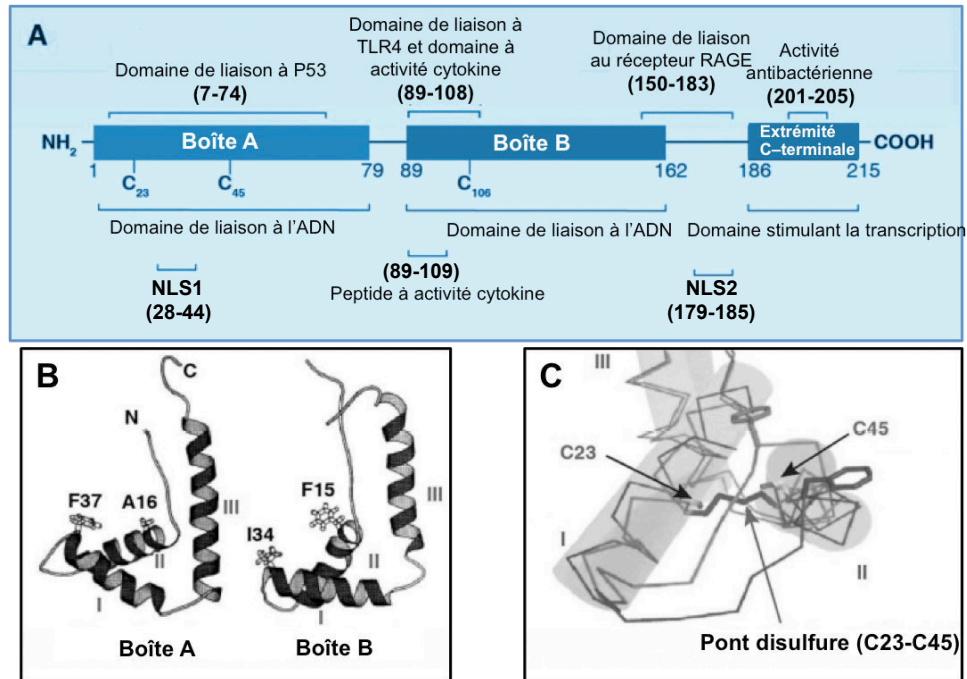


Figure 14 : Structure de la protéine HMGB1 (adaptée d'après Kang et al., 2014)

A) HMGB1 présente deux domaines de liaison à l'ADN (boîte A et B) et une extrémité C-terminale acide, (B) Structure secondaire hélicoïdale des boîtes A et B, (C) Pont disulfure entre les cystéines 23 et 45 situées sur la boîte A.

HMGB1 est une protéine formée de 215 acides aminés (aa). Sa structure s'organise autour de trois principaux domaines : deux domaines de liaison à l'ADN (boîtes HMG A, 1-79 aa et HMG B, 89-162 aa), et une extrémité C-terminale constituée d'acides aminés acide (boîte C, 186-215 aa) (figure 14A, Bianchi et al., 1992). Les deux boîtes HMG A et B forment trois hélices alpha en conformation « L » (figure 14B, Read et al., 1993 ; Weir et al., 1993). HMGB1 présente également deux domaines de localisation nucléaire appelés NLS (Nuclear Localisation Signals : NLS1, 28-44 aa et NLS2, 179-185aa) qui contrôlent la translocation de la protéine (figure 14A). Le domaine NLS1 contient 4 résidus lysine et le domaine NL2, 5 résidus. L'acétylation de ces résidus lysine contrôlerait la sécrétion de HMGB1 (Bonaldi et al, 2003). L'extrémité C-terminale participe au réarrangement spatial des boîtes HMG A et B et régule la liaison à l'ADN (Wang et al., 2007b).

HMGB1 s'associe de façon très labile à l'ADN de forme B et manifeste une affinité plus importante pour des structures courbes de l'ADN (hémicaténanes, ADN cruciforme). HMGB1 contient également des résidus cystéine en position 23, 45 et 106 sensibles aux réactions d'oxydo-réduction. La formation d'un pont disulfure entre les cystéines 23 et 45 (figure 14C), contrôlerait son activité inflammatoire (Yang et al., 2013).

Hormis l'ADN, HMGB1 peut lier un certain nombre de protéines et ces interactions sont importantes pour son activité et sa fonction. Les résidus d'acides aminés 150-183 sont responsables de la liaison avec le récepteur RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) impliqué dans la migration cellulaire et l'inflammation (Huttunen et al., 2002), alors que les résidus 89-108 et les résidus 7 à 74 sont responsables de la liaison aux domaines trans-activants TLR4 (Toll like receptor 4) et p53 impliqués respectivement dans l'inflammation et la transcription de gènes. Ces effets induits par la liaison de HMGB1 à ces récepteurs sont développés plus en détails dans le paragraphe II.2.

Récemment, il a été suggéré que la boîte B exercerait une activité pro-inflammatoire et la boîte A une activité anti-inflammatoire (Li et al., 2003). L'activité anti-inflammatoire de la boîte A serait augmentée lorsqu'elle fusionne avec l'extrémité C-terminale. De plus, Gong et collaborateurs ont montré que les résidus d'acides aminés 201-205 de l'extrémité C-terminale étaient responsables d'une activité antibactérienne de HMGB1 (Gong et al 2009). Cette région exercerait une activité protectrice des boîtes A et B au cours de la translocation de HMGB1 vers le cytoplasme cellulaire. Elle régulerait également la liaison de HMGB1 à l'ADN par interaction d'une part avec les résidus cystéine situés dans les domaines de liaison à l'ADN (Stros, 1998 ; Wang et al., 2007b), et d'autre part avec les résidus lysine des histones H1 et H3 (Sheflin et al., 1993 ; Ueda et al., 2004 ; Cato et al., 2008 ; Kawase et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré que la suppression de l'extrémité C terminale de la protéine diminuait son affinité pour l'ADN, et que la surexpression d'une forme de HMGB1 dépourvue de son extrémité C-terminale inhiberait l'expression de certains gènes (Aizawa et al., 1994 ; Stros et al., 1994).

2. Localisation cellulaire, sécrétion et libération de HMGB1

A) Localisations cellulaires de HMGB1

a. Au niveau nucléaire

La protéine HMGB1 est non seulement un composant architectural de la chromatine, mais elle joue également un rôle en tant que chaperon de l'ADN grâce à sa capacité de liaison et de remodelage de l'ADN. Elle participe au maintien de l'architecture et de la stabilité de la chromatine, à l'assemblage des unités du nucléosome ainsi qu'à la réplication de l'ADN (Mathew et al., 1979 ; Bonne-Andrea et al., 1984a, b). De plus, HMGB1 interagit avec les histones H1 et H5, ce qui modifie l'accessibilité

et/ou la topologie de certaines régions de l'ADN. HMGB1 participe à la transcription de gènes par interaction avec des facteurs de transcription tels que p53 ou NF- κ B, mais aussi avec les récepteurs nucléaires aux stéroïdes. Elle intervient également dans les processus de recombinaison et réparation de l'ADN. Toutes ces propriétés nucléaires soulignent le rôle essentiel de HMGB1 dans le fonctionnement cellulaire (voir pour revue Kang et al., 2014). Les souris KO (knock-out) HMGB1 ne sont d'ailleurs pas viables et meurent assez rapidement après la naissance d'une hypoglycémie et d'un déficit énergétique sévère (Calogero et al., 1999).

b. Au niveau cytoplasmique

Dans les conditions physiologiques, HMGB1 est synthétisée dans le cytoplasme puis transloquée dans le noyau où elle se fixe à l'ADN afin d'exercer ses fonctions nucléaires (que nous venons de décrire). Une localisation de HMGB1 au niveau du cytoplasme des cellules à l'état quiescent est toutefois retrouvée au niveau du tissu cérébral et hépatique, le ratio nucléo-cytoplasmique étant de 30 :1 (Kuehl et al., 1984).

Dans des conditions de stress ou d'activation cellulaire, HMGB1 est transloquée du noyau vers le cytoplasme. Cette translocation se déroule suite à des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation qui est une des réactions les plus courantes (Bonaldi et al., 2003). Néanmoins, d'autres modifications telles que la phosphorylation, la poly(ADP-ribosyl)ation, l'oxydation peuvent survenir (voir paragraphe I.3).

Le rôle de HMGB1 au niveau cytoplasmique n'est pas encore complètement élucidé. Des études rapportent que la protéine interviendrait dans la régulation du processus d'autophagie. En effet, Tang et collaborateurs ont montré *in vitro* sur des fibroblastes murins et des cellules pancréatiques humaines d'une part que la stimulation de l'autophagie entraînait une translocation cytoplasmique de HMGB1 et d'autre part que les fibroblastes HMGB1^{-/-} étaient dépourvus d'activité autophagique (Tang et al., 2010). La régulation de l'autophagie par HMGB1 dépendrait de son interaction avec le complexe Beclin1/Bcl-2 impliqué dans le processus d'autophagie. Dans une autre étude, des analyses en spectrométrie de masse ont montré que HMGB1 pourrait avoir un rôle dans les voies de sécrétions cellulaires non conventionnelles n'impliquant pas le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Lee et al., 2010a). Cette étude montrait en outre que HMGB1 était surexprimée et co-localisée au niveau des protéines des lysosomes dans les cellules cancéreuses du colon, du foie et de

l'estomac. Ces protéines incluent l'annexine A2, la myosine IC isoforme a, la myosine-9 et la protéine Rab-10, toutes impliquées dans la translocation et la sécrétion protéique.

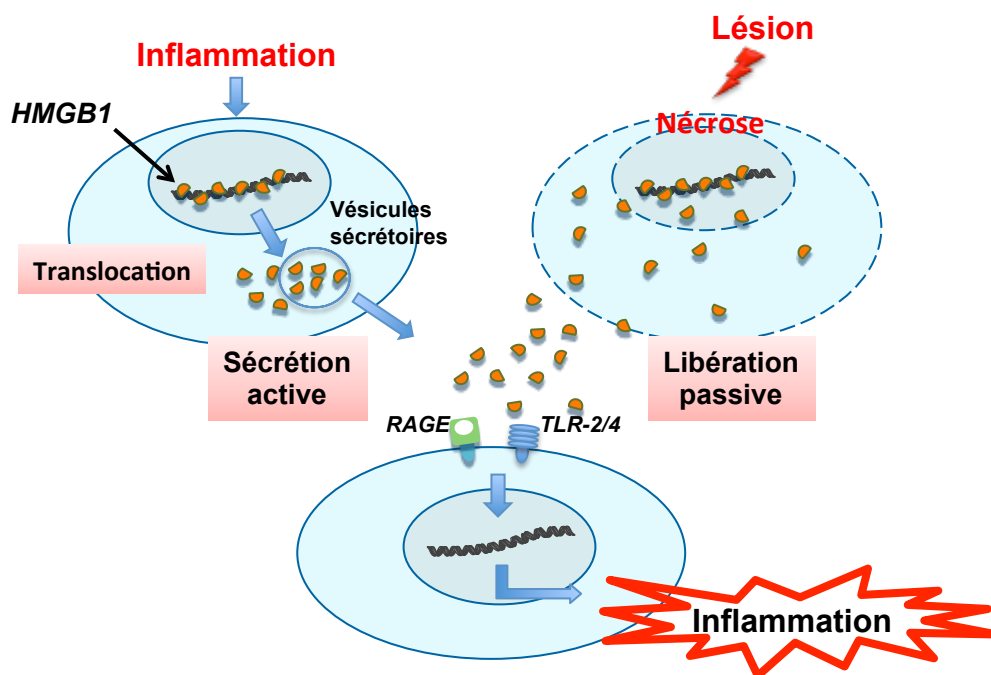
c. Au niveau membranaire

HMGB1 est présente à la surface membranaire de certaines cellules telles que les neuroblastes murins et humains. Elle jouerait un rôle dans la croissance des neurites mais également dans la génération de la plasmine à la surface des cellules, ce qui favoriserait l'adhésion et l'invasion cellulaire (Merenmies et al., 1991. Parkkinen et Rauvala. 1991). Il a également été montré que HMGB1 s'accumulait à la surface des cellules MEL (Murine Erythroleukemia cells) en différenciation (Passalacqua et al., 1997). HMGB1 est également présente à la surface de contact entre les macrophages et les érythroblastes au cours de la prolifération et de la maturation des cellules érythroïdes induite par les macrophages (Hanspal and Hanspal. 1994). Les précurseurs dendritiques myéloïdes expriment à leur surface HMGB1 qui serait impliquée dans la réponse immunitaire au cours de l'inflammation (Ciucci et al., 2011). Enfin, il a également été montré que HMGB1 était externalisée à la surface des plaquettes activées (Rouhiainen et al., 2000).

B) Mécanismes de sécrétion et de libération de HMGB1

Comme nous venons de le décrire, la protéine HMGB1 est majoritairement localisée à l'intérieur de la cellule, en particulier au niveau du noyau. Cependant au cours de certaines situations pathologiques, HMGB1 peut être libérée dans le milieu extracellulaire. Au cours de l'inflammation, au niveau des cellules immunitaires telles que les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques, les neutrophiles ou les cellules NK (natural killer), HMGB1 est transloquée du noyau vers le cytoplasme puis sécrétée dans le milieu extracellulaire par un mécanisme de sécrétion active. Dans tous les types cellulaires, au cours de la nécrose ou suite à une lésion cellulaire, HMGB1 peut être sécrétée par un mécanisme de sécrétion passive (figure 15).

Une fois sécrétée dans le milieu extracellulaire, HMGB1 exerce de multiples activités. Elle est notamment impliquée dans les processus tels que l'inflammation, l'immunité, la migration, l'invasion, la prolifération et la différenciation cellulaires mais aussi dans la régénération tissulaire et la défense antimicrobienne (voir pour revue Kang et al., 2014).



**Figure 15 : Mécanismes de sécrétion et de libération de HMGB1
(adaptée d'après Yang et al., 2005)**

RAGE = Receptor for Advanced Glycation End Product ; TLR = Toll Like Receptor.

a. Sécrétion active

La protéine HMGB1 peut être sécrétée *via* un mécanisme actif par les différentes cellules immunitaires : macrophages, monocytes (Gardella et al., 2002 ; Bonaldi et al., 2003 ; Tang et al., 2007a), neutrophiles (Ito et al., 2007), cellules dendritiques et cellules NK (Natural Killer) (Semino et al., 2005 ; Gougeon et Bras 2011 ;), ainsi que par les fibroblastes (Davis et al., 2012) et les cellules endothéliales (Mullins et al., 2004 ; Bae et Rezaie, 2011 ; Kim et al., 2015). Différents stimuli peuvent être à l'origine de ce mécanisme : LPS, LPC (lysophosphatidylcholine), TNF, INF- α , β ou γ , peroxyde d'hydrogène, monoxyde d'azote, peroxydites ainsi que l'hyperlipidémie et l'hyperglycémie (Wang, 1999 ; Gardella et al., 2002 ; Jiang et Pisetsky 2006 ; Tang et al., 2007a ; Haraba et al., 2011 ; Kim et al., 2011a ; Loukili et al., 2011 ; Tamura et al., 2011 ; Lu et al., 2014).

La sécrétion active de la protéine HMGB1 n'implique pas la voie classique endoplasmique mettant en jeu le réticulum-endoplasmique et l'appareil de Golgi. Elle serait, en effet, dépendante de l'acétylation des deux groupes de résidus lysine présents dans les segments 27-43 et 178-184 d'acides aminés. Ces segments sont localisés dans les domaines de localisation nucléaire à l'ADN (NLS1 et NLS2). Ainsi l'hyperacétylation entraînerait l'accumulation de la protéine HMGB1 dans le

cytoplasme soit par un blocage de son transport vers le noyau après sa synthèse, soit par activation de sa translocation du noyau vers le cytoplasme (Bonaldi et al., 2003).

Hormis l'acétylation, d'autres réactions telles que la phosphorylation, la poly(ADP-ribosyl)ation, l'oxydation ainsi que la méthylation peuvent également être à l'origine de la translocation et de la sécrétion de HMGB1 par un mécanisme actif (Tang et al., 2007a ; Ito et al., 2007 ; Oh et al., 2009 ; Davis et al., 2012 ; Walko et al., 2015, voir paragraphe I.2).

En ce qui concerne les mécanismes de sécrétion active de la protéine HMGB1, Gardella et collaborateurs ont suggéré l'implication des lysosomes (Gardella et al., 2002). En effet, ils ont montré que HMGB1 accumulée dans le cytoplasme est séquestrée dans des vésicules lysosomales dont la sécrétion est dépendante du calcium. L'activation par le LPS ou le LPC induit la sécrétion de HMGB1 dans le milieu extracellulaire (Gardella et al., 2002). Cette hypothèse est appuyée par d'autres études qui montrent que GILT (Gamma Interferon Inducible Lysosomal Thiol Reductase), une enzyme impliquée dans la réduction des liaisons protéiques disulfures ce qui favorise ainsi la dégradation des protéines par le lysosome, participerait à la régulation de la sécrétion de HMGB1 *via* les vésicules lysosomales (Lackman et al., 2007). En effet, il a été montré que les fibroblastes GILT^{-/-} présentait une augmentation du stress oxydant, une altération de la fonction mitochondriale et une accumulation de HMGB1 au niveau cytoplasmique (Chiang and Maric, 2011).

Enfin, les voies de signalisation cellulaire impliquées dans la sécrétion active de HMGB1 ne sont pas complètement élucidées. Néanmoins certaines études montrent l'implication de la voie des JAK/STAT (Liu et al., 2007a ; Hui et al., 2009 ; Kim et al., 2009 ; Wolfson et al., 2013), des MAPK (Zhou et al., 2013) et de NF- κ B (Wang et al., 2013, Watanabe et al., 2013a ; Yang et al., 2014a, Zhang et Wang, 2010).

b. Libération passive

La protéine HMGB1 peut être libérée par un mécanisme passif lors de la perte de l'intégrité membranaire au cours de la mort cellulaire de type nécrotique, lysosomale ou autophagique (figure 16) (Scaffidi et al., 2002 ; Bell et al., 2006 ; voir revue Bianchi et Manfredi, 2004) ou bien en cas de lésions induites par l'hypoxie, l'irradiation, la chimiothérapie, l'hyperthermie (Fucikova et al., 2014) ou la déprivation en glucose (Lee et al., 2011). Dans ces cellules, l'interaction de la protéine HMGB1

avec la chromatine est faible. La protéine est alors rapidement libérée dans le milieu extracellulaire où elle induit diverses réponses pro-inflammatoires.

Toutefois, dans les conditions d'apoptose cellulaire, les données de la littérature sont contradictoires. Certaines formes d'apoptose semblent permettre la libération d'HMGB1, comme l'ont démontré plusieurs travaux récents. En effet, Bell et collaborateurs ont montré que l'induction de l'apoptose sur des cellules Jukart (human T-cell leukemia), HeLa, ou Panc-1 (lignée de cellules épithéliales pancréatiques) par des stimuli apoptotiques tels que l'étoposide, la camptothécine, la staurosporine (STS), le cycloheximide ou le TNF entraînait la sécrétion de HMGB1 dans le milieu extracellulaire (Bell et al., 2006). Il a de plus été montré que HMGB1 libérée dans ces conditions perdait sa capacité à activer les cellules cibles (Kazama et al., 2008). Cette tolérance apparente pourrait être expliquée par la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par la mitochondrie (Kazama et al., 2008). En effet, les ERO pourraient oxyder les cystéines de la protéine HMGB1, qui perdrait alors son pouvoir « immunostimulant ».

Paradoxalement, Scaffidi et collaborateurs ont montré que l'induction de l'apoptose par le TNF ou le cycloheximide sur les cellules HeLa n'entraînait pas de libération de HMGB1 dans le milieu extracellulaire et que la protéine restait localisée au niveau nucléaire (Scaffidi et al., 2002). Cet effet pourrait être lié à une hypoacétylation de la chromatine suite à l'activité apoptotique, ce qui entraînerait en conséquence une rétention d'HMGB1 dans le noyau. La protéine ainsi séquestrée ne peut pas diffuser dans le milieu extracellulaire même si les membranes sont perméables et, de ce fait, elle ne pourra pas exercer son activité pro-inflammatoire (figure 16).

Ces différentes études montrent que la libération de HMGB1 dépend donc en partie de la forme que revêt la mort cellulaire. Ce mécanisme explique pourquoi l'apoptose est généralement silencieuse, alors que la nécrose est un facteur d'induction de l'inflammation.

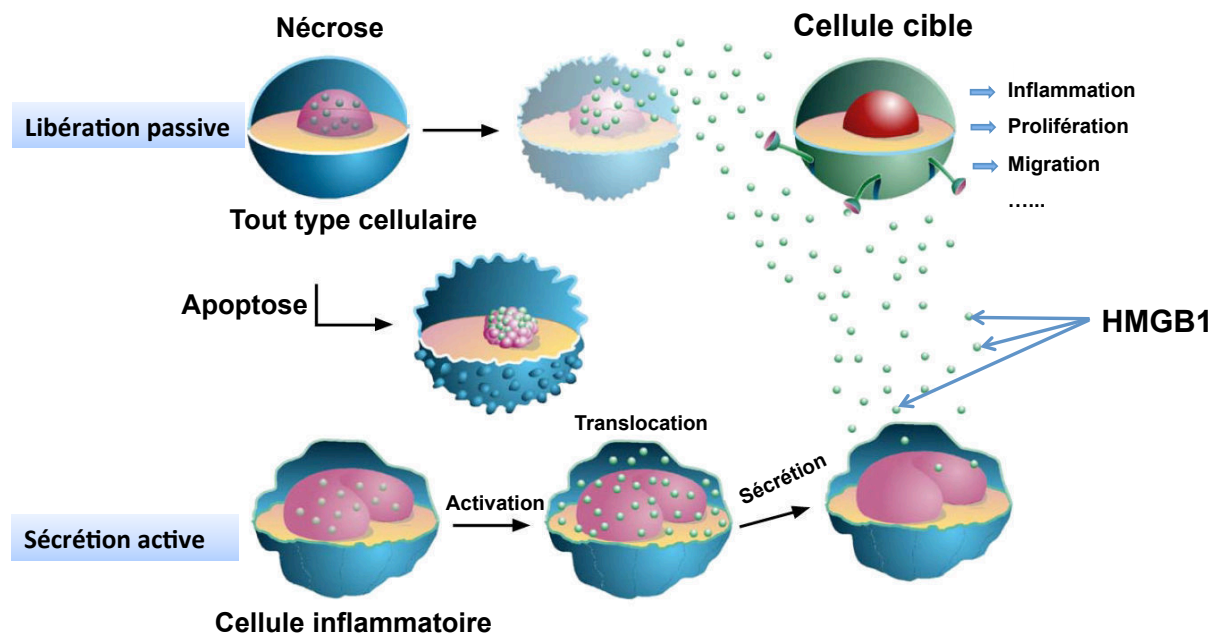


Figure 16 : Modifications de la localisation de HMGB1 après nécrose et apoptose cellulaires et après activation des cellules inflammatoires (adaptée d'après Müller et al., 2001)

3. Modifications post-traductionnelles de HMGB1 : conséquences en termes de localisation et de fonction

Comme nous l'avons déjà évoqué, la protéine HMGB1 peut subir différentes modifications post-traductionnelles qui auront notamment des conséquences sur la localisation et les fonctions cellulaires de HMGB1. Ces modifications incluent l'acétylation, mais également la poly(ADP-ribosyl)ation, la méthylation, la phosphorylation, la glycosylation et l'oxydation (voir pour revue Kang et al., 2014).

A) L'acétylation

L'acétylation de la protéine HMGB1 au niveau des lysines 1 et 11 a été mise en évidence en 1979 par Sterner et collaborateurs (Sterner et al., 1979). En 2003, Bonaldi et collaborateurs ont montré que l'acétylation de HMGB1 au niveau des segments 27-43 et 178-184 situés sur les domaines de localisation nucléaire NLS 1 et 2 favorisait sa sécrétion active par les monocytes (Bonaldi et al., 2003). Dans cette même étude, il a également été montré que l'inhibition des désacétylases, potentialisant donc l'activité des enzymes d'acétylation, favorisait la translocation cytoplasmique de HMGB1 (Bonaldi et al., 2003).

Par ailleurs, au cours de la mort cellulaire, l'acétylation des histones (et non pas de HMGB1) favoriserait la libération de HMGB1 par un mécanisme passif (Scaffidi et al., 2002).

B) La poly(ADP-ribosyl)ation

La poly(ADP-ribosyl)ation des protéines, réaction qui consiste à fixer plusieurs unités ADP-ribose sur les protéines, est catalysée par la poly(ADP-ribose)polymérase, ou PARP, en présence de NAD⁺. Cette enzyme est activée lorsque surviennent des lésions de l'ADN et participe à sa réparation.

La protéine HMGB1 peut être poly(ADP-ribosyl)ée en présence ou en absence de lésions de l'ADN (Tanuma and Johnson, 1983 ; Tanuma et al., 1985a ; 1985b ; 1986). Par ailleurs, des études montrent que la poly(ADP-ribosyl)ation de HMGB1 induit sa translocation et sa sécrétion lorsque les cellules fibroblastiques sont activées ou nécrosées (Ditsworth et al., 2007 ; Davis et al., 2012). D'autres études montrent que cet effet implique la potentialisation de l'activité des enzymes d'acétylation (HAT : Histone Acetyltransferases) et une diminution de celle des enzymes de désacétylation (HDAC 1 et 4 et Sirtuin1) par la PARP (Walko et al., 2015 ; Yang et al., 2014b). Ainsi, la poly(ADP-ribosyl)ation favoriserait l'acétylation de HMGB1 et donc sa translocation et sa sécrétion par les cellules.

C) La phosphorylation

La protéine HMGB1 peut être phosphorylée par des enzymes telles que la protéine kinase C (PKC) ou la calcium/calmoduline protéine kinase (CaMK) IV. Ceci a notamment été mis en évidence sur des monocytes et macrophages stimulés par le LPS, et entraînait ainsi la translocation et la sécrétion de HMGB1 (Zhang et al., 2008 ; Oh et al., 2009). Youn et Shin ont montré que la phosphorylation s'opérait au niveau des résidus sérine 35, 39, 42, 46, 53 et 181 situés dans les deux domaines NLS1 et 2 (Youn et Shin., 2006). Cette phosphorylation entraîne en outre une diminution de la liaison de HMGB1 à la protéine nucléaire KAP- α 1, ce qui modifie son interaction avec l'ADN et sa localisation (Youn et Shin, 2006).

D) Les réactions d'oxydo-réduction

La protéine HMGB1 contient 3 résidus cystéine, deux cystéines en position 23 et 45 situées sur la boîte A et une cystéine en position 106 située sur la boîte B. L'activité extracellulaire de la protéine est dépendante du statut d'oxydo-réduction de ces résidus cystéine (voir pour revue Yu et al., 2015).

Trois formes redox de HMGB1 ont été identifiées (figure 17) : HMGB1 réduite ou oxydée sur l'ensemble des cystéines et HMGB1 réduite au niveau de la cystéine 106 (Cys106) comportant un pont disulfure entre les cystéines 23 (Cys23) et 54 (Cys54).

HMGB1 réduite sur l'ensemble des groupements cystéine forme un complexe avec la chimiokine CXCL 12 et se lie ensuite au récepteur CXCR4 ce qui induit la migration cellulaire et le recrutement de cellules inflammatoires (Venereau et al., 2012). Par ailleurs, cette forme réduite de HMGB1 ne déclenche pas la production de cytokines par les cellules immunitaires.

En revanche, lorsque HMGB1 est à l'état réduit au niveau de la cystéine 106 seulement (forme avec pont disulfure), elle peut se lier au récepteur TLR4 et exercer une activité cytokine (Yang et al., 2010 ; Venereau et al., 2012).

Enfin, quand la protéine est oxydée sur l'ensemble des résidus cystéine, elle ne présente pas d'activité cytokine ou chimiotactique (Venereau et al., 2012). D'autres études ont cependant révélé que HMGB1 à l'état oxydé possède encore la capacité d'activer les neutrophiles et les cellules endothéliales vasculaires et de déclencher une réaction inflammatoire (Davalos et al., 2013 ; Maugeri et al., 2014).

Hormis leurs rôles dans l'inflammation, les modifications redox sont cruciales pour les fonctions de réparation de l'ADN et d'autophagie de HMGB1. La forme réduite et non pas oxydée de la protéine présente une affinité plus forte pour les structures d'ADN déformées, mais (Park et Lippard, 2011). Il est à noter que les mutations au niveau des cystéines 23 et/ou 45 n'affectent pas la distribution nucléaire de HMGB1, alors que les mutations sur la cystéine 106 provoquent une délocalisation nucléaire vers le cytosol et favorisent l'autophagie (Hoppe et al., 2006 ; Tang et al., 2010).

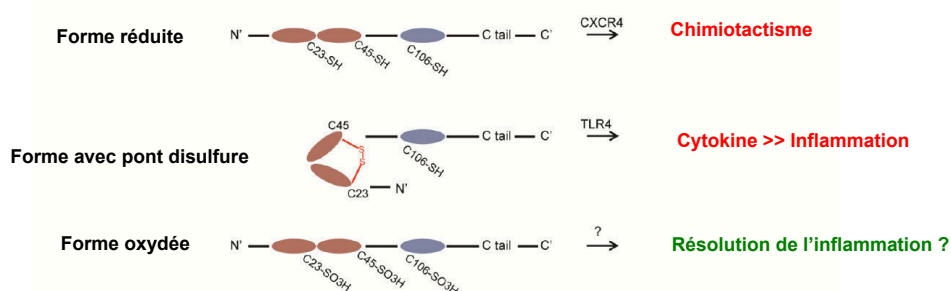


Figure 17 : Différentes formes redox de la protéine HMGB1 et les conséquences en terme de fonction cellulaire (adaptée d'après Singh et al., 2016)

E) La méthylation

Une mono-méthylation de la lysine en position 42 de la protéine HMGB1 peut être observée dans les neutrophiles, ce qui entraîne un changement de la conformation de la boîte A et une diminution de la liaison de HMGB1 à l'ADN. HMGB1 est alors transloquée du noyau vers le cytoplasme dans ces neutrophiles (Ito et al., 2007). De plus, dans des cellules de carcinomes rénaux, il a été mis en évidence une mono-méthylation de HMGB1 au niveau de la lysine 112, ce qui contribue également à la délocalisation de HMGB1 vers le cytoplasme (Wu et al., 2013). Ainsi, HMGB1 est une cible pour les agents de méthylation dans la chromatine (Boffa et Bolognesi, 1985).

II. Rôle de HMGB1 et récepteurs impliqués

Comme nous venons de le voir, HMGB1 peut être localisée dans différents compartiments cellulaires, et y exercer différents rôles. Au niveau nucléaire, elle participerait au maintien de la structure de la chromatine et à la transcription de gènes, et au niveau cytoplasmique à l'autophagie. Par ailleurs, une fois sécrétée dans le milieu extracellulaire HMGB1 exerce de multiples activités. Elle est notamment impliquée dans l'inflammation, l'immunité, la migration, l'invasion, la prolifération et la différenciation cellulaires mais également dans la régénération tissulaire et la défense anti-microbienne (figure 18) (voir pour revue Kang et al., 2014).

1. Rôles de HMGB1

A) Médiateur de l'inflammation

Ce sont les travaux menés par le groupe de K.J. Tracey qui ont démontré que les formes extracellulaires d'HMGB1 participent au choc septique en tant que cytokines pro-inflammatoires (Wang, 1999). Ces effets résultent de l'activation anormalement élevée de la réponse inflammatoire, le plus souvent liée à la libération massive de LPS dans le sang. Le LPS stimule la production de cytokines pro-inflammatoires précoces telles que l'IL-1 et le TNF, notamment par les macrophages. Ces médiateurs contribueraient secondairement à mettre en place une boucle d'activation autocrine qui provoquerait l'accumulation d'autres cytokines pro-inflammatoires.

Plus tardivement, l'activité du LPS et/ou des cytokines précoces induirait la sécrétion d'HMGB1. Cette dernière agirait en relais des cytokines exprimées précocement, et amplifierait la réponse

inflammatoire en induisant notamment en retour la sécrétion d'IL-1 et de TNF. La contribution tardive de HMGB1 au choc septique a été démontrée, notamment dans des modèles expérimentaux murins, par l'amélioration de l'état général observé après administration d'anticorps neutralisant la protéine HMGB1 ou de molécules bloquant sa sécrétion, tel que l'éthyl-pyruvate (Ulloa et al., 2002).

HMGB1 joue un rôle central dans de nombreuses pathologies aiguës ou chroniques à caractère inflammatoire : choc septique, polyarthrite rhumatoïde, pathologies d'ischémie/reperfusion, athérosclérose, lupus érythémateux et dans certains cancers (Klune et al., 2008 ; Kang et al., 2014).

Les effets inflammatoires de HMGB1 ont été mis en évidence *in vivo* dans plusieurs tissus. L'administration de la protéine HMGB1 par voie intracérébrale, intratrachéale ou intrapéritonéale chez la souris entraîne une inflammation respectivement au niveau du cerveau, des poumons, des intestins (voir pour revue Yang et al., 2005).

D'autres études ont mis en évidence l'effet de HMGB1 dans l'inflammation. Il a été montré *in vitro* que la protéine HMGB1 entraînait la libération de médiateurs de l'inflammation tels que TNF, IL-1 α , IL-1RA, IL-6, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β par les macrophages/monocytes (Andersson et al., 2000 ; He et al., 2012), les neutrophiles (Park et al., 2004a ; Silva et al., 2007) et les cellules dendritiques (Yang et al., 2007b) dont elle induit la maturation.

HMGB1 participe également à l'inflammation au niveau de l'endothélium. Une étude montre que l'incubation de HMGB1 avec des cellules HMEC (Human Microvascular Endothelial Cells) augmente l'expression d'ICAM-1, de VCAM-1 et des récepteurs RAGE, et la sécrétion de TNF, IL-8, MCP-1, PAI-1 et de t-PA (Fiuza et al., 2003). Treutiger et collaborateurs ont observé les mêmes effets sur des cultures de cellules HUVEC (Human Umbilical Venular Endothelial Cells) et ont montré en outre que ces effets inflammatoires impliquaient la boîte B de la protéine HMGB1 (Treutiger et al., 2003). Par ailleurs, HMGB1 participerait à la perte de l'intégrité membranaire des cellules endothéliales (Palumbo et al., 2004).

B) Migration cellulaire et réparation tissulaire

HMGB1 participe à la réorganisation du cytosquelette et stimule la migration des cellules musculaires lisses (Degryse et al., 2001). Elle entraîne également la migration des cellules endothéliales, monocytes, neutrophiles, cellules dendritiques et fibroblastes (figure 18) (voir pour revue : Barnay-Verdier et al., 2009 ; Kang et al., 2014). Cependant HMGB1 peut également inhiber la migration cellulaire. Il a

notamment été montré que la migration des cellules HPAECs (Human Pulmonary Artery Endothelial Cells) induite par le VEGF était inhibée par HMGB1 (Bauer et al., 2013).

La contribution de HMGB1 à la migration, la prolifération et/ou la différenciation des cellules n'est pas sans évoquer une implication possible de cette protéine dans le processus tumoral. De ce fait, il a été suggéré que HMGB1 pourrait moduler la prolifération cellulaire, augmenter la survie et accroître le pouvoir métastatique des cellules tumorales. Aussi, l'expression de la protéine HMGB1, déjà importante dans les cellules normales, serait accrue dans divers cancers et constituerait un marqueur de mauvais pronostic (Ellerman et al., 2007)

Enfin, HMGB1 recrute et induit la prolifération et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques. L'ensemble de ces résultats suggère que HMGB1 pourrait non seulement constituer un signal de lésion tissulaire, mais également prendre une part active à la reconstitution des tissus lésés. À l'appui de cette hypothèse, plusieurs études ont mis en évidence une participation d'HMGB1 dans la cicatrisation et la régénération du myocarde en stimulant notamment la prolifération et la différenciation des cellules souches myocardiques (Limana et al., 2005 ; Straino et al., 2008 ; King et Newmark, 2012).

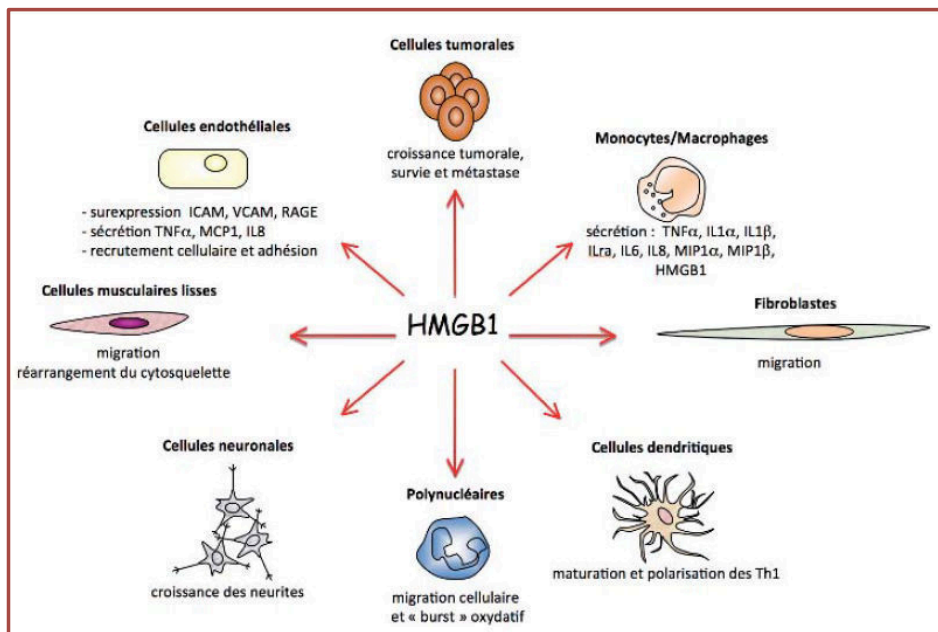


Figure 18 : Rôles biologiques de la protéine HMGB1 (d'après Barnay-Verdier et al., 2009)

2. Récepteurs cellulaires et voies de transduction impliquées dans les effets de HMGB1

L'activité extracellulaire de la protéine HMGB1 implique deux types de récepteurs : les récepteurs RAGE (Receptor for Advanced Glycation End product) et les récepteurs TLR-2 et 4 (Toll Like Receptor).

A) Le récepteur RAGE

Le récepteur RAGE appartient à la superfamille des immunoglobulines. Il a d'abord été identifié comme un récepteur aux produits de glycation avancée ou AGEs (advanced glycation endproducts). Les AGEs constituent un groupe hétérogène de protéines produites lors d'une réaction non enzymatique entre les groupements ose des sucres et les groupements amine des protéines, de l'ADN ou des lipides. Les AGEs sont des molécules qui s'accumulent dans le sang des patients diabétiques.

RAGE est exprimé à la surface de nombreuses cellules : cellules endothéliales, neurones, macrophages, lymphocytes, cellules dendritiques et cellules musculaires lisses, mais son niveau d'expression est très variable selon les cellules (voir pour revue Yang et al., 2005). En plus, il a été mis en évidence une forte augmentation de l'expression de RAGE chez les patients souffrant de diabète, de maladie d'Alzheimer, d'athérosclérose ou d'ischémie cérébrale (Rauvala et Rouhiainen, 2007 ; Zhai et al., 2008).

Le domaine d'interaction d'HMGB1 avec RAGE est localisé au niveau de la boîte B. Cette interaction induit au moins deux voies de transduction majeures : (1) la première implique Cdc42 et Rac, des triphosphatases à guanosine qui régulent la motilité cellulaire et la croissance neuronale ; (2) la seconde active Ras et les mitogen-activated protein kinases (MAPK) et conduit à l'activation de NF- κ B (Huttunen et al., 1999) (figure 19).

B) Les récepteurs TLR-2 et 4

Les récepteurs TLRs appartiennent à la grande famille des PRRs (Pattern Recognition Receptors). Ce sont des protéines transmembranaires possédant un domaine extracellulaire riche en leucine. Les récepteurs TLRs sont impliqués dans la reconnaissance de composants microbiens et dans la morphogénèse. La voie de signalisation des TLRs aboutit à l'activation de NF- κ B, qui est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, l'apoptose ou la réponse inflammatoire. HMGB1 interagit avec TLR-2 et 4 et ces interactions seraient particulièrement importantes dans l'activation des leucocytes (Park et al., 2004a).

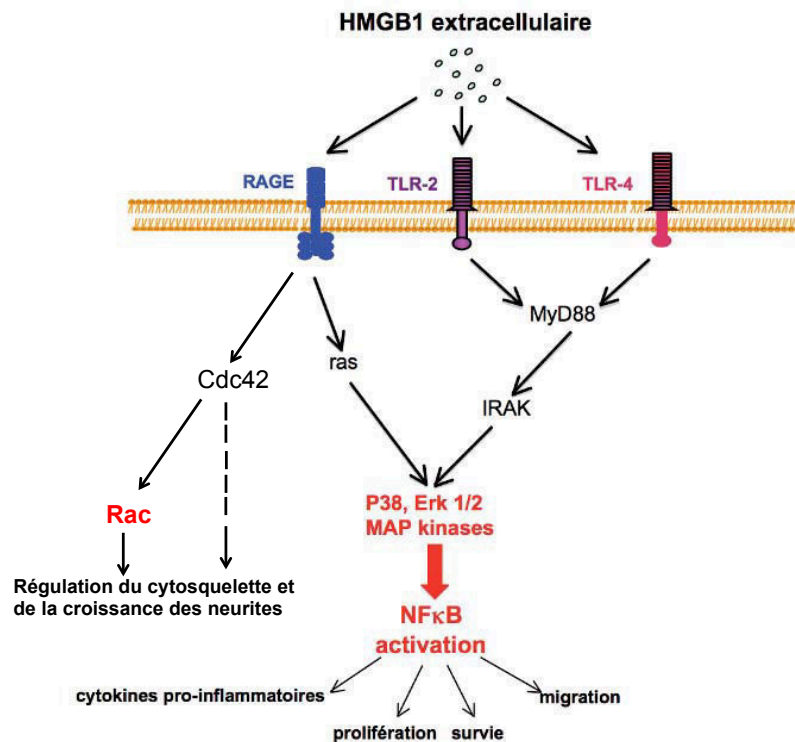


Figure 19 : Voies de transduction du signal induites par HMGB1 après fixation aux récepteurs RAGE et TLR-4 (d'après Huttunen et al., 1999 et Barnay-Verdier et al., 2009)

RAGE= Receptor for Advanced Glycation Endproducts; TLR = Toll Like Receptor; My D88 = *myeloid differentiation primary-response protein 88* ; ERK 1/2 = *Extracellular signal-regulated kinases 1/2* ; MAPK= *Mitogen-activated protein kinases* ; Cdc42 = *Cell division control protein 42 homolog* ; IRAK= *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase*.

III. HMGB1 et ischémie cérébrale

Au cours de l'ischémie cérébrale, l'activité inflammatoire participe à l'extension de la lésion initiale. Le processus inflammatoire implique l'activation de la microglie et des macrophages. Ce microenvironnement inflammatoire riche en cytokines et chimiokines induit notamment une augmentation de l'expression de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales et favorise le recrutement de leucocytes circulants puis leur infiltration dans le parenchyme cérébral.

Au cours de ma thèse, j'ai recherché si HMGB1 était impliquée dans la toxicité vasculaire du rt-PA après une ischémie. Quelques rappels bibliographiques sur le profil et le rôle de cette protéine au cours de l'ischémie sont donc nécessaires.

1. HMGB1 au cours de l'ischémie cérébrale

A) Expression et sécrétion post-ischémiques de HMGB1

Dans le cerveau, HMGB1 est exprimée par différentes cellules : neurones, microglie, astrocytes, oligodendrocytes et cellules endothéliales (Faraco et al., 2007 ; Qiu et al., 2008).

A la suite de l'ischémie, des études montrent que l'expression de HMGB1 évaluée par Western Blot diminue considérablement dans le cerveau 12 heures après l'ischémie et revient à son taux basal 3 jours après (Kim et al., 2006, 2008 ; Gong et al., 2014). A l'inverse, l'étude de Wang et collaborateurs est la seule à avoir montré une augmentation de l'expression de HMGB1 évaluée par Western Blot dans le parenchyme cérébral 24 heures après l'ischémie (Wang et al., 2010). Cependant, les ARN messagers restent inchangés. D'un point de vue immunohistologique, les études montrent dans les heures qui suivent l'ischémie, une perte du marquage de HMGB1 dans le cœur de la zone ischémisée, plus progressive dans la zone de pénombre, surtout au niveau neuronal (Faraco et al., 2007 ; Liu et al., 2007b ; Qiu et al., 2008). Cette diminution de l'expression de HMGB1 dans le cerveau est associée à une augmentation de sa concentration dans le LCR et le sang. Cette augmentation est observée dès 3 heures et persiste plusieurs jours : 7 jours pour le LCR et jusqu'à 10 jours pour le plasma (Kim *et al.*, 2006, 2008 ; Muhammad *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2011 ; Shin *et al.*, 2014 ; Gong *et al.*, 2014). La sécrétion de HMGB1 dans ces deux milieux biologiques peut avoir diverses origines cellulaires. Le tableau 3 regroupe les différentes sources cellulaires et tissulaire possibles de HMGB1 après une ischémie expérimentale.

Tableau 3 : Les différentes sources de HMGB1 au cours de l'ischémie cérébrale

Modèles expérimentaux	Source de HMGB1	Références
Ischémie cérébrale endovasculaire transitoire, rat	-Tissu cérébral - Neurones -Oligodendrocytes - Microglies/ Macrophages - Astrocytes - Cellules vasculaires	Kim et al., 2006, 2008
Ischémie cérébrale endovasculaire permanente, souris	- Neurones - Astrocytes (Nécrosés)	Faraco et al., 2007
Ischémie cérébrale transitoire, rat	- Tissu cérébral	Liu et al., 2007b
Ischémie cérébrale endovasculaire permanente, souris	- Neurones	Muhammad et al., 2008
Ischémie cérébrale transitoire, rat	- Neurones - Astrocytes	Qiu et al., 2008
Ischémie cérébrale transitoire, rat	- Tissu cérébral	Zhang et al., 2011
Ischémie cérébrale endovasculaire et par electro-coagulation, souris	- Tissu cérébral	Liesz et al., 2015

B) Mécanismes de sécrétion de HMGB1 au cours de l'ischémie cérébrale

a. Au cours de la phase aiguë d'ischémie

Au cours de la phase aiguë de l'ischémie, une importante nécrose cellulaire est observée dans la zone de lésion, la protéine HMGB1 est alors principalement libérée par un mécanisme passif (figure 20). Cette libération se produit précocement après le début de l'ischémie. Par conséquent le taux de

la protéine augmente très vite dans les liquides biologiques tels que le sang et le LCR (voir paragraphe III.1.A).

De plus, il a été montré que HMGB1 retrouvée dans le LCR est hypoacéthylée donc probablement libérée dans le milieu extracellulaire par un mécanisme de libération passive (Kim et al., 2006). Ce résultat a récemment été confirmé par l'équipe de Liesz et collaborateurs. Ils ont montré après une analyse en spectrophotométrie de masse de tissus cérébraux et de sérum des souris quelques heures après l'ischémie que HMGB1 était hypoacéthylée et sous forme réduite sur l'ensemble de ses résidus cystéines (forme chimiokine). Par contre, l'isoforme présentant un pont disulfure entre les résidus cystéines 23 et 45 (forme cytokine) n'était retrouvée que 24 heures après l'ischémie dans le sang (et non dans le tissu cérébral). Ces résultats suggèrent que HMGB1 libérée par les cellules nécrotiques quelques heures après l'ischémie l'est sous sa forme chimiokine. En traversant la barrière hémato-encéphalique, elle se retrouve dans la circulation sanguine où elle prend la forme redox cytokine (Liesz et al., 2015).

HMGB1 libérée après nécrose tissulaire serait capable d'induire la libération d'autres cytokines inflammatoires. Qiu et collaborateurs ont montré une augmentation de l'expression de TNF par des cellules gliales incubées en présence d'un milieu de culture de neurones exposés à un stress excitotoxique glutamatergique. Cet effet était bloqué par utilisation d'anticorps anti-HMGB1 (Qiu et al., 2008).

b. Au cours de la phase subaiguë d'ischémie

A côté de la libération passive de HMGB1 par les cellules nécrotiques au cours la phase aiguë de l'ischémie cérébrale, HMGB1 peut être secrétée par un mécanisme actif par différentes cellules cérébrales (microglie, astrocytes, cellules endothéliales) et par les cellules immunitaires, ce qui amplifie le processus inflammatoire mis en place (figure 20). En effet la sécrétion des protéines de l'inflammation, dont HMGB1, persiste plusieurs jours voire des mois après l'ischémie (Kim et al., 2006 ; Schulze et al., 2013).

Kim et collaborateurs ont montré une augmentation de l'expression de HMGB1 au niveau des microglies activées, des astrocytes et des cellules endothéliales chez le rat à deux jours post-ischémie (Kim et al., 2008). Les microglies, considérées comme les macrophages résidents du cerveau, sont capables d'activité phagocytaire après une activation inflammatoire. Elles peuvent également exercer une activité cytotoxique par la libération de cytokines inflammatoires (TNF, IL-1 β et IL-6), de

NO et d'espèces réactives de l'oxygène. Elles peuvent aussi avoir une activité neuroprotectrice par une production de facteurs neurotrophiques tels que le BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor) (Lucas et al., 2006).

L'activation microgliale par HMGB1 après l'ischémie persiste plusieurs jours. Les microglies peuvent à leur tour sécréter la protéine HMGB1 et d'autres cytokines inflammatoires (Kim et al., 2006 et 2008). La protéine HMGB1 sécrétée est capable alors de recruter des cellules immunitaires telles que les cellules NK (Natural killers), les lymphocytes T, les macrophages et les cellules dendritiques dont elle peut induire la maturation (Blanco et al., 2008 ; Sundberg et al., 2009). Les cellules NK activées et les cellules dendritiques matures peuvent sécréter à leur tour HMGB1 et stimuler la maturation des lymphocytes T, amplifiant l'inflammation au niveau du tissu ischémié (figure 20).

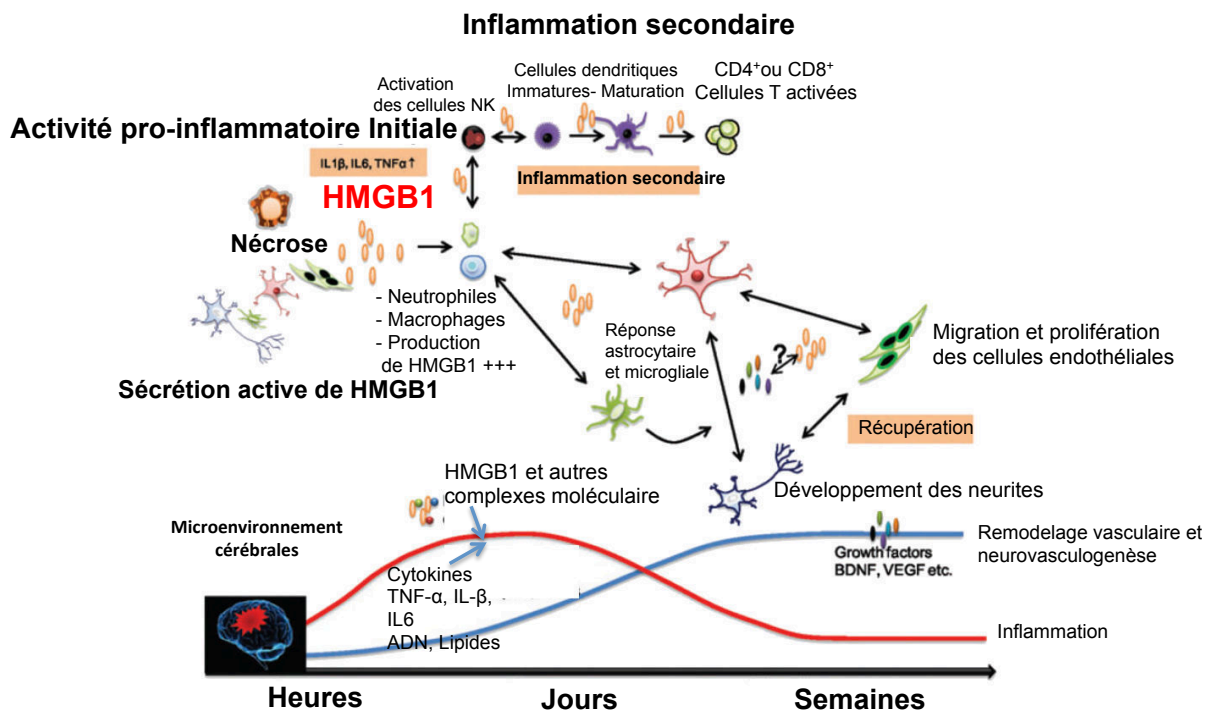


Figure 20 : HMGB1 au cours des différentes phases de l'ischémie cérébrale (adaptée d'après Hayakawa et al., 2010)

2. Rôle de HMGB1 au cours de l'ischémie cérébrale

Dans la littérature, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle délétère de HMGB1 après l'ischémie. En effet, l'injection de HMGB1 dans le cerveau de rats ischémiés augmente non seulement le volume d'infarctus mais aggrave le déficit neurologique (Liu et al., 2007b ; Zhang et al., 2014a).

Par ailleurs, il a été montré que HMGB1 favorisait l'expression de protéines inflammatoires, et notamment de cytokines. Faraco et collaborateurs ont montré que l'injection de HMGB1 recombinant dans le cerveau de souris ischémiées augmentait l'expression de NOS inducible (NOSi) et d'IL-1 β (Faraco et al., 2007). Zhang et collaborateurs, ont quant à eux mis en évidence une augmentation de l'expression d'IL-17A après injection de la protéine chez les souris ischémiées (Zhang et al., 2014a). Outre ces études *in vivo*, des études réalisées *in vitro* ont montré que l'incubation de la forme recombinante de la protéine avec 1) des cellules gliales induisait l'expression de la NOSi, d'IL-1 β , de TNF et de COX-2 (Kim et al., 2006 ; Faraco et al., 2007 ; Qiu et al., 2008) 2) avec des cellules endothéliales une augmentation de l'expression d'ICAM-1 (Qiu et al., 2008).

Plusieurs stratégies inhibitrices vis-à-vis de HMGB1 ont été évaluées *in vivo* et *in vitro* (tableau 4).

Kim et collaborateurs ont tout d'abord montré que la suppression de l'expression de HMGB1 chez les rats ischémiés grâce à l'utilisation de shRNA (short hairpin RNA) entraînait une diminution du volume de lésion, de l'activation microgliale et de la production de cytokines inflammatoires (TNF, NOSi, IL-1 β), confirmant ainsi le rôle central de HMGB1 dans le processus inflammatoire post-ischémique (Kim et al., 2006). Dans une autre étude, Liu et collaborateurs ont montré les mêmes effets neuroprotecteurs après l'injection d'anticorps anti-HMGB1 chez le rat dans un modèle d'ischémie transitoire (Liu et al., 2007b). Cette étude montrait en outre une diminution de l'activation des MMP-9 ainsi qu'une diminution de la perméabilité de la BHE après le traitement par un anticorps anti-HMGB1. Le rôle de HMGB1 dans l'inflammation post-ischémique a récemment été confirmé par Liesz et collaborateurs dans deux modèles d'ischémie endovasculaire transitoire. En effet l'administration d'anticorps anti-HMGB1 chez les souris ischémiées diminuait l'expression et les taux sériques des cytokines inflammatoires TNF, IL-1 β et IL-6 à 6 heures et 24 heures post-ischémie (Liesz et al., 2015). L'utilisation de ces anticorps réduisait également le volume de la lésion (Muhammad et al., 2008 ; Liesz et al., 2015). D'autres études utilisant des siRNA anti-HMGB1 ou la glycyrrhizine, un inhibiteur de l'expression et de l'activité chimiokine de HMGB1, ont également mis en évidence une réduction du volume de lésion et de la production de TNF, NOSi, IL-1 β et IL-6, mais également une

réduction des déficits fonctionnels post-ischémiques (Kim et al., 2011b ; Gong et al., 2014 ; Zhang et al., 2014a). Par ailleurs, Zhang et collaborateurs ont montré que l'injection d'anticorps anti-HMGB1 chez les rats ischémiés diminuait l'œdème cérébral et la perméabilité des capillaires cérébraux. Cet effet sur la perméabilité a été confirmé dans un modèle *in vitro* de BHE (Zhang et al., 2011).

HMGB1 libérées par les cellules nécrotiques ou sécrétée par les cellules immunitaires au cours de l'ischémie cérébrale interagit principalement avec les récepteurs RAGE et TLR.

Ces récepteurs sont exprimés par différentes cellules cérébrales : neurones, microglie et cellules endothéliales (Deane et al., 2003 ; Arancio et al., 2004 ; Bierhaus et al., 2005 ; Qiu et al., 2008). Une augmentation de l'expression des récepteurs RAGE et TLR a été retrouvée chez les patients victimes d'AVC ainsi que dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale (Menini et al., 2014 ; Zhai et al., 2008 ; Brea et al., 2011 ; Kamide et al., 2012).

En ce qui concerne les récepteurs RAGE, il a été mis en évidence que les souris ischémiées RAGE^{-/-} présentent une diminution du volume de lésion et de l'expression des cytokines TNF, IL-1 β et IL-6 (Muhammad et al., 2008 ; Liesz et al., 2015). Ces mêmes effets ont également été observés après injection d'anticorps anti-HMGB1 chez les souris ischémiées. L'utilisation de la forme soluble du récepteurs RAGE, qui fixe HMGB1 et empêche sa liaison aux récepteurs RAGE exprimés à la surface des cellules, avait également un effet protecteur après ischémie (Muhammad et al., 2008).

En ce qui concerne les récepteurs TLR, des études montrent que les souris ischémiées KO TLR 2 et 4 présentent une lésion cérébrale moindre et un déficit neurologique moins prononcé à 3 jours (Caso et al., 2007 ; Tang et al., 2007b). De plus, une corrélation des taux sériques des récepteurs TLR 2 et 4 et des taux sériques de TNF, IL-1 β et IL-6 a été mise en évidence chez les patients victimes d'AVC (Brea et al., 2011).

L'ensemble de ces études confirme le rôle crucial de HMGB1 dans la neuroinflammation et la progression de la lésion cérébrale post-ischémique.

Tableau 4 : Rôle de HMGB1 au cours de l'ischémie

Modèles d'ischémie cérébrale	Stratégie inhibitrice	Effets observés	Références
Ischémie endovasculaire transitoire, rat Culture primaire de microglie + NMDA	Anticorps (Anti-HMGB1) sh-ARN HMGB1	↓ Volume de lésion Activation microgliale TNF, NOSi, Cox-2, IL-1β	Kim et al., 2006, 2008
Ischémie transitoire, rat	Anticorps Anti-HMGB1	↓ Volume de lésion, Déficit neurologique Activation microgliale TNF, NOSi MMP9 Protection de de la BHE	Liu et al., 2007b
Ischémie endovasculaire permanente, souris	Anti-HMGB1 Souris RAGE ^{-/-} forme soluble RAGE	↓ Volume de lésion	Muhammad et al., 2008
Ischémie endovasculaire transitoire, rat	siRNA	↓ Volume de lésion Déficit neurologique	Kim et al., 2011b
Ischémie endovasculaire transitoire, rat	Glycyrrhizine	↓ Volume de lésion Déficit neurologique TNF, NOSi, COX-2, IL-6	Gong et al., 2014
Ischémie transitoire, souris	Glycyrrhizine	↓ Volume de lésion Déficit neurologique IL-17A via TLR-4	Zhang et al., 2014a
Ischémie endovasculaire transitoire, rat	Glycyrrhizine	↓ Volume de lésion Déficit neurologique et moteur Activation microgliale TNF, NOSi, COX-2, IL-1β	Kim et al., 2012
Ischémie transitoire, rat Modèle de BHE	Anti-HMGB1	↓ œdème cérébral Perméabilité des capillaires cérébraux Perméabilité de la BHE	Zhang et al., 2011
Ischémie endovasculaire et par electro-coagulation, souris	Anti-HMGB1 Souris RAGE ^{-/-}	↓ TNF, IL-1β, IL-6	Liesz et al., 2015

TNF= Facteur de nécrose tumorale ; IL-1β= Interleukine-1β ; IL-6= Interleukine-6 ; COX-2= Cyclo-oxygénase ; IL-17A Interleukine-17A ; siRNA ou shRNA = Petit *ARN interférant* ; MMP9= Métalloprotéase de la matrice ; NOSi =NO synthase inducible ; BHE= Barrière hémato-encéphalique ; RAGE = récepteur des produits de fin de glycation.

3. HMGB1, biomarqueur de l'inflammation post-ischémique en clinique ?

Plusieurs études cliniques ont été réalisées ces dernières années afin de déterminer si HMGB1 pouvait être considéré comme un biomarqueur de l'inflammation post-ischémique. Cependant, l'hétérogénéité de l'étiologie des AVC, de la localisation de la lésion ainsi que de la sévérité des signes cliniques rendent difficile l'interprétation de ces données cliniques. Le tableau 5 regroupe les études cliniques concernant l'évolution des taux de HMGB1 chez les patients victimes d'AVC.

Goldstein et collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence une augmentation des taux sériques de HMGB1 chez les patients victimes d'AVC ischémique (Goldstein et al., 2006). D'autres études ont ensuite confirmé ce résultat et ont montré que cette augmentation persistait plusieurs jours après l'ischémie (Muhammad et al., 2008 ; Vogelgesang et al., 2010).

Par ailleurs, les études menées par Schuleze et collaborateurs ont rapporté que les taux plasmatiques de HMGB1 restaient augmentés jusqu'à 30 jours après l'ischémie et étaient corrélés avec les taux élevés de leucocytes circulants chez les patients (Schuleze et al., 2013). D'autres corrélations intéressantes ont été mises en évidence, notamment entre les taux sériques et/ou plasmatiques élevés de HMGB1 chez les patients, la sévérité des signes cliniques et le taux de cytokines inflammatoires (TNF, IL-1 β), et ce 24 heures après l'ischémie (Yang et al., 2011 ; Liesz et al., 2015). Sapojnikova et collaborateurs ont montré une corrélation entre les taux plasmatiques élevés de HMGB1 et les taux de MMP9. Ces taux élevés de HMGB1 étaient corrélés entre autre à une mauvaise récupération clinique chez ces patients (Sapojnikova et al., 2014). Ces études suggèrent que HMGB1 peut être considérée aujourd'hui comme un marqueur de la sévérité des signes cliniques observés chez les patients. Par ailleurs, Huang et collaborateurs ont montré que les taux plasmatiques élevés de HMGB1 sont corrélés à la mortalité 1 an après l'ischémie (Huang et al., 2013), ce qui indique que HMGB1 pourrait également avoir une valeur pronostique chez les patients victimes d'AVC.

Toutefois, aucune donnée clinique sur la fonction biologique de HMGB1 ainsi que sur son potentiel impact clinique n'a encore été précisée. Il serait particulièrement intéressant de mieux caractériser les différentes formes oxydées ou réduites de la protéine afin de mieux comprendre la fonction d'induction et de résolution de l'inflammation de HMGB1 chez les patients victimes d'AVC.

Enfin, alors que plusieurs stratégies ciblant HMGB1 ont montré leur efficacité à réduire la lésion ischémique et l'inflammation dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale, aucune molécule n'a encore été testée chez l'homme.

Tableau 5 : Etudes cliniques concernant l'évolution des taux de HMGB1 à la suite d'un AVC

Etudes	Concentrations sériques ou plasmatiques de HMGB1	Temps post-AVC	Corrélations (taux de HMGB1)
Goldstein et al., 2006	HMGB1 sérique Contrôle : $16,8 \pm 10,9$ ng/ml Ischémie : $218 \pm 18,8$ ng/ml	24 heures	Faible corrélation avec le temps d'apparition des symptômes cliniques
Vogelgesang et al., 2010	HMGB1 sérique	2 semaines	Corrélation avec les taux sériques d'IL-6
Muhammad et al., 2008	HMGB1 sérique	24 heures	–
Schulze et al., 2013	HMGB1 plasmatique	1, 3, 7 jours et jusqu'à 1 an	–
Yang et al., 2011	HMGB1 sérique Contrôle : $14,5 \pm 6,8$ ng/ml Ischémie : $303,4 \pm 36,5$ ng/ml	24 heures	Corrélation avec la sévérité des signes cliniques évalués par le score NHISS Corrélation avec les taux de TNF
Liesz et al., 2015	HMGB1 plasmatique	24 heures	Corrélation avec le volume de lésion et la sévérité des signes cliniques évalués par le test NHISS Corrélation avec les taux élevés de IL-1 β
Huang et al., 2013	HMGB1 plasmatique	Variable (au moment de l'admission)	Corrélation avec la sévérité des signes cliniques après ischémie et la mortalité chez les patients 1 an après l'ischémie
Sapojnikova et al., 2014	HMGB1 plasmatique	Dans les 24 heures	Corrélation avec une mauvaise récupération fonctionnelle Corrélation avec les taux de MMP9

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

L'activité enzymatique à l'origine de la synthèse des poly(ADP-riboses) a été décrite en 1960 par le laboratoire de Paul Mandel à Strasbourg en France (Chambon et al., 1963). L'enzyme responsable de cette activité a d'abord été nommée poly(ADP-ribose)transférase (PADPRT) puis PAR synthétase (PARS) et enfin poly(ADP-ribose)polymérase (PARP) qui est le terme retenu. Au cours de cette dernière décennie, les approches génomiques ont permis d'identifier 18 séquences codant pour la PARP dans le génome humain (Hassa et al., 2006). A ces 18 séquences correspondent 18 isoformes de l'enzyme PARP dont 6 isoformes présentent une activité de poly(ADP-ribosyl)ation (les PARP-1, -2, -3 et -4, et les tankyrases-1 et -2), alors que les autres membres de la famille catalysent la mono(ADP-ribosyl)ation (Amé et al., 2004 ; Kleine et al., 2008 ; Riffel et al., 2012). Les enzymes de la famille PARP sont abondamment présentes dans les noyaux des cellules, notamment au niveau cérébral.

La PARP-1 est l'enzyme la plus abondante et étudiée dans cette famille. Principalement localisée au niveau du noyau, elle est constitutive, ubiquitaire et abondamment retrouvée dans l'organisme. Elle peut être associée à la chromatine ou localisée au niveau du centrosome. Il a également été montré que la PARP-1 serait présente dans la mitochondrie (Du et al., 2003 ; Lai et al., 2008). Au niveau cellulaire, 85% de l'activité de poly(ADP-ribosyl)ation est assurée par la PARP-1. Cette activité est d'autant plus importante au cours de situations pathologiques telles que l'ischémie cérébrale au cours de laquelle l'enzyme est en état d'hyperactivation. Par conséquent, dans notre thématique de travail, nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur l'isoforme -1 de la PARP.

I. La PARP-1 : structure et fonction

1. Structure

La PARP-1 est une protéine de 113 kDa, constituée de 3 domaines (voir pour revue Moroni et Chiarugi, 2009 ; Gupte et al., 2017) (figure 21) :

- Un domaine de liaison à l'ADN situé sur l'extrémité N-terminale, capable de reconnaître les cassures de l'ADN et de s'y fixer grâce à la présence de deux domaines en doigts de zinc. Il contient également un motif NLS (Nuclear Localisation Signal) qui contient le site de clivage de la caspase-3 ;

- Un domaine central riche en acide glutamique qui correspond au domaine d'auto-modification. Ce domaine porte deux motifs distincts : le motif le PBM (PARs binding motif) qui permet la liaison des PARs ainsi que l'autopoly(ADP-ribosyl)ation de la PARP-1 ; le motif BRCT (Breast Cancer Associated Protein C-terminal) permet l'interaction de la PARP et des constituants nucléaires ;
- Un domaine catalytique situé sur l'extrémité C-terminale qui contient le site de liaison au NAD⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) qui est le substrat de la PARP-1. Cette liaison est facilitée par la région appelée WGR riche en tryptophane (W), en glycine (G) et en arginine (R) qui conduit au changement de conformation de l'enzyme après fixation à l'ADN.

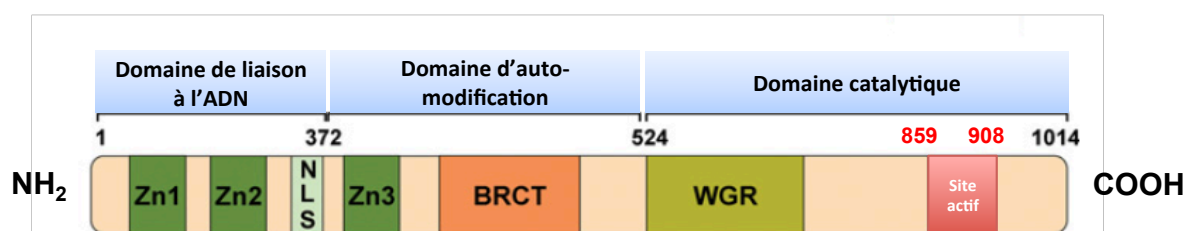


Figure 21 : Schéma représentatif de la structure de la PARP-1 (adaptée d'après Gupte et al., 2017)

Zn : motif en doigt de zinc ; NLS : nuclear localisation signal ; BRCT : breast Cancer Associated Protein C-terminal ; WGR : motif riche en tryptophane (W) glycine (G) et arginine (R).

2. Fonctionnement de la PARP

La PARP est l'enzyme responsable de la réaction de poly(ADP-ribosyl)ation dite PARylation. C'est une modification post-traductionnelle qui consiste à synthétiser des poly(ADP-riboses) (PARs) puis à les greffer de manière covalente sur une protéine acceptrice (voir pour revues Schreiber et al., 2006 ; Gibson et Kraus, 2012). Les protéines cibles peuvent être impliquées dans la régulation de la structure de la chromatine, la transcription génique, la réparation de l'ADN ou la mort cellulaire.

L'activation de la PARP peut être induite par des cassures au niveau de l'ADN simple ou double brin sous l'effet d'un stress oxydant ou nitrant (productions de ROS ou de RNS), de radiations ionisante, d'agents alkylants, et également par les cassures de l'ADN induite au cours des processus de réparation par excision de bases ou de nucléotide (voir pour revue Hegedűs et Virág., 2014).

La PARP peut également être activée même quand l'ADN n'est pas lésé. Ainsi elle peut se fixer à l'AND présentant des régions en épingles à cheveux et cruciformes (Lonskaya et Potaman, 2005).

L'activité de la PARP-1 peut être induite par d'autres types de modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation par la CamKII delta ou l'acétylation (Ju et al., 2004 ; Hassa et al., 2005 ; Kauppinen et al., 2006 ; Walker et al., 2006). Par ailleurs, SIRT6, une enzyme de désacétylation, peut être recrutée au niveau du site de lésion de l'ADN où elle s'associe à la PARP-1 et l'active par mono(ADP-ribosyl)ation (Mao et Hine., 2011). La PARP-3 peut également catalyser l'activation de la PARP-1, mais cette réaction a lieu en l'absence d'ADN (Loseva et al., 2010). Enfin, la PARP-1 peut être activée à la suite d'interactions avec d'autres protéines telles que ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1 & 2) et JNK (c-Jun N-terminal kinase (Cohen-Armon et al., 2007 ; Zhang et al., 2007b).

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

A) Synthèse des PARs

L'activation de la PARP-1 est observée suite à l'apparition de cassures au niveau de l'ADN. Cette activation entraîne un clivage du NAD⁺ libérant un groupement nicotinamide ainsi qu'une unité ADP-ribose, qui est rapidement greffée *via* une liaison covalente sur une protéine acceptrice (figure 22).

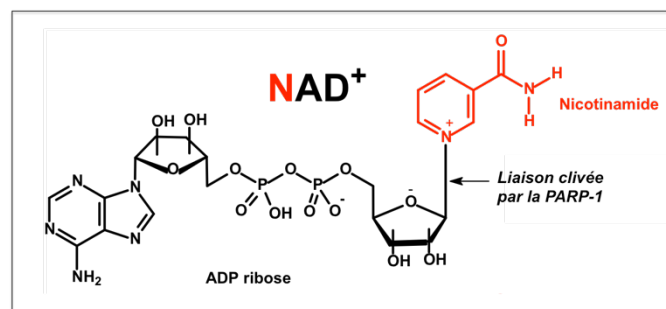


Figure 22 : Structure d'une molécule de NAD⁺ et site de clivage par la PARP (d'après Curtin et Szabo, 2013)

Ce premier transfert est dit mono(ADP-ribosyl)ation, il est suivi d'une étape d'élongation de la chaîne de façon linéaire par la fixation d'autres unités ADP-riboses reliées par des liaisons O-glycosidiques ribose-ribose (figure 23). Cette chaîne linéaire ainsi formée peut contenir jusqu'à 200 unités de poly(ADP-riboses) et peut subir des ramifications formant des branches de poly(ADP-riboses).

A la fin de cette étape de synthèse, un recyclage du NAD⁺ est effectué grâce à deux enzymes, la nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT) puis la nicotinamide mononucléoside adényltransférase (NMNAT). Cette dernière, exclusivement nucléaire, est recrutée par la PARP afin

de régénérer le NAD^+ , ce qui nécessite 4 molécules d'ATP (Kim et al., 2005 ; Zhang et al., 2012) (figure 23).

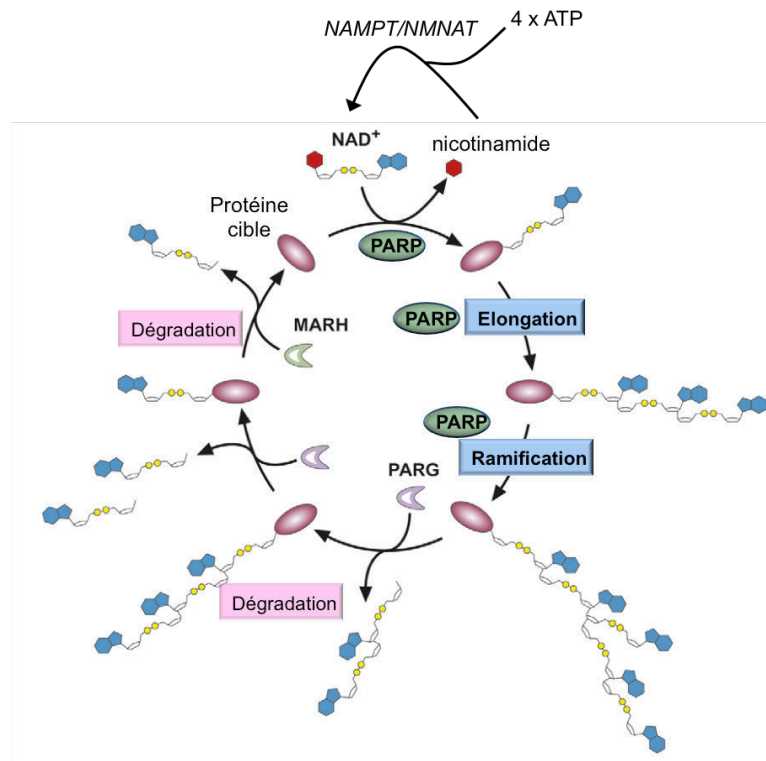


Figure 23 : La poly(ADP-ribosylation) : synthèse et dégradation des PARs, régénération du NAD^+ (adaptée d'après Heeres et Hergenrother, 2007)

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

La PARP peut PARyler de nombreuses protéines notamment au niveau nucléaire, mais elle peut également s'auto-PARYler. Les protéines cibles de la PARP-1 contiennent toutes un motif de liaison des PARs, nommé PBM (PARs binding motif), qui chevauche leur domaine fonctionnel, ce qui explique que les PARs puissent altérer les propriétés fonctionnelles de leurs cibles.

Le mécanisme le plus caractérisé en ce qui concerne la régulation de l'activité de la PARP est son auto-PARYlation (Kawaichi et al., 1981). Par ailleurs, l'accumulation des PARs, chargés négativement, sur leur cible entraîne un phénomène de répulsion électrostatique qui finit par détacher la PARP de sa cible.

B) Dégradation des PARs

La PARYlation que nous venons de décrire est un processus très rapide. Les PARs présentent une demi-vie très courte, inférieure à 1 minute (Whitacre et al., 1995 ; Gibson et Kraus, 2012). En effet,

les PARs sont rapidement pris en charge par des enzymes de dégradation, dans un premier temps par la poly(ADP-ribose)glycohydrolase (PARG), puis dans un second temps par la mono(ADP-ribosyl)protéine hydrolase (MARH) ou par la mono(ADP-ribosyl)protéine lyase (MSRL) (Davidovic et al., 2001).

La PARG possède des activités exo- et endo-glycosidiques, qui permettent le clivage des liaisons O-glycosidiques ribose-ribose, ce qui dégrade ainsi les PARs présents sur la chaîne linéaire principale et au niveau des ramifications. Il existe au moins 5 isoformes de cette enzyme chez l'homme. Elles sont localisées dans le cytoplasme, la mitochondrie ou dans le noyau. L'isoforme nucléaire (110 kDa) est présente en faible quantité par rapport à la PARP-1, néanmoins elle possède une activité spécifique très élevée. En effet, une inhibition minimale de 90% de l'activité par la PARG est nécessaire pour observer une accumulation de PARs (Krishnakumar et Kraus, 2010)

En ce qui concerne les enzymes mono(ADP-ribosyl)protéine hydrolase et mono(ADP-ribosyl)protéine lyase, il semblerait qu'elles interviennent pour cliver la liaison entre le dernier monomère d'ADP-ribose et la protéine acceptrice (Hassa et Hottiger, 2008).

II. Rôle physiologique de la PARP

En conditions physiologiques, les cassures au niveau de l'ADN sont peu nombreuses, la PARP-1 est faiblement activée. Cette activation permet néanmoins de réguler des processus cellulaires clés, tels que la réparation et le maintien de la stabilité de l'ADN, la régulation du remodelage de la chromatine, la transcription de gènes ou bien encore le cycle cellulaire.

1. Réparation de l'ADN

Lorsque des cassures de l'ADN surviennent au niveau de la cellule, des mécanismes de réparation sont très vite enclenchés, la PARP-1 favorisant ces réparations (de Murcia et al., 1997 ; Menissier de Murcia et al., 2003 ; Schreiber et al., 2006) (Figure 24). En effet, la PARP-1 intervient au niveau des cassures simple ou double brin, et dans la réparation par excision de base. Ainsi après le repérage de la zone de cassure, la PARP se fixe à l'ADN grâce à ses motifs en doigts de zinc, ce qui entraîne son activation. L'enzyme commence alors son activité de PARylation des protéines de l'ADN surtout celle des histones H1 et H2B. En conséquence, l'encombrement stérique ainsi que la répulsion

électrostatique entre les charges négatives des PARs fixés sur les histones et celles de l'ADN entraînent le passage de l'ADN d'une forme super-enroulée à une forme plus relâchée. La relaxation de la chromatine permet ainsi aux systèmes de réparation d'accéder aux zones d'ADN lésées.

La PARP-1 entraîne également la PARylation d'autres protéines nucléaires qui seront par la suite recrutées telles que XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein-1), l'ADN-polymérase III et l'ADN-ligase III. Une fois sa fonction de réparation achevée, la PARP-1 catalyse sa propre PARylation ce qui permet le détachement de l'enzyme de l'ADN et ainsi son inactivation.

La fonction de participation à la réparation de l'ADN par la PARP est nécessaire. Il a été montré dans des études que les cellules PARP-1^{-/-} ou des souris PARP^{-/-} soumises à des radiations ionisantes ou traitées par des agents alkylant de l'ADN présentaient des déficits de réparation de l'ADN et des anomalies chromosomiques importantes (de Murcia et al., 1997). De plus, les souris PARP^{-/-} ainsi traitées aux radiations ou par les agents alkylants, présentaient une létalité plus élevée que les souris sauvages (de Murcia et al., 1997).

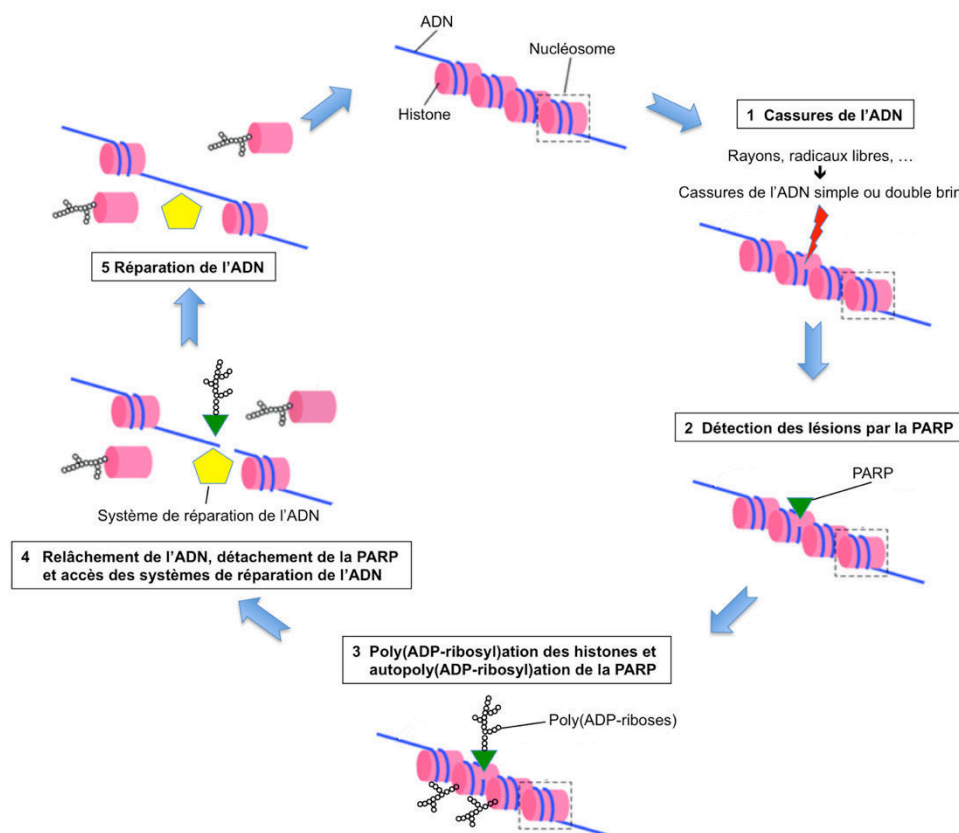


Figure 24 : Processus de réparation de l'ADN par la PARP (adaptée d'après De Vos et al., 2012 ; Lin, 2007)

2. Régulation de la transcription génique

La PARP-1 participe à la régulation de la transcription de gène via deux mécanismes :

- Le premier implique une relaxation de la chromatine du fait, comme nous l'avons vu, d'une répulsion électrostatique entre les histones PARylés et donc chargés négativement, et l'ADN. Les gènes sont donc plus accessibles à la machinerie transcriptionnelle.
- Le deuxième mécanisme implique une interaction directe de la PARP-1 avec certains facteurs ou cofacteurs de transcription tels que NF- κ B (nuclear factor-kappa B) et AP-1 (activator protein-1), ou avec leurs sites de fixation, ce qui conduit à la répression ou à l'activation de certains gènes.

3. Régulation du cycle cellulaire

Les enzymes PARP sont présentes au niveau des centrosomes et des télomères, elles y sont associées à des protéines et participent à la régulation du cycle cellulaire. En effet, la PARP fait partie du complexe de réplication multiprotéinique (MRC) et certains facteurs de réplication et protéines du centromère et télomères sont ses substrats (Simbulan-Rosenthal et al., 1996). Par ailleurs, l'activité de la PARP est augmentée dans le noyau des cellules en mitose (Tanuma et al., 1978).

La PARP est ainsi capable d'interrompre la progression du cycle cellulaire au cours de la mitose en cas de lésion de l'ADN, afin de limiter la réplication des aberrations de l'ADN (d'Adda di Fagagna et al., 1999). De plus, chez des souris PARP-2^{-/-} irradiées, on observe un niveau élevé d'anomalies des chromosomes (Amé et al., 2004).

La PARP possède d'autres fonctions physiologiques notamment dans la régulation de l'activité des télomérases (Samper et al., 2001), dans la dégradation des protéines par ubiquitination (Kang et al., 2001) et elle pourrait même être impliquée dans la réorganisation du cytosquelette (Uchida et al., 2001).

A côté de ces effets bénéfiques de la PARP dans les conditions physiologiques, son hyperactivation qui est observée dans des conditions pathologiques telle que l'ischémie cérébrale s'avère être à l'inverse délétère.

III. PARP et ischémie cérébrale

1. Activation de la PARP à la suite de l'ischémie cérébrale

A la suite de l'ischémie cérébrale, une libération accrue de glutamate est observée au niveau cérébral, entraînant un stress excitotoxique *via* l'activation des récepteurs NMDA. La principale conséquence de ce stress excitotoxique est l'augmentation de la production de radicaux libres tels que NO, O₂⁻, et ONOO⁻, responsables d'un stress oxydant qui provoque des cassures de l'ADN. Une activation excessive de la PARP est alors observée dans la plupart des cellules cérébrales (neurones, cellules endothéliales, astrocytes, microglies, leucocytes infiltrants) (Moroni et al., 2008 ; Moroni et Chiarurgi, 2009).

Cette activation de la PARP a d'ailleurs été mise en évidence dans plusieurs études expérimentales. Cependant la cinétique d'accumulation des PARs diffère selon les études. En effet Endres et collaborateurs ont mis en évidence dans un modèle d'ischémie focale chez la souris (2 heures d'occlusion) une accumulation de PARs dans le cortex cérébral 5 minutes seulement après le début de l'ischémie (Endres et al., 1997). Cet effet disparaît à des temps plus tardifs (3 à 6 heures). Dans le même modèle Li et collaborateurs ont mis en évidence une activation de la PARP 20 minutes après la reperfusion, qui devient maximale à 1 heure et disparaît à 24 heures (Li et al., 2010). Dans un autre modèle d'ischémie transitoire chez le rat (1 heure d'occlusion), l'accumulation des PARs a été observée à 1 heure et 6 heures post-ischémie et n'était plus détectable à 15 heures (Iwashita et al., 2004). Enfin dans un modèle d'ischémie permanente chez le rat, Tokime et collaborateurs ont mis en évidence une augmentation de l'activité de la PARP à 2 et 8 heures post-ischémie, mais aucun effet à 16 heures (Tokime et al., 1998).

En ce qui concerne les études cliniques, il a été mis en évidence par Love et collaborateurs après une ischémie globale faisant suite à un arrêt cardiaque une forte accumulation de PARs dans les noyaux neuronaux et ce à 2 jours post-mortem (Love et al., 1999). Cet effet a également été décrit chez les patients par Sairanen et collaborateurs 3 jours après l'ischémie (Sairanen et al., 2009). Dans une autre étude réalisée par Love et collaborateurs, il a été montré que l'activation de la PARP après une ischémie chez les patients était biphasique : une activation précoce dans les 24 heures principalement au niveau neuronal, et une activation plus tardive, entre 3 jours et 1 semaine, essentiellement au niveau des cellules inflammatoires (Love et al., 2000).

La PARP est donc une enzyme qui est activée au cours de l'ischémie cérébrale, mais qu'en est-il de son rôle au cours de cette pathologie ?

2. Rôle de la PARP dans l'ischémie cérébrale

Le rôle de la PARP dans l'ischémie cérébrale a tout d'abord été étudié grâce à la délétion du gène codant pour la PARP. Les souris PARP^{-/-} ischémiées présentent un volume de lésion réduit par rapport aux souris sauvages, confirmant ainsi le rôle délétère de la PARP dans l'ischémie (Eliasson et al., 1997 ; Endres et al., 1997), d'autant plus que la restauration de l'enzyme par transfection virale du gène de la PARP-1 restitue ses effets délétères (Goto et al., 2002). Eliasson et collaborateurs ont également montré *in vitro* que les cultures primaires de cellules corticales PARP^{-/-} sont résistantes à la toxicité induite par le NMDA ou par des conditions OGD (Oxygen Glucose Deprivation) (Eliasson et al., 1997).

Depuis, plusieurs inhibiteurs de la PARP ont été développés et leurs effets protecteurs au cours de l'ischémie ont été étudiés. Parmi les molécules testées, le 3-amino-benzamide (3-AB), un inhibiteur synthétique d'une concentration inhibitrice 50 (CI50) de 33 µM, a montré son efficacité dans des modèles d'ischémie cérébrale en réduisant notamment le volume de la lésion, le déficit neurologique et l'œdème cérébral (Endres et al., 1997 ; Couturier et al., 2003 ; Koh et al., 2004).

D'autres inhibiteurs plus puissants présentant une CI50 de l'ordre du nanomolaire tels que le 1,5-dihydroxyisoquinoline ou DHIQ (CI50 = 390 nM), le MP-124 (CI50 = 20,8 nM), le INO-1001 (CI50 < 10 nM), entraînaient également un effet neuroprotecteur dans des modèles d'ischémie cérébrale (Komjáti et al., 2004 ; Egi et al., 2011 ; Matsuura et al., 2011). Des études ont également mis en évidence dans des modèles d'ischémie cérébrale, l'effet anti-inflammatoire et neuroprotecteur de la minocycline, une tétracycline qui inhibe la PARP (CI50 = 42 nM) (Alano et al., 2006 ; Chen et al., 2014).

Au laboratoire, nous avons montré qu'un autre inhibiteur, le **PJ34**, dont la CI50 est de 17 nM, réduisait le volume de lésion, le déficit neurologique, les hémorragies spontanées ainsi que l'inflammation dans des modèles d'ischémie cérébrale transitoire ou permanente chez la souris (Haddad et al., 2006 ; 2008). De plus il a été montré que l'inhibition de la PARP par le PJ34 protégeait la BHE et diminuait sa perméabilité à la suite de l'ischémie cérébrale (Lencsér et al., 2007 ; Teng et al., 2013 ; El Amki et al (soumis)).

Enfin, plus récemment l'olaparib qui est le premier inhibiteur de la PARP approuvé en 2014 par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement des cancers ovariens liés à la mutation du gène BRCA (breast cancer) a été testé dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire chez la souris. Ces effets protecteurs incluaient une réduction du volume de lésion, du déficit neurologique et une protection de la BHE (Teng et al., 2016).

En ce qui concerne leur mécanisme d'action, les inhibiteurs de PARP contiennent un groupement amide identique à celui du nicotinamide qui forme le NAD⁺. Le groupement nicotinamide est nécessaire à la liaison de la PARP à son cofacteur le NAD⁺. Ainsi, les inhibiteurs qui contiennent dans leur structure ce même groupement, leur permet de rentrer en compétition avec le NAD⁺ et de prendre sa place au niveau du site catalytique de l'enzyme PARP (voir pour revue Curtin et Szabo, 2013).

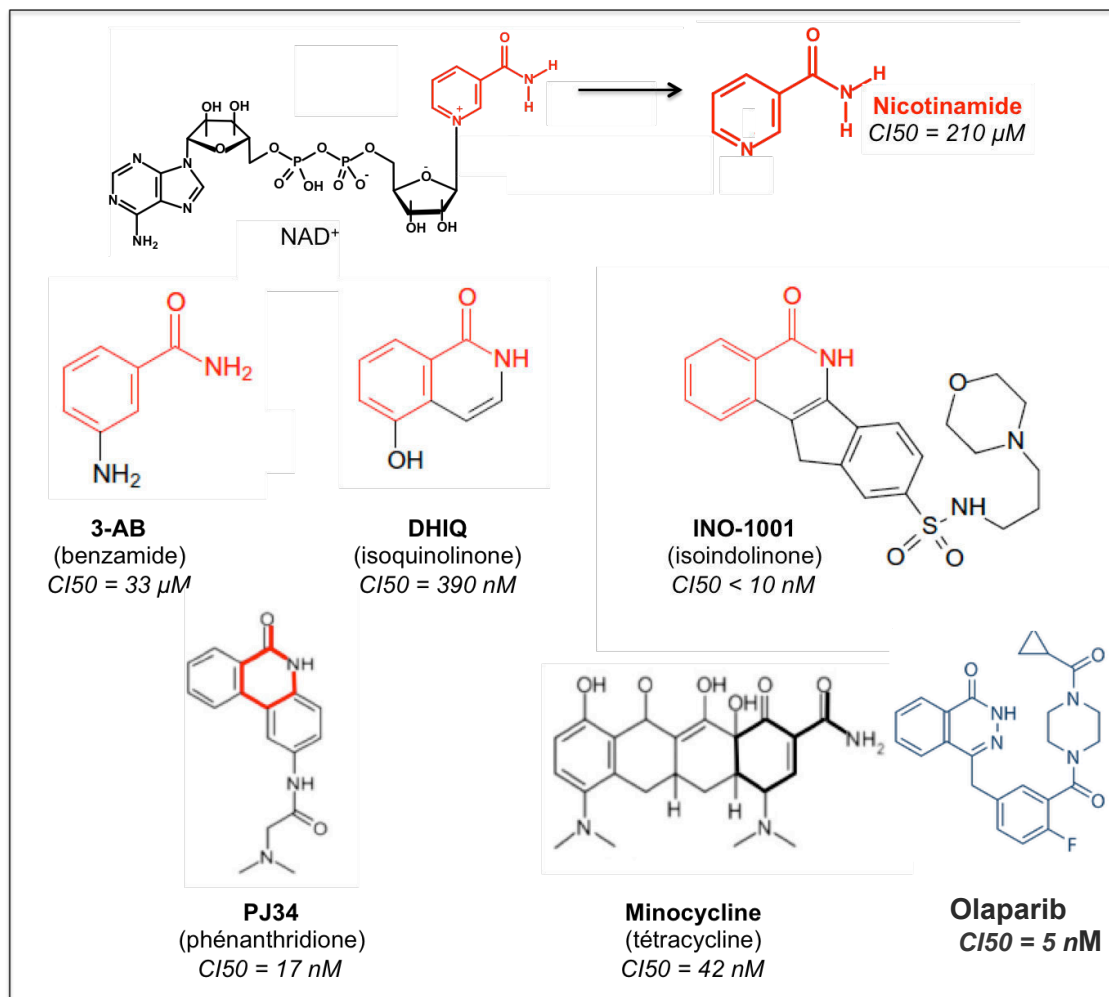


Figure 25 : Principaux inhibiteurs pharmacologiques de la PARP (d'après Curtin et Szabo, 2013)

Le nicotinamide lui-même est un inhibiteur peu puissant puisque sa CI50 est de 210 μM . Ainsi les inhibiteurs de PARP détaillés précédemment ont été développés par modification de la structure du nicotinamide, afin d'augmenter la puissance (diminution de la CI50), la spécificité et la solubilité des produits (figure 25).

3. Mécanismes délétères de la PARP au cours de l'ischémie

Le rôle délétère de la PARP dans l'ischémie cérébrale est aujourd'hui clairement établi. En ce qui concerne les mécanismes impliqués par contre, plusieurs hypothèses sont évoquées (voir pour revue Strosznajder et al., 2010 ; Curtin et Szabo, 2013) :

A) Théorie de la déplétion énergétique

Cette théorie proposée en 1985 par Berger et son équipe stipule qu'une baisse des taux de NAD^+ suite à l'activation excessive de la PARP après l'ischémie entraîne une déplétion énergétique qui peut conduire à la nécrose cellulaire (Berger et al., 1985).

Le NAD^+ étant un cofacteur des enzymes du métabolisme du glucose, il est mobilisé au cours de la glycolyse pour la production d'ATP. Au cours de la poly(ADP-ribosyl)ation, la régénération du NAD^+ nécessite la consommation de 4 molécules d'ATP. Ainsi, au cours de l'ischémie cérébrale, une hyperactivation de la PARP entraîne une consommation excessive de NAD^+ qui d'une part ne sera plus disponible pour la glycolyse, et dont la régénération d'autre part est très consommatrice en énergie. Cette déplétion énergétique induite par l'hyperactivation de la PARP aggrave le déficit énergétique provoqué par chute de l'apport en oxygène et en glucose au niveau cérébral qui fait suite à l'ischémie. Par conséquent, certains processus cellulaires sont altérés tels que le fonctionnement des pompes Na^+/K^+ -ATPase et les protéine ATP-dépendantes, ce qui contribue à la mort cellulaire.

Cette hypothèse a été appuyée par la mise en évidence *in vivo* dans des modèles d'ischémie cérébrale transitoires ou permanents d'une chute des taux de NAD^+ dans le tissu cérébral après l'ischémie. Ces études ont de plus montré que cette chute de NAD^+ est atténuée chez les souris ischémisées $\text{PARP}^{-/-}$ ou après traitement par le 3-AB ou par le nicotinamide (Endres et al., 1997 ; Liu et al., 2009).

Cependant, cette hypothèse reste discutable, d'autant plus que certaines données de la littérature ne montrent aucune baisse des taux de NAD^+ dans des modèles d'ischémie focale ou globale

(Nagayama et al., 2000 ; Paschen et al., 2000). De plus, l'effet protecteur observé chez les souris PARP^{-/-} ou traitées par le 3-AB sont indépendants de la restauration des réserves énergétiques (Chiarugi, 2002 ; Goto et al., 2002).

Par ailleurs il a été montré par l'équipe de Dawson et collaborateurs que l'inhibition de la glycolyse médiée par PARP-1 n'est pas simplement due à la consommation accrue de NAD⁺ par PARP-1, mais elle résulte de la liaison des PARs à l'hexokinase, la première enzyme régulée dans la voie glycolytique. Ceci provoque son inhibition, ce qui ralentit la glycolyse (Andrabi et al., 2014)

Au vu de ces données, il s'avère que la théorie de la déplétion énergétique n'explique pas totalement les effets délétères induit par la PARP au cours de l'ischémie. D'autres mécanismes peuvent en effet intervenir.

B) La mort cellulaire par apoptose ou par parthanatos

A la suite de l'ischémie cérébrale, les effets délétères de la PARP sont liés également à la mort cellulaire par apoptose et par parthanatos.

➤ Apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire programmée caractérisée par une fragmentation de l'ADN, un clivage des protéines, une condensation de la chromatine et une formation de corps apoptotiques. Deux voies, extrinsèque et intrinsèque, ont été identifiées. La première, la voie extrinsèque, est favorisée par des molécules de la famille du TNF et implique les caspases-8 et -10. La voie intrinsèque se caractérise par une activation mitochondriale et la libération du cytochrome c, AIF (apoptosis inducing factor), et l'endonucléase G, ce qui entraîne l'activation de la caspase-9. Les deux voies, extrinsèque et intrinsèque, aboutissent au clivage des caspases-3 et -7 ce qui déclenche ainsi leur activation (Giansanti et al., 2011).

Il a été montré que la PARP pouvait être clivée par les caspases-3 et -7 en deux fragments, ce qui entraîne son inactivation. Une fois inactivée la PARP n'est plus capable d'assurer sa fonction dans la réparation de l'ADN (Sodhi et al., 2010).

➤ Parthanatos

Le parthanatos est une forme de mort apoptotique caspase-indépendante caractérisée par la translocation d'un facteur mitochondrial, AIF (Apoptosis Inducing Factor), vers le noyau (Wang et al., 2009). AIF est une flavoprotéine synthétisée dans le cytosol sous forme d'un précurseur de 67 kDa

(pré-AIF), puis importée sous forme mature (62 kDa) dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, où elle régule les réactions mitochondriales importantes.

L'hyperactivation de la PARP au cours de l'ischémie entraîne une accumulation de PARs qui quittent le noyau pour interagir avec AIF au niveau mitochondrial (Yu et al., 2006). Cette interaction provoque une translocation de AIF de la mitochondrie vers le noyau. Au niveau nucléaire, AIF favorise la condensation de la chromatine, la dégradation de l'ADN et la mort cellulaire (Fatokun et al., 2014).

C) PARP et inflammation

Il est aujourd'hui bien décrit que la PARP participe au processus inflammatoire post-ischémique. En effet, des études ont montré que la délétion génétique du gène codant pour la PARP ou l'inhibition pharmacologique de l'enzyme chez des souris ischémisées réduisait considérablement l'activité inflammatoire. Plusieurs études dont celles réalisées par notre laboratoire ont montré :

- ✚ Une diminution de l'expression de la COX-2, de la NOS-2, d'ICAM-1, d'IL-6, d'IL-1 β chez les souris ischémisées PARP^{-/-} (Koh et al., 2004 ; Park et al., 2004b ; Rapizzi et al., 2004 ; Erdélyi et al., 2005 ; Sodhi et al., 2010).
- ✚ Une diminution de l'expression des cytokines inflammatoires TNF et IL-1 β , des molécules d'adhérence E-sélectine et ICAM-1 et de l'infiltration des neutrophiles chez les souris ischémisées traitées par le PJ34 ou le 3-AB (Ducrocq et al., 2000 ; Couturier et al., 2003 ; Koh et al., 2005, Haddad et al., 2006 ; Lenzér et al., 2007 ; Sun et al., 2012).

D'autre part, il a été montré que la PARP participait à l'activation des microglies et la migration des cellules immunitaires du système nerveux, ce qui favorise la production de facteurs pro-inflammatoires (Ulrich et al., 2001). Il a en effet été montré dans des modèles d'ischémie cérébrale que l'inhibition de la PARP réduisait l'activation microgliale (Koh et al., 2004 ; Hamby et al., 2007 ; Kauppinen et al., 2006).

En ce qui concerne les mécanismes impliqués dans cet effet pro-inflammatoire de la PARP, l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 serait un événement clé (Hassa et al., 2001 ; Hassa et Hottiger, 2002 ; Chiarugi et Moskowitz, 2003 ; Koh et al., 2005 ; Hu et al., 2013). En effet, ces deux facteurs de transcription sont responsables de la régulation de l'expression de protéines et de cytokines pro-inflammatoires. Des études montrent que l'activation de ces deux facteurs par la PARP dépendrait de son activité enzymatique (Chiarugi et Moskowitz, 2003 ; Nakajima et al., 2004).

D'autres études expliquent que cet effet résulte plutôt d'une interaction directe de la PARP avec ces facteurs de transcription en question (Hassa et al., 2001).

IV. PARP et inflammation : une implication de HMGB1 ?

Comme nous l'avons décrit plus haut, la PARP est une enzyme capable de poly(ADP-ribosyl)er des protéines, ce qui peut modifier leur localisation cellulaire ainsi que leur fonction biologique. Des études montrent que la protéine inflammatoire HMGB1 est un candidat à ces réactions de poly(ADP-ribosyl)ation qui peuvent non seulement entraîner sa délocalisation nucléaire mais également sa sécrétion. Ainsi, une fois sécrétée HMGB1 enclenche une machinerie inflammatoire notamment *via* l'activation des récepteurs TLR et RAGE (voir quatrième chapitre « HMGB1 » ; Pragrape III).

Une étude récente a rapporté que l'inhibition de la PARP réduisait considérablement l'activité inflammatoire induite par les contraintes de cisaillement du le flux sanguin (Low Shear Stress) sur les cellules HUVEC et ce *via* un blocage de la translocation de HMGB1 (Qin et al., 2015).

D'autres études réalisées principalement *in vitro* ont mis en évidence un lien entre la PARP et HMGB1. Ditsworth et collaborateurs ont montré que les fibroblastes embryonnaires (MEFs) PARP^{-/-} traités par le MNNG, un agent alkylant de l'ADN, ne sécrétaient pas la protéine. Il a également montré que même dans des conditions de nécrose cellulaire qui induit le plus souvent une sécrétion HMGB1, la protéine restait localisée au niveau nucléaire dans ces cellules PARP^{-/-} (Ditsworth et al., 2007). Le même effet a été observé après traitement des cellules par un inhibiteur de PARP, le DHIQ (1,5-isoquinolinedio). Ces effets ont également été en évidence dans l'étude Davis et collaborateurs sur des cellules MEFs PARP^{-/-} traitées par le LPS. De plus la restitution de la PARP par transfection adénovirale dans ces cellules inversait l'effet (Davis et al., 2012).

La poly(ADP-ribosyl)ation de HMGB1 serait donc un mécanisme nécessaire à sa sécrétion par les cellules qu'elles soient activées ou nécrosées.

Hormis sa capacité à modifier la localisation cellulaire de HMGB1, la poly(ADP-ribosyl)ation peut également modifier sa fonction. En effet, Davis et collaborateurs ont montré que HMGB1 PARylée exerce une activité inhibitrice de l'efférocytose plus élevée que la forme non PARylée (Davis et al., 2012). Par ailleurs, la poly(ADP-ribosyl)ation de HMGB1 augmenterait la résistance des cellules cancéreuses à l'activité apoptotique induite par TNFSF10 (tumor necrosis factor superfamily, member 10). L'inhibition de la cascade PARP-HMGB1 diminue non seulement l'activité autophagique

au niveau des cellules cancéreuses mais elle favorise également l'activité apoptotique induite par le TNFSF10 (Yang et al., 2015).

Des études montrent que la poly(ADP-ribosyl)ation de HMGB1 serait indirectement impliquée dans sa sécrétion. Yang et collaborateurs ont montré que la PARP-1 était impliquée dans la sécrétion de HMGB1 par les macrophages BMDM (Murine Bone Marrow Derived Macrophages) traités par le LPS par une potentialisation de son acétylation. Ainsi, l'activation de la PARP-1 augmente le ratio HAT (Histone Acétyl Transférase)/HDAC (Histone Désacétyl Transférase) en régulant l'expression des enzymes d'acétylation (PCAF, CBP, P300) et de déacétylation (HDAC4) (Yang et al., 2014b). Dans une autre étude réalisée sur des fibroblaste MEF traités par H₂O₂, il a été montré que c'est la phosphorylation de HMGB1 par la PKC et non pas sa poly(ADP-ribosyl)ation par la PARP qui est à l'origine de la translocation de HMGB1 vers le cytosol (Andersson et al., 2016). Cette étude montre de plus que la délocalisation de HMGB1 du noyau induit par la PKC favorise l'activité de la PARP au niveau du noyau, d'autant plus que les cellules HMGB1^{-/-} traitées par H₂O₂ présentent des taux élevés de PARs au niveau nucléaire.

V. PARP, rt-PA et ischémie cérébrale

Le rt-PA est capable de potentialiser l'activité l'enzyme PARP. L'étude de Crome et collaborateurs réalisée en 2007, montrait pour la première fois dans un modèle d'ischémie cérébrale focale permanente chez la souris que l'administration du rt-PA (10 mg/kg, i.v), 1 heure après l'ischémie augmentait considérablement la formation de PARs dans le cerveau à 4 heures. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de PARP le 3-AB diminuait cet effet. Ces travaux ont également identifié l'implication des récepteurs NMDA dans l'activation de la PARP induite par le rt-PA (Crome et al., 2007).

Par ailleurs, les travaux menés au sein de notre laboratoire ont montré que l'inhibition de la PARP grâce à l'administration de PJ34 réduit les TH hémorragiques spontanées et induites par le rt-PA dans nos modèles d'ischémie cérébrale chez la souris (Haddad et al., 2008, 2013 ; Teng et al., 2013 ; El Amki et al., (soumis)). Cet effet est par ailleurs associé à une diminution de la dégradation des protéines de jonction inter-endothéliales induite par le rt-PA et donc une protection de la BHE. D'autres études ont rapporté les mêmes effets protecteurs avec d'autres inhibiteurs de PARP tels que la minocycline et cilostazol (Murata et al., 2008 ; Machado, et al., 2009 ; Ishiguro et al., 2010). Cet effet protecteur impliquerait en autres une réduction des taux de MMP-9.

Ces différentes données de la littérature illustrent bien le rôle majeur de la PARP dans les atteintes vasculaires post-ischémiques et surtout après thrombolyse par le rt-PA. Ainsi, l'inhibition de la PARP lors de la thrombolyse chez les patients victime d'un AVCi pourrait constituer une stratégie protectrice intéressante contre les effets délétères du rt-PA au niveau vasculaire.

BUT DU TRAVAIL

BUT DU TRAVAIL

La thrombolyse par le rt-PA constitue encore aujourd'hui le seul traitement pharmacologique dont disposent les cliniciens pour traiter les AVCi. Cependant, son utilisation reste limitée, son efficacité variable selon les patients, tout comme sa sécurité. Face à cette situation, deux axes de recherche peuvent être envisagés :

- le premier consiste à rechercher des alternatives à la thrombolyse par le rt-PA, soit en développant de nouveaux thrombolytiques plus efficaces, moins toxiques et dont l'utilisation est moins contraignante, soit en mettant en place des stratégies de reperfusion non pharmacologiques telles que la thrombectomie,
- le deuxième consiste en une meilleure caractérisation des mécanismes de toxicité du rt-PA, plus particulièrement au niveau vasculaire, afin de proposer des stratégies à associer à la thrombolyse pour une meilleure prise en charge des patients.

Dans la continuité des travaux initiés au laboratoire, l'objectif de mon travail de thèse a été de préciser les mécanismes impliqués dans la toxicité vasculaire du rt-PA, et plus particulièrement au niveau endothélial. Pour cela, je me suis intéressée à l'effet du rt-PA sur les **microvésicules endothéliales (MVE)** qui sont des marqueurs particulièrement novateurs de la dysfonction endothéliale, grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr. Boulanger (INSERM-U970, Paris-Centre de Recherche Cardiovasculaire). Je me suis également intéressée à une autre entité, l'alarmine « **HMGB1 (High Mobility Group Box 1)** », une cytokine impliquée dans l'inflammation post-ischémique et capable d'altérer la barrière hémato-encéphalique. Mon travail de thèse a comporté deux volets, l'un *in vitro* et l'autre *in vivo*. La partie *in vitro* a été réalisée sur une lignée de cellules endothéliales cérébrales murines, les bEnd.3. La partie *in vivo* a été réalisée dans un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris qui consiste en une occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM) par un filament de nylon introduit par voie endovasculaire. L'occlusion peut être permanente ou transitoire selon la durée de maintien du filament. Enfin, j'ai recherché l'implication de la **poly(ADP-ribose) polymérase (PARP)** sur les effets du rt-PA *in vitro* vis-à-vis des MVE comme de HMGB1.

L'ensemble de ces travaux s'intègre dans l'étude des atteintes vasculaires induites par le rt-PA. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans ses effets délétères au niveau vasculaire permettra de proposer des stratégies plus sûres, plus efficaces et dont pourrait bénéficier un plus grand nombre de patients atteints d'AVC ischémiques.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Expérimentations *in vitro*

1. Modèle *in vitro* de culture cellulaire

Les études *in vitro* ont été réalisées sur des cultures de cellules endothéliales cérébrales murines immortalisées appartenant à la lignée bEnd.3 (ATCC[®]CRL[™]-2299, Manassas, Virginie, États-Unis) (96091929-1VL, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Les cellules de la lignée bEnd.3 sont des cellules endothéliales adhérentes obtenues à partir du cortex cérébral de souris BALB/c qui ont été immortalisées (infection avec le retrovirus NTKmT qui exprime l'antigène T moyen du polyomavirus) (Montesano et al., 1990).

A) Protocole de culture cellulaire

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

B) Traitements des cellules

Les cellules sont tout d'abordensemencées dans du milieu de culture contenant du SVF, soit en plaques de 24 puits (2x10⁵ cellules/puits), soit en plaques de 96 puits (4x10⁴ cellules/puits). Vingt-quatre heures après, les cellules sont traitées par différents agents et/ou inhibiteurs pharmacologiques (tableau 6) dans un milieu de culture dépourvu en SVF. Les inhibiteurs pharmacologiques préparés dans le milieu sans SVF sont appliqués sur les cellules une heure avant le

traitement. L'inhibition est ensuite maintenue pendant toute la durée de l'expérience. Les cellules contrôles quant à elles subissent un changement de milieu (milieu sans SVF) (figure 26).

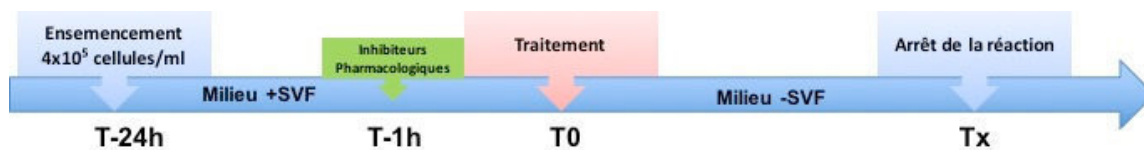


Figure 26 : Protocole de traitement des cellules bEnd.3

Tableau 6 : LISTE DES AGENTS PHARMACOLOGIQUES UTILISÉS			
Molécule	Concentration	Solvant	Référence
rt-PA	10 ; 20 ; 40 ; 80 µg/ml	eau ppi	Actilyse®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Allemagne #Lot 1 : 502074 #Lot 2 : 601772
H ₂ O ₂	0,5 ; 1 ; 2 mM	PBS	Hydrogen peroxide solution 50 wt % 516813, Sigma Aldrich
LPS	100 ng/ml	Milieu de culture	LPS Escherichia Coli 0127 : B8 L3129-100MG, Sigma
Aprotinine	2 µM	PBS	Bayer, Lyon, France
Acide Tranexamique	10 mM	Milieu de culture	Acide 4(méthylamino)cyclohexanecarboxylique 87653 , Sigma
PJ34	1 ; 10 ; 50 ; 100 µM	PBS	P4365, Sigma-Aldrich,

Eau PPI : eau pour préparation injectable, PBS : phosphate buffer saline.

2. Observation de la morphologie cellulaire

La morphologie des cellules est observée à l'aide d'un microscope inversé (VWR, Fontenay Sous-Bois, France), puis des photos représentatives des cultures sont prises (Moticam camera 580 5.0 MP, Motic, Barcelona, Spain).

3. Évaluation de la survie des cellules

La viabilité cellulaire évaluée par le test MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium bromide) est réalisée sur des cellules ensemencées dans des plaques de 96 puits (Kit MTT : TOX-1,

Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Le principe de ce test est basé sur la réduction du MTT qui est de couleur jaune, en un produit violet, le formazan, par les deshydrogénases mitochondriales présentes dans les cellules viables. Ainsi, l'intensité de la coloration violette est proportionnelle au nombre de cellules dont l'activité mitochondriale est intacte.

Tout d'abord, le MTT est reconstitué dans du milieu DMEM (Low Glucose Phenol Red Free ; D2429, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Un volume de 10 µl de cette solution est ajouté dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée 3 heures à 37 °C et 5% de CO₂ à l'abri de la lumière. A la fin de l'incubation, 100 µl d'une solution de solubilisation (solution d'arrêt) sont ajoutés dans chaque puits ; l'absorbance à 570 nm corrigée par l'absorbance à 690 nm est alors mesurée au spectrophotomètre (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH, Champigny sur Marne, France).

4. Évaluation de la mort cellulaire

La mort cellulaire est déterminée par la mesure de la lactate déshydrogénase (LDH) relarguée dans le milieu de culture par les cellules mortes. La LDH est une enzyme qui catalyse la conversion du pyruvate en lactate, avec comme co-facteur le NADH qui est converti en NAD⁺. Le principe du dosage consiste à suivre la diminution de l'absorbance du NADH à 340 nm en présence de pyruvate. La pente de la cinétique de disparition du NADH est proportionnelle à la concentration de LDH relarguée dans le milieu de culture par les cellules mortes.

Pour ce faire, 50 µl de milieu prélevé dans chaque puits sont déposés en triplicates dans une plaque de 96 puits. Un volume de 100 µl de NADH à 0,3 g/l (I481913, Calbiochem) et 20 µl de pyruvate à 0,325 g/l (P2256, Sigma Aldrich) sont ensuite additionnés dans chaque puits. L'absorbance est suivie pendant 5 minutes (une lecture toutes les 30 secondes) à l'aide d'un spectrophotomètre (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH, Champigny sur Marne, France). Les valeurs des pentes sont calculées à partir des droites obtenues représentant l'absorbance en fonction du temps. Ces pentes sont exprimées en unité d'absorbance par unités de temps (UA/sec). Les mesures obtenues sont ensuite converties en pourcentage de mort cellulaire à l'aide d'une valeur contrôle « Full Kill » (FK) qui correspond à 100% de mortalité. Pour obtenir la condition « Full Kill » les cellules ont été traitées par une solution de Triton X-100 à 0.1% (T 8787, Sigma Aldrich) pendant 2 heures.

5. Dosage des microvésicules endothéliales (MVE)

A) Isolation des microvésicules endothéliales

Les microvésicules endothéliales sont isolées à partir du milieu de culture des cellules bEnd.3. Dans un premier temps, les cellules sontensemencées dans des plaques de 24 puits. Un volume de 1,5 ml de milieu de culture est récupéré à la fin de chaque expérience en rassemblant le volume de 5 puits de même condition de traitement. Dans un second temps, un protocole de centrifugation spécifique est réalisé et permet d'isoler les microvésicules endothéliales.

Ce protocole consiste en une première centrifugation (600 g, 15 minutes, 4°C) qui permet d'éliminer les débris cellulaires, puis une seconde centrifugation (20 500g, 90 minutes, 4°C) qui permet d'isoler le culot de MVE. Le culot obtenu est ensuite suspendu dans du tampon PBS (1X) filtré à 0,1 µm (pour un volume initial de milieu de culture de 1,5 ml par exemple, le culot est alors suspendu dans 150 µl de PBS (rapport 10 :1). Enfin, les échantillons sont conservés à -40°C jusqu'au jour du dosage par cytométrie en flux (figure 27).

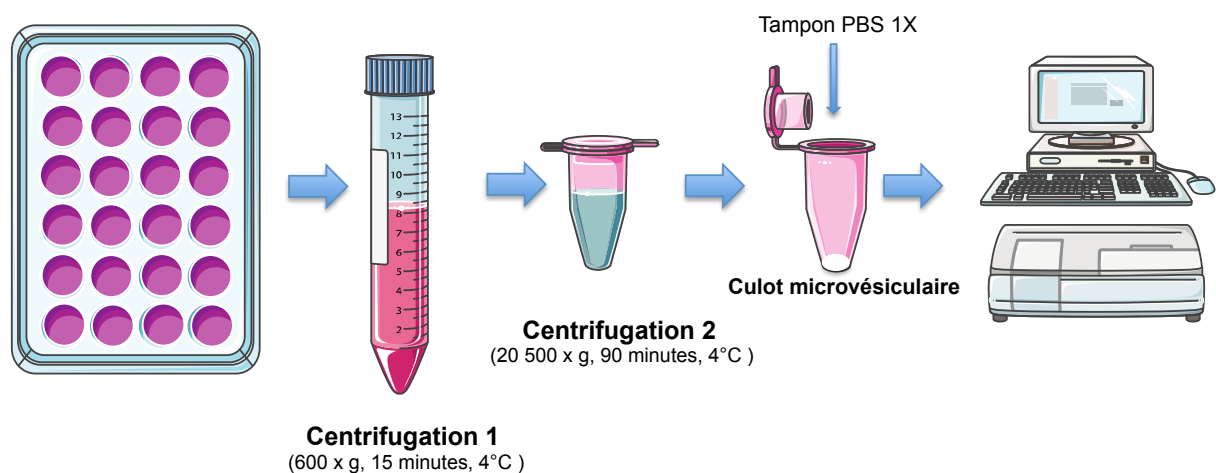


Figure 27 : Les différentes étapes d'isolation des microvésicules endothéliales
PBS=Phosphate Buffer Saline.

B) Principe du dosage des MV par cytométrie en flux

Les MV présentes dans les échantillons sont détectées grâce à un cytomètre en flux de dernière génération, de haute résolution et grande sensibilité (Gallios, Beckman Coulter, Brea, CA, États-Unis). L'utilisation de billes de calibration (diamètre : 0.3, 0.5 and 0.9 µm; Megamix-Plus FSC 7802, Biocytex, Marseille, France) permet de définir, en fonction de la taille (forward scatter ; FS), une fenêtre d'analyse dans laquelle se trouvent les événements de type microvésiculaire dont le diamètre est inférieur à 1 µm (figure 28).

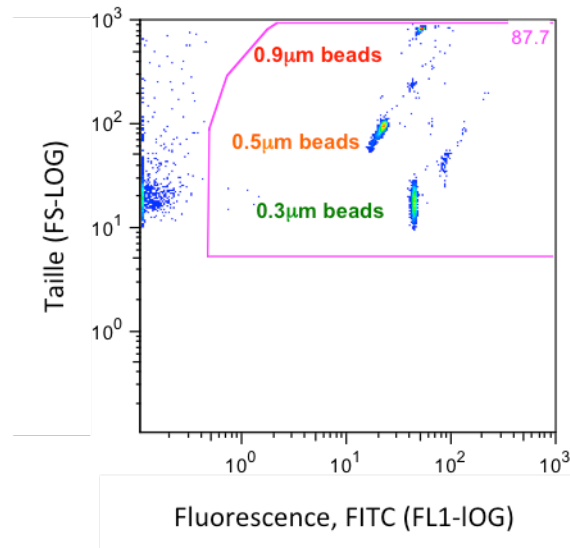


Figure 28 : Dot plot représentatif de calibration du cytomètre en flux utilisé pour le dosage des microvésicules endothéliales.

La fenêtre des éléments de taille microparticulaire est définie ici grâce à des billes de calibration fluorescentes de taille (0.3, 0.5, 0.9 µm) en forward scatter (FS) et fluorescence (FL1). Protocole FS trigger, seuil=12, voltage FL1=472 FL2=298 ; voltage FSC=716, SSC=539, FS gain = 20, SS gain = 5.

L'utilisation de billes de quantification ajoutées en quantité connue dans les échantillons (SPHERO™, AcFP-50-5, Spherotech, Illinois, États-Unis) permet de quantifier ces événements pour en déduire la concentration par µl d'échantillon selon la formule :

$$C_{MV} = (Nb_{MV} \times V_{billes} \times C_{billes}) / (Nb_{billes} \times V_{MV})$$

C_{MV} = Concentration en microvésicules ; Nb_{MV} = Nombre de microvésicules mesurées ; V_{billes} = volume de billes utilisé ; C_{billes} = Concentration de billes dans le lot spherotech utilisé ; Nb_{billes} = Nombre de billes mesurées ; V_{MV} = Volume d'échantillon utilisé

Un marquage en fluorescence des phosphatidylsérines est ensuite réalisé grâce à l'AnnexineV couplée au fluoroisocyanate FITC (AnnV-FITC ; 2,5 µg/ml; IM3546, Beckman Coulter, Brea, CA, États-Unis). Ce marquage en fluorescence permet de mesurer le pourcentage d'éléments de taille microvésiculaire positifs au marquage AnnexineV. L'analyse des résultats est réalisée à l'aide du logiciel Flow-Jo (version 10.0.7; TreeStar, Ashland, OR).

C) Marquage des MVE par l'annexine V et dosage par cytométrie en flux

a. Principe du marquage

Les MVE sont détectées grâce à un marquage à l'Annexine V (AnnV). En effet, en présence de calcium, l'AnnV se lie de manière spécifique à la phosphatidylsérine présente sur le feuillet externe des MVE. L'annV couplée au fluoroisocyanate (FITC) est détectée par fluorescence au cytomètre en flux (Gallios, Beckman Coulter, Brea, CA, États-Unis) en fluorescence FL1. Le marquage non spécifique est détecté en incubant les échantillons avec l'AnnV en absence de calcium et en présence d'EDTA (acide éthylène-diamine-tétraacétique), un agent chélateur de calcium (figure 29). La concentration d'évènements de taille microvésiculaire marqués spécifiquement à l'AnnV (MVE_AnnV+) contenus dans chaque échantillon est calculé selon la formule :

$$C_{MV} \text{ AnnV+} / \mu\text{l} = \frac{C_{MV} \times (\% \text{ AnnV+ (tube positif)} - \% \text{ AnnV+ (tube négatif)})}{100}$$

100

$C_{MV} \text{ AnnV+} / \mu\text{l}$ = concentration en microvésicules AnnV positives ;

% AnnV+ (tube positif) = pourcentage d'évènements annexine V positifs dans le tube avec calcium

% AnnV+ (tube négatif) = pourcentage d'évènements annexine V positifs dans le tube sans calcium

Pour chaque série de culture (n), ce nombre est rapporté à la valeur des cellules contrôles correspondantes et est exprimé en pourcentage.

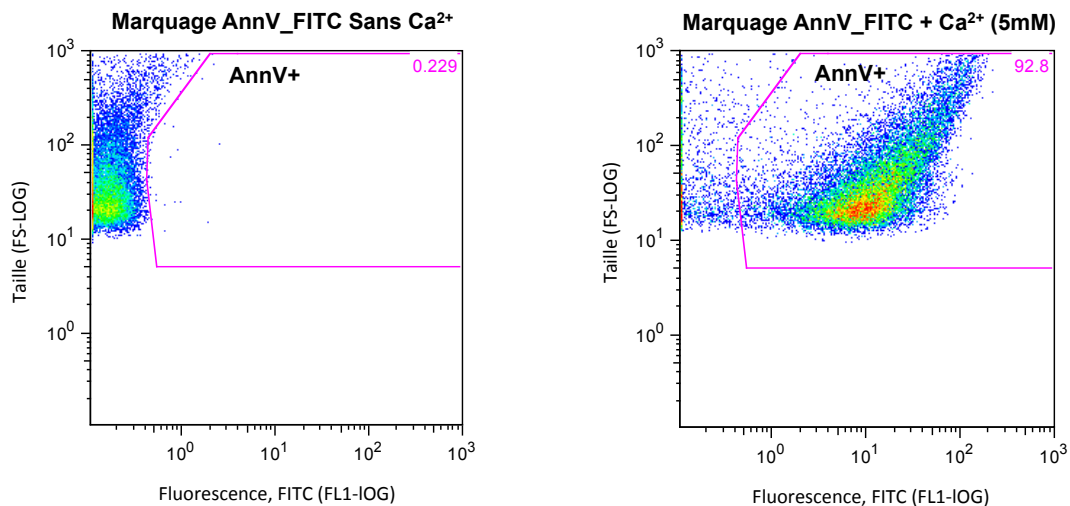


Figure 29 : Détection des microvésicules endothéliales par cytométrie en flux

FS=forward Scatter ; FITC= fluoroisocyanate

b. Protocole de marquage

Trois préparations sont réalisées pour chaque échantillon :

- La première préparation correspond au tube de numération (tube num). Elle contient selon les études un volume de 10 ou 30 μl d'échantillon dilué dans respectivement 100 ou 80 μl de tampon (HEPES 10 mM pH 7,4 ; NaCl 140 mM). Un volume de 10 μl de billes de quantification (SPHEROTM, AcFP-50-5, Spherotech, Illinois, États-Unis) est ajouté au mélange qui est immédiatement analysé au cytomètre en flux, afin d'en déduire le nombre de MV par μl d'échantillon.

- La deuxième préparation correspond au tube AnnV+/Ca²⁺. Elle contient un volume de 10 ou 30 μl d'échantillon incubé dans respectivement 110 ou 90 μl de tampon contenant du calcium (HEPES 10 mM pH 7,4 ; NaCl 140 mM ; CaCl₂ 5 mM) et en présence d'AnnV couplée au FITC (AnnV-FITC, 2,5 $\mu\text{g/ml}$; IM3546, Beckman Coulter, Brea, CA, États-Unis) pendant 30 minutes à 4°C à l'obscurité.

- La troisième préparation correspond au tube contrôle négatif et contient le même volume en échantillon que pour les préparations 1 et 2. L'annexineV-FITC est diluée dans un tampon dépourvu de calcium (HEPES 10 mM pH 7,4 ; NaCl 140 mM), en présence d'EDTA (1,6 mM ; EDTA disodique ; E5134, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

Tous les tampons utilisés sont préalablement filtrés avec des filtres 0,1 μm .

Les préparations sont lancées pour l'analyse en cytométrie dans l'ordre. Les images des acquisitions sont ensuite analysées avec le logiciel Flow-Jo afin d'en déduire le taux de microvésicules selon les formules exposées précédemment.

6. Dosage des corps apoptotiques

Le taux de corps apoptotiques contenus dans les échantillons ayant été utilisés pour le dosage des microvésicules a été mesuré par cytométrie en flux.

a. Principe du marquage

Les corps apoptotiques sont détectés grâce à un double marquage des phosphatidylsérines par l'AnnexineV couplée à l'allophycocyanine (APC) (AnnV-APC, 550474, BD Pharmingen™), et des acides nucléiques (ADN) par l'iodure de propidium (IP ; P16063 ; Invitrogen). L'iodure de propidium est un colorant rouge fluorescent qui peut diffuser à l'intérieur des corps apoptotiques puisque leur membrane est perméable. Il se lie ensuite à l'ADN en s'intercalant entre les bases nucléiques.

Ce marquage en cytométrie permet de définir dans la fenêtre d'analyse des fluorescences une zone qui inclut des événements de taille inférieure à 1µm marqués positivement à l'AnnV-APC et à l'iodure de propidium et qui correspondent aux corps apoptotiques (figure 30)

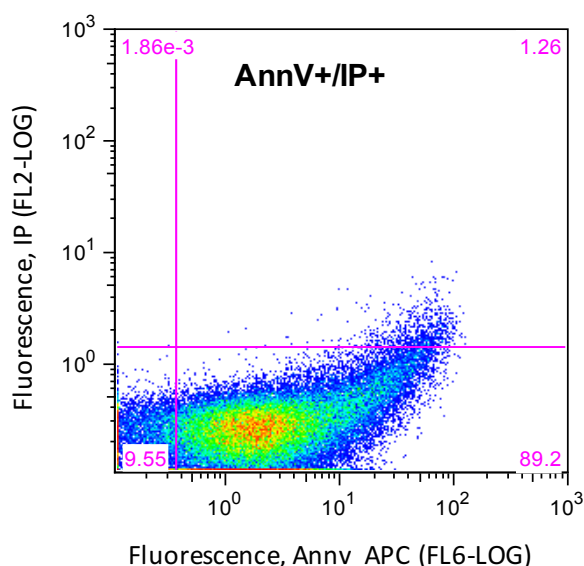


Figure 30 : Détection des corps apoptotiques par cytométrie en flux après un marquage AnnV-APC/IP

IP =iodure de propidium ; AnnV-APC = Annexine V couplée à l'APC.

b. Protocole de marquage

Comme pour le marquage AnnV-FITC, différentes préparations sont réalisées :

- La première préparation correspond au tube de numération (tube num). Elle est composée d'un volume de 10 µl d'échantillon dilué dans 100 µl de tampon (HEPES 10 pH 7,4mM ; NaCl 140 mM). Un volume identique de billes de quantification (10 µl ; SPHERO™, AcFP-50-5, Spherotech,

Illinois, États-Unis) est ajouté au mélange qui est immédiatement analysé au cytomètre en flux, afin d'en déduire le nombre de corps apoptotiques par μl d'échantillon.

- La deuxième préparation correspond au tube contrôle négatif du marquage de l'iodure de propidium (AnnV+ IP-). Elle contient un volume de 10 μl d'échantillon dilué dans 110 μl de tampon contenant du calcium (HEPES 10 mM pH 7,4 ; NaCl 140 mM ; CaCl_2 5 mM) et incubé en présence d'AnnV couplée à l'APC (AnnV-APC, 550474, BD Pharmingen™) pendant 30 minutes à 4°C à l'obscurité.

- La troisième préparation correspond au tube (AnnV+ IP+). Elle contient également un volume de 10 μl d'échantillon dilué dans 107,6 μl de tampon contenant du calcium (HEPES 10 mM pH 7,4 ; NaCl 140 mM ; CaCl_2 5 mM), l'AnnV couplée à l'APC (AnnV-APC, 550474, BD Pharmingen™) et incubé pendant 30 minutes à 4°C à l'obscurité. Un volume de 2,4 μl d'iodure de propidium (1mg/ml) est ajouté à la fin de l'incubation juste avant la lecture au cytomètre.

- La quatrième préparation correspond au tube contrôle négatif du marquage AnnexineV (AnnV- IP+). Elle contient un volume de 10 μl d'échantillon incubé avec d'AnnV-APC mais dans un tampon dépourvu de calcium (HEPES 10 mM pH 7,4 ; NaCl 140 mM) en présence d'EDTA à 1,6 mM. Un volume de 2,4 μl d'iodure de propidium (1 mg/ml) est ajouté comme précédemment à la fin de l'incubation juste avant la lecture au cytomètre.

Comme pour les précédentes expériences, les tampons utilisés sont préalablement filtrés avec des filtres 0,1 μm . Les différentes préparations sont examinées en cytométrie. Les images d'acquisition sont ensuite analysées par logiciel Flow-Jo afin de déterminer le pourcentage de corps apoptotiques AnnV+ IP+.

II. Expérimentations *in vivo*

Toutes les expériences *in vivo* ont été réalisées chez des souris mâles Swiss d'un poids compris entre 27 et 32 g (Janvier, Le Genest Saint Isle, France), en accord avec la directive européenne 2010/63/UE et les réglementations françaises (décret 2013-118) sur la protection des animaux utilisés en expérimentation. Une autorisation de projet a été accordée par le Ministère de la Recherche (projet numéro 03132.02), le projet ayant reçu un avis favorable du Comité d'éthique en expérimentation animale n°34 (Paris Descartes).

Différents modèles d'ischémie cérébrale chez la souris ont été utilisés durant ma thèse. Les ischémies chez la souris ont été réalisées par notre technicien Bérard Coqueran.

1. Modèle d'ischémie cérébrale focale par voie endovasculaire

Le modèle d'ischémie cérébrale focale par voie endovasculaire consiste en une occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM) par un filament de nylon introduit par voie endovasculaire. L'occlusion de l'ACM est permanente ou transitoire selon les études.

A) Réalisation de l'ischémie chez la souris

Les souris sont anesthésiées soit par injection intrapéritonéale (i.p., 10 ml/kg) d'un mélange de kétamine (50 mg/kg) et de xylazine (6 mg/kg) ou par de l'isoflurane (2,5%) suivi d'une injection de buprénorphine (0,05 mg/kg). Pendant la phase d'endormissement, les souris sont placées dans une couveuse thermostatée à 30 °C (environ 7 minutes). Durant toute la chirurgie, le débit sanguin cérébral du territoire de l'ACM est mesuré. Pour cela, une incision de la peau est réalisée entre l'œil et l'oreille gauches, et l'os du crâne est dégagé. Une sonde de laser Doppler (MoorLAB, Moor instruments, Millwey, Royaume-Uni) est collée sur la boîte crânienne à l'aide de colle cyanoacrylate (Loctite®, SUPER GLUE 3, Henkel, France). Les souris sont ensuite placées en décubitus dorsal sur une couverture chauffante thermostatée reliée à une sonde rectale (Harvard apparatus, Ebenbridge, Kent, Royaume-Uni) afin de les maintenir en normothermie ($37 \pm 0,5$ °C). La peau est incisée au niveau de la région trachéenne. Une goutte de xylocaïne 1% (AstraZeneca, Rueil-Malmaison, France) est déposée au niveau de l'incision. Sous une loupe binoculaire (Zeiss S2, Jena, Allemagne), les glandes salivaires sont dégagées, puis les muscles sterno-cléido-mastoïdiens sont dilacérés de manière à dégager l'artère carotide commune (ACC), l'artère carotide externe (ACE) et l'artère carotide interne (ACI) du côté gauche.

Pour la réalisation de l'ischémie endovasculaire permanente (figure 31), l'ACC est dégagée du nerf vague, ligaturée du côté proximal par un fil de soie (5-0 Ethicon FK870, Issy les Moulineaux, France) puis occluse temporairement du côté distal par un autre fil de soie. Une artériotomie est ensuite réalisée au niveau de l'ACC entre les deux fils afin d'y introduire un filament de nylon (Feeling competition Sensa 36608, Fontenay-sur Eure, France ; 80 µm de diamètre) dont l'extrémité est recouverte de colle thermofusible (Jet Melt, Radiospires, Beauvais, France) sur 3 mm de long

(diamètre final : 190 µm pour les souris d'un poids compris entre 27 et 32 g). Le filament est avancé délicatement dans l'ACI jusqu'à ce que son extrémité vienne occlure l'origine de l'ACM (figure 31).

Afin de réaliser le modèle d'ischémie transitoire, le filament est introduit cette fois par l'ACE puis avancé via l'ACI jusqu'à l'origine de l'ACM (figure 31).

L'occlusion de l'ACM est contrôlée par la mesure de la chute de débit sanguin cérébral, calculée en rapportant le débit mesuré 5 minutes après l'occlusion de l'ACM par rapport au débit initial mesuré avant le début de l'opération. Une chute de débit inférieure à 50% est un critère d'exclusion de l'animal.

Le filament est soit maintenu en place par un fil de soie noué autour de l'ACC pour induire l'ischémie de façon permanente, soit retiré au bout d'une heure pour une ischémie transitoire. La plaie est refermée par quelques points de suture (fil de polyamide 4/0 Ethicon F2416, Issy les Moulineaux, France).

Afin de prévenir la déshydratation des animaux, une administration de NaCl à 0,9% est réalisée par voie sous-cutanée (0,5 ml/souris). Les animaux sont ensuite placés dans une couveuse thermostatée à 30°C avec eau et nourriture. Ont été également inclus dans nos études des animaux témoins-opérés, c'est-à-dire des animaux qui subissent l'ensemble de la chirurgie excepté l'introduction du filament.

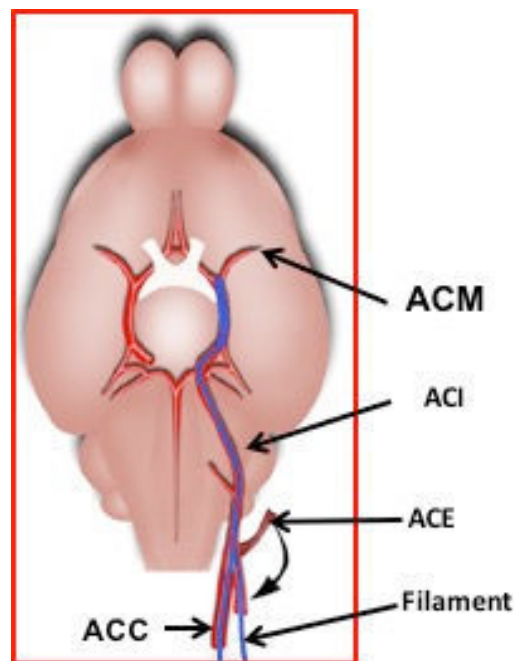


Figure 31 : Modèle d'ischémie cérébrale focale endovasculaire (intraluminal) chez la souris

ACM = artère cérébrale moyenne ; ACI = artère carotide interne ; ACE = artère carotide externe ; ACC = artère carotide commune.

B) Protocole d'administration des agents pharmacologiques

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

Le rt-PA est administré à la dose de 10 mg/kg par voie intraveineuse (i.v. ; veine caudale), 6 heures après le début de l'ischémie dans le modèle d'ischémie permanente et 4 heures après dans le modèle d'ischémie transitoire. En effet, l'administration du rt-PA à 6 heures dans le modèle d'ischémie endovasculaire permanente est considéré comme une administration tardive et délétère entraînant une aggravation des transformations hémorragiques post-ischémique (Teng et al., 2013). Les souris témoins-opérées et témoins ischémiées ont reçu le solvant du rt-PA (NaCl, 0,9%) selon le même protocole.

Le mode d'administration a été établi pour mimer les conditions d'administration du thrombolytique en clinique : 10% de la dose est administrée en bolus pendant 22 secondes, puis 90% de la dose en perfusion pendant environ 30 minutes (durée adaptée au poids de la souris) (figure 32).

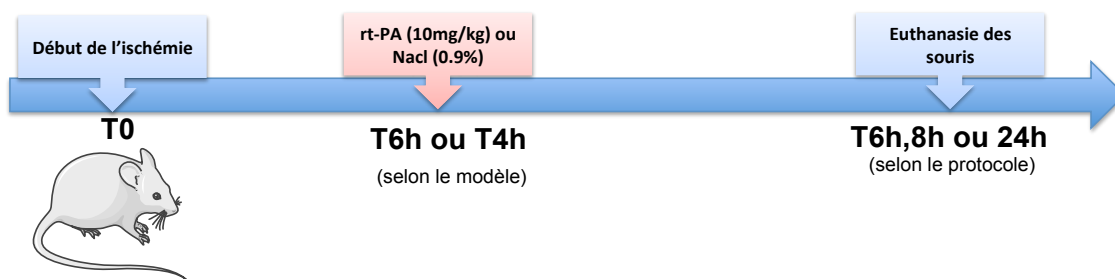


Figure 32 : Protocole d'administration du rt-PA à la suite de l'ischémie chez la souris

III. Evaluation de l'expression et de la sécrétion des protéines par Western Blot

L'expression des protéines d'intérêt et leur sécrétion ont été évaluées par la technique d'électrophorèse des protéines suivie d'une immuno-détection par des anticorps dirigés contre les protéines recherchées (Western Blot).

1. Préparation des échantillons

A) Préparation des échantillons de cellules

Les cellules sont ensemencées dans des plaques de 24 puits. A la fin de chaque traitement, les surnageants de culture sont retirés et les cellules sont lavées avec du tampon PBS chauffé à 37°C (500 µl/puits). Un volume de 30 µl de tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM pH 7,4 ; NaCl 150 mM ; NP-40 (Nonidet P40) 1% ; SDS 10% ; desoxycholate de sodium 0,1%) est ajouté dans chaque puits. A l'aide d'une pointe de pipette prédécoupée, les cellules sont grattées afin d'accélérer l'action du tampon puis incubées pendant 30 minutes à 4°C. Les lysats cellulaires récupérés sont ensuite centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C afin de récupérer **la fraction protéique soluble**. Une partie des surnageants est utilisée pour le dosage des protéines par la méthode BCA (Bicinchoninic Acid Protein Assay) (voir paragraphe III.2.B) ; le reste est dilué au 1/2 dans du tampon de Laemmli en conditions réductrices (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ; glycérol 10% ; β-mercaptoéthanol 5% ; SDS 4%), puis chauffé durant 10 minutes à 95°C. Les échantillons sont conservés à -40°C jusqu'au jour de l'électrophorèse des protéines.

Le culot cellulaire est quant à lui lavé une seconde fois avec le même tampon de lyse (150 µl), afin d'éliminer les protéines solubles piégées dans le culot. La suspension est ensuite centrifugée à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot qui correspond à la **fraction protéique insoluble** est solubilisé dans du tampon de Laemmli en conditions réductrices. Les échantillons sont chauffés durant 10 minutes à 95°C. Une partie de cette fraction est utilisée pour le dosage des protéines par la technique EZQ™ (voir paragraphe III.2.A) et l'autre partie est conservée à -40°C jusqu'au jour de l'électrophorèse des protéines.

B) Concentration des milieux de culture

Le milieu de culture est retiré à la fin de chaque traitement. Un volume correspondant à 2 ml est alors obtenu en regroupant le volume de 5 puits de même condition. Les tubes sont ensuite placés dans de la glace à 4°C après y avoir ajouté 30 µl d'une solution mère d'inhibiteur de protéase (1 pastille/100 µl ; Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets 04693124001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne). Les tubes sont centrifugés 10 minutes à 3 000 g à 4°C pour éliminer les cellules en suspension et les gros débris cellulaires qui pourraient colmater le filtre.

Les protéines contenues dans les surnageants de la première centrifugation sont ensuite concentrées à l'aide de tubes de concentration possédant un seuil de filtration d'environ 3 kDa (Microsep™ Advance Centrifugal Device ; 3K MWCO ; MCP003C41 ; PALL Corporation). On dépose 1,5 ml de surnageant dans la partie supérieure des tubes au contact de la membrane filtrante et une deuxième centrifugation est alors réalisée pendant 75 minutes à 3 000 g à 4°C. Cette centrifugation permet de récupérer les protéines d'une masse moléculaire supérieure à 3 kDa dans un plus petit volume de milieu (environ 150 µl). Les surnageants obtenus sont dilués au $\frac{3}{4}$ dans du tampon de Laemmli en condition réductrice, chauffés pendant 10 minutes à 95°C, et conservés à -40°C jusqu'au jour de l'électrophorèse des protéines.

C) Prélèvement et préparation des échantillons de tissus

a. Prélèvement des échantillons de tissus

Immédiatement après prélèvement de sang, les souris sont euthanasiées, les cerveaux sont prélevés puis 7 coupes coronales de 1 mm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un chopper (Mickle Laboratory Engineering, Gomshall Surrey, Royaume-Uni). Les cortex des coupes de l'hémisphère ischémié (ipsilatéral) et non ischémié (controlatéral) sont prélevés. Les coupes 1-3-5 sont rassemblées dans un tube, de même que les coupes 2-4-6 (figure 33). Les échantillons sont immédiatement congelés à -40°C jusqu'au jour de leur broyage.

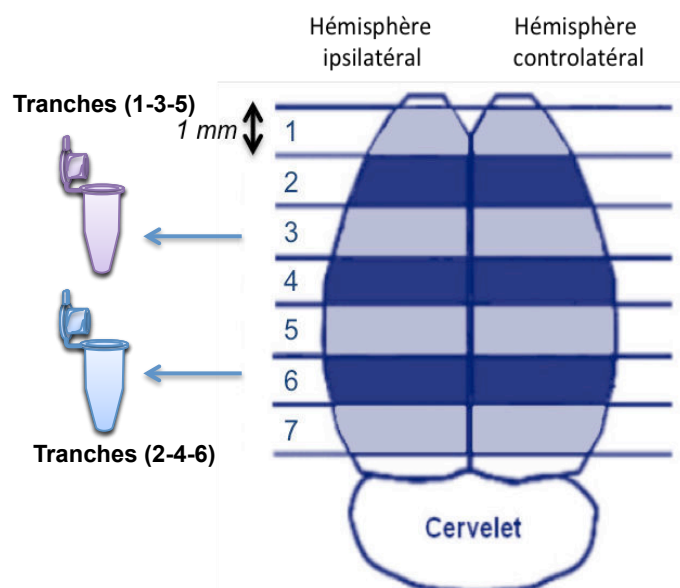


Figure 33 : Prélèvement des échantillons de tissu cérébral

b. Broyage des échantillons de tissu

Le broyage des tissus est réalisé dans un tampon de broyage constitué de : 25 mM Tris/HCl PH 7,6 ; 1 mM d'EDTA ET 2% de SDS. Une pastille d'inhibiteur de protéases EDTA free est additionnée pour un volume de 10 ml de tampon (500 µl pour 50 mg de tissu). Les échantillons sont broyés à l'Ultra Turax (tige T8) pendant 3 fois 5 secondes à froid. Ils sont ensuite soniqués pendant 3 fois 5 secondes à la puissance (30 Watts) à froid (le tube est maintenu dans la glace). Les homogénats sont centrifugés pendant 30 minutes à 4°C à 14 000 g. Un volume de 50 µl de surnageant est prélevé et additionné à 50 µl de tampon de Laemmli. Les tubes sont alors chauffés pendant 10 minutes à 95°C. La fraction de surnageant utilisée pour le dosage des protéines est diluée au ¼ avant le dosage par une technique BCA.

D) Prélèvement et préparation des échantillons de plasma

Les souris sont anesthésiées par une injection i.p. de pentobarbital disodique (60 mg/kg, Ceva Santé Animale, Libourne, France) puis placées en décubitus dorsal. La paroi abdominale est incisée en prenant soin de ne pas abîmer le diaphragme, les viscères sont dégagés grâce à une pince à bout rond. Un prélèvement sanguin est réalisé dans la veine cave inférieure à l'aide d'une seringue de 1 ml et d'une aiguille 27G. L'ensemble seringue/aiguille est préalablement rincé soit dans une solution de citrate (0,130 M) ou d'EDTA potassique (0,5 M, ethylene diamine tetraacetic acid dipotassium salt dihydrate ; Sigma Aldrich). Le sang est récupéré dans des tubes eppendorfs de 1,5 ml contenant de l'EDTA potassique (5µl EDTA à 0,5M pour 500 µl de sang) ou de citrate (0,130 M). Deux centrifugations sont ensuite réalisées dans les 2 heures qui suivent le prélèvement : une première centrifugation à 1 500 g pendant 15 minutes à 20°C permet d'obtenir un surnageant qui correspond au plasma pauvre en plaquette (PPP). La seconde centrifugation est réalisée sur ce surnageant à 13 000 g pendant 10 minutes à 20°C et permet d'obtenir du PFP (platelet free plasma). Ce dernier est aliquoté et congelé à -40°C.

2. Dosage des protéines

A) Méthode EZQ

Le dosage des protéines est réalisé par fluorescence à l'aide du réactif contenu dans le kit « EZQ® Protein Quantitation » (R33200, Molecular Probes, Interchim, Clichy, France). Une gamme étalon

comprise entre 0,05 et 1,6 mg/ml est réalisée à partir d'une solution d'ovalbumine fournie dans ce kit et diluée dans du tampon de Laemmli. Les échantillons, ainsi que chaque point de gamme sont déposés en triplicates (1 µl par dépôt) sur une feuille de papier (fournie par le fabricant du kit) positionnée sur une plaque d'adaptation pour le format 96 puits. La membrane est ensuite séchée et les protéines sont alors fixées et lavées dans du méthanol (40 ml/membrane) pendant 5 minutes sous agitation. A la fin de l'agitation, la membrane est une nouvelle fois séchée avant d'être incubée en présence du réactif EZQ® (40ml/membrane) pendant 30 minutes sous agitation et à l'abri de la lumière. Les membranes sont rincées 3 fois pendant 2 minutes sous agitation avec un mélange acide acétique 7%/ méthanol 10%. La fluorescence mesurée au fluorimètre est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans les échantillons (excitation : 440 nm, émission : 620 nm).

B) Méthode BCA

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode BCA (acide bicinchoninique) à l'aide du kit « Bicinchoninic Acid Protein Assay » (BCA1, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Le principe de ce dosage repose sur la formation d'un complexe protéine-Cu²⁺ en condition alcaline, suivie d'une réduction du Cu²⁺ en Cu⁺. L'ion Cu⁺, en formant un complexe violet avec le BCA, est détecté par colorimétrie. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon. L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une gamme d'albumine sérique bovine (A3059, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) comprise entre 0,1 et 1,5 mg/ml.

Le réactif de travail est préparé extemporanément. Il est constitué de réactif A (bicinchoninoate de sodium en milieu alcalin ; B9643, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et de réactif B (solution de pentahydrate de sulfate de fer II à 4%, Sigma-Aldrich C2284-25) dans un rapport 50 :1. Le réactif est agité jusqu'à obtention d'une coloration homogène vert clair.

Les échantillons ainsi que les différents points de gamme sont déposés en duplicate sur une microplaque de 96 puits à raison de 20 µl par puits. Ensuite, 200 µl de réactif de travail sont ajoutés à chaque puits. Après une incubation pendant 30 minutes à 37°C, l'absorbance à 562 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (SPECTROstar^{Nano}, BMG LABTECH, Champigny sur Marne, France).

3. Electrophorèse des protéines et immuno-détection

La technique d'électrophorèse consiste à séparer les protéines d'un échantillon par l'utilisation d'un courant électrique. L'utilisation de SDS lors de la préparation des échantillons va permettre une

séparation des protéines selon leurs masses moléculaires. Après électrotransfert sur une membrane, la protéine d'intérêt pourra être révélée à l'aide d'un anticorps (Ac) spécifique.

A) Electrophorèse

Les protéines des échantillons sont déposées en quantité constante sur un gel de concentration en polyacrylamide à 4,15% (acrylamide/bisacrylamide 4,15%/0,1%). Les protéines sont ensuite séparées dans un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes à 7,5 ou 12 % d'acrylamide (acrylamide/bisacrylamide 7,5%/0,2% ou 12%/0,3%). La migration des échantillons à travers le gel de concentration est réalisée sous courant constant (25 mA/gel) et en présence de tampon d'électrophorèse (Tris 25 mM – glycine 192 mM – SDS 0,1%). Un marqueur de masse moléculaire (5 µl/puits ; RPN800E, Full-Range rainbow, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) est déposé en même temps sur chaque gel.

B) Electrotransfert

Les protéines contenues dans le gel sont ensuite transférées par électrotransfert sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF ; porosité 0,2 µm ou 0,45 µm). Les membranes ont été préalablement activée dans de l'éthanol absolu pendant 1 minute avant leur utilisation. Le transfert est réalisé pendant 1 heure à 100 Volts dans un tampon de transfert (Tris Base 50 mM - glycine 384 mM - 20% d'éthanol).

C) Blocage des sites non spécifiques et immunomarquage

A la fin du transfert, les membranes sont incubées pendant 1 heure à température ambiante sous agitation dans une solution de T-TBS à 0,1% (Tris 10 mM - NaCl 142 mM - pH 7,6 - 0,1% de Tween®20) contenant du lait écrémé dont la concentration dépend de l'anticorps utilisé (voir tableau 7). Les membranes sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C en présence de l'Ac primaire dilué dans la solution de blocage (voir tableau 7). Après 3 lavages (1x15 minutes puis 2x5 minutes) dans du tampon T-TBS à 0,1% de Tween®20, les membranes sont mises en présence d'un Ac secondaire dilué dans la solution de blocage pendant 1 heure sous agitation, à température ambiante et à l'abri de la lumière (tableau 7). L'anticorps secondaire est couplé à HRP (HorseRadish Peroxidase) pour une révélation par ECL (chimiluminescence) et à FITC (fluorescein isothiocyanate) pour une révélation

par ECF (chimiofluorescence). Trois lavages sont ensuite réalisés (1x15 minutes et 2x5 minutes) dans du tampon T-TBS à 0,1%.

D) Révélation

a. Révélation par chimioluminescence (ECL)

Le système de révélation Enhanced Chimio Luminescence (ECL) select consiste à ajouter sur chaque membrane pendant environ 5 minutes, 1 ml d'un mélange de luminol/peroxyde (RPN2235, GE-Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). L'action de la peroxydase HRP couplée à l'Ac secondaire sur la solution de peroxyde entraîne l'oxydation du luminol conduisant à une émission de lumière. Cette émission de lumière est révélée par l'utilisation de film photographique (Z373508, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et elle est proportionnelle à la quantité de protéines sur la membrane.

b. Révélation par chimiofluorescence (ECF)

Cette technique de révélation nécessite une amplification du signal *via* la fixation d'un Ac tertiaire anti-fluorescéine couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1/2000^{ème} dans la solution de blocage. Après 1 heure d'incubation sous agitation, à température ambiante et à l'obscurité, les membranes sont lavées dans du tampon T-TBS à 0,1%. Un volume de 1 ml de substrat Enhanced Chimio Fluorescence (ECF, RPN5781 du Kit ECF, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) est ensuite additionné sur chaque membrane. La révélation et la quantification se font à l'aide d'un Storm 860 (Amersham-Pharmacia Biotech, Orsay, France). Une semi-quantification a été réalisée avec le logiciel ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics, Foster City, California, USA).

Tableau 7 : Conditions expérimentales utilisées au cours du Western Blot

Protéine d'intérêt	Blocage (% de lait)	Ac primaire	Ac secondaire
HMGB1	5%	Ac de lapin anti-HMGB1 (Ab18256 ; Abcam) Dilution : 1/1000	Ac anti-IgG de lapin, couplé FITC (RPN5780, Amersham) Dilution: 1/1 000
Actine	5%-3%	Ac de lapin anti-Actine (A2066 ; Sigma) Dilution : 1/1000	Ac anti-IgG de lapin, couplé FITC (RPN5780, Amersham) Dilution: 1/1 000
Histone	5%-3%	Ac de lapin anti-Histone (H0164. Sigma) Dilution : 1/10000	Ac anti-IgG de lapin, couplé FITC (RPN5780, Amersham) Dilution: 1/1 000
PAR	3%	Ac polyclonal de lapin anti-PARs (4336-BPC-100. Trevigen)	Ac anti IgG de lapin couplé HRP
VEGF-A	5%	Ac de lapin anti-VEGF-A (sc-152 ; Santa Cruz)	Ac anti-IgG de lapin, couplé FITC (RPN5780, Amersham) Dilution: 1/1 000

Le poids moléculaire des protéines révélées a été calculé en comparant leurs distances de migration à celles des marqueurs de masse moléculaire ayant migré dans le même gel. Les bandes ont été quantifiées lors de la révélation par l'ECF à l'aide du logiciel ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics, Foster City, California, USA). Les résultats sont exprimés en unités arbitraire (UA) corrigées par une protéine contrôle. L'actine a été utilisée pour les corrections des protéines contenus dans la fraction protéique soluble qui contiendrait en outre les protéines cytoplasmiques. L'histone a été utilisée pour les corrections de la fraction protéique insoluble qui contiendrait les protéines nucléaires insolubles.

IV. Dosages ELISA

Les concentrations de HMGB1 et de VEGF-A ont été mesurées dans le plasma de souris et, pour VEGF-A, dans les surnageants de culture, grâce à des kits ELISA (ST 51011 IBL International GMBH pour HMGB1 ; Quantikine ELISA mouse VEGF, MMV00, R et D system pour le VEGF-A), qui consistent en un dosage immunoenzymatique de type sandwich. Les concentrations en HMGB1 et VEGF-A sont calculées grâce à une gamme dont les concentrations sont comprises entre 2,5 et 80 ng/ml pour HMGB1 et entre 7,8 et 500 pg/ml pour VEGF-A.

1. Protocole de dosage de HMGB1 dans le plasma

Cent microlitres de tampon diluant sont répartis dans tous les puits de la microplaque. Ensuite, des dépôts de 10 µl de : tampon diluant (pour les puits blancs de la microplaque), points de gammes, contrôle positif et échantillons de plasma sont réalisés. La plaque est ensuite incubée à 37°C pendant 24 heures. Chaque puits de la microplaque est lavé 5 fois avec 400 µl de tampon de lavage. Ensuite, 100 µl de conjugué enzymatique (anticorps conjugué à de la peroxydase) sont additionnés dans chaque puits. La plaque est alors incubée pendant 2 heures à 25°C puis lavée 5 fois avec 400 µl de tampon de lavage par puits. Une solution contenant du TMB (Tétra-méthyl-benzidine) et du peroxyde d'hydrogène est ajoutée dans chaque puits (100 µl/puits) et la plaque est incubée pendant 30 minutes à température ambiante à l'obscurité. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout d'une solution d'arrêt.

L'intensité de la coloration mesurée au lecteur de microplaque (Spectro Nano Star Nano, GMH Labitech) à 450 nm est proportionnelle à la quantité de HMGB1 présente dans chaque échantillon.

2. Protocole de dosage du VEGF-A dans le plasma et dans les surnageants concentrés

Cinquante microlitres de tampon diluant sont répartis dans tous les puits de la microplaque. Ensuite, des dépôts de 50 µl de : tampon diluant (pour les puits blancs de la microplaque), points de gammes, contrôle positif et échantillons de plasma ou de surnageants sont réalisés. La plaque est ensuite incubée à température ambiante (25°C) pendant 2 heures. Chaque puits de la microplaque est lavé 5 fois avec 400 µl de tampon de lavage. Ensuite, 100 µl de conjugué enzymatique (anticorps conjugué à de la peroxydase) sont additionnés dans chaque puits. La plaque est alors incubée pendant 2 heures à 25°C puis lavée 5 fois avec 400 µl de tampon de lavage par puits. La solution substrat est ajoutée dans chaque puits (100 µl/puits) et la plaque est incubée pendant 30 minutes à température ambiante à l'obscurité. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout d'une solution d'arrêt.

L'intensité de la coloration mesurée au lecteur de microplaque (Spectro Nano Star Nano, GMH Labitech) à 450 nm est proportionnelle à la quantité de VEGF-A présente dans chaque échantillon.

V. Etude de la localisation cellulaire de HMGB1 par Immunocytochimie

Le principe de cet immunomarquage repose sur la fixation d'un anticorps primaire qui reconnaît spécifiquement les molécules d'intérêt. Cette étape est suivie de la fixation sur cet anticorps d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Un marquage des noyaux cellulaires par le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) permet de situer le marquage de la protéine d'intérêt dans la cellule. La fluorescence est observée au microscope à fluorescence (Zeiss Microscopy, 765505, Germany).

1. Préparation des échantillons

Les cellules sontensemencées sur des lamelles (diamètre : 13 mm ; 100048 ; Dominique Dutscher) disposées dans des plaques 24 puits et recouvertes de poly D-Lysine (P6407 ; Sigma Aldrich) afin de permettre une meilleure adhésion des cellules.

A la fin du traitement, le milieu de culture est retiré et un lavage (400 µl/puits) avec du PBS stérile chauffé à 37°C est effectué.

Pour l'étude de l'effet du rt-PA sur la protéine HMGB1 après perméabilisation, les cellules ont d'abord été perméabilisées grâce à une solution de NP40 (0,1%) pendant 30 secondes. Elles ont ensuite été fixées avec du paraformaldéhyde (4% dans du PBS, 400 µl/puits ; PFA (90-92%) 169650025, ACROS ORGANIC) pendant 12 minutes. Pour les autres expériences sans perméabilisation, les cellules sont fixées directement après le traitement. Après trois lavages au PBS, 400 µl d'une solution de cryoprotectant (glycérol 0,2% ; éthylène glycol 0,3% ; PBS 0,5%) sont additionnés dans chaque puits et les cellules sont congelées à -40°C jusqu'au jour de la réalisation de l'immunocytochimie (figure 34).

2. Réalisation de l'immunocytochimie

Les cellules fixées sur les lamelles sont décongelées à température ambiante, puis lavées au PBS. La membrane cellulaire est ensuite perméabilisée à l'aide d'une solution de PBS - 0.1% Triton™X100 (180 µl/puits) pendant 10 minutes à température ambiante, puis un lavage au PBS est réalisé. Les sites antigéniques non spécifiques sont ensuite bloqués par une solution de sérum de chèvre (D-9023 Sigma ; 5%) pendant 30 minutes à température ambiante. Le sérum a été choisi en fonction de l'animal chez lequel l'anticorps secondaire utilisé a été produit. Les cellules ont ensuite été incubées

toute la nuit à 4°C dans une solution d'anticorps primaire dirigé contre la protéine HMGB1 (Ac de lapin anti-HMGB1 (Ab18256 ; Abcam) dilué à 1/1000 dans une solution PBS + Serum 5%). Le marquage est révélé grâce à un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit, A-21428 ; Millipore ; dilution 1/1000) dirigé contre l'anticorps primaire pendant 1h à température ambiante à l'obscurité. Enfin, après un lavage, les cellules sont incubées avec le DAPI pendant 5 minutes. Les lamelles sont montées sur lames dans un milieu Mowiol® (4-88 Sigma-Aldrich), séchées une journée à température ambiante à l'abri de la lumière puis conservées à 4°C.

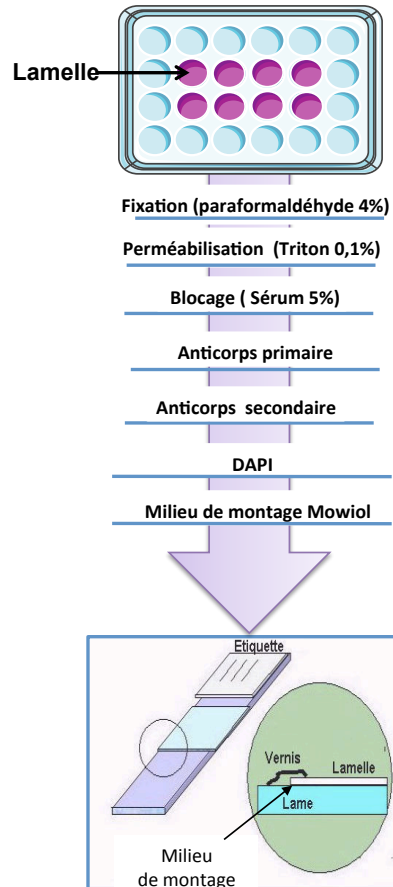


Figure 34 : Les étapes de réalisation d'un marquage en immunocytologie

VI. Analyse statistique des résultats

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

Pour les études sur les MVE, une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée suivie soit d'un test de Dunnett si les groupes sont comparés au groupe contrôle, soit d'un test de Bonferroni dans le cas de comparaisons multiples. Dans le cas d'une comparaison entre deux groupes, un test t de Student a été utilisé.

Pour les études sur HMGB1 et le VEGF, (*in vivo* et *in vitro*) les données de Western Blot et d'ELISA ont été réalisées par un test de Kruskal Wallis suivi d'un test U de Mann et Whitney corrigé. Un test de Kruskal Wallis suivi d'un test Dunn a été réalisée pour les données de viabilité et de mort cellulaire.

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

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

PREMIÈRE PARTIE : Etude *in vitro* de l'implication du rt-PA et de la plasmine dans la libération des microvésicules endothéliales par les cellules bEnd.3

Les premières études sur l'effet du rt-PA dans la production des microvésicules endothéliales (MVE) ont été réalisées au laboratoire par le Dr. M. Garraud. Ses résultats de thèse montraient que le rt-PA à la concentration de 40 µg/ml entraînait à 24 heures une augmentation de la libération des MVE par les cellules endothéliales cérébrales murines de la lignée bEnd.3, ils mettaient également en évidence l'implication de la PARP et de la p38 MAPK (Mitogen Associated Protein Kinase) dans cet effet.

Dans la continuité de ces travaux, nous avons recherché si cette augmentation de la libération des MVE observée 24 heures après traitement par le rt-PA impliquait la plasmine.

Pour ce faire, j'ai dû tout d'abord prendre en main la technique de culture cellulaire de la lignée bEnd.3 (ATCC® CRL-2299™).

Nous avons choisi les cellules bEnd.3 comme modèle *in vitro* afin d'étudier les mécanismes de toxicité endothéliale du rt-PA observés dans nos modèles *in vivo* d'ischémie cérébrale. Ces effets toxiques se traduisent notamment par des altérations de la barrière hématoencéphalique (BHE) et l'apparition d'hémorragies intracérébrales (El Amki et al., 2012 ; Haddad et al., 2013 ; Teng et al., 2013). Le choix de ce modèle cellulaire pour nos études *in vitro* a été motivé d'une part parce les cellules bEnd.3 possèdent différentes caractéristiques de BHE, et d'autre part en raison de la simplicité à cultiver ces cellules. En effet, contrairement aux cultures primaires de cellules endothéliales, les cellules bEnd.3, conservent leurs caractéristiques même après plusieurs passages (30 à 40 passages, Brown et al., 2007). Elles présentent des similarités avec le phénotype de BHE *in vivo* en exprimant notamment des protéines de jonctions serrées telles que l'occludine, la claudine-5 et les zonula occludens 1 et 2 (ZO-1, ZO-2) (Brown et al., 2007). Les cellules bEnd.3 expriment également des transporteurs (transporteur de D-glucose (GLUT-1), Glycoprotéine-P, transporteurs d'acides aminés) ainsi que des protéines associées aux vésicules impliquées dans l'endocytose telles que la clatherine, la caveoline-1 et la flotilline (Omidi et al., 2003). De plus, il a été montré que ces cellules présentaient une faible perméabilité au sucrose (Omidi et al., 2003) et à la fluorescéine de sodium (Watanabe et al., 2013b).

A l'état constitutif, les cellules bEnd.3 expriment des molécules d'adhérence telles que ICAM-1 et VCAM-1 ainsi que le facteur de Von Willebrand (Camos et Mallolas et al., 2010). Lorsqu'elles sont stimulées *in vitro* par le LPS (lipopolysaccharide) ou par des cytokines comme le TNF, elles sont capables de surexprimer ICAM-1 (Scott et al., 2004) ainsi que la E et la P-selectine (Yao et al., 1999 ; pour revue Camos et Mallolas (2010)). Par ailleurs, différentes données montrent que les cellules bEnd.3 sont sensibles au t-PA. En effet, les cellules bEnd.3 expriment les récepteurs glutamatergiques de type NMDA (Scott et al., 2007 ; Betszen et al., 2009) et le récepteur LRP (low density lipoprotein receptor protein). Ces récepteurs sont décrits comme les principaux intermédiaires des effets du rt-PA au niveau cellulaire. Une étude a d'ailleurs montré que le t-PA entraîne *via* les récepteurs LRP une surexpression de ICAM-1 par les cellules bEnd.3 (Wang et al., 2014). Il a également été montré que l'interaction t-PA/LRP était à l'origine de la sécrétion des métalloprotéases MMP-2,3 et 9 par les cellules bEnd.3 (Suzuki et al., 2009 ; Kim et al., 2017). De plus, Won et collaborateurs ont montré que le t-PA augmentait d'une part la perméabilité des cellules bEnd.3 et d'autre part l'expression du VEGF-A en conditions d'hypoxie (Won et al., 2014).

Au début de nos travaux, nous avons tenté d'optimiser le protocole de culture cellulaire utilisé jusqu'ici afin de diminuer la variabilité observée pour certains de nos résultats. Ce nouveau protocole consistait en une synchronisation des cellules dans du milieu de culture dépourvu sérum de veau fœtal (SVF) pendant 24 heures avant le début du traitement. L'idée était qu'une synchronisation permettrait aux cellules de se retrouver toutes au même stade de division cellulaire et dans un état quiescent au moment du traitement.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que les cellules bEnd.3 que nous utilisons étaient bien capables de répondre à un stress par une production de microvésicules endothéliales (MVE). Pour cela, nous avons choisi de synchroniser les cellules puis de les soumettre à des conditions de stress oxydant en les traitant par du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Nous avons ensuite évalué la viabilité et la mort cellulaires ainsi que la production de MVE dans le surnageant de culture par cytométrie en flux. Dans un second temps, nous avons testé l'effet d'une gamme de rt-PA (10, 20, 40 µg/ml) afin de reproduire les résultats obtenus par le Dr. Garraud. Enfin, nous avons recherché si la plasmine était impliquée dans la production des microvésicules endothéliales induite par le rt-PA.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. Chantal Boulanger de l'INSERM-U970 au Paris-Centre de Recherche Cardiovasculaire (PARCC) à l'hôpital européen Georges Pompidou.

I. Expériences préliminaires : Recherche d'une libération de MVE après stimulation des cellules bEnd.3

1. Recherche de l'effet du peroxyde d'hydrogène

a. Protocole expérimental

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans du milieu en présence de sérum de veau fœtal (SVF). Vingt-quatre heures après, un changement de milieu sans SVF est réalisé et les cellules sont incubées pendant 24 heures supplémentaires sans SVF afin de les synchroniser. Les cellules ont ensuite été traitées par une gamme de H₂O₂ (0,5 ; 1 et 2 mM) pendant 24 heures (figure 35).

A la fin du traitement, les surnageants de culture ont été récupérés afin d'évaluer le taux de MVE par cytométrie en flux après un marquage des phosphatidylsérines par l'Annexin V. Le taux de microvésicules marquées positivement à l'annexine V (MVE_AnnV+) de chaque échantillon est exprimé en pourcentage par rapport aux cellules contrôles de chaque série (n=8/condition de traitement).

La viabilité cellulaire a été évaluée par un test MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium bromide) et la mort cellulaire par une mesure de la lactate déshydrogénase (LDH) libérée dans le surnageant. Le taux de viabilité est exprimé en pourcentage par rapport aux cellules contrôles et la mort cellulaire en pourcentage par rapport au Full Kill (FK) qui représente 100% de mort cellulaire (n=8/condition).

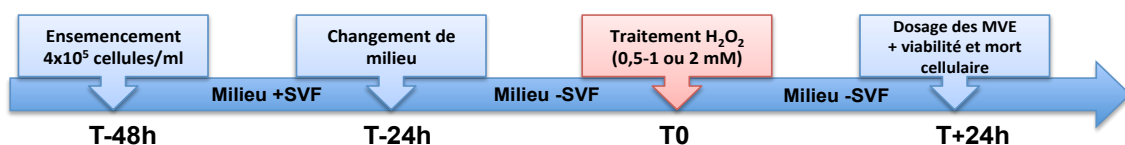


Figure 35 : Protocole de traitement par H₂O₂ des cellules bEnd.3 synchronisées

b. Résultats

✚ Dosage des MVE

Après 24 heures d'incubation, le traitement par H₂O₂ aux concentrations de 0,5 et 1 mM n'entraîne pas d'augmentation de la libération des MVE par les cellules bEnd.3 par rapport au groupe contrôle (figure 36). A la concentration de 2 mM de H₂O₂, une augmentation du taux de MVE de près de 100%

est observée par rapport au groupe contrôle (11583± 11018 MV/μl, versus 5712 ± 2718 MVE/μl, P< 0,05).

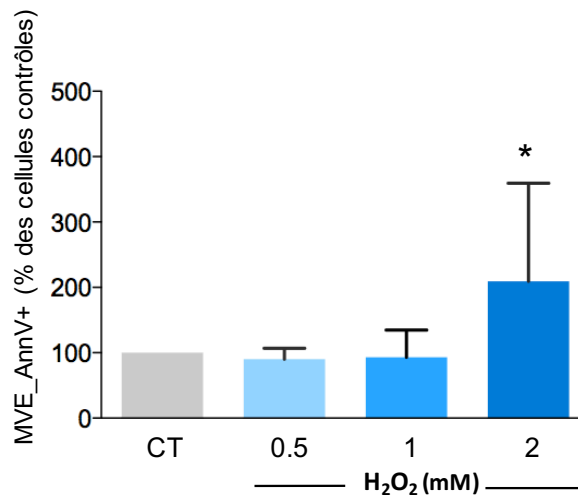


Figure 36 : Effet du peroxyde d'hydrogène sur la libération des MVE par les cellules bEnd.3 après 24h d'incubation

Les résultats (moyenne ± sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles. n= 8/condition. CT= cellules contrôles.*P< 0,05 versus CT.

✚ Mesure de la viabilité et de la mort cellulaire

Le traitement des cellules bEnd.3 par H₂O₂ aux concentrations de 0,5 et 1 mM ne modifie ni la viabilité cellulaire ni la mort cellulaire (figure 37). En revanche, à la dose de 2 mM, H₂O₂ entraîne une baisse de la viabilité cellulaire (P< 0,001) ainsi qu'une augmentation de la mort cellulaire (P< 0,01).

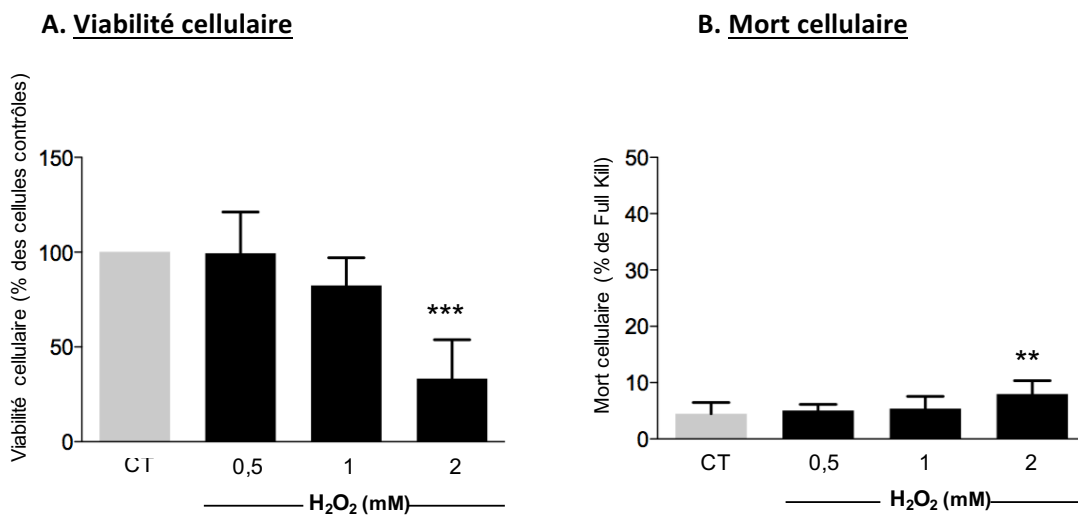


Figure 37 : Effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité (A) et la mort (B) des cellules bEnd.3 après 24h d'incubation

Les résultats (moyenne ± sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles pour la mesure de la viabilité et en % de Full Kill (100% de mort) pour la mesure de la mort cellulaire. n= 8/condition. CT=cellules contrôles. *** : P <0,001 ; ** : P<0,01 versus CT.

Morphologie des cellules

Au microscope, les cellules contrôles forment un tapis cellulaire homogène. Le traitement des cellules par H_2O_2 aux concentrations de 0,5 et 1 mM ne modifie ni la morphologie ni l'organisation du tapis cellulaire. A la concentration de 2 mM, la densité cellulaire est diminuée. Le tapis cellulaire présente des zones lacunaires, probablement dues au détachement de cellules mortes à cette forte concentration de H_2O_2 (figure 38).

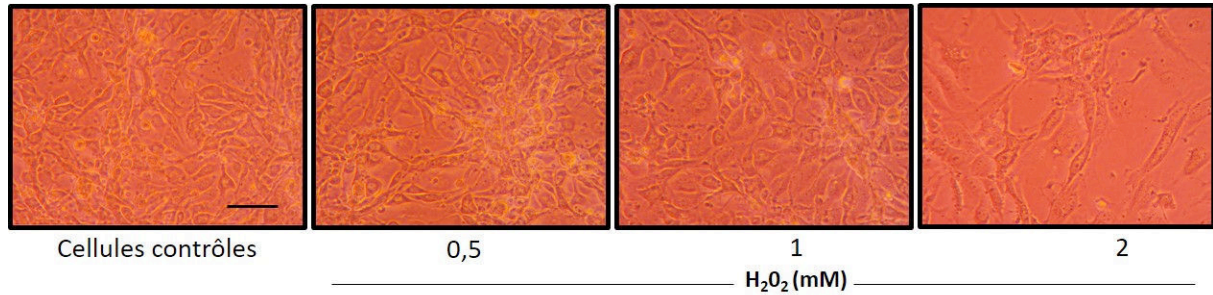


Figure 38 : Effet du peroxyde d'hydrogène sur la morphologie des cellules

La barre d'échelle représente 100 μ m.

c. Discussion

Au laboratoire, différents stimuli avaient été testés afin d'induire une production de MVE par les cellules bEnd.3, notamment la thrombine et le TNF (Thèse M. Garraud, 2014). Paradoxalement, contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature, aucun effet n'avait été observé ni avec le TNF, ni avec la thrombine (Sapet al., 2006 ; Szotowski et al., 2007 ; Curtis et al., 2009 ; Lee et al., 2014).

Nous avons donc choisi de rechercher dans cette première étude l'effet d'un autre stimulus, le stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène. En effet, dans la littérature, il a été montré que le traitement des cellules endothéliales HMVEC (Human Lung Microvascular Endothelial Cells) et HAECs (Human Aortic Endothelial Cells) par le peroxyde d'hydrogène entraînait une libération de MVE (Takahashi et al., 2013). De plus, il est bien établi qu'après une ischémie cérébrale, il existe une production importante d'espèces réactives de l'oxygène et d'autres radicaux libres responsables d'un stress oxydant qui participe à la lésion primaire post-ischémique. Ainsi l'association d'un stress oxydant au rt-PA pour traiter les cellules bEnd.3 permettrait de mimer les processus lésionnels observés *in vivo*.

Nous avons montré dans cette première expérience que H_2O_2 à la concentration de 2 mM entraîne une libération de MVE par les cellules bEnd.3 à 24 heures. En revanche, nous avons observé à cette concentration une diminution de la viabilité associée à une augmentation de la mort cellulaire. Nous

ne pouvons donc pas exclure que l'augmentation des MVE soit la conséquence d'une mort cellulaire par apoptose.

Au vu de ces résultats, nous avons décidé dans la suite de nos travaux d'étudier l'effet du rt-PA seul et non en condition de stress oxydant sur la production des MVE.

2. Recherche de l'effet du rt-PA

A) Effet d'une gamme de rt-PA sur les cellules bEnd.3 synchronisées

a. Protocole expérimental

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées comme précédemment dans du milieu de culture contenant du SVF ; puis 24 heures après, elles ont été incubées dans du milieu dépourvu de SVF durant 24 heures supplémentaires afin de les synchroniser. Les cellules ont alors été traitées par une gamme de rt-PA (lot 1, #502074) (10 ; 20 et 40 µg/ml) pendant 24 heures (figure 39). A la fin du traitement, les cellules ont été observées au microscope, puis le surnageant a été récupéré afin d'y doser les MVE. La cytotoxicité du traitement a été évaluée par le test de viabilité cellulaire (MTT), et par la mesure de la LDH dans le surnageant.

Le taux de MVE_AnnV+ de chaque échantillon et la viabilité cellulaires sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles de chaque série (n=8/condition). Le taux de mort cellulaire est exprimé en pourcentage par rapport au Full Kill (FK) qui représente 100% de mort cellulaire (n=8/condition).

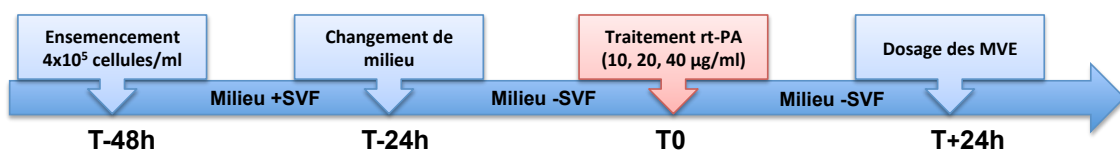


Figure 39 : Protocole de traitement par une gamme de rt-PA des cellules bEnd.3 synchronisées

b. Résultats

✚ Effet sur la morphologie

A l'observation au microscope, les cellules bEnd.3 contrôles apparaissent confluentes et forment un tapis cellulaire homogène (figure 40). Le traitement des cellules par le rt-PA entraîne une

modification de leur morphologie : le tapis cellulaire est complètement réorganisé, les cellules sont fusiformes, elles se regroupent et forment des prolongements entre elles ; ces effets sont d'autant plus marqués que la concentration de rt-PA est élevée.

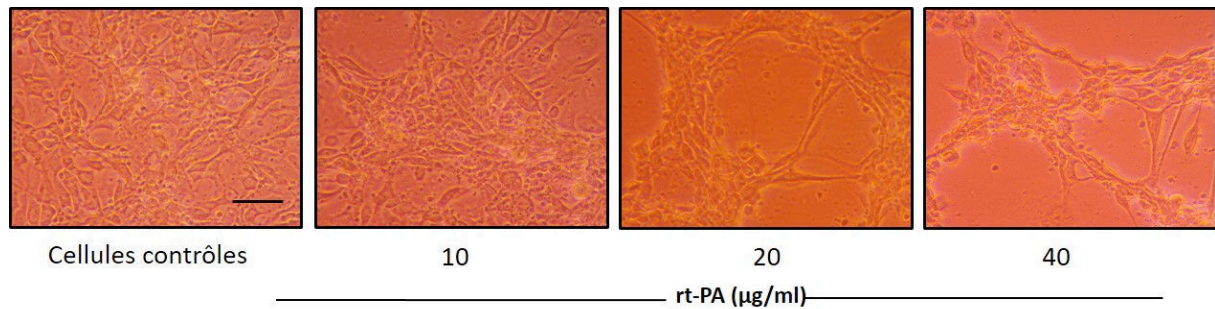


Figure 40 : Effet du rt-PA sur la morphologie des cellules

La barre d'échelle représente 100 µm.

+ Dosage des MVE

Le traitement des cellules bEnd.3 par le rt-PA pendant 24 heures ne modifie pas le taux de MVE par rapport au groupe contrôle, quelle que soit la concentration de rt-PA utilisée (contrôle : 3983 ± 1903 MVE/µl ; rt-PA (10 µg/ml) 4169 ± 1343 MVE/µl ; rt-PA (20 µg/ml) 3627 ± 925 MVE/µl ; rt-PA (40 µg/ml) 3248 ± 683 MVE/µl), (figure 41).

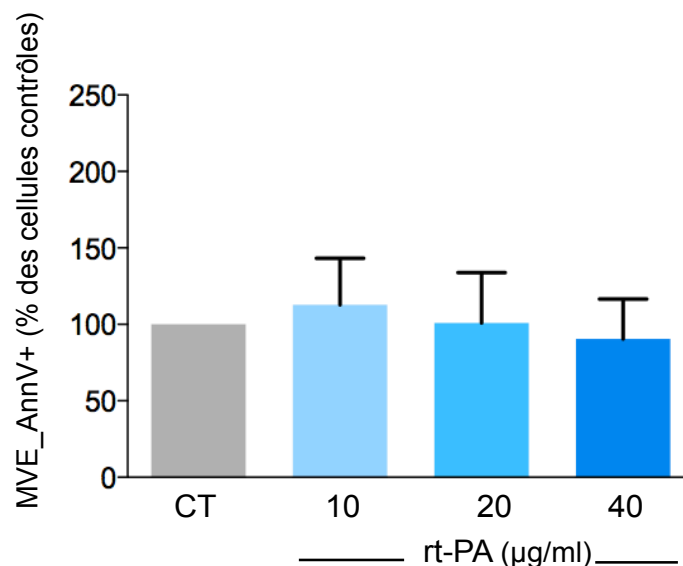


Figure 41 : Effet d'une gamme de rt-PA sur la libération de MVE par les cellules bEnd.3 synchronisées après 24h d'incubation

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles. n= 8/condition. CT = cellules contrôles.

✚ Mesure de la viabilité et de la mort cellulaire

Le traitement des cellules bEnd.3 par le rt-PA pendant 24 heures ne modifie pas leur viabilité cellulaire (figure 42A) et n'entraîne pas non plus de mort cellulaire quelle que soit la concentration (figure 42B).

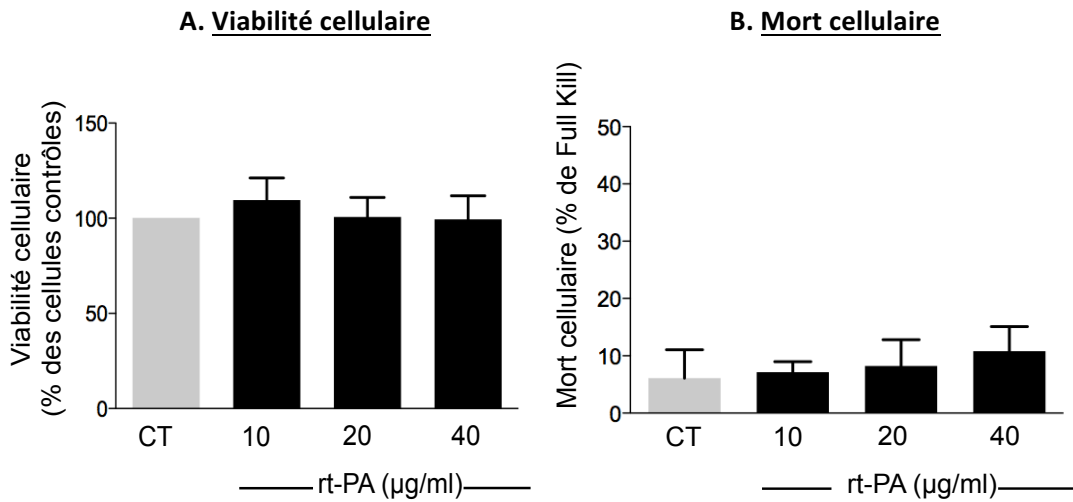


Figure 42 : Effet d'une rt-PA sur la viabilité (A) et la mort (B) des cellules bEnd.3 après 24h d'incubation

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles pour la mesure de la viabilité et en % de Full Kill (100% de mort) pour la mesure de la mort cellulaire. n= 8/condition. CT =cellulescontrôles.

c. Discussion

Dans cette deuxième expérience, nos résultats montrent que les cellules bEnd.3 synchronisées ne libèrent pas de MVE après traitement par le rt-PA pendant 24 heures, que ce soit à la concentration de 10, 20 ou 40 µg/ml. Or, sur des cellules bEnd.3 non synchronisées, le Dr. Garraud avait montré une production de MVE par le rt-PA à la concentration de 40 µg/ml (thèse M. Garraud, 2014).

Pour la suite de nos travaux, nous avons donc décidé de continuer à ne pas synchroniser les cellules bEnd.3 afin de préciser les mécanismes à l'origine de la libération des MVE.

B) Effet du rt-PA (40 µg/ml) sur les cellules bEnd.3 non synchronisées

a. Protocole expérimental

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans du milieu contenant du SVF. Vingt-quatre heures après, elles ont été traitées par le rt-PA à la concentration de 40 µg/ml pendant 24 heures n=4/condition (figure 43). Comme précédemment, leur morphologie a été observée au microscope avant de récupérer le surnageant pour le dosage des MVE. Enfin, des tests de cytotoxicité (viabilité et mort cellulaire) ont été réalisés.

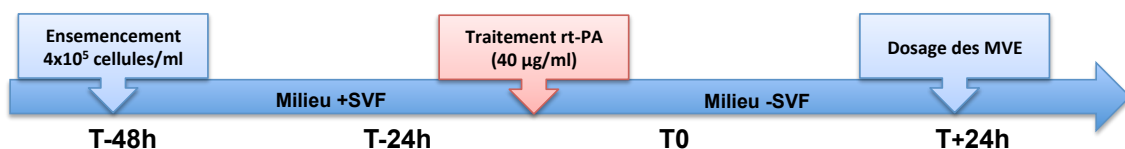


Figure 43 : Protocole de traitement par le rt-PA (40 µg/ml) des cellules bEnd.3 non synchronisées

b. Résultats

✚ Effet sur la morphologie

Le traitement par le rt-PA (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) modifie la morphologie des cellules, comme précédemment, Les cellules se réorganisent, forment des prolongements entre elles et le tapis cellulaire n'est plus homogène comparativement aux cellules contrôles (figure 44).

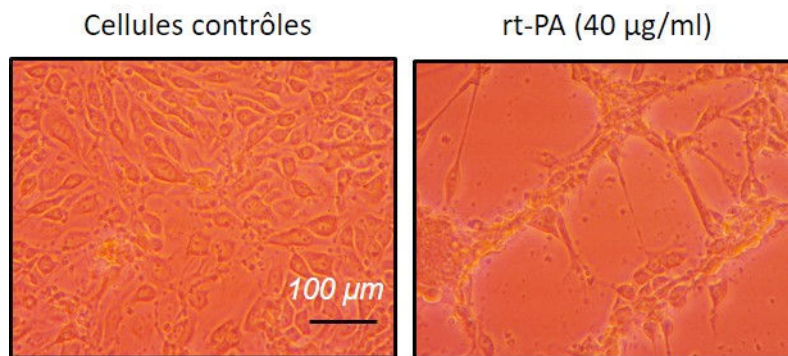


Figure 44 : Effet du rt-PA (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sur la morphologie des cellules à 24 heures

La barre d'échelle représente 100 μm .

✚ Dosage des MVE

La figure 45A présente des dots-plots représentatifs du marquage en cytométrie de flux des échantillons de cellules contrôles et traitées par le rt-PA. L'utilisation de billes de calibration a tout d'abord permis de définir une zone qui inclut tous les événements de taille microvésiculaire comprise entre 0,3 et 1 μm . Le marquage des phosphatidylsérines par l'Annexine V (en présence de calcium) a ensuite permis de mesurer le pourcentage d'éléments de taille microvésiculaire positifs à ce marquage.

Après vingt-quatre heures d'incubation, les contrôles négatifs (sans ajout de calcium dans le tampon de dosage) des cellules contrôles comme des cellules traitées par le rt-PA présentent un faible taux de marquage à l'annexine V (bruit de fond négligeable). Les résultats montrent que les cellules contrôles libèrent un taux de base de MVE de $11670 \pm 2281 \text{ MV}/\mu\text{l}$. Ce taux est significativement augmenté de près de 30% après traitement par le rt-PA (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ($15665 \pm 3996 \text{ MV}/\mu\text{l}$, $P < 0,01$, figure 45B).

A.

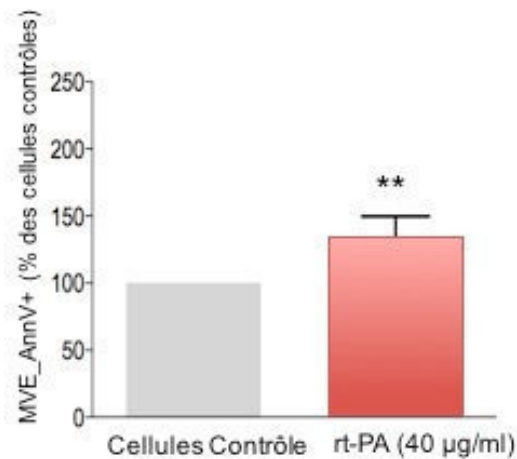
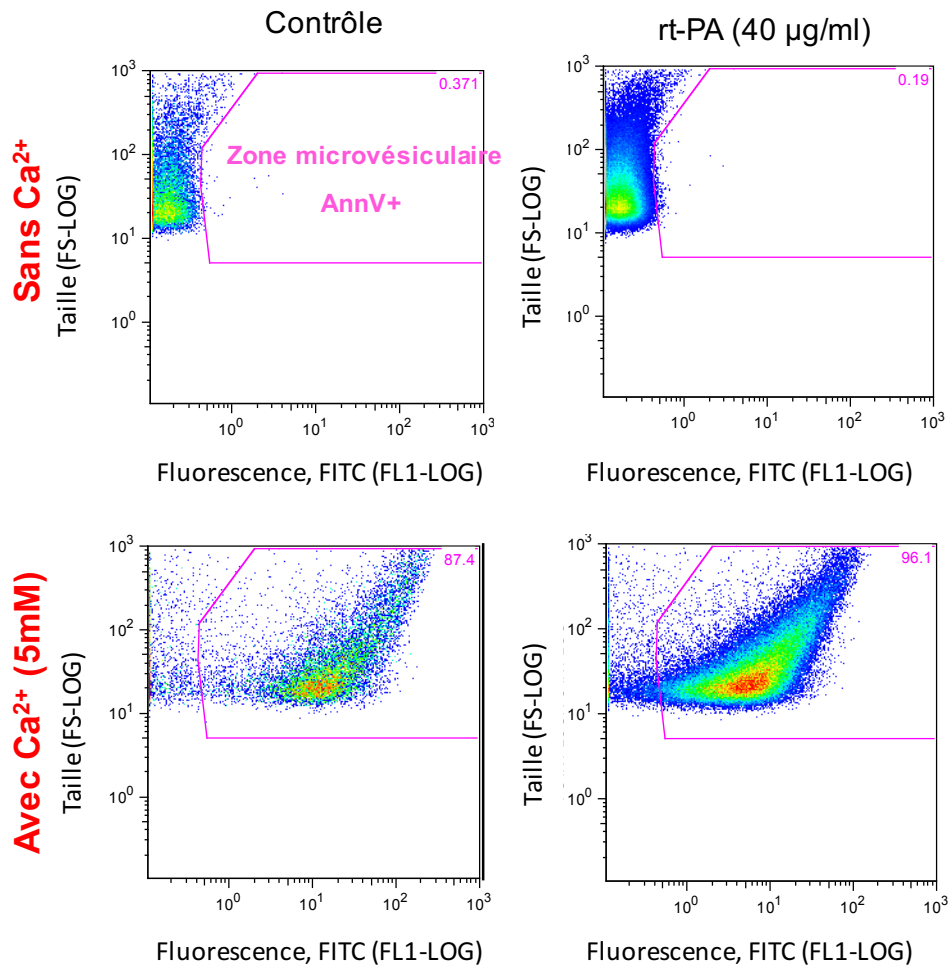


Figure 45 : Effet du rt-PA (40 µg/ml) sur la libération des MVE par les cellules bEnd.3 après 24 heures d'incubation

A) Dots plots représentatifs des événements de taille microvésiculaire marqués positivement à l'Annexine V en cytométrie en flux, pour les cellules contrôles et les cellules traitées par le rt-PA, en présence ou non de Ca²⁺ ; B) Quantification de l'effet du rt-PA sur la libération des MVE. Les résultats (moyenne ± sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles. n = 4/condition. CT = cellules contrôles. ** : P < 0,01 versus CT.

✚ Mesure de la viabilité et de la mort cellulaire

La viabilité cellulaire est diminuée de 13% ($P < 0,05$) après traitement par le rt-PA (40 $\mu\text{g/ml}$) pendant 24 heures ($P < 0,05$) (figure 46A). Toutefois, la mort cellulaire à 24 heures n'est pas modifiée (figure 46B).

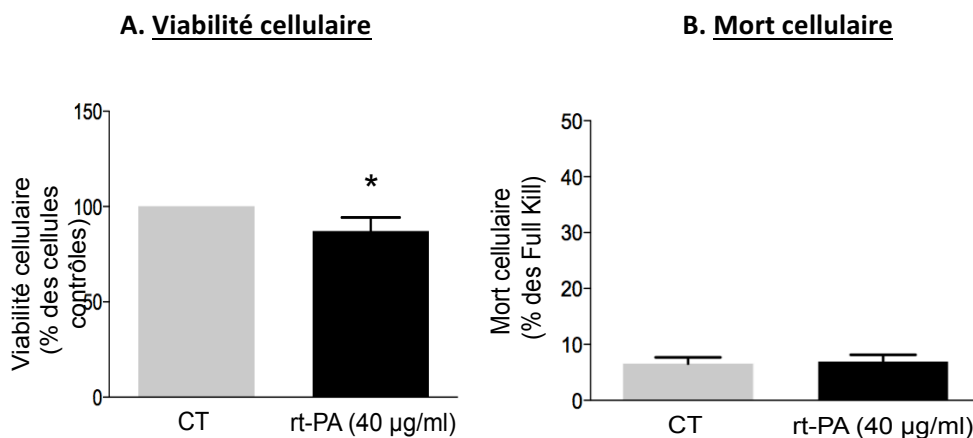


Figure 46 : Effet du rt-PA (40 $\mu\text{g/ml}$) sur la viabilité (A) et la mort (B) des cellules bEnd.3 après 24h d'incubation.

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles pour la mesure de la viabilité et en % de Full Kill (100% de mort) pour la mesure de la mort cellulaire. $n = 4/\text{condition}$. CT = cellules contrôles. * $P < 0,05$ versus CT.

3. Discussion

Dans la littérature, la majorité des études montre que la déprivation des cellules endothéliales en sérum n'influence pas l'effet de stimuli tels que le traitement par la thrombine, le TNF ou le PAI-1 sur la production de MVE, que ce soit sur des cultures primaires (Combes et al., 1999 ; Brodsky et al., 2002) ou sur des lignées (Sapet et al., 2006). Il a même été montré que la déprivation des cellules en sérum, et donc en facteurs de croissance, stimule la libération de MVE (Jimenez et al., 2003 ; Mezentsev et al., 2005). Dans nos premières expériences, nous avons déprivé nos bEnd.3 de sérum afin de les synchroniser, notre but étant de diminuer la variabilité observée par le Dr. Garraud pour certains de ses résultats. Or, dans cette série d'expériences, nous avons montré que : 1) le traitement des cellules synchronisées par H_2O_2 ou par le rt-PA ne modifie pas le taux de base des MVE, hormis lorsque la mort cellulaire est augmentée (H_2O_2 à 2 mM) ; 2) les cellules non synchronisées traitées par le rt-PA à la concentration 40 $\mu\text{g/ml}$ libèrent des taux de MVE supérieurs à ceux des cellules contrôles.

Au vu de ces résultats pour la suite des expériences, nous avons choisi de ne pas synchroniser les cellules avant le traitement par le rt-PA. Les traitements ont toutefois été réalisés dans du milieu sans sérum comme ce qui se fait couramment en pratique. Le SVF contient en effet de nombreux facteurs de croissance susceptibles d'interférer avec les agents pharmacologiques utilisés pour le traitement des cellules et donc de modifier la réponse cellulaire. De plus, ces facteurs de croissance maintiennent les cellules dans un état prolifératif, ce qui est susceptible de biaiser les effets des traitements sur les cellules.

En ce qui concerne la morphologie cellulaire, le rt-PA entraîne une réorganisation importante du tapis cellulaire ainsi qu'une modification de la morphologie cellulaire. Le tapis cellulaire n'est plus uniforme, les cellules sont fusiformes, elles se regroupent en amas et forment des prolongements entre elles. Des études *in vitro* réalisées au laboratoire montrent que ces effets sur la morphologie observés à 24 heures ne sont pas liés à une modification de l'expression des protéines de jonction serrées (occludine et ZO-1) ou adhérentes (VE-cadherine) (thèse M. Garraud, 2014). Cependant, les études *in vivo* réalisées au laboratoire sur des modèles d'ischémie cérébrale chez la souris (modèle endovasculaire et modèle par injection de thrombine) montrent que le rt-PA aggrave la diminution de l'expression des protéines de jonction serrée (claudine-5, occludine et ZO-1) et de jonction adhérente VE-Cadherine, suggérant ainsi leur dégradation (Teng et al., 2013 ; El Amki et al (soumis)). Toutefois, même si le rt-PA ne modifie pas l'expression des protéines de jonction *in vitro*, il pourrait modifier leur localisation ou phosphorylation, ce qui pourrait être à l'origine des changements morphologiques que nous observons. Il a en effet été montré que la phosphorylation des résidus tyrosine modifie le couplage de l'occludine aux protéines ZO (1,2 et 3), essentiel au maintien de la BHE (Kale et al., 2003). Dans une autre étude il a été montré que l'augmentation de la perméabilité des cellules bEnd.3 traitées par le LPS (lipopolysaccharide) était due à une relocalisation cytosolique des protéines occludine et ZO-1 et non pas à une diminution de leur expression (Seok et al., 2013). Dans la suite de nos expérimentations *in vitro* nous ne nous sommes pas intéressés d'avantage à ces changements morphologiques induits par le rt-PA. Nous nous sommes focalisés sur son effet dans la production des MVE et l'implication de la plasmine dans cet effet.

Après avoir mis en évidence une libération de MVE par les cellules bEnd.3 après traitement par rt-PA à la concentration de 40 µg/ml, nous avons recherché si cet effet impliquait la plasmine. Les résultats

obtenus au cours de cette étude associés à ceux du Dr. Garraud ont fait l'objet d'une publication dans le « Journal of Neurological Sciences » présentée après.

II. Implication de la plasmine dans la production de MVE induite par le rt-PA (Article)

1. Rappel des objectifs

L'article présenté ici regroupe les travaux initiés par le Dr. Garraud sur l'effet du rt-PA dans la production des microvésicules endothéliales par les cellules bEnd.3, ainsi que les travaux auxquels j'ai contribué concernant le rôle de la plasmine dans ces effets. Ils ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr. Chantal Boulanger au sein du laboratoire l'INSERM-U970 au Paris-Centre de Recherche Cardiovasculaire (PARCC) à l'hôpital européen Georges Pompidou.

Les objectifs étaient plus précisément de :

- ❖ Rechercher l'effet du rt-PA sur la libération de microvésicules endothéliales par les cellules bEnd.3, et préciser :
 - l'influence de la durée du traitement par le rt-PA
 - l'implication de la plasmine dans ses effets

- ❖ Etudier l'implication des voies classiques de vésiculation dans les effets du rt-PA :

Trois voies ont été examinées mettant en jeu :

 - Les caspases
 - la p38 MAPK
 - ROCK

- ❖ Etudier l'implication de la PARP dans la libération des MVE induite par le rt-PA

L'ensemble des études a été réalisé *in vitro* sur une lignée de cellules endothéliale cérébrales murines « les bEnd.3 ». Le dosage des MVE a été réalisé dans le surnageant des cultures cellulaires par une technique de cytométrie en flux. La morphologie a été évaluée au microscope en contraste de phase et après un marquage en cytochimie. Une évaluation de la cytotoxicité des différents traitements a été réalisée grâce à des tests de viabilité cellulaire (test MTT) et de mort cellulaire (mesure de la LDH).

2. Article

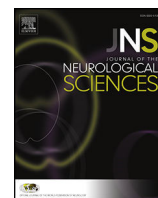
Recombinant tissue plasminogen activator enhances microparticle release from mouse brain-derived endothelial cells through plasmin

Marie GARRAUD^{*a}, Kahina KHACEF^{*a}, Anne-Clémence VION^b, Claire LECONTE^a, Min YIN^b, Jean-Marie RENARD^b, Catherine MARCHAND-LEROUX^a, Chantal M. BOULANGER^b, Isabelle MARGAILL^a, Virginie BERAY-BERTHAT^a

^a : Equipe de recherche "Pharmacologie de la Circulation Cérébrale" EA4475, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^b : INSERM, U970, Paris Cardiovascular Research Center, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

*: These authors contributed equally to this work



Recombinant tissue plasminogen activator enhances microparticle release from mouse brain-derived endothelial cells through plasmin



Marie Garraud ^{a,1}, Kahina Khacef ^{a,1}, Anne-Clémence Vion ^b, Claire Leconte ^a, Min Yin ^b, Jean-Marie Renard ^b, Catherine Marchand-Leroux ^a, Chantal M. Boulanger ^b, Isabelle Margaille ^a, Virginie Beray-Berthet ^{a,*}

^a Equipe de recherche "Pharmacologie de la Circulation Cérébrale" EA4475, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^b INSERM, U970, Paris Cardiovascular Research Center, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2015

Received in revised form 14 September 2016

Accepted 15 September 2016

Available online 16 September 2016

Keywords:

Microparticles

Microvesicles

Recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA)

Brain endothelial cells

Plasmin

Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)

p38 MAPK

ABSTRACT

Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) is currently the only approved pharmacological strategy for acute ischemic stroke. However, rt-PA exhibits vascular toxicity mainly due to endothelial damage. To investigate the mechanisms underlying rt-PA-induced endothelial alterations, we assessed the role of rt-PA in the generation of endothelial microparticles (EMPs), emerging biological markers and effectors of endothelial dysfunction.

The mouse brain-derived endothelial cell line bEnd.3 was used. Cells were treated with rt-PA at 20, 40 or 80 µg/ml for 15 or 24 h, and EMPs were quantified in the culture media using Annexin-V staining coupled with flow cytometry. Rt-PA enhanced EMP release from bEnd.3 cells with a maximal increase at the 40 µg/ml dose for 24 h (+78% compared to controls). Using tranexamic acid and aprotinin we demonstrated that plasmin is responsible for rt-PA-induced EMP release. The p38 MAPK inhibitor SB203580 and the poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) inhibitor PJ34 also reduced rt-PA-induced EMP production, suggesting that p38 MAPK and PARP are downstream intracellular effectors of rt-PA/plasmin. Rt-PA also altered through plasmin the morphology and the confluence of bEnd.3 cells. By contrast, these changes did not implicate p38 MAPK and PARP.

This study demonstrates that rt-PA induces the production of microparticles by cerebral endothelial cells, through plasmin, p38 MAPK and PARP pathways. Determining the phenotype of these EMPs to clarify their role on the endothelium in ischemic conditions could thus be of particular interest.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The only pharmacological treatment for acute ischemic stroke is currently recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA), a thrombolytic administered to achieve clot lysis and thus to allow tissue reperfusion. Unfortunately, rt-PA efficacy in clinical practice remains very low because of a modest recanalization rate and the occurrence of arterial re-occlusion [1–3]. In addition, the use of rt-

PA is limited by the risk of post-ischemic intracerebral haemorrhage, also called haemorrhagic transformation, which represents the major complication of this thrombolytic therapy [4]. This well-known vascular toxicity of rt-PA was reported to be related to the direct proteolytic activity of rt-PA and/or to the activation of matrix metalloproteinases (MMP), among the most frequently proposed mechanisms [5,6]. The ubiquitous nuclear enzyme poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) is another recently identified downstream effector of rt-PA implicated in its vascular toxicity. Indeed, rt-PA was shown to increase post-ischemic PARP activity [7], and we demonstrated that a PARP inhibitor reduced rt-PA vascular toxicity after experimental cerebral ischemia [8,9].

Further investigation of the mechanisms of endothelial damage occurring after rt-PA treatment represents today a major challenge. In this context, we hypothesized that rt-PA could also mediate its vascular toxicity through an increase in the production of endothelial microparticles (EMPs).

Microparticles are membrane vesicles produced by cell activation or apoptosis. They are characterized by their size (0.1–1 µm) and by the expression of phosphatidylserine on their outer leaflet [10]. Circulating microparticles, emitted by different cells such as platelets, endothelial

Abbreviations: APC, allophycocyanin; BBB, blood brain barrier; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; EMPs, endothelial microparticles; FITC, fluorescein isothiocyanate; ICAM-1, intercellular cell adhesion molecule; LDH, lactate dehydrogenase; LRP, lipoprotein receptor-related protein; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MMP, matrix metalloproteinases; PARP, poly(ADP-ribose)polymerase; PI, propidium iodide; PJ34, N-(6-oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-(N,N-dimethylamino)acetamide hydrochloride; ROCK, Rho-associated protein kinase; rt-PA, recombinant tissue plasminogen activator; TXA, tranexamic acid; VEGF, vascular endothelial growth factor.

* Corresponding author at: EA 4475 "Pharmacologie de la Circulation Cérébrale", Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie de Paris, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France.

E-mail address: virginie.berthet@parisdescartes.fr (V. Beray-Berthet).

¹ These authors contributed equally to this work.

cells, leukocytes and red blood cells are both biomarkers of cell injury and an important emerging class of cell-cell messengers involved in various pathologies, especially in cardiovascular diseases [10–12]. Experimental and clinical data demonstrated that microparticles contribute to inflammation, thrombosis, vascular tone and angiogenesis [13–15].

Although endothelial microparticles represent a small fraction of the overall pool of plasma microparticles, an increase in circulating EMP levels constitute an emerging marker of endothelial dysfunction. With regard to stroke, clinical studies have shown an increase in circulating microparticles, more particularly particles derived from endothelial cells and platelets [16–18]. Moreover, a correlation has been reported between circulating EMPs of particular phenotypic profiles and the severity of the outcome after acute ischemic stroke [19–21].

The aim of the present study was thus to investigate whether rt-PA could enhance the production of EMPs using bEnd.3 cells, a mouse brain-derived endothelial cell line. The involvement of plasminogen/plasmin in such effects of rt-PA was examined. The contribution of the main signalling pathways involved in membrane vesiculation and EMP release (i.e. caspases, Rho-associated protein kinase (ROCK) and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)) [22–24], and the potential role of PARP were also studied.

2. Materials and methods

2.1. Materials

rt-PA (Actilyse®) was purchased from Boehringer-Ingelheim France (Paris, France), aprotinin (Trasylol®) from Bayer (Lyon, France), the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK (FMK001) from R&D systems (Lille, France), Alexa Fluor® 555 Phalloidin (A34055) from Invitrogen (Fisher Scientific, Illkirch, France), and propidium iodide (P16063) from Invitrogen. Annexin-V coupled with fluorescein isothiocyanate (AnnV-FITC; IM3614) was obtained from Beckman Coulter (Villepinte, France), and Annexin-V conjugated to allophycocyanin (AnnV-APC; 550474) from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). PJ34 (P4365), tranexamic acid (857653), the ROCK inhibitor Y27632 (Y0503), the p38 MAPK pathway inhibitor SB203580 (S8307), the *in vitro* toxicology assay kit MTT based (TOX-1) and biochemical reagents unless specified were obtained from Sigma (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

2.2. Cell culture and evaluation of morphological changes

Transformed mouse brain endothelial cells bEnd.3 (ATCC® CRL-2299™, Manassas, Virginia, USA) purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% fetal calf serum, 1 mM sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin in a humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C. Cell line passages of <30 were used for all experiments.

bEnd.3 cells were cultured in 96 well plates (4 × 10⁴ cells/well) to assess cell viability, and in 24 well plates (2 × 10⁵ cells/well) for the evaluation of EMP release and morphological changes.

Cell morphology was observed with an inverted-microscope (VWR, Fontenay sous Bois, France), and images were taken (Moticam camera 580 5.0 MP, Motic, Barcelona, Spain). For fluorescent cytochemistry, cells were cultured on glass coverslips coated with poly-D-lysine in 24 well plates; 24 h after treatments, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS 0.01 M, pH 7.4) and fixed for 12 min using 4% paraformaldehyde in PBS. Cells were permeabilized for 10 min with 0.5% Triton X-100 in PBS, incubated for 15 min with Alexa Fluor® 555 Phalloidin (1/50) for actin staining, and for 5 min with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 0.2 µg/ml) for nuclei staining. Coverslips were mounted with Mowiol® on glass slides and imaged using an

epifluorescence microscope (Olympus BX41 Fluorescence Microscope Hamburg, Germany).

2.3. EMP isolation and detection by flow cytometry

EMPs were isolated and identified as elements with a size <1 µm and >0.1 µm that were positively labelled by AnnV in a calcium-dependent manner, according to Vion et al. [25]. All buffers used were filtered through 0.1 µm filters. Media were collected (1.5 ml) and cell debris was eliminated by centrifugation (600 g; 15 min; 4 °C). The resulting supernatant was then ultracentrifuged (20 500 g; 90 min; 4 °C) to pellet EMPs, which were resuspended in 150 µl of PBS and stored at –80 °C until analysis.

Samples were analysed using a highly sensitive flow cytometer (Gallios, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) calibrated with fluorescent beads (0.3, 0.5 and 0.9 µm in diameter; Megamix-Plus FSC 7802, Biotex, Marseille, France) in order to detect events <1 µm diameter (Suppl. Fig. 1). Twenty microliters of EMP resuspended pellet were incubated with 100 µl of AnnV-FITC in AnnV binding buffer (0.04 µg/ml AnnV-FITC, 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.4) 30 min at 4 °C in the dark. As calcium is required for AnnV binding, control experiments were performed in calcium free buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1.6 mM EDTA, pH 7.4). Flow-count fluorospheres (Spherotech, Illinois, USA) were used to establish EMP concentration in the sample. Events were identified on forward scatter and fluorescence dot representation. Data were analysed using Flow-Jo software (version 10.0.7; TreeStar, Ashland, OR, USA). The experiments were carried out in several series. EMP levels are expressed as a percentage relative to control cells of each series of experiments.

Annexin V negative EMPs together with the background noise of the flow cytometer represented <10% of the total number of events.

Levels of apoptotic bodies were estimated as AnnV + propidium iodide (PI) + events. For this purpose, samples were incubated with AnnV-APC for 30 min in the dark at room temperature and PI was added right before the measurement (1 µg/ml). <2% of the events were AnnV + PI + (data not shown) and were therefore negligible.

2.4. Determination of cell viability

The MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay, which measures the cell viability by the determination of the mitochondrial activity in living cells, was performed with MTT based TOX-1 kit according to the manufacturer's instructions on cells in 96 well plates. Briefly, 15 h or 24 h after treatment, 10 µl of MTT was added to each well. After a 3 hour-incubation at 37 °C, 100 µl of solubilisation solution was added to each well. The reduction of MTT to formazan by mitochondrial dehydrogenases within viable cells was measured using a microplate reader (SPECTRO star^{Nano}, BMG LABTECH, Champigny sur Marne, France) at a wavelength of 570 nm and a correction of interference at 690 nm. The experiments were carried out in several series. Viability is expressed as a percentage relative to control cells of each series of experiments.

2.5. Cell treatment

After 24 h of culture, confluent cells were incubated for 15 h or 24 h with a serum free medium (control cells) or with the treatments below diluted in the same serum free medium.

In a first study, cells were treated with a range of rt-PA concentrations (20, 40 and 80 µg/ml). The concentration of 40 µg/ml corresponds to the blood concentration of rt-PA reached after a 30-minute intravenous injection of rt-PA at 10 mg/kg in rats, which is the protocol used for experimental thrombolysis [26]. This concentration was framed by two other doses, the lowest of 20 µg/ml being the concentration of rt-PA most often encountered in studies using bEnd.3 cells [27–29]. After

a 15-hour or 24-hour incubation with rt-PA, EMP levels, cell morphology and cell viability were evaluated.

In order to examine the implication of plasmin in rt-PA-induced EMP production, tranexamic acid (10 mM [30]) and aprotinin (2 μ M [30]) were added to rt-PA treatment (40 μ g/ml) for 24 h. The role of caspases, ROCK and p38 MAPK in rt-PA-induced EMP release was studied using Z-VAD-FMK (2.10⁻⁵ M), Y27632 (10⁻⁶ M) and SB203580 (10⁻⁵ M) respectively; inhibitors were added 1 h prior to rt-PA treatment and in combination with rt-PA (40 μ g/ml) for 24 h. Concentrations were chosen according to Vion et al. [25]. Stock solutions of SB203580 and Z-VAD-FMK were obtained in pure DMSO and then further diluted in medium. It has been reported that DMSO 0.1%, corresponding to the concentration present in medium + inhibitor solution, did not affect basal release of EMPs on human umbilical vein endothelial cells [25]. PJ34 (N-(6-Oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-(N,N-dimethyl amino)acetamide hydrochloride), a potent PARP inhibitor, was tested to evaluate the role of PARP-1 in rt-PA-induced EMP production. First, the effect of a range of PJ34 concentrations (10, 25, 50 or 100 μ M) was studied after a 24-hour incubation. Then, PJ34 at 10 or 100 μ M was added 1 h prior to rt-PA (40 μ g/ml) treatment and in combination with rt-PA (40 μ g/ml) for 24 h.

2.6. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SD. Statistical analyses were performed with one-way ANOVA followed by Dunnett's test for comparisons between control and treatment conditions, or by Bonferroni corrected test for multiple comparisons. All statistical tests were conducted using Statview 5.0 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). P-values < 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Effects of rt-PA on bEnd.3 cells: implication of plasmin

3.1.1. Time and concentration dependent effects of rt-PA on EMP release, cell morphology and viability

3.1.1.1. EMP release. Fig. 1A shows representative forward scatter and fluorescence dots of samples from supernatants of bEnd.3 cells (e.g. control and rt-PA 40 μ g/ml, 24 hour-incubation). In Ca²⁺-free conditions, the number of AnnV + EMPs is quasi null (0.229% and 0.249% of total events for control and rt-PA conditions, respectively) whereas in the presence of Ca²⁺ (5 mM), AnnV + EMPs represents >92% of total events (92.8% and 93.5% respectively). Quantification of AnnV + EMPs from bEnd.3 cells incubated with a dose-range of rt-PA for 15 or 24 h are presented on Fig. 1B. After a 15-hour incubation, EMP levels in the supernatant of bEnd.3 cells treated with rt-PA at 20 μ g/ml were not different from those of control cells. However, at 40 μ g/ml and 80 μ g/ml, rt-PA significantly increased EMP release compared to controls by 55% (P < 0.01) and 47% (P < 0.05), respectively. After 24 h of incubation, the lowest concentration of rt-PA still did not affect EMP production. At 40 μ g/ml, rt-PA significantly enhanced EMP formation by 78% (P < 0.05 versus control cells). EMP production by bEnd.3 cells exposed to 80 μ g/ml rt-PA was in the same range, but did not differ from control cells due to a higher variability in this treatment condition.

3.1.1.2. Cell morphology and viability. As observed in optical microscopy, in basal culture conditions, the control bEnd.3 cells were oval, uniform, confluent and evenly spread in the wells (Fig. 2A). In the presence of rt-PA, the morphology of endothelial cells radically changed and

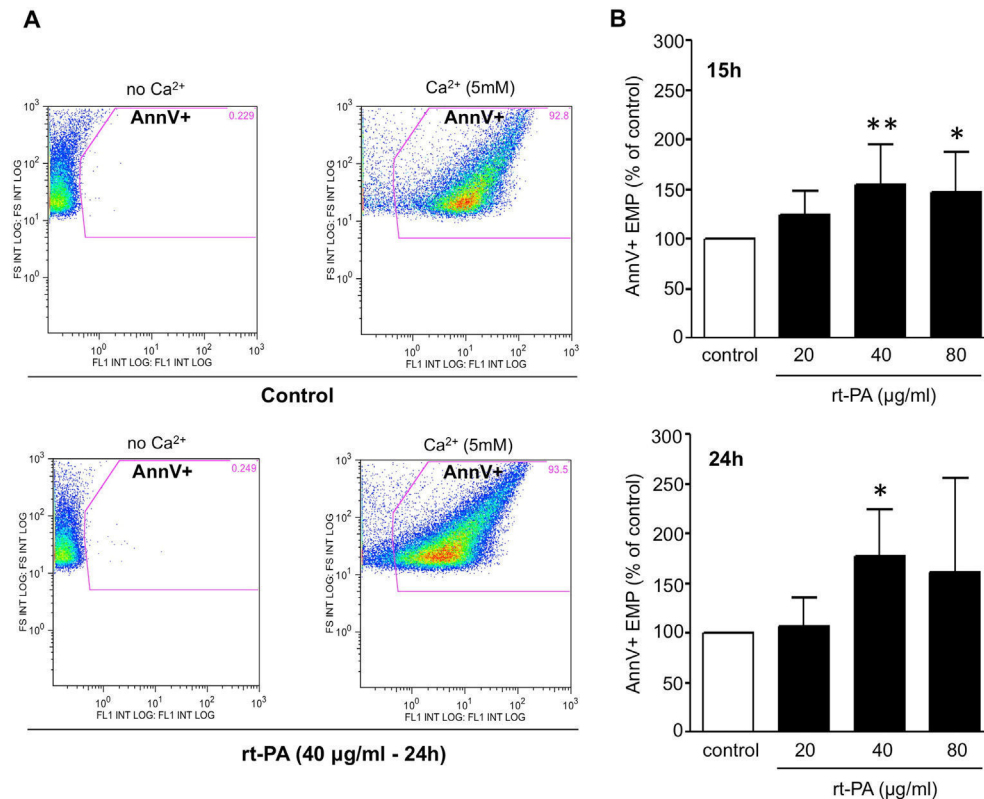


Fig. 1. Effects of rt-PA on EMP production by cerebral endothelial cells (bEnd.3). bEnd.3 cells were treated with vehicle or a range of rt-PA concentrations (20, 40 or 80 μ g/ml). EMPs were isolated from the supernatant and detected by flow cytometry at 15 h and 24 h. Non-specific AnnV + labelling was detected using EDTA (i.e. no Ca²⁺) and specific AnnV + labelling in the presence of calcium (5 mM). Representative forward scatter (FS log) and fluorescence (FL1 log) dot plots of control and rt-PA (40 μ g/ml, 24 h) treated cells (A). Quantification of AnnV + EMP levels in control and rt-PA treated cells after 15 h and 24 h of incubation (B). EMP levels in control cells at 15 and 24 h were 7048 \pm 1892 EMPs/ μ l and 12,005 \pm 3045 EMPs/ μ l, respectively. Data are presented as mean \pm SD n = 7; *P < 0.05, **P < 0.01 versus control cells.

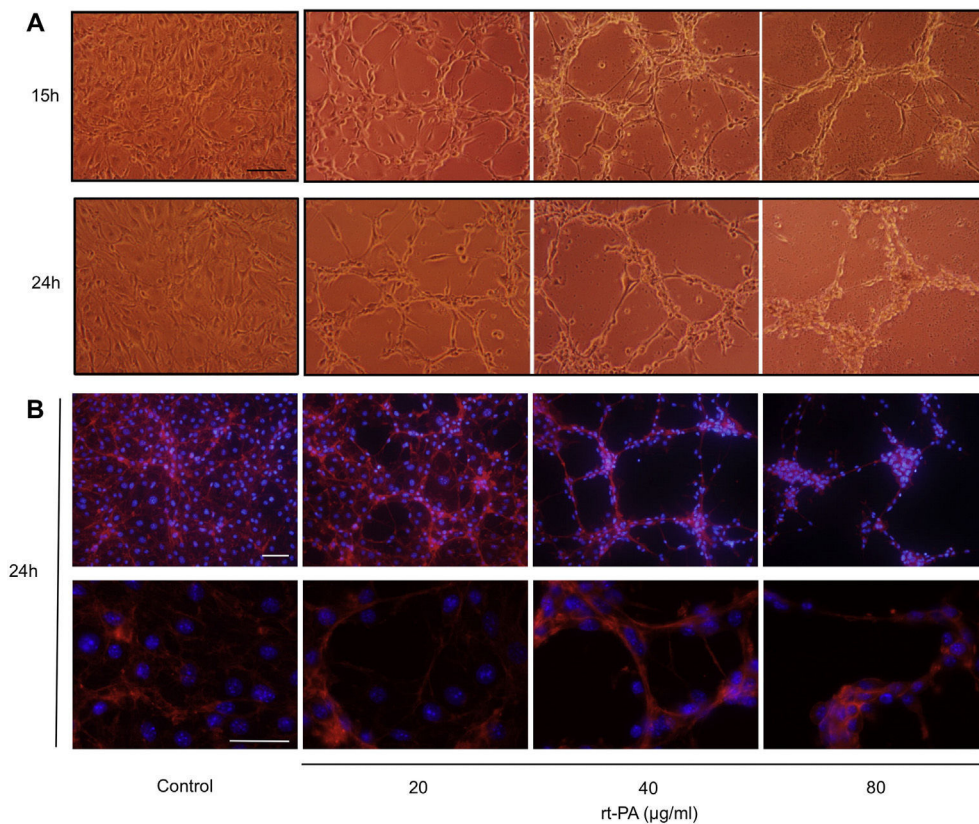


Fig. 2. Effects of rt-PA on endothelial cell morphology. bEnd.3 cells were incubated with vehicle or a range of rt-PA concentrations (20, 40 or 80 µg/ml). Cell morphology was observed in optical microscopy 15 h and 24 h after treatments (A, scale bar = 100 µm). bEnd.3 cells were fixed and stained for actin (with phalloidin in red) and nuclei (with DAPI in blue) 24 h after treatments (B, scale bar = 50 µm). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

pleomorphism was observed: bEnd.3 cells became elongated, thin and formed extensions. Rt-PA treated cells were aggregated and a loss of confluence was observed compared to control cells organised in a uniform monolayer. These effects were more pronounced for both higher concentrations of rt-PA and with the longest incubation time (Fig. 2A). These marked modifications were ascertained on fixed cells with fluorescent phalloidin staining for actin and DAPI for nuclei (Fig. 2B). At 24 h, the highest concentration of rt-PA (80 µg/ml) drastically increased pleomorphism; cells were greatly aggregated and some of them were even no longer fixed to the well.

The cell viability after 15 h of incubation was increased by the lowest concentrations of rt-PA (Fig. 3A): +28% at 20 µg/ml ($P < 0.01$ versus control cells) and +41% at 40 µg/ml ($P < 0.01$ versus control cells). At 80 µg/ml, rt-PA did not alter cell viability.

After a 24-hour incubation, the cell viability was not modified with the concentrations of 20 and 40 µg/ml. However, rt-PA at 80 µg/ml significantly reduced the viability of bEnd.3 cells in comparison to controls (−32%, $P < 0.01$; Fig. 3B).

Because the 24 hour-incubation with rt-PA at 40 µg/ml induced maximal EMP release without affecting the viability of bEnd.3 cells, these conditions were selected to study the implication of plasminogen/plasmin and the intracellular pathways involved in rt-PA effects.

3.1.2. Implication of plasminogen/plasmin in rt-PA effects

3.1.2.1. Effects of tranexamic acid and aprotinin on EMP generation. The effects on EMP production at 24 h of tranexamic acid and of aprotinin, a lysine analogue that blocks the formation of plasmin and a plasmin inhibitor respectively, are presented on Fig. 4A and B. Both inhibitors were devoid of effect on EMP release when given alone. In both

experiments, rt-PA induced a significant increase in EMP levels compared to control cells (+69%, $P < 0.001$ in tranexamic acid experiment, +55%, $P < 0.001$ in aprotinin experiment). Tranexamic acid significantly reduced by 86% the EMP production induced by rt-PA ($P < 0.01$). Rt-PA-induced EMP release was also significantly decreased by aprotinin (−62%, $P < 0.001$).

3.1.2.2. Effects of tranexamic acid and aprotinin on cell morphology and viability. Tranexamic acid or aprotinin alone had no effect on cell morphology (Fig. 5A). Tranexamic acid fully prevented the effect of rt-PA on cell morphology. Aprotinin also partly reduced the drastic morphological changes induced by rt-PA.

Tranexamic acid did not exert any effect per se on cell viability and a slight decrease was observed with aprotinin (14%, $P < 0.05$, Fig. 5B). In both experiments, a statistically significant decrease in cell viability was observed after rt-PA treatment ($P < 0.001$ versus control). This effect was blocked by both inhibitors ($P < 0.01$ for tranexamic acid, and $P < 0.001$ for aprotinin, versus rt-PA alone).

3.2. Intracellular pathways involved in the effects of rt-PA/plasmin on bEnd.3 cells

3.2.1. Implication of “classical” intracellular vesiculation pathways

Fig. 6A shows the effects of Z-VAD-FMK (pan-caspase inhibitor), Y27632 (ROCK inhibitor) and SB203580 (p38 MAPK inhibitor) on EMP generation. After a 24-hour incubation, none of the three inhibitors modified the basal production of EMPs compared to control cells. For each of these three experiments, rt-PA induced a significant increase in EMP levels compared to control cells (+67%, $P < 0.001$; +53%, $P < 0.05$; +43%, $P < 0.01$ respectively). Z-VAD-FMK and Y27632 did

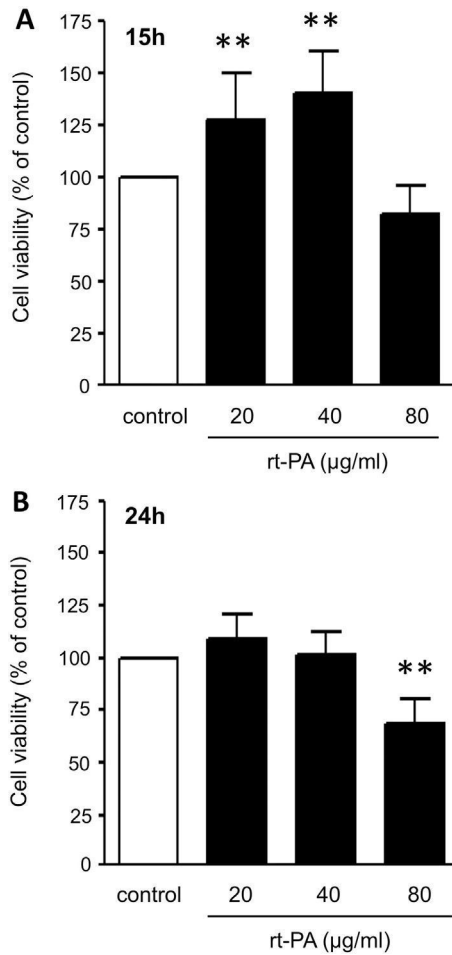


Fig. 3. Effect of rt-PA on endothelial cell viability. bEnd.3 cells were incubated with vehicle or a range of rt-PA concentrations (20, 40 or 80 μg/ml). Viability of bEnd.3 cells was measured at 15 h (A) and 24 h (B) using the MTT assay. Data are presented as mean ± SD; n = 8; **P < 0.01 versus control cells.

not reduce the EMP production induced by rt-PA. Treatment with SB203580 significantly decreased the EMP release induced by rt-PA from $143 \pm 21\%$ to $115 \pm 26\%$ of basal values ($P < 0.05$).

Z-VAD-FMK and Y27632 had no effect on cell morphology and cell viability, either alone or in association with rt-PA (data not shown). SB203580 did not alter cell morphology compared to control cells (Fig. 6B). However, the SB203580 + rt-PA association drastically enhanced the pleomorphism and the aggregation of bEnd.3 cells. Some cells were no longer fixed to the well. Nevertheless, SB203580 had no effect on cell viability, alone or in combination with rt-PA (Fig. 6C).

3.2.2. Implication of PARP

A preliminary study showed that the potent PARP inhibitor PJ34 had no effect per se on EMP production, cell morphology and cell viability (Suppl. Fig. 3). Subsequent experiments were thus conducted with the lowest (10 μM) and the highest (100 μM) concentrations of PJ34 used in this preliminary study.

The effect of PJ34 on rt-PA-induced EMP release is presented on Fig. 7A. PJ34 at 10 or 100 μM had no effect on basal EMP levels. Rt-PA induced a 67% increase in EMPs compared to controls ($P = 0.001$). This increase was not significantly modified by PJ34 at 10 μM. By contrast, the highest concentration of PJ34 (100 μM) significantly reduced EMP release induced by rt-PA from $167 \pm 50\%$ to $123 \pm 29\%$ ($P < 0.05$).

As noticed before, incubation of bEnd.3 cells with rt-PA induced pleomorphism and extensions between cells (Fig. 7B). PJ34 alone at 10 or 100 μM had no effect on cell morphology. Association of PJ34 at

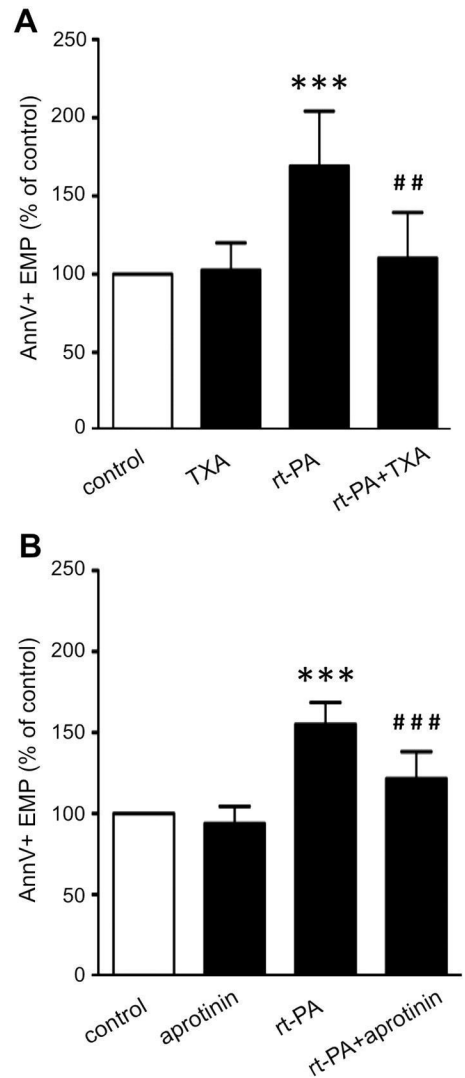


Fig. 4. Implication of plasminogen/plasmin in rt-PA-induced EMP production. bEnd.3 cells were incubated with tranexamic acid (TXA, a lysine analogue that blocks the formation of plasmin, 10 mM, A), and aprotinin (a plasmin inhibitor, 2 μM, B), which were added concurrently with rt-PA (40 μg/ml) or vehicle. EMP levels were assessed by flow cytometry 24 h after treatments. EMP levels in control cells in experiments A and B were $19,968 \pm 3703$ EMPs/μl and $36,168 \pm 10,793$ EMPs/μl, respectively. Data are presented as mean ± SD. n = 6; ***P < 0.001 versus control cells; ###P < 0.01 versus rt-PA treated cells.

10 μM to rt-PA did not alter rt-PA-induced morphological changes. However, at 100 μM, PJ34 slightly modified the morphology of rt-PA-treated cells: cells were more round and curved than cells incubated with rt-PA alone, with fewer extensions.

As already observed in previous experiments, neither PJ34 at 10 μM, PJ34 at 100 μM nor rt-PA at 40 μg/ml modified the viability (Fig. 7C). Furthermore, the association of rt-PA to PJ34 (10 or 100 μM) had no effect on the viability of bEnd.3 cells.

4. Discussion

The present study demonstrates for the first time that rt-PA, via plasmin, is a potent activator of microparticle production by bEnd.3 cells. We also reported that p38 MAPK and PARP were identified as signalling pathways involved in rt-PA-induced EMP generation.

bEnd.3 cells are immortalized mouse brain-derived endothelial cells and a widely used model of cerebrovascular endothelium [31]. Interestingly, it has been recently demonstrated that bEnd.3 cells respond to rt-PA as they exhibit induction of matrix metalloproteinases (MMP)

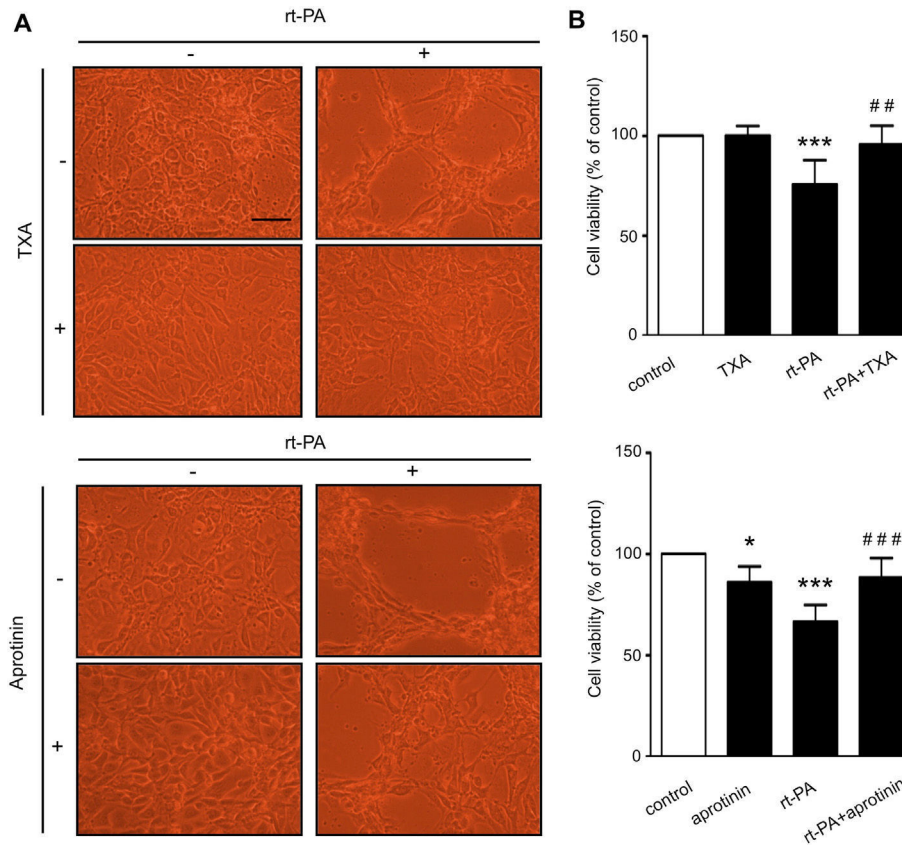


Fig. 5. Effect of rt-PA combined with plasminogen/plasmin inhibitors on endothelial cell morphology and viability. bEnd.3 cells were incubated with tranexamic acid (TXA, 10 mM), and aprotinin (2 µM), which were added concurrently with rt-PA (40 µg/ml) or vehicle. Cell morphology was observed in optical microscopy 24 h after treatments (A, scale bar = 100 µm). Viability of bEnd.3 cells was measured at 24 h using the MTT assay (B). Data are presented as mean \pm SD; n = 6; *P < 0.05, ***P < 0.001 versus control cells; ##P < 0.01, ###P < 0.001 versus rt-PA treated cells.

through activation of lipoprotein receptor-related protein (LRP) [27], secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) [29], increase in intercellular cell adhesion molecule (ICAM-1) expression and T cell adhesion [28] after rt-PA treatment.

On the basis of these studies, we first studied the effect of a range of rt-PA concentrations on EMP production by bEnd.3 cells. A preliminary study with a 6-hour exposure did not reveal any significant effect of rt-PA on microparticle release by bEnd.3 cells, whatever the dose used (20, 40 or 80 µg/ml, Suppl. Fig. 2), which led us to investigate longer exposure times. After 15 h, rt-PA at the highest doses (i.e. 40 and 80 µg/ml) significantly increased the release of EMPs by bEnd.3 cells. With 24 h of exposure, rt-PA still enhanced EMP production at 40 µg/ml whereas the dose of 80 µg/ml had no significant effect, which was most likely due to the high variability observed within this group. To explain this high variability, it might be speculated that, rt-PA at this high concentration resulted in some necrotic cells that do not vesiculate, as demonstrated for human corneal endothelial cells in culture [32].

The ability of rt-PA to enhance EMP production had never been previously observed. This increase in EMP release 24 h after rt-PA treatment (40 µg/ml) was consistently observed in each of the 7 independent experiments performed on bEnd.3 cells (from 43% to 78% compared to control cells).

In subsequent experiments bEnd.3 cells were treated with tranexamic acid, an inhibitor of plasmin formation, and aprotinin, a plasmin inhibitor, demonstrating that rt-PA-induced increase in EMPs was to a very large extent plasmin dependent. Interestingly, Dœuvre et al. reported that plasmin induced EMP release from adherent cells and most particularly from human microvascular endothelial cells [33]. It is noteworthy that in the present study, Actilyse®, the pharmaceutical form of rt-PA administered to patients suffering from ischemic

stroke, was used. It is unlikely that excipients contributed to EMP release as it is blocked by tranexamic acid.

To date, the exact signalling pathways involved in membrane vesiculation and EMP release remain poorly understood. Nevertheless, *in vitro* studies identified caspases, ROCK and p38 MAPK as key contributors to EMP release [25,34–36]. In the present study we thus examined the role of these three pathways in rt-PA-induced EMP production. Our results show that rt-PA-induced EMP release by bEnd.3 cells is affected neither by the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK nor by the ROCK inhibitor Y27632. In contrast, we demonstrated that p38 MAPK was involved in the production of EMPs induced by rt-PA. There are few reports regarding the existence of a link between rt-PA and p38. Armstead and collaborators (2010) reported that rt-PA administration in a model of cerebral ischemia induced by photothrombosis potentiates the activation of p38 MAPK, as higher levels of phosphorylated p38 were found in the cerebrospinal fluid of rt-PA-treated ischemic animals [37]. Pineda and collaborators (2012) likewise demonstrated in primary microglial cell cultures that rt-PA exposure results in the activation of the p38 signal transduction pathway [38]. Finally, Lin et al. have recently shown that tPA activates a signalling cascade involving p38 in both *in vitro* and *in vivo* models of macrophage-mediated inflammation [39]. It is noteworthy that p38 has also been reported as a downstream effector of plasmin in various cells [40,41] and notably in endothelial cells [42].

In the present study, we have also shown that the PARP inhibitor, PJ34, is able to reduce rt-PA-induced EMP release by bEnd.3 cells. In experimental cerebral ischemia, it has been demonstrated that rt-PA administration increases post ischemic PARP-1 activation within ischemic hemispheres [7]. Furthermore, recent studies from our laboratory have shown in mouse models of cerebral ischemia that PARP

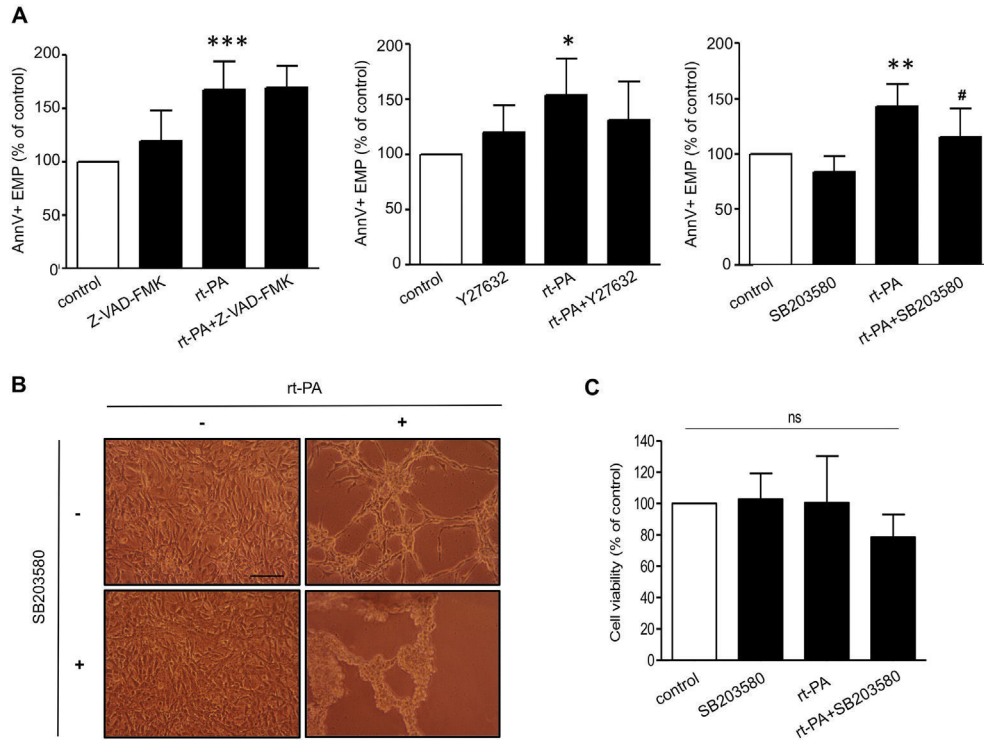


Fig. 6. Signalling pathways associated with rt-PA-induced EMP release, morphology and viability. bEnd.3 cells were incubated with Z-VAD-FMK (a pan-caspase inhibitor, 2.10^{-5} M), Y27632 (a ROCK inhibitor, 10^{-6} M), and SB203580 (a p38 MAPK inhibitor, 10^{-5} M) which were added 1 h prior to rt-PA (40 μ g/ml) or vehicle. EMP levels were assessed by flow cytometry 24 h after exposure (A). EMP levels in control cells were 4305 ± 601 EMPs/ μ l, 4445 ± 337 EMPs/ μ l and 4361 ± 507 EMPs/ μ l for these three experiments, respectively. Effect of SB203580 combined with rt-PA on cell morphology was examined with an inverted microscope (B, scale bar = 100 μ m), and cell viability was measured using the MTT test (C). Data are presented as mean \pm SD; n = 5–6; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control cells, #P < 0.05 versus rt-PA treated cells; ns: nonsignificant.

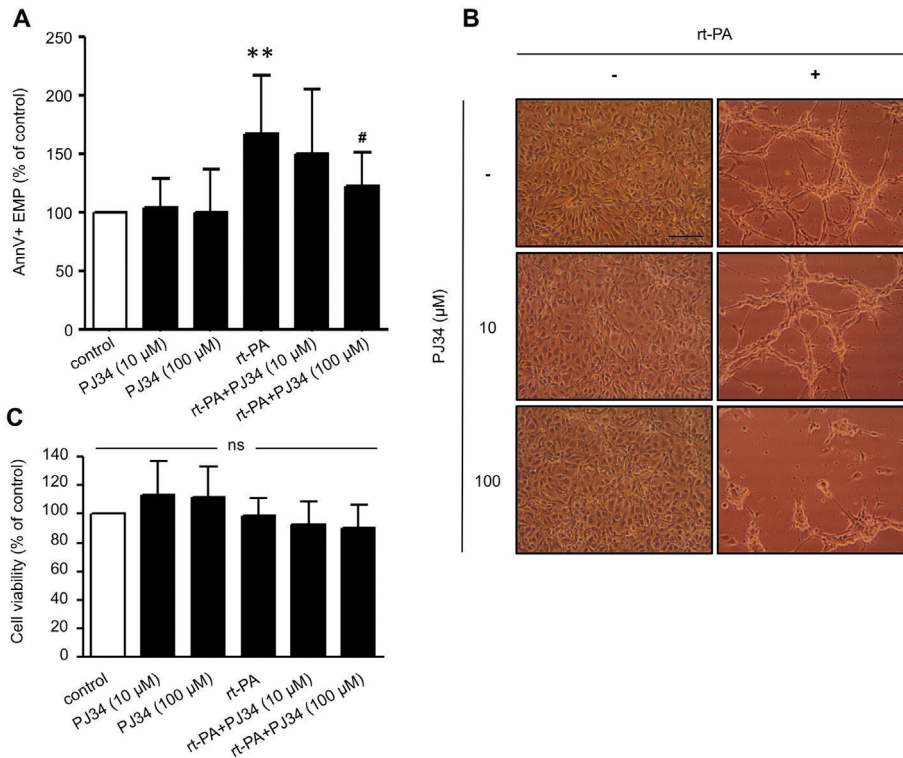


Fig. 7. Effects of associating rt-PA + PJ34 on EMP release, cell morphology and viability. PJ34 (PARP inhibitor, 10 or 100 μ M) was added 1 h prior to rt-PA (40 μ g/ml) or vehicle. After a 24-hour incubation, EMP levels were measured by flow cytometry (A). EMP levels in control cells were 5590 ± 1402 EMPs/ μ l. Cell morphology was observed with an inverted microscope (B, scale bar = 100 μ m), and cell viability was measured by the MTT test (C). Data are presented as mean \pm SD; n = 10; **P < 0.01 compared with control cells, #P < 0.05 compared with rt-PA treated cells; ns: nonsignificant.

inhibition by PJ34 prevents rt-PA-induced vascular damages as PJ34 protects endothelial junctions of the blood brain barrier (BBB) and reduces haemorrhagic transformations induced by rt-PA ([8,9] and unpublished results). Whether the BBB protection by PJ34 in these studies could be linked to a reduction in the release of EMPs induced by rt-PA remains to be established. A first step could be to isolate EMPs from rt-PA-treated bEnd.3 cells and examine their effect on distinct bEnd.3 cell cultures. bEnd.3 cells in culture indeed express appropriate tight junction proteins and present barrier properties [31,43,44].

The involvement of p38 MAPK and PARP pathways in EMP production triggered by rt-PA may be either linked or completely independent from each other. Some studies indeed demonstrated that PARP activation is able to regulate MAPK cascades, including p38 [45,46]. Finally, even if p38 MAPK and PARP pathways have been identified in rt-PA-induced EMP production, the involvement of other mechanisms cannot be excluded.

Besides increasing EMP release, plasmin generated by rt-PA exhibited also remarkable and deep effects on bEnd.3 cell morphology. Pleomorphism was observed at both 15 and 24 h. bEnd.3 cells not only became elongated and thin, but also, they were no longer organised in a uniform monolayer, thus rather aggregated and with extensions. To date, little information has been available regarding the *in vitro* effect of rt-PA on endothelial cell morphology. Human corneal endothelial cells exposed to increasing concentrations of rt-PA for 24 h displayed signs of cellular damages, including pleomorphism, prominent nuclei, shrunken cytosol and disruption of the intercellular junctional complexes [32]. With specific regard to brain endothelial cells, Niego et al. (2012) and Freeman et al. (2014) reported more recently that rt-PA applied on human brain endothelial cells induced marked morphological changes quite similar to those observed in our study [30,47]. Finally, regarding endothelial cell reorganisation, it is noteworthy that Teng et al. (2012) reported that tPA contributes to sonic hedgehog-induced cerebral angiogenesis and tube formation of primary mouse brain endothelial cells [48].

Our experiments clearly demonstrate that plasmin is a major actor in the morphological modifications and cell reorganisation induced by rt-PA. This corroborates the results from Niego et al. demonstrating that morphological changes induced by rt-PA in human brain endothelial cells are plasmin-dependent [30]. Moreover, plasmin exerts morphological changes in brain endothelial cells and notably a retraction phenomenon [49] (for a review see [50]). Whether rt-PA and plasmin induce morphological changes through subsequent MMP activation, as proposed in the literature [50,51], remains to be examined in our conditions. With regards to intracellular signalling pathways, p38 MAPK and PARP were not involved in morphological changes and cell reorganisation, while they contributed to EMP release. The ROCK inhibitor was also devoid of effect on endothelial cell morphology, in accordance with Niego et al. [30].

Decreased viability of bEnd.3 cells with rt-PA, 40 µg/ml for 24 h, was observed in 2 of the 7 experiments we performed. In these latest experiments, LDH activity in the supernatants of rt-PA-treated cells did not differ from that of control cells (data not shown), suggesting decreased metabolic activity (evaluated by the MTT assay) rather than mortality. Furthermore, profound morphological changes/reorganisation and EMP release did not appear to be associated with cell viability since they were observed both concomitantly with increased (e.g. rt-PA, 40 µg/ml for 15 h) but also decreased (rt-PA, 40 µg/ml for 24 h, tranexamic acid experiment) viability.

In conclusion, we clearly demonstrate that rt-PA stimulates microparticle production by brain-derived endothelial cells through plasmin, and we also identified p38 MAPK and PARP as pathways involved in this EMP release. Determining the phenotype of these endothelial microparticles could be of particular interest to clarify their role on the endothelium in pathological conditions such as stroke.

Conflict of interest statement

The authors have no relevant conflict of interest to declare.

Acknowledgements

We thank Dr. Sandra Manceau for cell culture technical assistance, Valérie Dias for her help with English language editing, and Bérard Coqueran for technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2016.09.026>.

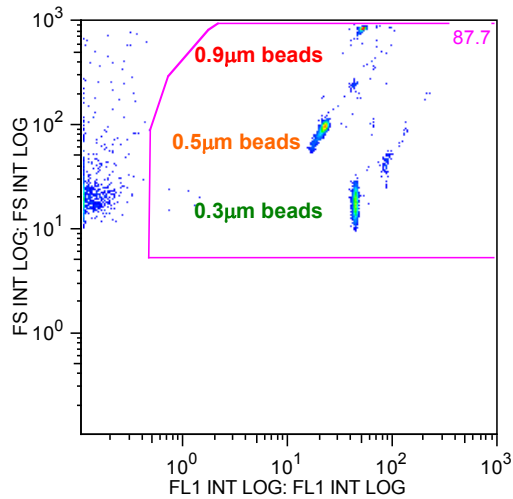
References

- [1] M. Ribo, J. Alvarez-Sabín, J. Montaner, F. Romero, P. Delgado, M. Rubiera, et al., Temporal profile of recanalization after intravenous tissue plasminogen activator: selecting patients for rescue reperfusion techniques, *Stroke* 37 (4) (April 2006) 1000–1004.
- [2] M. Rubiera, J. Alvarez-Sabín, M. Ribo, J. Montaner, E. Santamarina, J.F. Arenillas, et al., Predictors of early arterial reocclusion after tissue plasminogen activator-induced recanalization in acute ischemic stroke, *Stroke* 36 (7) (July 2005) 1452–1456.
- [3] M. Saqqur, C.A. Molina, A. Salam, M. Siddiqui, M. Ribo, K. Uchino, et al., Clinical deterioration after intravenous recombinant tissue plasminogen activator treatment: a multicenter transcranial Doppler study, *Stroke* 38 (1) (Jan 2007) 69–74.
- [4] W. Hacke, G. Donnan, C. Fieschi, M. Kaste, R. von Kummer, J.P. Broderick, et al., Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials, *Lancet* 363 (9411) (6 March 2004) 768–774.
- [5] R. Jin, G. Yang, G. Li, Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator, *Neurobiol. Dis.* 38 (3) (June 2010) 376–385.
- [6] D. Vivien, M. Gauberti, A. Montagne, G. Defer, E. Touzé, Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31 (11) (Nov. 2011) 2119–2134.
- [7] O. Crome, T.R. Doepfner, S. Schwarting, B. Müller, M. Bähr, J. Weise, Enhanced poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation contributes to recombinant tissue plasminogen activator-induced aggravation of ischemic brain injury *in vivo*, *J. Neurosci. Res.* 85 (8) (June 2007) 1734–1743.
- [8] M. Haddad, V. Beray-Berthot, B. Coqueran, M. Plotkine, C. Marchand-Leroux, I. Margail, Combined therapy with PJ34, a poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor, reduces tissue plasminogen activator-induced hemorrhagic transformations in cerebral ischemia in mice, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 27 (4) (August 2013) 393–401.
- [9] F. Teng, V. Beray-Berthot, B. Coqueran, C. Lesbats, M. Kuntz, B. Palmier, et al., Prevention of rt-PA induced blood-brain barrier component degradation by the poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor PJ34 after ischemic stroke in mice, *Exp. Neurol.* 248 (Oct. 2013) 416–428.
- [10] X. Loyer, A.-C. Vion, A. Tedgui, C.M. Boulanger, Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases, *Circ. Res.* 114 (2) (17 Jan 2014) 345–353.
- [11] S.F. Mause, C. Weber, Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange, *Circ. Res.* 107 (9) (29 Oct 2010) 1047–1057.
- [12] M.A. Roos, L. Gennero, T. Denysenko, S. Reguzzi, G. Cavallo, G.P. Pescarmona, et al., Microparticles in physiological and in pathological conditions, *Cell Biochem. Funct.* 28 (7) (Oct. 2010) 539–548.
- [13] F. Lovren, S. Verma, Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction, *Clin. Chem.* 59 (8) (2013) 1166–74.
- [14] O. Morel, F. Toti, N. Morel, J.-M. Freyssinet, Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious? *Haematologica* 94 (3) (March 2009) 313–317.
- [15] L. Doeuvre, L. Plawinski, F. Toti, E. Anglés-Cano, Cell-derived microparticles: a new challenge in neuroscience, *J. Neurochem.* 110 (2) (July 2009) 457–468.
- [16] E. Anglés-Cano, D. Vivien, STROKAVENIR, Cellular microparticles, potential useful biomarkers in the identification of cerebrovascular accidents, *Med. Sci. (Paris)* 25 (10) (Oct 2009) 843–846.
- [17] Y. Chen, Y. Xiao, Z. Lin, X. Xiao, C. He, J.C. Bihl, et al., The role of circulating platelets microparticles and platelet parameters in acute ischemic stroke patients, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 24 (10) (Oct 2015) 2313–2320.
- [18] M.-L. Liu, K.J. Williams, Microvesicles: potential markers and mediators of endothelial dysfunction, *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 19 (2) (April 2012) 121–127.
- [19] K.-H. Jung, K. Chu, S.-T. Lee, H.-K. Park, J.-J. Bahn, D.-H. Kim, et al., Circulating endothelial microparticles as a marker of cerebrovascular disease, *Ann. Neurol.* 66 (2) (August 2009) 191–199.
- [20] P. Li, C. Qin, Elevated circulating VE-cadherin + CD144 + endothelial microparticles in ischemic cerebrovascular disease, *Thromb. Res.* 135 (2) (Feb. 2015) 375–381.
- [21] J. Simak, M.P. Gelderman, H. Yu, V. Wright, A.E. Baird, Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome, *J. Thromb. Haemost.* 4 (6) (June 2006) 1296–1302.
- [22] A.M. Curtis, J. Edelberg, R. Jonas, W.T. Rogers, J.S. Moore, W. Syed, et al., Endothelial microparticles: sophisticated vesicles modulating vascular function, *Vasc. Med.* 18 (4) (August 2013) 204–214.
- [23] F. Dignat-George, C.M. Boulanger, The many faces of endothelial microparticles, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (1) (Jan 2011) 27–33.

- [24] A.S. Leroyer, F. Anfosso, R. Lacroix, F. Sabatier, S. Simoncini, S.M. Njock, et al., Endothelial-derived microparticles: biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis, *Thromb. Haemost.* 104 (3) (Sept 2010) 456–463.
- [25] A.-C. Vion, B. Ramkhalawon, X. Loyer, G. Chironi, C. Devue, G. Loirand, et al., Shear stress regulates endothelial microparticle release, *Circ. Res.* 112 (10) (10 May 2013) 1323–1333.
- [26] K.R. Godfrey, P. Tanswell, R.A. Bates, M.J. Chappell, F.N. Madden, Nonlinear pharmacokinetics of tissue-type plasminogen activator in three animal species: a comparison of mathematical models, *Biopharm. Drug Dispos.* 19 (2) (March 1998) 131–140.
- [27] Y. Suzuki, N. Nagai, K. Yamakawa, J. Kawakami, H.R. Lijnen, K. Umemura, Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein, *Blood* 114 (15) (8 Oct 2009) 3352–8.
- [28] J. Wang, X. Zhang, L. Mu, M. Zhang, Z. Gao, J. Zhang, et al., t-PA acts as a cytokine to regulate lymphocyte-endothelium adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Clin. Immunol.* 152 (1–2) (June 2014) 90–100.
- [29] S. Won, J.H. Lee, B. Wali, D.G. Stein, I. Sayeed, Progesterone attenuates hemorrhagic transformation after delayed tPA treatment in an experimental model of stroke in rats: involvement of the VEGF-MMP pathway, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34 (1) (Jan 2014) 72–80.
- [30] B. Niego, R. Freeman, T.B. Puschmann, A.M. Turnley, R.L. Medcalf, t-PA-specific modulation of a human blood-brain barrier model involves plasmin-mediated activation of the Rho kinase pathway in astrocytes, *Blood* 119 (20) (17 May 2012) 4752–4761.
- [31] R.C. Brown, A.P. Morris, R.G. O'Neil, Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells, *Brain Res.* 1130 (1) (26 Jan 2007) 17–30.
- [32] E. Yoeruek, M.S. Spitzer, O. Tatar, T. Biedermann, S. Grisanti, M. Lüke, et al., Toxic effects of recombinant tissue plasminogen activator on cultured human corneal endothelial cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49 (4) (April 2008) 1392–1397.
- [33] L. Doeuve, L. Plawinski, D. Goux, D. Vivien, E. Anglés-Cano, Plasmin on adherent cells: from microvesiculation to apoptosis, *Biochem. J.* 432 (2) (1 Dec 2010) 365–373.
- [34] M.L. Coleman, E.A. Sahai, M. Yeo, M. Bosch, A. Dewar, M.F. Olson, Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I, *Nat. Cell Biol.* 3 (4) (April 2001) 339–345.
- [35] A.M. Curtis, P.F. Wilkinson, M. Gui, T.L. Gales, E. Hu, J.M. Edelberg, p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles, *J. Thromb. Haemost.* 7 (4) (April 2009) 701–709.
- [36] C. Sapet, S. Simoncini, B. Liorod, D. Puthier, J. Sampol, C. Nguyen, et al., Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2, *Blood* 108 (6) (15 Sept 2006) 1868–1876.
- [37] W.M. Armstead, J. Riley, J.W. Kiessling, D.B. Cines, A.A.-R. Higazi, Novel plasminogen activator inhibitor-1-derived peptide protects against impairment of cerebrovasodilation after photothrombosis through inhibition of JNK MAPK, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299 (2) (August 2010) R480–R485.
- [38] D. Pineda, C. Ampurdanés, M.G. Medina, J. Serratosa, J.M. Tusell, J. Saura, et al., Tissue plasminogen activator induces microglial inflammation via a noncatalytic molecular mechanism involving activation of mitogen-activated protein kinases and Akt signaling pathways and AnnexinA2 and Galectin-1 receptors, *Glia* 60 (4) (April 2012) 526–540.
- [39] L. Lin, Y. Jin, K. Hu, Tissue-type plasminogen activator (tPA) promotes M1 macrophage survival through p90 ribosomal S6 kinase (RSK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, *J. Biol. Chem.* 290 (12) (20 March 2015) 7910–7.
- [40] S.K. Mandal, L.V.M. Rao, T.T.T. Tran, U.R. Pendurthi, A novel mechanism of plasmin-induced mitogenesis in fibroblasts, *J. Thromb. Haemost.* 3 (1) (Jan 2005) 163–169.
- [41] L. Burysek, T. Syrovets, T. Simmet, The serine protease plasmin triggers expression of MCP-1 and CD40 in human primary monocytes via activation of p38 MAPK and janus kinase (JAK)/STAT signaling pathways, *J. Biol. Chem.* 277 (36) (6 Sept 2002) 33509–17.
- [42] Q. Li, T. Syrovets, T. Simmet, J. Ding, J. Xu, W. Chen, et al., Plasmin induces intercellular adhesion molecule 1 expression in human endothelial cells via nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinases-dependent pathways, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 238 (2) (Feb 2013) 176–186.
- [43] L. Song, J.S. Pachter, Culture of murine brain microvascular endothelial cells that maintain expression and cytoskeletal association of tight junction-associated proteins, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 39 (7) (August 2003) 313–320.
- [44] T. Watanabe, S. Dohgu, F. Takata, T. Nishioku, A. Nakashima, K. Futagami, et al., Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4, *Biol. Pharm. Bull.* 36 (3) (2013) 492–495.
- [45] B. Racz, K. Hanto, A. Tapodi, I. Solti, N. Kalman, P. Jakus, et al., Regulation of MKP-1 expression and MAPK activation by PARP-1 in oxidative stress: a new mechanism for the cytoplasmic effect of PARP-1 activation, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (12) (15 Dec 2010) 1978–1988.
- [46] B. Veres, B. Radnai, F. Gallyas, G. Varbiro, Z. Berente, E. Osz, et al., Regulation of kinase cascades and transcription factors by a poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, 4-hydroxyquinazoline, in lipopolysaccharide-induced inflammation in mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310 (1) (July 2004) 247–255.
- [47] R. Freeman, B. Niego, D.R. Croucher, L.O. Pedersen, R.L. Medcalf, t-PA, but not desmoteplase, induces plasmin-dependent opening of a blood-brain barrier model under normoxic and ischaemic conditions, *Brain Res.* 1565 (27 May 2014) 63–73.
- [48] H. Teng, M. Chopp, A. Hozeska-Solgot, L. Shen, M. Lu, C. Tang, et al., Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 contribute to sonic hedgehog-induced *in vitro* cerebral angiogenesis, *PLoS One* 7 (3) (2012), e33444.
- [49] Z. Nagy, K. Kolev, E. Csonka, M. Pék, R. Machovich, Contraction of human brain endothelial cells induced by thrombogenic and fibrinolytic factors. An *in vitro* cell culture model, *Stroke* 26 (2) (Feb 1995) 265–270.
- [50] B. Niego, R.L. Medcalf, Plasmin-dependent modulation of the blood-brain barrier: a major consideration during tPA-induced thrombolysis? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34 (8) (August 2014) 1283–1296.
- [51] Y. Suzuki, N. Nagai, K. Umemura, A review of the mechanisms of blood-brain barrier permeability by tissue-type plasminogen activator treatment for cerebral ischemia, *Front. Cell. Neurosci.* 10 (2016) 2.

Supplementary material

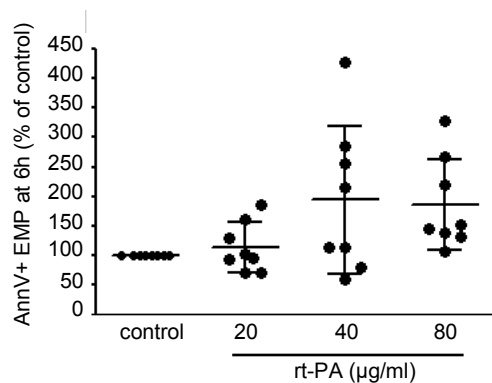
Supplementary Figure 1



Representative dot plot of fluorescent beads used for cytometer (Gallios, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) calibration.

Microparticle size gate was set using standard fluorescent beads (0.3, 0.5, 0.9 μm), identified here on forward scatter (FS log) and fluorescence (FL1 log) dot plot.

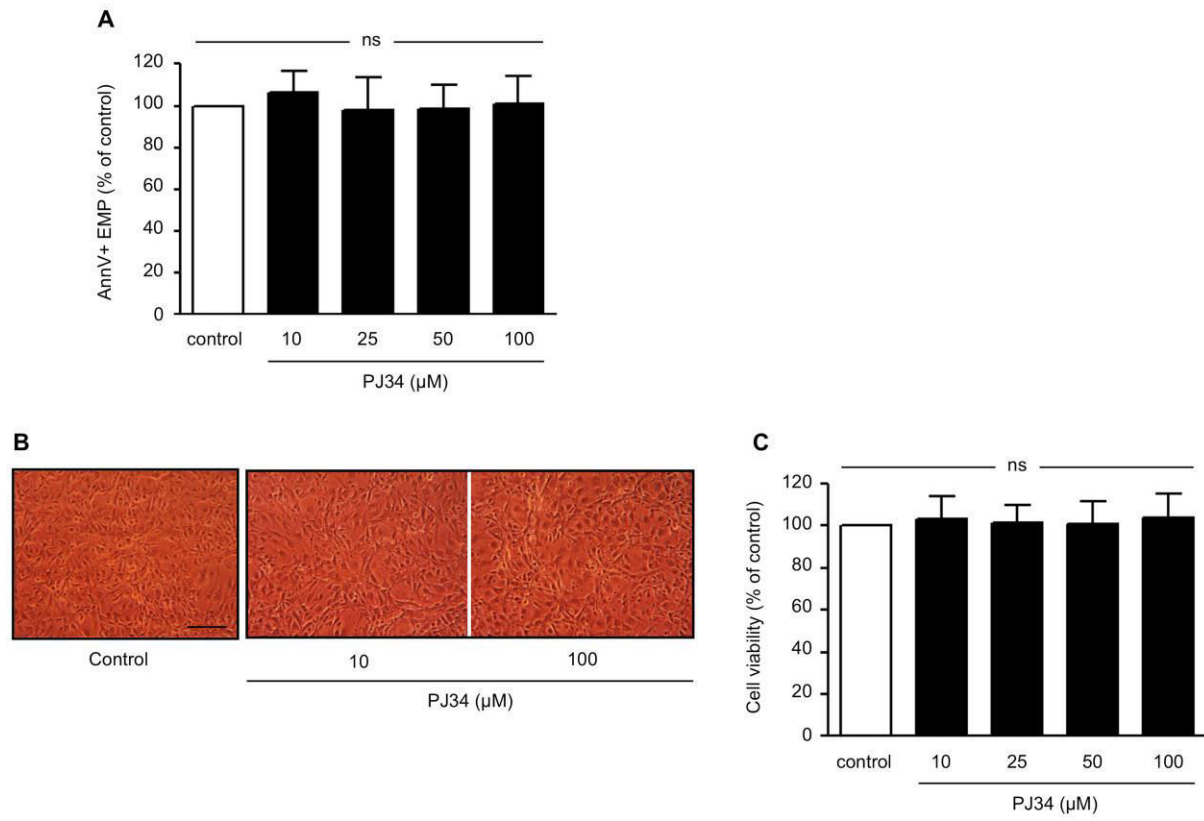
Supplementary Figure 2



Preliminary study with 6-hour exposure with rt-PA on bEnd.3 cells EMPs production

After 24 hours of culture, confluent bEnd.3 cells were incubated for 6 hours with a serum free medium (control cells) or with a range of rt-PA concentrations (20, 40 and 80 μg/ml) diluted in the same serum free medium, and EMP levels were evaluated in the supernatant. This preliminary experiment showed that a 6-hour exposure with rt-PA had no significant effect on EMPs production by bEnd.3 cells whatever the concentration (20, 40 or 80 μg/ml, $P > 0.05$).

Supplementary Figure 3



Effects of PJ34 per se on EMP production, cell morphology and viability.

bEnd.3 cells were treated with a range of concentrations of PJ34 (a potent PARP inhibitor; 10, 25, 50 or 100 μM). At 24 hours, EMP release was quantified by flow cytometry (A), cell morphology was observed with a phase-inverted microscope (B, representative photographs, scale bar = 100 μm), and cell viability was assessed using the MTT assay (C). EMP levels in control cells were 13340 ± 3654 EMPs/μl. Data are presented as mean \pm SD; n=6; ns: non significant.

3. Résumé des principaux résultats

- ❖ Le traitement prolongé des cellules bEnd.3 par le rt-PA entraîne *via* la plasmine une libération accrue de microvésicules endothéliales et des changements morphologiques profonds

Nous avons observé une tendance à l'augmentation de la libération des MVE lorsque les cellules bEnd.3 étaient exposées au rt-PA à un temps court (6 heures); cette augmentation devient significative pour les temps d'incubation plus longs de 15 heures et 24 heures. Afin de vérifier que les événements détectés dans ces expériences sont bien MVE et pas des corps apoptotiques, nous avons réalisé, en marge de l'article présenté, une détection spécifiques de ces éléments. Les résultats de cette étude sont présentés à la suite de cette discussion.

Nous avons ensuite montré que cette libération de MVE par le rt-PA est plasmine dépendante puisque l'acide tranexamique, un inhibiteur de sa formation, et l'aprotinine, un inhibiteur de son activité, s'y sont opposés.

Comme nous l'avons vu précédemment, la libération des MVE peut résulter d'une activation des cellules ou de leur apoptose. Dans notre étude, la concentration de rt-PA qui produit des MVE n'augmente pas la mortalité cellulaire évaluée par la LDH.

Si la capacité de la plasmine à induire une production de MV par les cellules endothéliales adhérentes (HMEC-1) a déjà été décrite dans une étude de Doeuvre (Doeuvre et al., 2010), nos travaux sont les premiers à montrer que le rt-PA entraîne (*via* la plasmine) une libération des MV par des cellules endothéliales d'origine cérébrale.

En ce qui concerne la morphologie des cellules, sous l'effet du rt-PA, et *via* la plasmine, les cellules bEnd.3 deviennent fusiformes, émettent des prolongements entre elles et se regroupent en amas. Ce résultat est en accord avec ceux de la littérature sur des cellules endothéliales cérébrales hBEC (Human Brain Endothelial Cells) (Niego et al., 2012 ; Freeman et al., 2014).

Les mécanismes qui sous-tendent cet effet du rt-PA sur la morphologie des cellules ne sont pas encore élucidés. Il est suggéré une implication des MMP qui peuvent être activées aussi bien par le rt-PA que par la plasmine (Lijnen, 2001 ; Suzuki et al., 2007, 2009). Par ailleurs, l'organisation du tapis cellulaire après traitement par le rt-PA peut s'apparenter à une formation de structures vasculaires, ce qui laisse supposer que le rt-PA puisse exercer un effet pro-angiogénique. Des études suggèrent

d'ailleurs que le rt-PA pourrait jouer un rôle dans le remodelage vasculaire et l'angiogenèse (Yip et al., 2013 ; Teng et al., 2012 ; Benarroch, 2007). Cet effet pro-angiogénique peut non seulement impliquer les MMP mais également le VEGF-A (vascular endothelial growth factor) auquel nous nous sommes d'ailleurs intéressée dans la dernière partie de mes travaux de thèse (voir pour revue Niego et al., 2012 ; Suzuki et al., 2016 ; Kanazawa et al., 2017).

Dans la problématique des AVCi, il est intéressant de noter que certains auteurs suggèrent que l'effet de la plasmine sur la morphologie des cellules endothéliales pourrait être à l'origine de l'ouverture de la BHE au cours de la thrombolyse (Nagy et al., 1995).

❖ Parmi les voies classiques de vésiculation, seule la p38 MAPK semble impliquée dans les effets du rt-PA

Un inhibiteur de **p38**, le SB203580, diminue significativement la libération des microvésicules induite par le rt-PA dans les cellules bEnd.3, montrant le rôle clé de cette MAPKinase dans nos conditions. La p38MAPkinase est largement exprimée dans le cerveau et voit son activité augmentée après ischémie cérébrale (voir pour revue Mehta et al., 2007). Armstead et collaborateurs ont montré que l'administration de rt-PA dans un modèle d'ischémie cérébrale par photothrombose chez le cochon augmente l'expression de la protéine p38 MAPK phosphorylée (forme active) détectée dans le LCR (Armstead et al., 2010). Des études réalisées *in vitro* sur des cultures de microglies ou de macrophages ont également montré que le rt-PA active la voie des P38 MAPK (Pineda et al 2012 ; Lin et al., 2015). Par ailleurs, des études montrent que la plasmine est également capable d'activer cette voie (Burysek et al., 2002 ; Mandal et al., 2005 ; Li et al., 2013).

❖ La PARP est impliquée dans la production des MVE induite par le rt-PA

Nous avons par la suite recherché si la **PARP** joue un rôle dans la libération des MVE induite par le rt-PA. En effet, il a été montré *in vivo*, dans un modèle d'ischémie cérébrale, que le rt-PA augmente l'activité de la PARP (Crome et al., 2007). De plus, au laboratoire, nous avons mis en évidence que la PARP participe à la toxicité vasculaire post-ischémique du rt-PA notamment aux transformations hémorragiques (Haddad et al., 2013 ; Teng et al., 2013, El Amki et al., (soumis)). Nos résultats montrent que le PJ34 (100 µM) diminue la libération de MVE induite par le rt-PA ; cette étude est la première à mettre en évidence un rôle de la PARP dans l'augmentation de la production de MVE induite par le rt-PA.

Ces deux voies pourraient être liées ou complètement indépendantes puisque des études montrent que la PARP est capable de réguler les MAPK, dont la voie des p38 (Veres et al., 2004 ; Racz et al., 2010). Par ailleurs, nos travaux n'excluent pas l'implication d'autres voies de signalisation.

4. Etude complémentaire : Recherche des corps apoptotiques dans le surnageant des cellules bEnd.3 traitées par le rt-PA

➤ Protocole expérimental

En utilisant le même protocole de dosage que précédemment, nous avons tout d'abord mesuré le taux de MVE libérées dans le milieu de culture après traitement des cellules par le rt-PA 40 µg/ml. Nous avons ensuite dosé dans ce même culot les corps apoptotiques dont le diamètre est inférieur à 1 µm (n=6 contrôle, n=6 rt-PA (40 µg/ml)). Le marquage d'une part des phosphatidylsérines par l'annexine V couplée à l'APC (Allophycocyanine) et d'autre part de l'ADN par l'iodure de propidium (IP) permet la détection de ces corps apoptotiques.

➤ Résultats

✚ Dosage des MVE

Le dosage des MVE montre, comme précédemment, une augmentation de leur libération par les cellules 24 heures après traitement par le rt-PA à la concentration de 40 µg/ml ($P < 0,01$) (figure 47).

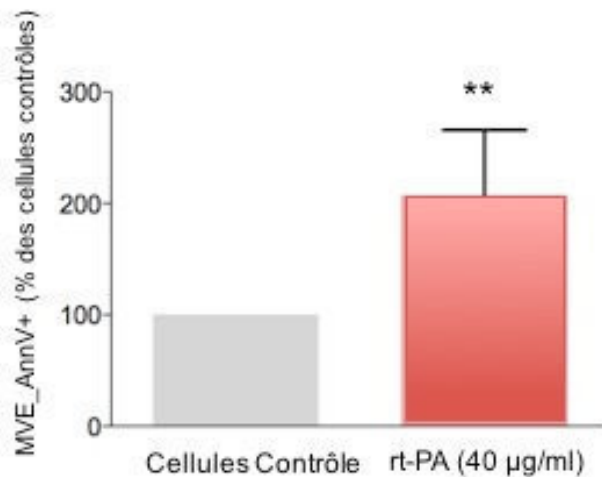


Figure 47 : Effet du rt-PA (40 µg/ml) sur la libération des MVE par les cellules bEnd.3 après 24 heures d'incubation

Les résultats (moyenne ± sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles. n= 6/condition. CT = cellules contrôles. ** : P<0,01 versus CT.

✚ Dosage des corps apoptotiques

Le dosage des corps apoptotiques par cytométrie a permis de générer les dots plots dont deux exemples représentatifs sont présentés sur la figure 48. Sur le logiciel d'analyse de données, une zone correspondant à tous les éléments de taille inférieure à 1 µm est tout d'abord définie. Ensuite, grâce à la fluorescence de l'annexineV_APC détectée par le laser FL6 et celle de l'iodure de propidium détectée par le laser FL2, une mesure du pourcentage d'éléments de taille inférieure à 1 µm marqués doublement à l'annexineV_APC et à l'IP est réalisée (figure 48).

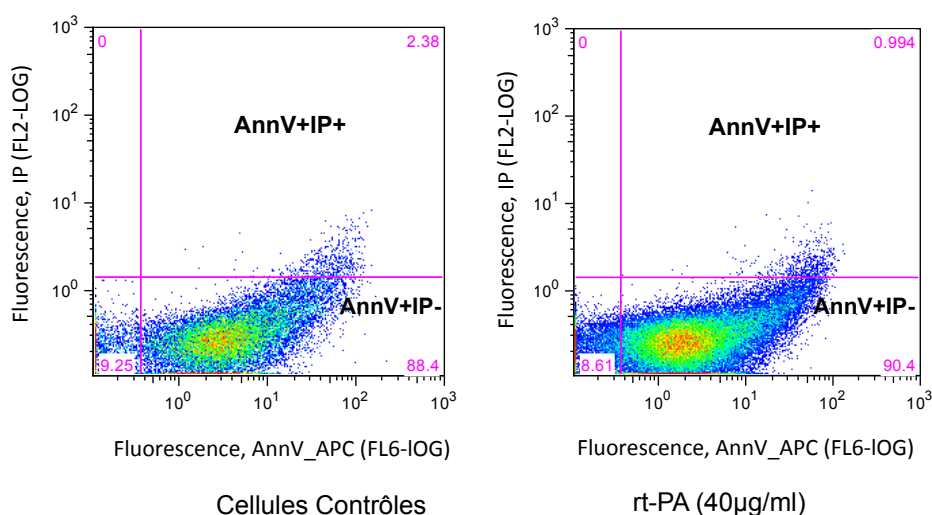


Figure 48 : Dots Plot représentatifs du marquage en cytométrie en flux des corps apoptotiques par l'Annexine-V (AnnV-APC) et l'iodure de propidium (IP)

Les résultats de la quantification représentés dans le tableau 8 montrent que le taux de corps apoptotiques libérés dans le surnageant des cellules traitées par le rt-PA et des cellules contrôles est négligeable (< 2%, n=6/ condition).

% Corps apoptotiques (AnnV+ IP+)	Contrôles	rt-PA (40µg/ml)
Moyenne ± sd	1,68 ± 0,46	0,86 ± 0,32

Tableau 8 : Pourcentage des corps apoptotiques marqués AnnV+ IP+ dans la fenêtre des évènements de taille microvésiculaire (< 1 µm)

➤ Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons montré que le rt-PA n'augmente pas le nombre de corps apoptotiques présents dans le surnageant des cellules bEnd.3 et que les éléments détectés dans ces surnageants sont bien des MVE.

III. Perspectives *in vitro*

Dans cette première partie de mes travaux de thèse, nous avons montré que le rt-PA entraîne une libération plasmine et PARP-dépendante de MVE par les cellules bEnd.3.

Il serait pertinent de confirmer ces effets sur des cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales. Il serait également intéressant de rechercher sur ces cultures primaires si les mêmes voies de signalisation sont impliquées dans la vésiculation, en utilisant notamment d'autres outils tels que, dans le cas de la PARP, des siRNA ou des cellules PARP^{-/-}.

Par ailleurs, l'étude du phénotype de ces MVE, en particulier par l'identification des marqueurs exprimés à leur surface, permettrait de rechercher leur rôle dans les effets délétères du rt-PA au niveau endothélial. Il serait notamment intéressant d'examiner si ces microvésicules exercent un rôle dans les changements morphologiques induits par le rt-PA. Pour répondre à cette question, les MVE

isolées des surnageants de cellules traitées par le rt-PA pourraient être incubées avec des cellules endothéliales saines (naïves) et la morphologie de ces cellules observée.

Toujours dans la perspective de déterminer le rôle de ces MVE dans la toxicité du rt-PA, il serait également intéressant d'évaluer leur effet sur un modèle de BHE *in vitro*. Pan et collaborateurs ont d'ailleurs mené une étude de ce type avec des MVE isolées de surnageants de cellules soumises à des conditions OGD qui miment *in vitro* les conditions d'ischémie cérébrale (Pan et al., 2016). Leur incubation avec un modèle de BHE *in vitro* a montré une diminution de l'expression des protéines de jonction ZO-1 (zonula-occludens) et claudine-5 ainsi qu'une augmentation de la perméabilité cellulaire.

DEUXIÈME PARTIE : Effet du rt-PA sur la protéine HMGB1

Dans la deuxième partie de ma thèse, je me suis intéressée à la protéine HMGB1, une DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) jouant le rôle de cytokine inflammatoire et particulièrement délétère au cours de l'ischémie. En effet, il a été montré que cette protéine est augmentée dans le plasma chez les patients après l'ischémie cérébrale (Goldstein et al., 2006 ; Liesz et al., 2015) et également dans le LCR après ischémie chez le rongeur (Kim *et al.*, 2006 ; Muhammad *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2011 ; Shin *et al.*, 2014 ; Gong *et al.*, 2014). De plus, l'injection de la protéine recombinante dans le cerveau ischémié chez le rongeur aggrave le volume de lésion, le déficit neurologique et l'activité inflammatoire (Faraco et al., 2007 ; Liu et al., 2007b ; Zhang et al., 2014a). Par ailleurs, l'inhibition de cette protéine à l'aide d'agents pharmacologiques, d'anticorps ou de siRNA est protectrice : elle réduit entre autres le volume de lésion, le déficit neurologique, l'inflammation post-ischémique et la perméabilité de la BHE (Kim et al., 2006 ; Liu et al., 2007b ; Zhang et al., 2011). Dans ce contexte, j'ai recherché si HMGB1 était impliquée dans la toxicité vasculaire du rt-PA, et plus particulièrement au niveau endothélial. Pour cela, j'ai étudié *in vitro* sur les cellules bEnd.3 l'effet du rt-PA sur la protéine HMGB1. J'ai également recherché l'implication de la PARP dans ces effets afin de mettre en évidence une cascade rt-PA/ PARP/ HMGB1. En parallèle à ces études *in vitro*, j'ai étudié la protéine HMGB1 dans nos modèles *in vivo* d'ischémie cérébrale après traitement par le rt-PA.

I. Etudes *in vitro*

1. Etude préliminaire : recherche d'un témoin positif de sécrétion de HMGB1 : effet du LPS

Nous avons tout d'abord recherché si les cellules bEnd.3 que nous utilisons étaient capables de sécréter HMGB1. Nous avons choisi de les stimuler par du lipopolysaccharide (LPS), classiquement utilisé pour induire une sécrétion de HMGB1 par différents types cellulaires (Jiang et al., 2007 ; Bae et Rezaie, 2011 ; Davis et al., 2012 ; Yang et al., 2014b ; Kim et al., 2015 ; Walko et al., 2015). En ce qui concerne le choix de la concentration et du temps de stimulation, nous nous sommes basés sur l'étude de Bae et collaborateurs, qui rapporte que le traitement de cellules endothéliales de type HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) par le LPS à la concentration de 100 ng/ml entraîne une sécrétion de HMGB1 dans le milieu extracellulaire (Bae et Rezaie, 2011).

a. Protocole expérimental

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées à une densité de 400 000 cellules/ml dans des plaques de 24 puits dans du milieu contenant du sérum de veau foetal (SVF). Vingt-quatre heures après, elles ont été traitées par le LPS à la concentration de 100 ng/ml pendant 24 heures dans du milieu dépourvu de SVF (figure 49). Les cellules contrôles ont fait l'objet d'un changement de milieu sans SVF afin d'être soumises aux mêmes conditions que les cellules traitées.

Les surnageants ont été récupérés, concentrés et analysés par Western Blot afin de rechercher une sécrétion de HMGB1. Les taux de HMGB1 sont exprimés en unités arbitraires (n=5/condition).



Figure 49 : Protocole de traitement des cellules bEnd.3 par le LPS

b. Résultats

Le Western Blot réalisé avec les surnageants concentrés montre une bande se situant aux environs de 25 kDa d'après le marqueur de masse moléculaire, ce qui correspond à la masse moléculaire de la protéine HMGB1 (figure 50A).

La quantification de cette bande montre que le LPS entraîne une augmentation de la sécrétion de HMGB1 par les cellules bEnd.3 par rapport aux cellules contrôles (P<0,05) (figure 50B).

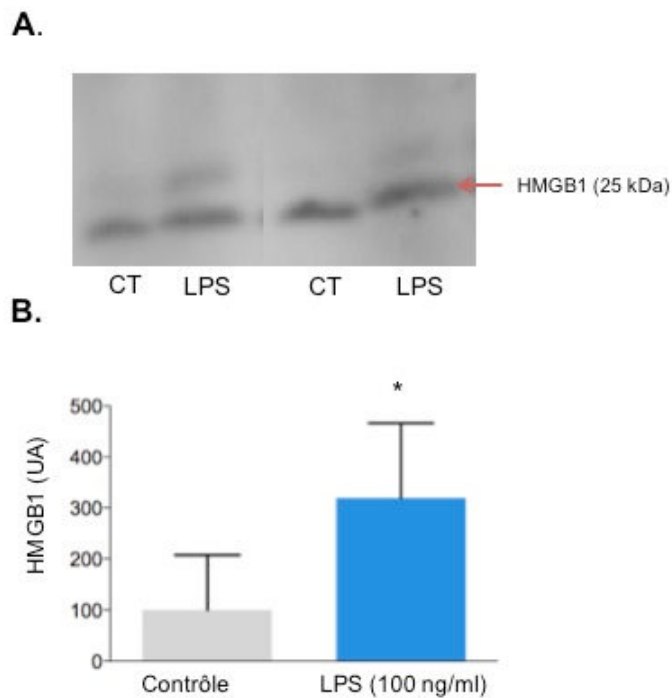


Figure 50 : Effet du LPS sur la sécrétion de HMGB1 par les cellules bEnd.3.

A) Western Blot représentatif ; B) Quantification de HMGB1

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en unités arbitraires (UA). n=5/condition. CT=contrôle. * P<0,05 versus CT.

2. Effet du rt-PA sur la sécrétion, l'expression et la localisation de HMGB1 dans les cellules bEnd.3 : première partie

A) Etude de l'expression et de la sécrétion de HMGB1 après traitement par le rt-PA

Dans la suite de nos études nous avons étudié la sécrétion et l'expression de HMGB1 par les cellules bEnd.3 après différents temps de traitement par le rt-PA. Le choix de la concentration de rt-PA utilisée, qui est de 40 μ g/ml, repose sur nos précédents résultats qui montraient que les cellules bEnd.3 libéraient à cette concentration des taux élevés de MVE considérées comme des marqueurs d'activation cellulaire.

a. Protocole expérimental

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits dans du milieu contenant du SVF. Vingt-quatre heures après, elles ont été traitées par le rt-PA (lot 1, #502074) à la concentration de 40 µg/ml pendant 30 minutes, 3, 6 ou 24 heures dans du milieu dépourvu de SVF. En ce qui concerne les traitements à court terme (30 minutes, 3 ou 6 heures), un changement de milieu sans SVF a été réalisé et les cellules ont été maintenues en culture jusqu'à 24 heures (figure 51).

Les cellules contrôles ont subi quant à elles un changement de milieu sans SVF pour être soumises aux mêmes conditions que les cellules traitées.

Le surnageant de ces cellules a été récupéré à chaque fin de stimulation avant le changement de milieu sans SVF, soit après 30 min, 3 ou 6 heures de traitement par le rt-PA (surnageant 1, figure 51) et à 24 heures après le changement de milieu sans SVF (surnageant 2, figure 51).

Les lysats cellulaires ont quant à eux été collectés à 24 heures dans un tampon contenant du NP40 (1%). A la suite d'une centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes, la **fraction protéique soluble** qui contient toutes les protéines solubles dans le tampon a été isolée et analysée.

L'expression et la sécrétion de HMGB1 dans les surnageants et la fraction protéique soluble ont été évaluées par une technique de Western Blot.

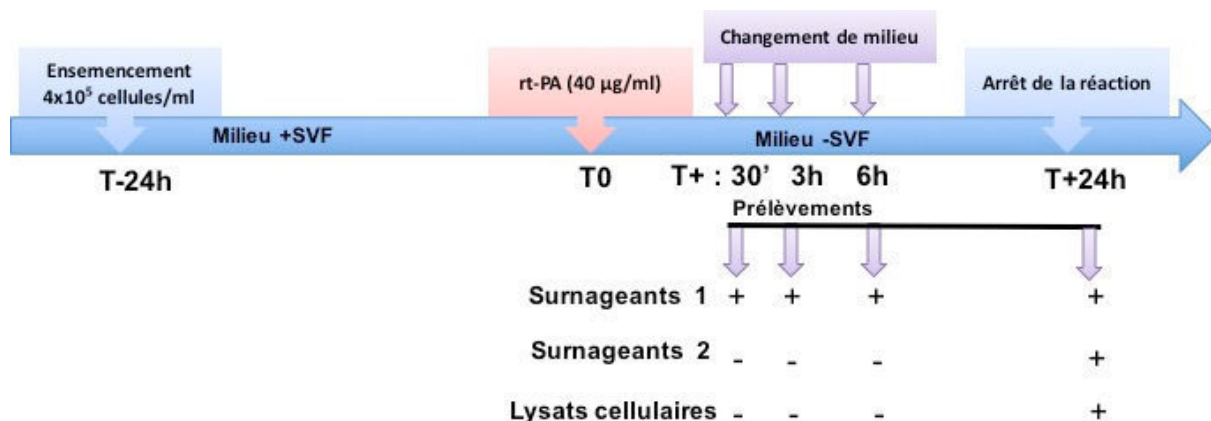


Figure 51 : Protocole d'étude de l'expression de HMGB1 après différents temps de traitement par le rt-PA (40 µg/ml)

Surnageants 1 : milieux de culture récupérés avant le changement de milieu sans SVF soit à 30 minutes, 3 heures et 6 heures. Surnageants 2 : milieux de culture récupérés 24 heures après le changement de milieu sans SVF.

b. Résultats

Le résultat du Western Blot de la **fraction protéique soluble** des lysats montre comme précédemment une bande qui se situe, d'après le marqueur de masse moléculaire, aux environs de 25 kDa, ce qui correspond à la masse moléculaire de HMGB1 (figure 52). Le traitement des cellules par le rt-PA à la concentration de 40 µg/ml pendant 30 minutes, 3 heures ou 6 heures ne modifie pas l'expression de HMGB1 évaluée à 24 heures par rapport à son expression dans les cellules contrôles. Cependant, le traitement par le rt-PA à la concentration de 40 µg/ml pendant 24 heures entraîne une disparition complète de la protéine au niveau de la fraction protéique soluble (figure 52).

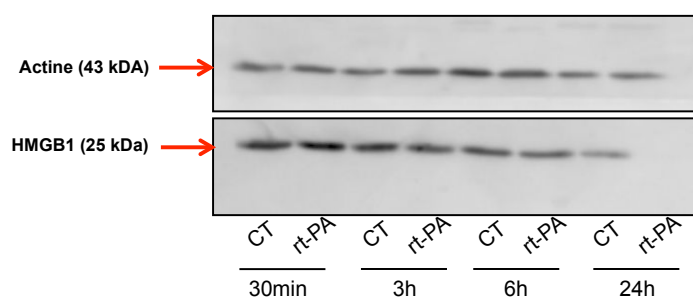


Figure 52 : Western Blot représentatif de l'expression de HMGB1 dans les cellules bEnd.3 à 24 heures après différentes durées de traitement par le rt-PA

n=1/condition. CT=contrôle.

L'analyse par Western Blot des **surnageants** prélevés d'une part à chaque fin de stimulation (surnageants 1) et d'autre part à 24 heures (surnageants 2) ne montre aucune trace de la protéine HMGB1, ce qui n'est donc pas en faveur d'une sécrétion (Western Blot non quantifiable).

Au vu de ce résultat surprenant, nous avons décidé de poursuivre nos recherches par l'étude de l'effet d'une gamme de rt-PA appliquée pendant 24 heures sur les bEnd.3, sur l'expression de HMGB1 dans la fraction protéique soluble et sa sécrétion dans les surnageants.

B) Effet d'une gamme de rt-PA sur l'expression et la sécrétion de HMGB1 à 24 heures

a. Protocole expérimental

Les cellules confluentes (24 heures après ensemencement dans des plaques de 24 puits) ont été traitées par une gamme de rt-PA (20, 40, 80 µg/ml) pendant 24 heures dans du milieu dépourvu de SVF. Les cellules contrôles n'ont quant à elles subi qu'un changement de milieu (figure 53). Vingt-quatre heures après, les lysats cellulaires et les surnageants ont été récupérés. L'expression de HMGB1 dans la fraction protéique soluble et sa sécrétion dans les surnageants concentrés ont été évaluées par Western Blot. Les taux de HMGB1 ont été corrigés par l'actine et sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles (n=2/ condition).

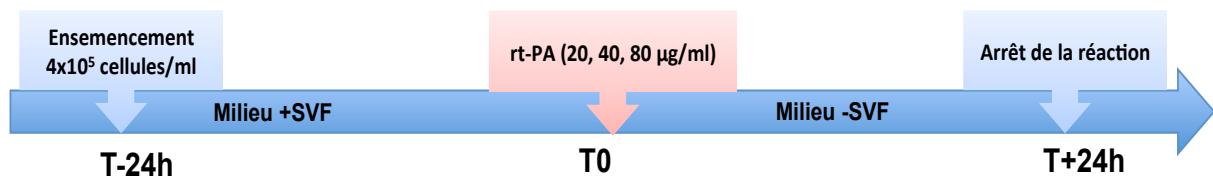


Figure 53 : Protocole de traitement des cellules bEnd.3 par une gamme de rt-PA

b. Résultats

Le Western Blot de la protéine HMGB1 réalisé sur la fraction protéique soluble montre que le rt-PA à la concentration de 20 µg/ml ne modifie pas l'expression de la protéine. En revanche, le traitement des cellules par le rt-PA à 40 ou 80 µg/ml entraîne une disparition complète de la protéine HMGB1 dans cette fraction (figure 54).

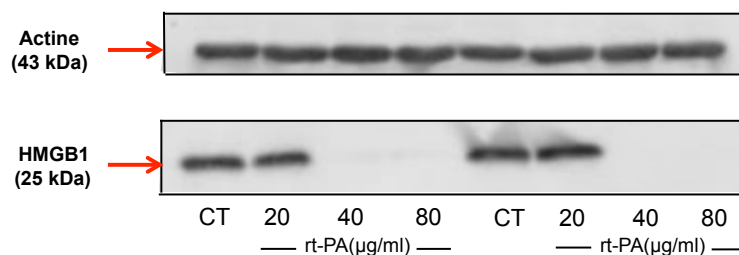


Figure 54 : Effet d'une gamme de rt-PA sur l'expression de HMGB1 et de l'actine dans la fraction protéique soluble.

n=2/condition. CT=contrôle.

La quantification du Western Blot (tableau 9) montre un même taux d'expression de HMGB1 chez les cellules contrôles et chez celles traitées par le rt-PA 20 µg/ml. Un taux très bas (<2%) a été quantifié après traitement par le rt-PA aux concentrations de 40 et de 80 µg/ml.

HMGB1 (% des cellules contrôles)	Contrôle	rt-PA (20 µg/ml)	rt-PA (40 µg/ml)	rt-PA (80 µg/ml)
n1	96,46	80,68	1,77	1,64
n2	103,66	102,78	2,15	2,02
Moyenne	100,00	91,73	1,96	1,83

Tableau 9 : Taux d'expression de HMGB1 dans la fraction protéique soluble exprimés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles

En ce qui concerne les surnageants, l'évaluation de la sécrétion de HMGB1 n'a montré aucune trace de la protéine après le traitement par le rt-PA, quelle que soit la concentration utilisée (Western Blot non quantifiable).

c. Discussion

Dans ces deux premières études, nous avons recherché si le rt-PA entraînait une sécrétion de la protéine HMGB1 par les cellules bEnd.3.

HMGB1 est une protéine ubiquitaire, localisée majoritairement au niveau nucléaire. Comme ceci est décrit dans la littérature, dans des conditions d'inflammation ou de nécrose cellulaire, HMGB1 est transloquée, puis sécrétée dans le milieu extracellulaire. Une fois sécrétée, HMGB1 est capable d'induire ou d'amplifier la machinerie inflammatoire notamment *via* son interaction avec les récepteurs TLR et RAGE.

De nombreuses études se sont intéressées à la protéine HMGB1 au cours de l'ischémie cérébrale et ont mis en évidence sa sécrétion dans le plasma et le LCR à des temps précoces et tardifs dans les modèles expérimentaux (Kim *et al.*, 2006, 2008 ; Muhammad *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2011 ; Shin *et al.*, 2014 ; Gong *et al.*, 2014). Il a également été montré que HMGB1 participait non seulement à l'inflammation post-ischémique mais également à la rupture de la BHE (Zhang *et al.*, 2011).

Par ailleurs *in vitro*, des études ont montré que les cellules endothéliales stimulées par le LPS ou le TNF sont capables de sécréter HMGB1 (Bae et Rezaie, 2011 ; Kim *et al.*, 2015). De plus, HMGB1 augmente l'expression par les cellules endothéliales de marqueurs d'inflammation tels qu'ICAM-1,

VCAM-1 et E-sélectine (Qiu et al., 2008, Fiuza et al., 2003 ; Treutiger et al., 2003). HMGB1 entraîne également la sécrétion de molécules inflammatoires telles que le TNF, l'IL-8, le MCP-1, et non inflammatoires comme le PAI-1 et le t-PA (Fiuza et al., 2003 ; Treutiger et al., 2003). Par ailleurs, HMGB1 provoque une perte de l'intégrité de la membrane des cellules endothéliales (Palumbo et al., 2004) et une augmentation de la perméabilité dans les modèles *in vitro* de BHE (Zhang et al., 2011 ; Festoff et al., 2016).

Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à l'effet du rt-PA sur HMGB1 au niveau endothélial. Dans ce contexte, nous avons tout d'abord étudié dans notre modèle cellulaire (les cellules bEnd.3) l'effet du rt-PA à la concentration de 40 µg/ml sur HMGB1. Le choix de cette concentration repose sur nos précédentes études qui montraient que les cellules bEnd.3 traitées par le rt-PA à cette concentration libéraient des microvésicules endothéliales, marqueurs d'activation et de souffrance endothéliale voire d'apoptose.

Dans un premier temps, nous avons montré que les cellules bEnd.3 sont capables de sécréter HMGB1 lorsqu'elles sont stimulées par le LPS pendant 24 heures. Dans un second temps, nous avons réalisé des traitements des cellules bEnd.3 par le rt-PA à différents temps afin d'étudier le profil de sécrétion de HMGB1 dans notre modèle. Deux types de surnageants ont été analysés : 1) ceux prélevés à chaque fin de stimulation soit à 30 minutes, 3 heures et 6 heures ; 2) ceux prélevés à 24 heures suite aux courtes (30 min, 3h et 6 heures) et longues (24 heures) stimulations. Dans les deux types de surnageants, nous n'avons détecté aucune trace de la protéine quel que soit le temps de stimulation.

Toutefois, nous avons observé qu'au niveau cellulaire, HMGB1 disparaissait lorsque les cellules sont traitées par le rt-PA en continu, pendant 24 heures. Ce résultat est d'autant plus surprenant que la protéine n'est pas sécrétée dans les surnageants.

Nous avons voulu confirmer ce résultat en étudiant l'effet d'une gamme complète de rt-PA dans une nouvelle expérience. Le même effet a été retrouvé à la concentration de 40 µg/ml et il a également été observé à la concentration de 80 µg/ml. A la concentration 20 µg/ml en revanche, HMGB1 n'est pas modifiée.

Nous avons émis l'hypothèse que cette baisse importante de l'expression de HMGB1 au niveau cellulaire pouvait être la conséquence d'une dégradation directe par le rt-PA, qui est une sérine protéase, ou un effet indirect *via* l'action de la plasmine qui est le produit de transformation du plasminogène par le t-PA. Une étude réalisée par Parkkinen et collaborateurs montre d'ailleurs un effet protéolytique indirect du t-PA (forme endogène du rt-PA) sur les amphotérines telles que

HMGB1 (Parkkinen et al., 1993). Cet effet protéolytique indirect implique la plasmine. Nous avons donc réalisé par la suite un test *in vitro* sans cellules avec la protéine HMGB1 recombinante afin de vérifier cette hypothèse.

C) Test de dégradation de HMGB1 par le rt-PA et rôle de la plasmine

Nous avons donc testé *in vitro*, en conditions acellulaires, l'effet du rt-PA à la concentration de 40 µg/ml sur la protéine recombinante HMGB1 en présence et en absence de plasminogène.

Le choix de la concentration de plasminogène, du temps et des conditions d'incubation sont tirés de l'étude de Parkkinen et collaborateurs (Parkkinen et al., 1993).

a. Protocole expérimental

Dans des tubes eppendorf, la protéine HMGB1 recombinante (14 ng/tube) a été incubée pendant 2 heures à 37 °C dans un tampon PBS contenant du rt-PA (40 µg/ml) associé ou non au plasminogène (10 µg/ml), dans le but d'étudier le rôle de la plasmine. Dans le même but, un inhibiteur de la fixation du plasminogène au rt-PA, l'acide tranexamique, a été utilisé à la concentration de 10 mM. Enfin, un contrôle négatif constitué de la protéine HMGB1 incubée avec le plasminogène seul a été réalisé (figure 55).

A la fin de l'incubation, la réaction est arrêtée par ajout de tampon de Laemmli et les échantillons sont déposés en Western Blot afin d'évaluer les taux de HMGB1.

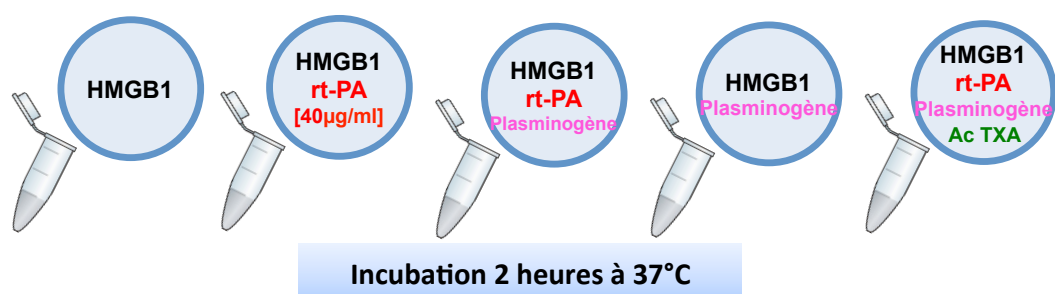


Figure 55 : Test *in vitro* acellulaire : effet du rt-PA et de la plasmine sur la protéine HMGB1
HMGB1 (14 ng/tube) ; rt-PA (40 µg/ml) ; plasminogène (10 µg/ml) ; Ac TXA= Acide tranexamique (10 mM).

b. Résultats

Les résultats du Western Blot ont permis de mettre en évidence la protéine HMGB1 qui migre à une masse moléculaire apparente de 25 kDa, identique à celle retrouvée dans les cellules et les surnageants. Cependant, HMGB1 n'est pas dégradée par le rt-PA (40 µg/ml), que ce soit en présence ou en absence de plasminogène (figure 56).

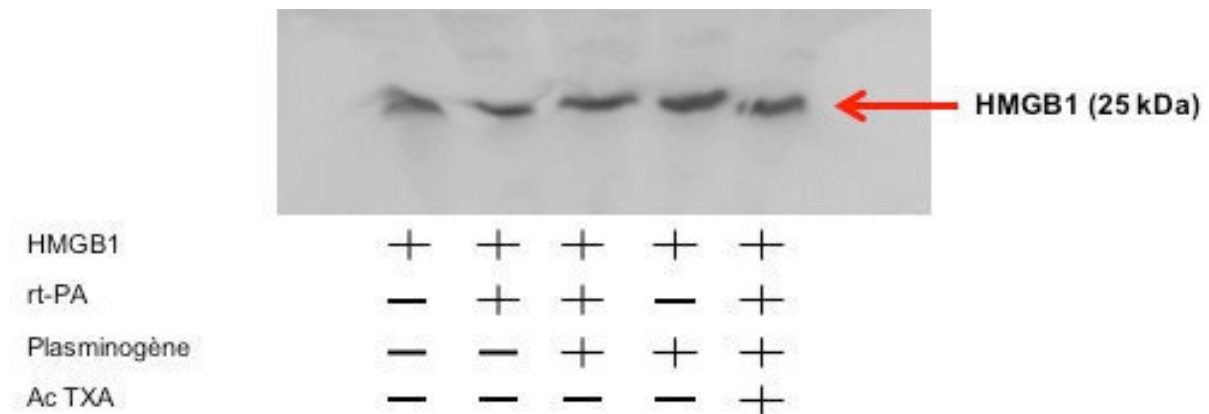


Figure 56 : Effet du rt-PA et de la plasmine sur la protéine HMGB1

HMGB1 (14 ng/tube) ; rt-PA (40 µg/ml) ; plasminogène (10 µg/ml) ; Ac TXA= Acide tranexamique (10 mM).

c. Discussion

Nous avons montré dans ce test *in vitro* acellulaire que HMGB1 n'était pas dégradée par le rt-PA, que ce soit en présence ou en absence de plasminogène. Ce résultat est en contradiction avec ceux de l'étude de Parkkinen et collaborateurs qui ont montré que HMGB1 était dégradée par le t-PA (forme endogène du rt-PA) dans un plasma normal et dans un plasma déplété puis surchargé avec la même quantité de plasminogène que celle utilisée dans notre expérience (10 µg/ml) et pendant le même temps d'incubation (2 heures). Cet effet n'était cependant pas retrouvé lorsque le plasma était déplété en plasminogène sans surcharge (Parkkinen et al., 1993), montrant dans ces conditions une dégradation de HMGB1 par le t-PA plasmine-dépendante.

Dans nos conditions, la protéine recombinante a été incubée avec du plasminogène et du rt-PA dans un tampons PBS, alors que Parkkinen et collaborateurs ont utilisé un plasma qui contient probablement du fibrinogène, un substrat sur lequel le plasminogène et le t-PA peuvent se fixer et s'assembler afin de permettre la génération de plasmine (Parkkinen et al., 1993). L'assemblage de

ces deux facteurs nécessaires à la génération de plasmine peut aussi bien s'effectuer à la surface du fibrinogène qu'à la surface des cellules ou sur d'autres molécules d'attache (Roussel et al., 2011 ; Dejouvencel et al., 2010). Ainsi, dans les études de Parkkinen, il a été montré que HMGB1 pouvait jouer le rôle de surface de fixation et d'assemblage du plasminogène et du t-PA notamment par liaison aux sites LBS (Lysine Binding Site) situés sur les domaines Kringles du rt-PA (Parkkinen et al., 1991, 1993). La plasmine ainsi générée est capable ensuite de dégrader HMGB1. Cet effet ne semble pas se produire dans nos conditions expérimentales où la quantité de la protéine HMGB1 reste inchangée en présence de rt-PA, de plasminogène ou des deux facteurs combinés. Par ailleurs, il n'est pas exclu que le temps d'incubation (2 heures) ne soit pas suffisamment long, même si la réaction est réalisée dans des conditions acellulaires où la protéine est en contact direct avec le rt-PA/plasminogène contrairement aux conditions de culture cellulaire.

Nous n'avons pas testé d'autres conditions et avons décidé d'utiliser une autre technique afin de localiser HMGB1 au niveau cellulaire après traitement par le rt-PA. Nous avons alors choisi la technique d'immunocytochimie.

D) Etude de la localisation cellulaire de HMGB1 après traitement par le rt-PA par une technique d'immunocytochimie

a. Protocole expérimental

Les cellules ont étéensemencées sur des lamelles recouvertes de poly-D lysine dans des plaques de 24 puits. Vingt-quatre heures après, elles ont été traitées par une gamme de rt-PA (20, 40, 80 µg/ml) pendant 24 heures. Les cellules contrôles n'ont subi qu'un changement de milieu. A la fin du traitement, les cellules ont été fixées par du paraformaldéhyde et un double marquage HMGB1/Dapi a été réalisé.

b. Résultats

Comme illustré sur les images de la figure 10, les cellules contrôles forment un tapis cellulaire homogène. Malgré un léger marquage cytoplasmique dans les cellules contrôles, HMGB1 est retrouvée majoritairement au niveau nucléaire (figure 57).

Lorsque les cellules sont traitées par le rt-PA (20, 40, 80 µg/ ml), la protéine HMGB1 est toujours visible au niveau cellulaire, mais la réorganisation du tapis cellulaire et le regroupement des cellules

en amas rendent la localisation de HMGB1 difficile (figure 57) : le marquage nucléaire est visible, mais le marquage cytoplasmique est difficilement observable au vu de la morphologie des cellules. Cette étude ne nous permet donc pas de conclure quant à une éventuelle translocation de HMGB1 au niveau cytoplasmique, mais permet de confirmer que la protéine est bien présente dans la cellule et qu'elle n'est pas dégradée par le rt-PA quelle que soit la concentration.

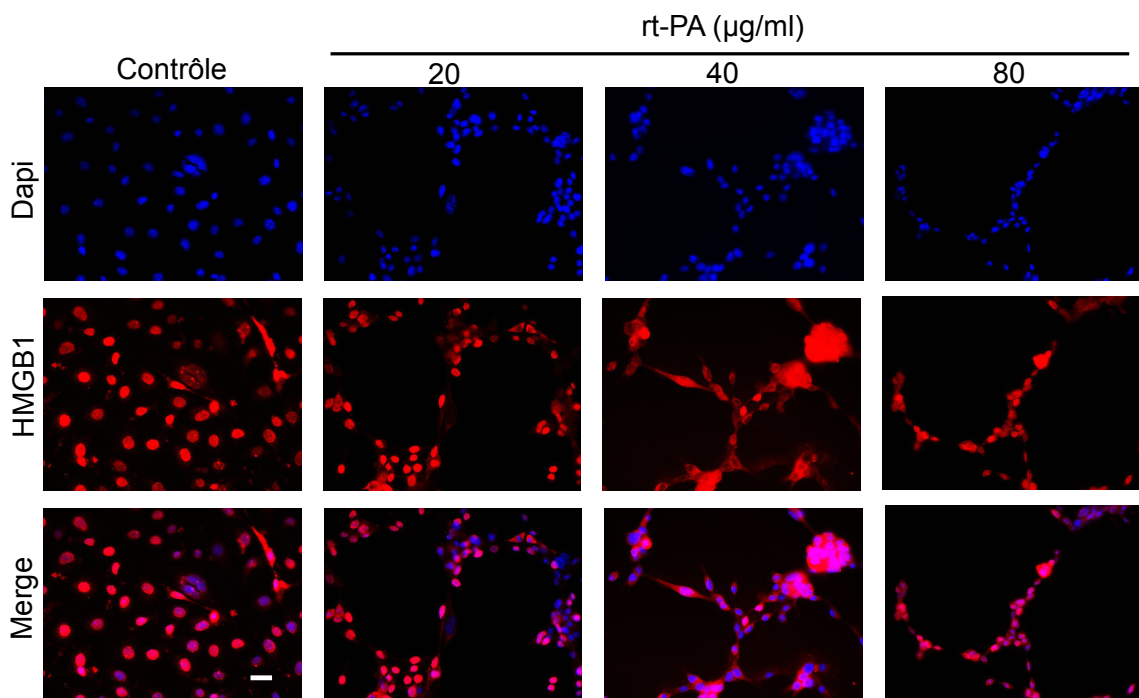


Figure 57 : Images d'immunofluorescence représentatives de l'effet d'une gamme de rt-PA sur la localisation de HMGB1 dans les cellules bEnd.3

HMGB1 en rouge ; Dapi en bleu, échelle= 25 µm.

c. Discussion

Dans cette expérience, nous avons cherché à localiser la protéine HMGB1 par immunocytochimie dans les cellules après traitement par une gamme de rt-PA. Malgré un changement morphologique important des cellules après rt-PA, nous observons toujours la présence d'un marquage nucléaire de HMGB1 comme chez les cellules contrôles. En ce qui concerne le cytoplasme, il est difficile de le distinguer après traitement au rt-PA car les cellules changent de morphologie et se regroupent en amas. Nous ne pouvons donc pas conclure quant à la présence ou l'absence d'un marquage HMGB1 dans ce compartiment cellulaire après rt-PA. Nous pouvons toutefois affirmer que la protéine est toujours présente au niveau des cellules et qu'elle n'est pas dégradée après rt-PA.

Etant donné que HMGB1 disparaît de la fraction protéique soluble après traitement par le rt-PA et qu'elle n'est ni sécrétée, ni dégradée, nous avons supposé que HMGB1 pourrait être localisée dans le culot obtenu après la première centrifugation des lysats cellulaires. Ce culot a été lavé avec le même tampon de lyse afin de solubiliser un maximum de protéines, puis a été isolé après une deuxième centrifugation. Il correspondrait à une fraction contenant toutes les protéines insolubles dans le tampon de lyse utilisé.

3. Effet du rt-PA sur la sécrétion, l'expression et la localisation de HMGB1 par les cellules bEnd.3 : deuxième partie

A) Etude de l'effet d'une gamme de rt-PA sur l'expression et la sécrétion de HMGB1 à 24h

Après un changement du lot de rt-PA (lot 2 #601772), nous avons cherché à reproduire les résultats obtenus précédemment et à les confirmer sur un plus grand nombre de cultures cellulaires.

a. Protocole expérimental

Nous avons utilisé le même protocole que dans les études précédentes. Les cellules bEnd.3 ont été ensemencées dans des plaques de 24 puits dans du milieu contenant du SVF. Vingt-quatre heures après, elles sont traitées par le rt-PA à la concentration de 20, 40 ou 80 µg/ml pendant 24 heures dans du milieu dépourvu de SVF. Les cellules contrôles n'ont quant à elles subi qu'un changement de milieu sans SVF pour être dans les mêmes conditions que les cellules traitées (figure 58).

A la fin des traitements, les lysats et surnageants cellulaires ont été récupérés. Les fractions protéiques solubles et insolubles ont été isolées à partir des lysats cellulaires. L'expression de HMGB1 a ensuite été évaluée par Western Blot et corrigée par l'actine dans la fraction protéique soluble et par l'histone dans la fraction protéique insoluble, puis exprimée en pourcentage des cellules contrôles (n=6/condition). Enfin, les surnageants ont été concentrés afin d'évaluer la sécrétion de HMGB1.

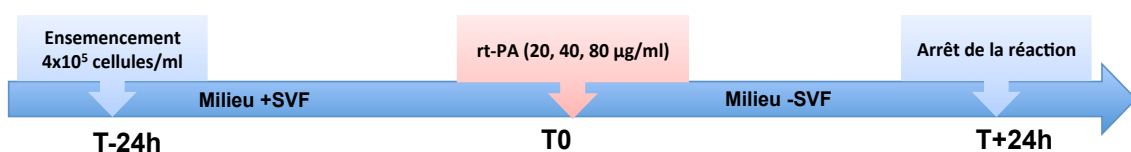


Figure 58 : Protocole de traitement des cellules bEnd.3 par une gamme de rt-PA

b. Résultats

✚ Evaluation de la sécrétion de HMGB1 dans les surnageants

Le Western Blot de HMGB1 dans les surnageants montre une bande faible intensité, parfois indétectable, de masse moléculaire apparente de 25 kDa (figure 59). Cette bande est toutefois très visible dans le contrôle positif (CT+) correspondant à un échantillon de fraction protéique soluble des cellules contrôles et qui a permis de valider le Western Blot.

Dans les surnageants, l'intensité de cette bande n'est pas modifiée par le traitement par le rt-PA quelle que soit la concentration utilisée. HMGB1 n'est donc pas sécrétée dans le milieu extracellulaire dans nos conditions. Cette étude est en accord avec nos précédents résultats (figure 59).

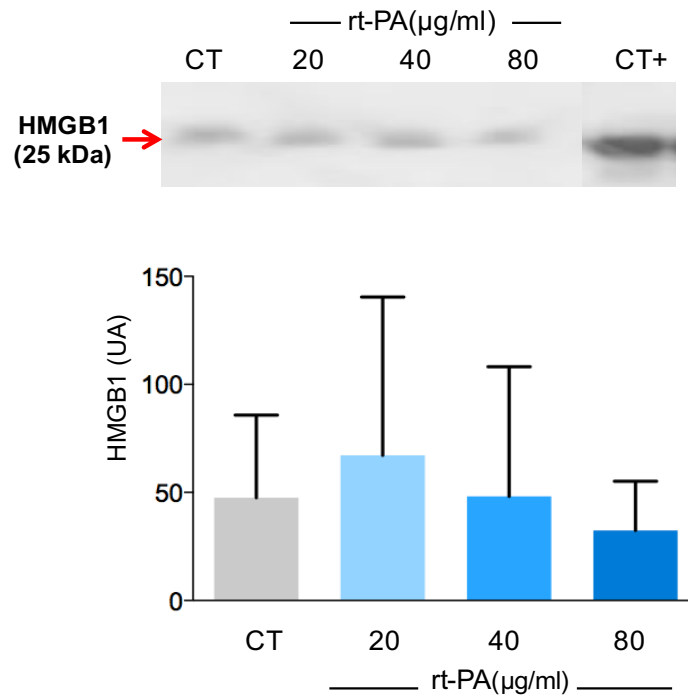


Figure 59 : Effet d'une gamme de rt-PA sur la sécrétion de HMGB1 par les cellules bEnd.3

CT+ = control positif = fraction protéique soluble des cellules contrôles. Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en unités arbitraires (UA). n=6/condition ; CT=contrôle.

✚ Evaluation de l'expression de HMGB1 dans la fraction protéique soluble

Une bande migrant à la même masse moléculaire que précédemment (25 kDa) a été mise en évidence dans cette fraction et correspond à HMGB1. La quantification de cette bande montre que

l'expression de HMGB1 corrigée par celle de l'actine qui reste stable, n'est pas modifiée par le traitement par le rt-PA, que ce soit à la concentration de 20 ou 40 $\mu\text{g/ml}$. Cependant, quand les cellules sont traitées par le rt-PA à la concentration de 80 $\mu\text{g/ml}$, l'expression de HMGB1 diminue considérablement dans cette fraction ($P < 0,05$) (figure 60). Par ailleurs aucune trace de l'histone n'est détectée dans cette fraction.

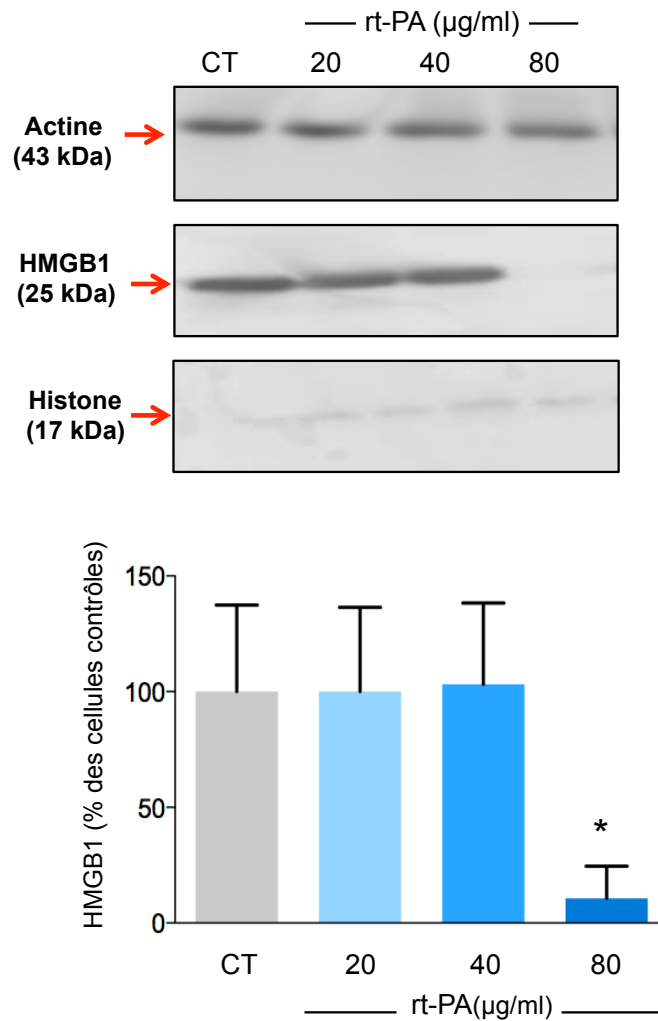


Figure 60 : Effet d'une gamme de rt-PA sur l'expression de HMGB1 dans la fraction protéique soluble des cellules bEnd.3 évaluée par Western Blot

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en pourcentage des cellules contrôles. $n=6$ /condition ; CT=contrôle ; * $P < 0,05$ versus CT.

✚ Evaluation de l'expression de HMGB1 dans la fraction protéique insoluble

Le résultat du Western Blot dans cette fraction protéique insoluble montre une expression stable de l'histone dans toutes les conditions (figure 61). L'évaluation de l'expression de HMGB1 corrigée par l'histone dans cette fraction montre un taux élevé de la protéine après traitement par le rt-PA à la concentration de 80 µg/ml ($P < 0,01$), concentration à laquelle nous avons observé une diminution significative de son expression dans la fraction protéique soluble. Cet effet n'est pas observé aux autres concentrations de rt-PA (20 et 40 µg/ml). Par ailleurs aucune trace de l'actine n'est détectée dans cette fraction.

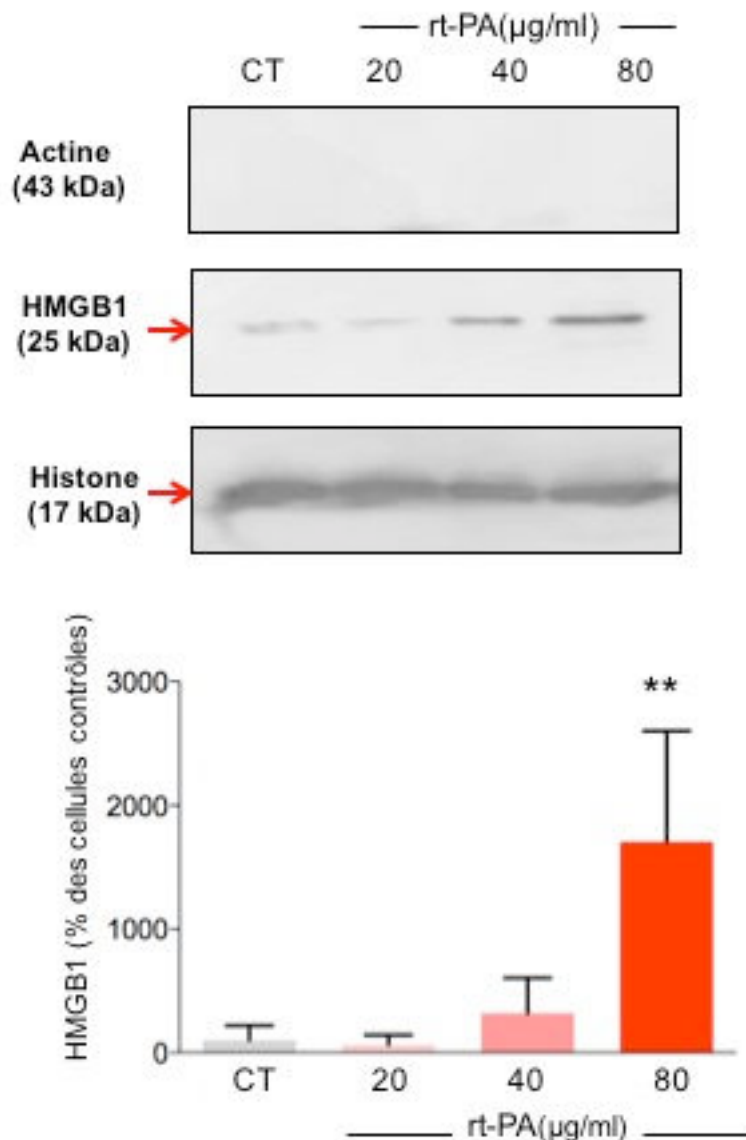


Figure 61 : Effet d'une gamme de rt-PA sur l'expression de HMGB1 dans la fraction protéique insoluble

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en pourcentage des cellules contrôles. n=6/condition. CT=contrôle. **: $P < 0,01$ versus CT.

✚ Evaluation de la cytotoxicité du rt-PA

La viabilité cellulaire a été évaluée par un test MTT et la mort cellulaire par une mesure des taux de LDH dans le milieu de culture. Les résultats montrent que le rt-PA n'a aucun effet à la concentration de 20 µg/ml. Aux concentrations de 40 et 80 µg/ml, il entraîne une diminution significative de la viabilité cellulaire ($P < 0,01$) (figure 62A). Cependant, la mort cellulaire n'est augmentée qu'après traitement des cellules par le rt-PA à la concentration de 80 µg/ml ($P < 0,05$) (Figure 62B).

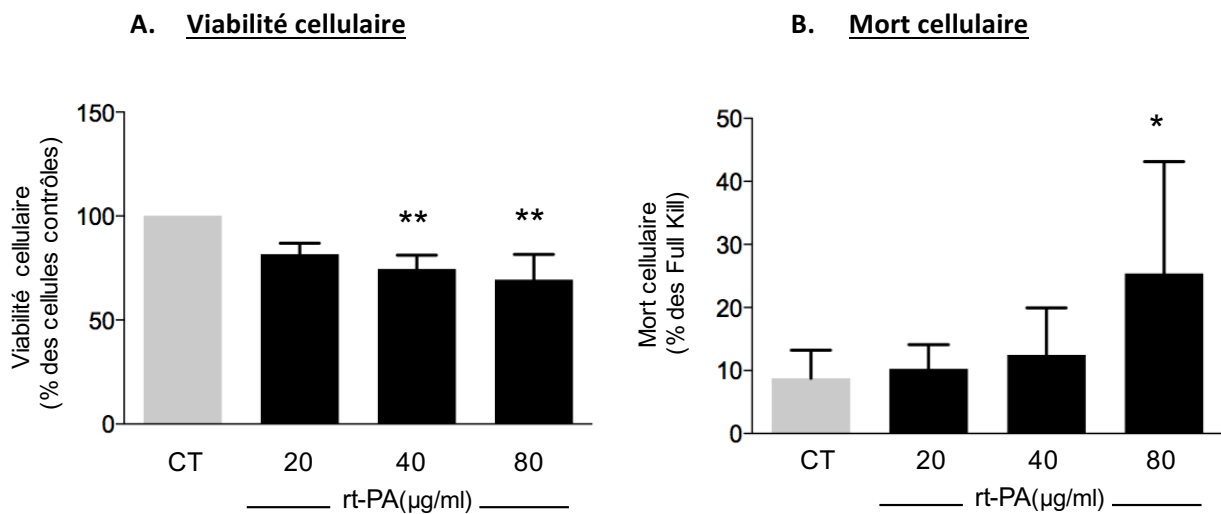


Figure 62 : Effet cytotoxique du rt-PA sur les cellules bEnd.3.

A) Viabilité cellulaire (test MTT), B) Mort cellulaire (dosage LDH)

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles pour la mesure de la viabilité et en % de Full Kill (100% de mort) pour la mesure de la mort cellulaire. n=6/condition. CT=contrôle. * : $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ versus CT.

c. Discussion

Dans cette étude, après un changement de lot de rt-PA, nous avons recherché pour la deuxième fois l'effet d'une gamme de rt-PA sur HMGB1. Nous avons tout d'abord analysé les surnageants et la fraction protéique soluble. Comme précédemment, nous n'avons détecté aucune trace de la protéine dans les surnageants, et ce quelle que soit la concentration de rt-PA utilisée. Cependant, l'analyse de la fraction protéique soluble montre que l'expression de HMGB1 restait inchangée après traitement par le rt-PA 20 et 40 µg/ml et baissait considérablement à la concentration de 80 µg/ml. Ce résultat diffère du résultat obtenu avec le précédent lot qui montrait une disparition de HMGB1 dès 40 µg/ml de rt-PA. L'activité des deux lots de rt-PA, très proches d'après le fournisseur (lot 1 :

11,74 x10⁶ UI/flacon ; lot 2 : 11, 90 x 10⁶ UI/flacon), ne semble pas impliquée dans cette différence de l'effet. La réponse des cellules semble être un effet de tout ou rien. Deux hypothèses peuvent être envisagées : 1) la concentration de 40 µg/ml est peut-être située dans la zone « charnière » de la courbe effet/dose, zone dans laquelle l'effet est fluctuant, 2) une légère variation de la densité des cellules dans nos conditions de culture peut avoir influencé leur réponse.

Par ailleurs, nous avons observé un effet intéressant en analysant la fraction protéique insoluble issue de nos cellules. En effet, à la concentration de 80 µg/ml, la protéine HMGB1 qui, comme décrit précédemment disparaît complètement de la fraction protéique soluble mais n'est pas sécrétée par les cellules, se retrouve dans une fraction protéique insoluble très riche en histones. Le rt-PA semble donc modifier l'état de solubilité de HMGB1 dans les cellules bEnd.3, voire son affinité à chromatine. Un tel effet du rt-PA sur HMGB1 n'a encore jamais été décrit. Toutefois Scaffidi et collaborateurs ont montré que dans des conditions d'apoptose induite dans les cellules HeLa, HMGB1 était retenue au niveau nucléaire et n'était pas sécrétée par les cellules (Scaffidi et al., 2002). Cependant, d'autres données de la littérature contredisent cet effet, notamment l'étude de Bell et collaborateurs qui montre qu'en condition de nécrose comme d'apoptose, HMGB1 ne reste pas dans le noyau et est bien sécrétée (Bell et al., 2006).

Afin de rechercher une éventuelle fixation d'HMGB1 au niveau des protéines nucléaires après traitement par le rt-PA, nous avons choisi de perméabiliser les cellules avant de les fixer par le paraformaldéhyde. Chez les cellules contrôles, une perméabilisation doit permettre la diffusion de HMGB1 dans le milieu extracellulaire. Toutefois, si le rt-PA modifie la solubilité de HMGB1 ainsi que son affinité au noyau, la protéine demeurerait nucléaire après perméabilisation des cellules traitées par le thrombolytique.

B) Etude de l'effet du rt-PA sur la localisation de HMGB1 par une technique d'immunocytochimie après perméabilisation cellulaire

a. Protocole expérimental

Les cellules ont étéensemencées sur des lamelles recouvertes de poly-D lysine dans des plaques de 24 puits. Vingt-quatre heures après, elles ont été traitées par le rt-PA aux concentrations de 40 et 80 µg/ml pendant 24 heures. Les cellules contrôles n'ont subi qu'un changement de milieu.

A la fin du traitement, les cellules ont été perméabilisées par une solution tampon NP40 à 0,1% pendant 30 secondes avant d'être fixées par du paraformaldéhyde. Un double marquage

HMGB1/Dapi en immunocytochimie a ensuite été réalisé. Les lames ont été observées au microscope à fluorescence.

b. Résultats

Les images de la figure 63 représentent le marquage cellulaire de HMGB1 en rouge et des noyaux par le Dapi en bleu. Les cellules contrôles présentent comme observé précédemment un marquage de HMGB1 majoritairement nucléaire et très faible au niveau cytoplasmique. Lorsque les cellules contrôles sont perméabilisées, le marquage de HMGB1 au niveau cytoplasmique est plus important, ce qui témoigne d'une mobilité de la protéine du noyau vers le cytoplasme. Cependant le marquage au niveau nucléaire n'est pas diminué.

En ce qui concerne les cellules traitées par le rt-PA, quelle que soit la concentration utilisée, une perte importante des cellules a pu être constatée. Nous ne pouvons donc pas conclure quant à un effet du rt-PA dans ces conditions.

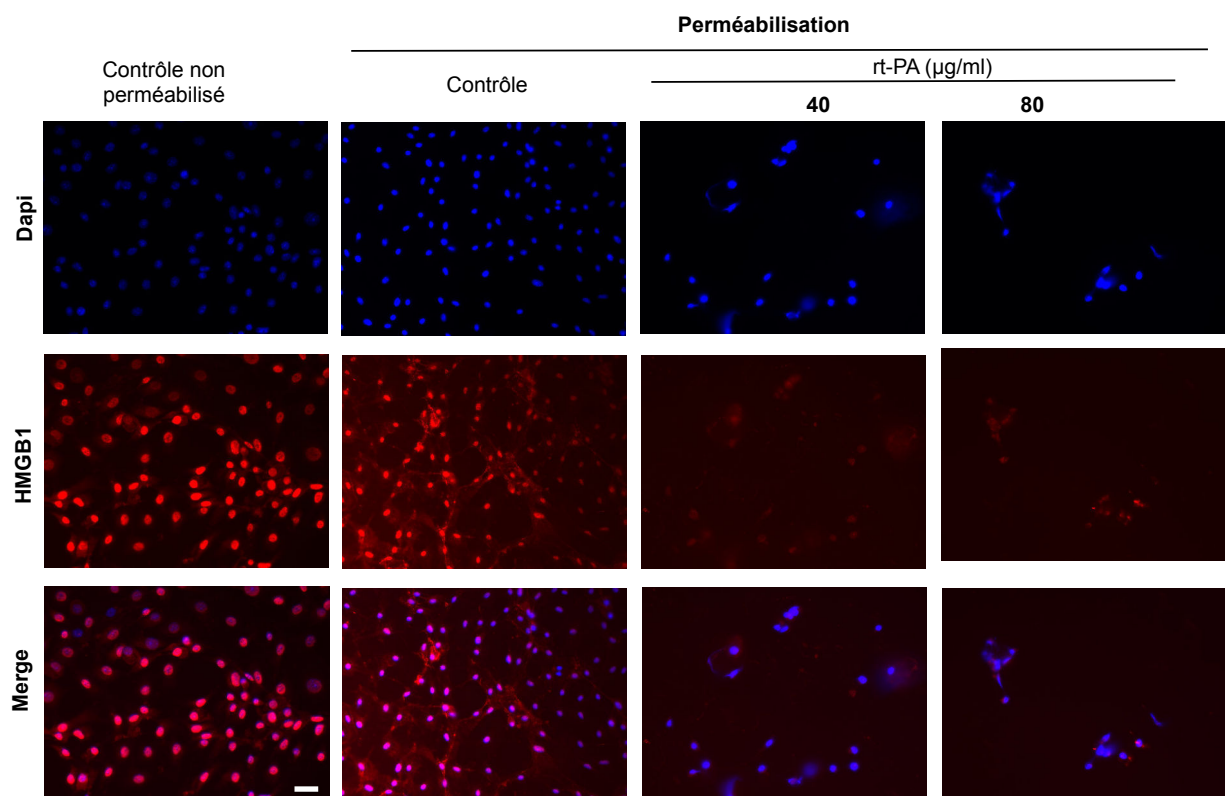


Figure 63 : Images d'immunofluorescence représentatives de l'effet du rt-PA sur la localisation cellulaire de HMGB1 après perméabilisation des membranes cellulaires

HMGB1 en rouge, Dapi en bleu, échelle = 25 μm .

C) Implication de la PARP dans les effets du rt-PA sur la protéine HMGB1

a. Recherche d'une production de PARs par les cellules bEnd.3

Avant d'étudier l'implication de la PARP dans les effets du rt-PA sur la protéine HMGB1, nous avons vérifié dans les cellules bEnd.3 que la PARP était bien activable. Pour cela, nous avons choisi de stimuler les cellules avec du peroxyde d'hydrogène qui, comme décrit par Dantzer et al (1999), est capable d'induire des altérations au niveau de l'ADN et ainsi d'activer la PARP. Ensuite, nous avons mesuré la production des poly(ADP-riboses) (PARs) par Western Blot. Nous avons également réalisé un effet dose/réponse des cellules au PJ34, un inhibiteur de la PARP, sur la formation des PARs.

➤ Protocole expérimental

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits dans du milieu contenant du SVF. Vingt-quatre heures après, elles ont été déprivées en SVF pendant 24 heures supplémentaires. A la fin de la période de déprivation, les cellules ont été stimulées par H₂O₂ à la concentration de 1 mM préparé dans du milieu Hank's et ce pendant 10 minutes (Dantzer et al., 1999). Un traitement par le PJ34 aux concentrations de 0,01, 0,02, 0,08, 0,2, 1, 10, 50 et 100 µM a été réalisé 10 minutes avant la stimulation par H₂O₂. Les deux traitements ont ensuite été maintenus pendant la durée de la stimulation, c'est-à-dire 10 minutes. À la fin de la stimulation, le milieu contenant les traitements est remplacé par du milieu Hank's frais et les cellules ont été laissées au repos pendant 20 minutes afin de permettre la synthèse des PARs (figure 64).

Les protéines totales ont ensuite été récupérées dans du tampon de Laemmli et les PARs ont été analysés par Western Blot. Les cellules contrôles n'ont subi qu'un changement de milieu (n=1/condition)



Figure 64 : Protocole de l'effet dose/réponse du PJ34 sur la formation des PARs après stimulation par H₂O₂

➤ Résultats

Le Western Blot des PARs ne montre pas une unique bande spécifique, mais se présente sous forme de trainées « smear » qui correspondent aux poly(ADP-riboses) fixés sur les différentes protéines PARylées par la PARP (figure 65). La PARP, elle-même PARylées, est retrouvée dans la zone de masse moléculaire comprise entre 113 kDa et 120 kDa.

Comme le montre la figure 65, H₂O₂ (1mM) induit la formation des PARs par les cellules bEnd.3 ce qui se traduit par une trainée intense de leur marquage le long du gel. L'intensité de ces trainées est considérablement diminuée lorsque les cellules sont traitées par le PJ34 à partir de la concentration de 0,02 µM jusqu'à 100 µM, ce qui indique un blocage de la production de PARs. Le PJ34 aux concentrations inférieures à 0,2 µM n'a pas effet.

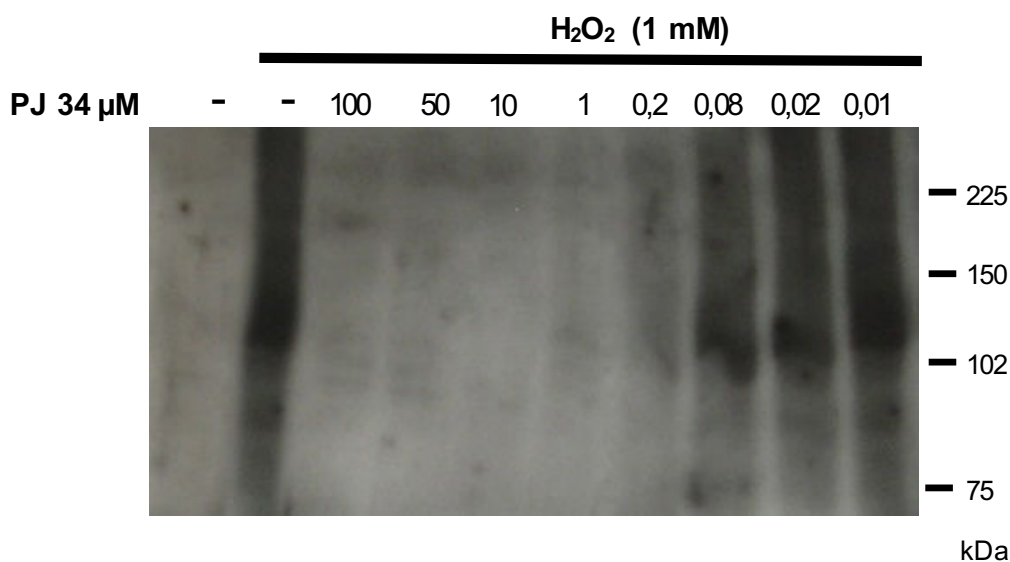


Figure 65 : l'effet d'une gamme de PJ34 sur la formation des PARs après stimulation par H₂O₂
n=1/condition.

b. Etude de l'effet d'une gamme de PJ34 sur les cellules bEnd.3 à 24h

Nous avons précédemment montré que les cellules bEnd.3 étaient capables de produire des PARs lorsqu'elles étaient stimulées par H₂O₂ et que cette production était inhibée par le PJ34. Nous avons donc décidé d'étudier l'effet cytotoxique d'une gamme de PJ34 (10, 50, 100 µM) à 24 heures afin de choisir la concentration à associer au traitement par le rt-PA.

➤ Protocole expérimental

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits dans du milieu contenant du SVF. Vingt-quatre heures après, elles ont été traitées par le PJ34 aux concentrations de 10, 50 et 100 μM pendant 24 heures dans du milieu dépourvu de SVF. Les cellules contrôles n'ont quant à elles subi qu'un changement de milieu sans SVF pour être dans les mêmes conditions que les cellules traitées (n=4/groupe).

La viabilité cellulaire a ensuite été évaluée par un test MTT, et la mort cellulaire par une mesure du taux de LDH relargué dans le milieu de culture.

➤ Résultats

Le PJ34 n'entraîne pas de modification de la viabilité cellulaire aux concentrations de 10 et 50 μM . Cependant, à la concentration de 100 μM , une diminution statistiquement significative de la viabilité cellulaire est observée (figure 66A).

Par ailleurs, les données de LDH ne montrent pas d'augmentation de la mort cellulaire aux différentes concentrations de PJ34 utilisées (figure 66B).

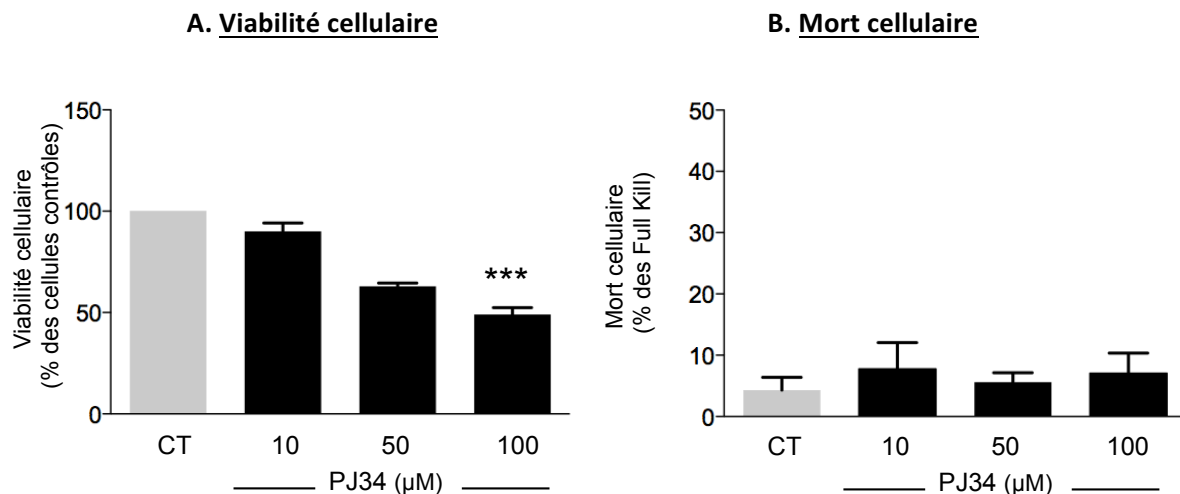


Figure 66 : Effet d'une gamme de PJ 34 sur la viabilité et la mort des cellules bEnd.3

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles pour la mesure de la viabilité et en % de Full Kill (100% de mort) pour la mesure de la mort cellulaire. n=4/ condition. CT= contrôle. ***P<0.001 versus CT.

c. Discussion

Le PJ34 est un inhibiteur synthétique de la PARP de la famille des phénanthridiones qui présente une IC50 de 17 nM. Il possède une structure proche de celle du nicotinamide et entre en compétition avec le NAD⁺, substrat de la PARP. Au laboratoire, nous avons montré dans nos modèles d'ischémie cérébrale chez la souris que l'inhibition de la PARP par le PJ34 exerce un effet protecteur en réduisant notamment les transformations hémorragiques, quelles soient spontanées ou induites par le rt-PA (Haddad et al., 2008, 2013 ; Teng et al., 2013). Il protège également les constituants de la BHE (protéines de jonction serrées et adhérentes) altérés après la thrombolyse par le rt-PA dans nos modèles (Teng et al., 2013 ; El Amki (soumis)). Nous avons également montré *in vitro* que le PJ34 réduit le taux de microvésicules endothéliales, marqueurs d'altération endothéliale, libérées par les cellules bEnd.3 après traitement par le rt-PA (Garraud et al., 2016).

Nous avons donc choisi d'utiliser le PJ34 afin d'étudier l'implication de la PARP dans les effets du rt PA sur HMGB1. Ainsi, nous avons tout d'abord cherché à mettre en évidence la production de PARs, qui reflète l'état d'activation de la PARP, en traitant les cellules bEnd.3 par H₂O₂. En effet, H₂O₂ est un agent capable d'oxyder l'ADN et de l'altérer, ce qui active les systèmes de réparation cellulaire dont la PARP. En utilisant le même protocole de stimulation que l'étude de Dantzer et collaborateurs (Dantzer et al., 1999), nous avons mis en évidence par Western Blot une production de PARs qui est complètement inhibée par le PJ34 aux concentrations de 1, 10, 50 et 100 µM.

En ce qui concerne les effets cytotoxiques du PJ34, nous avons observé une baisse de la viabilité cellulaire statistiquement significative à la concentration 100 µM, qui refléterait plutôt une altération du métabolisme cellulaire, d'autant plus qu'à cette même concentration aucune augmentation de la mort cellulaire n'a été mise en évidence. Aux autres concentrations étudiées (10 et 50 µM), nous n'avons observé aucun effet cytotoxique. Nous avons donc choisi d'associer le PJ34 à la concentration de 10 µM au traitement par le rt-PA dans l'étude qui suit.

d. Etude de l'implication de la PARP dans les effets du rt-PA sur HMGB1

➤ Protocole expérimental

Les cellules ont étéensemencées comme précédemment dans des plaques de 24 puits en présence de SVF. Vingt-quatre heures après, elles ont été traitées par le rt-PA aux concentrations de 40 ou 80 µg/ml associé ou non au PJ34 (10 µM) dans du milieu sans SVF. Le PJ34 a été additionné dans le

milieu 1 heure avant le rt-PA et l'inhibition a été maintenue pendant toute la durée du traitement, c'est-à-dire 24 heures. Les cellules contrôles ont subi un changement de milieu à T-1h et T0 (n= 5/ condition) (figure 67).

A la fin du traitement, les lysats cellulaires ont été récupérés et les fractions protéiques solubles et insolubles ont été séparées. L'expression de HMGB1 a ensuite été évaluée dans chaque fraction par Western Blot. Les taux de HMGB1 mesurés ont été corrigés par l'actine dans la fraction soluble et par l'histone dans la fraction insoluble et sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles.

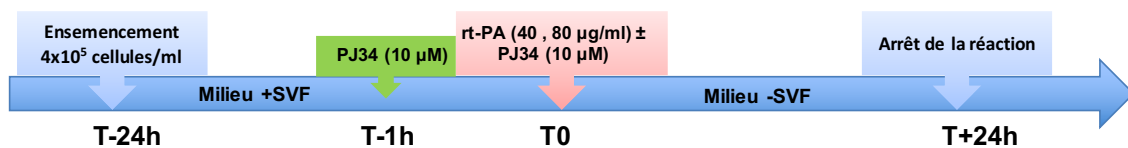


Figure 67 : Protocole de traitement des cellules par le rt-PA associé ou non au PJ34

➤ Résultats

✚ Evaluation de l'expression de HMGB1 dans la fraction protéique soluble

Le PJ34 seul n'exerce pas d'effet sur l'expression de HMGB1 dans la fraction protéique soluble (figure 68). Le traitement des cellules par le rt-PA aux concentrations de 40 ou 80 µg/ml entraîne une diminution statistiquement significative ($P < 0,05$) de l'expression de HMGB1 par rapport à la condition contrôle. L'association du PJ34 au traitement par le rt-PA à la concentration de 40 µg/ml tend à bloquer la diminution de l'expression de HMGB1 observée à cette concentration. A la concentration de 80 µg/ml de rt-PA, l'association du PJ34 n'a aucun effet sur l'expression de HMGB1.

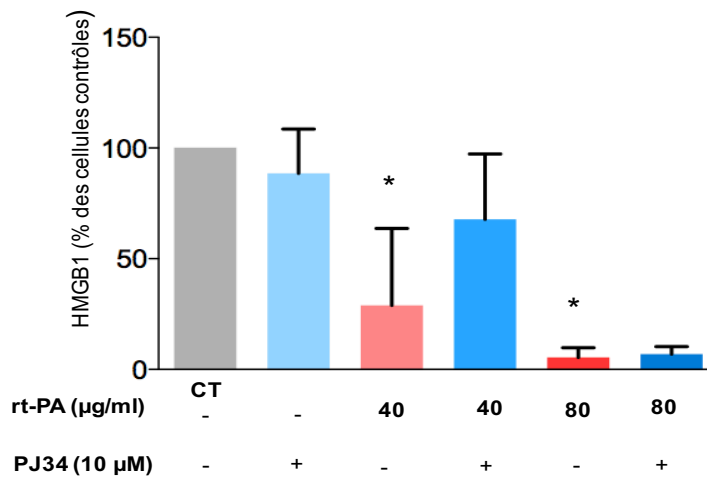


Figure 68 : Implication de la PARP dans les effets du rt-PA sur HMGB1 dans la fraction protéique soluble

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en pourcentage des cellules contrôles. n=5/condition ; CT= contrôles. * : P< 0,05 versus CT.

✚ Evaluation de l'expression de HMGB1 dans la fraction protéique insoluble

Dans la fraction protéique insoluble, le PJ34 ne modifie pas l'expression de HMGB1. Lorsque les cellules sont traitées par le rt-PA aux concentrations de 40 et 80 µg/ml les taux de HMGB1 augmentent par rapport à la condition contrôle (P<0,05). L'association du PJ34 que ce soit à la concentration de 40 µg/ml ou de 80 µg/ml de rt-PA ne bloque pas cet effet (figure 69).

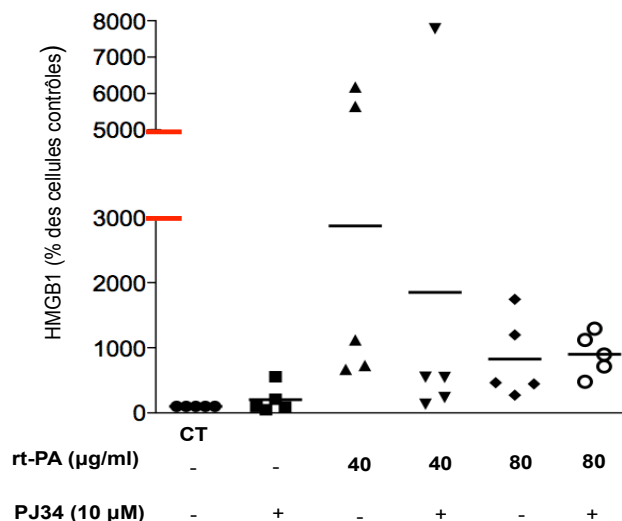


Figure 69 : Implication de la PARP dans les effets du rt-PA sur HMGB1 dans la fraction protéique insoluble

Les résultats (moyenne) sont exprimés en pourcentage des cellules contrôles. n=5/ condition ; CT= contrôle.

✚ Evaluation de la mort cellulaire

Le PJ34 n'exerce pas d'effet propre sur la mort cellulaire. Le traitement des cellules par le rt-PA aux concentrations de 40 et 80 µg/ml entraîne une augmentation de la mort cellulaire ($P < 0,05$) (figure 70). L'association du PJ34 au rt-PA quelle que soit la concentration ne modifie pas cet effet.

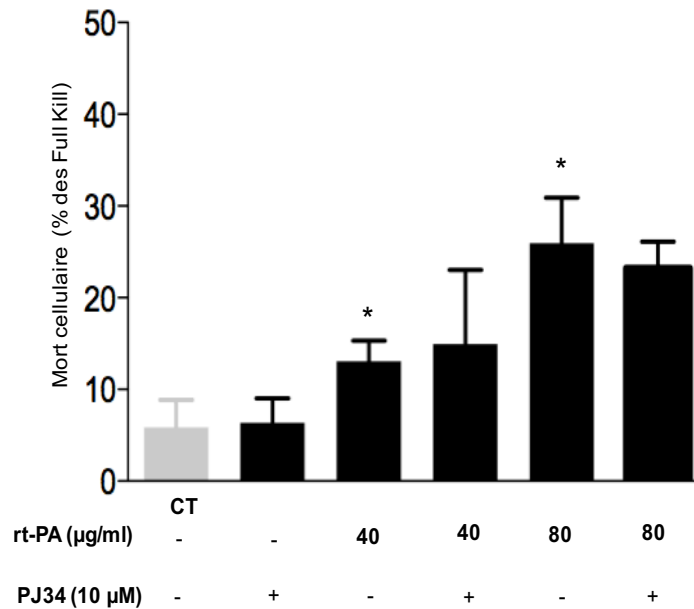


Figure 70 : Effet du rt-PA et du PJ34 sur la mort cellulaire

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en pourcentage des cellules contrôles. $n=5$ / condition. CT= contrôle (* : $P < 0,05$) versus contrôle.

e. Discussion

Au cours de cette expérience nous avons recherché si la PARP était impliquée dans la modification de l'état de solubilité de HMGB1 induite par le rt-PA dans les cellules bEnd.3. Pour cela, nous avons choisi d'associer le PJ34, un puissant inhibiteur de la PARP, au traitement par le rt-PA aux concentrations de 40 et 80 µg/ml.

Dans la présente étude, les deux concentrations de rt-PA ont entraîné une mortalité cellulaire qui est toujours associée au passage de HMGB1 de la fraction soluble à la fraction insoluble. Les liens de cause à effet entre ces deux phénomènes restent cependant à déterminer.

Le PJ34 tend à bloquer les effets du rt-PA 40 µg/ml sur le changement de fraction d'HMGB1. Néanmoins cette étude nécessite d'être complétée afin de confirmer une implication de la PARP dans les effets du rt-PA.

II. Etudes *in vivo*

Les données de la littérature rapportent une augmentation de la concentration plasmatique de HMGB1 chez les souris et les rats soumis à une ischémie cérébrale dans des modèles endovasculaires permanents et transitoires (Kim et al., 2006 ; Muhammad et al., 2008 ; Gong et al., 2014).

Parallèlement à nos études menées *in vitro*, nous avons examiné l'expression de HMGB1 dans des modèles d'ischémie cérébrale chez la souris.

Nous avons recherché dans un premier temps une sécrétion de HMGB1 dans le plasma de souris ischémisées traitées ou non par le rt-PA dans un modèle d'ischémie endovasculaire permanent. Dans un second temps, nous avons recherché les mêmes effets dans un modèle d'ischémie endovasculaire transitoire. Les ischémies ont été réalisées par notre technicien Bérard Coqueran. Le traitement des souris, leur euthanasie, ainsi que le prélèvement des échantillons de sang et de cerveau ont été réalisés par mes soins.

1. Etude de l'effet du rt-PA sur la sécrétion de HMGB1 dans un modèle d'ischémie cérébrale endovasculaire permanente

a. Protocole expérimental

Dans ce modèle, l'ischémie est induite par introduction d'un filament de nylon dans l'artère carotide commune (ACC) et avancé jusqu'à l'origine de l'artère cérébrale moyenne (ACM). Le filament est laissé en place jusqu'au moment de l'euthanasie afin d'entraîner l'occlusion de l'artère de façon permanente (voir paragraphe II.1.A Matériels et Methodes).

Le rt-PA (ou son solvant) est administré à la dose de 10 mg/kg, 6 heures après le début l'ischémie et les souris ont été euthanasiées 2 heures après ce traitement ou à 24 heures (figure 71). Les souris témoins opérées ont subi toute la chirurgie sauf l'ischémie.

Au moment de l'euthanasie des souris, des échantillons de sang ont été prélevés dans la veine cave inférieure sur citrate (0,130M). HMGB1 a été mesurée dans ces plasmas à l'aide d'un Kit ELISA. Les valeurs sont exprimées en ng/ml (n= 4-6/ groupe).

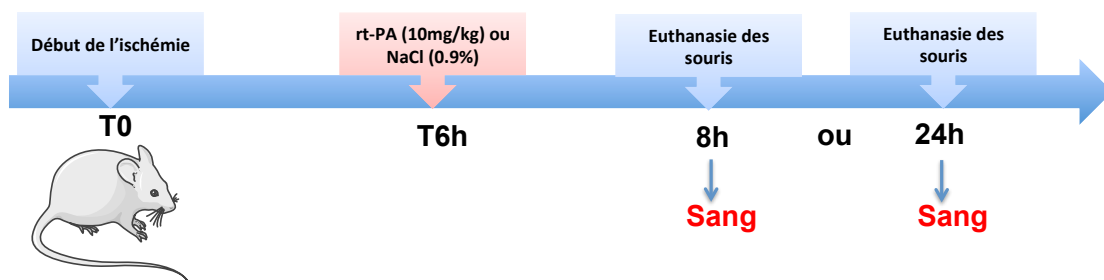


Figure 71 : Protocole d'étude de l'effet du rt-PA sur la sécrétion plasmatique de HMGB1 dans le modèle d'ischémie endovasculaire permanent

b. Résultats

Les résultats de l'ELISA montrent que les taux plasmatiques de HMGB1 dans le plasma ne sont augmentés ni après ischémie ni après traitement par le rt-PA par rapport aux souris témoins opérés, que ce soit à 8h (figure 72A) ou à 24 heures (figure 72B) post-ischémie.

Toutefois, il est à noter une très grande variabilité des valeurs plasmatiques de HMGB1 au sein des groupes en particulier chez les témoins opérés à 8 heures.

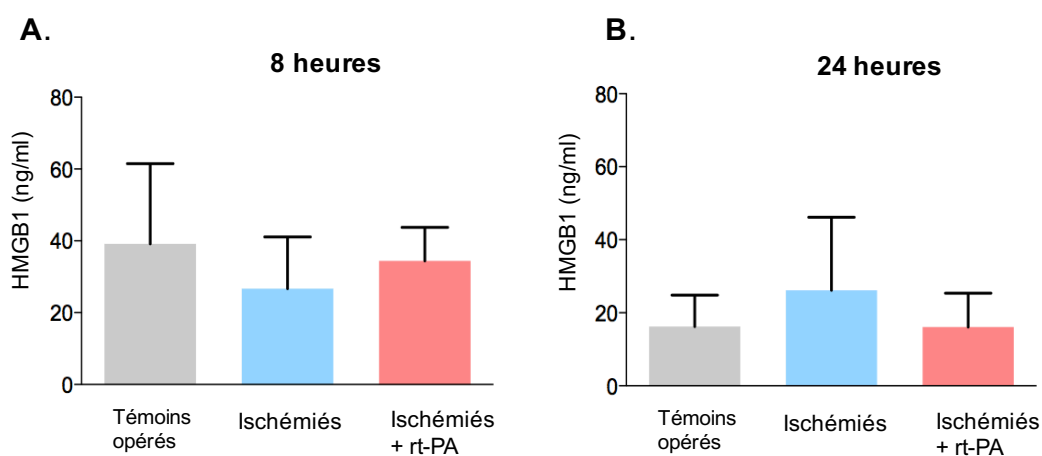


Figure 72 : Taux plasmatiques de HMGB1 après ischémie et traitement par le rt-PA dans un modèle d'ischémie endovasculaire permanent

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en ng/ml. n = (4-6) /groupe .

2. Etude de l'effet du rt-PA sur l'expression et la sécrétion de HMGB1 dans un modèle d'ischémie endovasculaire transitoire

a. Protocole expérimental

Dans le modèle d'ischémie transitoire, l'ACM est également occluse à l'aide d'un filament en nylon, mais qui est introduit par l'artère carotide externe (ACE), avant d'être dirigé vers l'ACC. Il est ensuite avancé *via* l'artère cérébrale interne (ACI) jusqu'à l'origine de l'ACM. Le filament est ensuite laissé en place pendant **1 heure** afin d'induire l'occlusion de l'artère de façon transitoire. Puis, le filament est retiré afin de permettre la reperfusion.

Le rt-PA est administré à la dose de 10 mg/kg, 4 heures après l'ischémie et les souris ont été euthanasiées 6 heures ou 24 heures après (figure 73). Les souris témoins opérées ont subi toute la chirurgie sauf l'ischémie.

Après euthanasie des souris, des échantillons de sang ont été prélevés dans la veine cave inférieure sur EDTA potassique (0,5M). HMGB1 a été mesurée dans ces plasmas à l'aide d'un Kit ELISA, les concentrations sont exprimées en ng/ml (n=6/ groupe).

L'expression de HMGB1 a également été évaluée par Western Blot dans le cortex ipsilatéral à la lésion. Les valeurs sont exprimées en unités arbitraires corrigées par l'actine (n=6/ groupe).

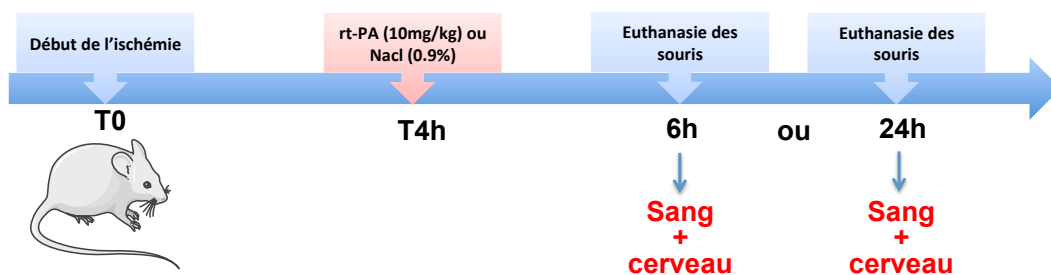


Figure 73 : Protocole d'étude de l'effet du rt-PA sur la sécrétion plasmatique et l'expression cérébrale de HMGB1

b. Résultats

Etude de l'effet du rt-PA sur la sécrétion de HMGB1 dans le plasma

Les taux plasmatiques de HMGB1 sont augmentés dans le plasma des souris ischémiées par rapport à ceux des témoins opérés à 6 heures ($P < 0,05$; figure 74A) et à 24 heures (augmentation de près de 50% ; $P < 0,05$; figure 74B). Cependant, le rt-PA ne modifie pas cette sécrétion plasmatique, que ce soit à 6 heures ou à 24 heures.

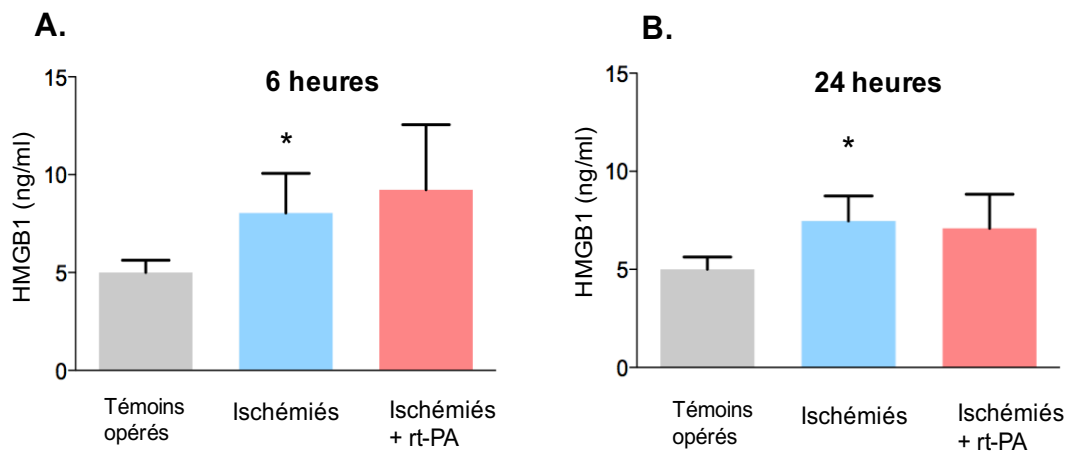


Figure 74 : Taux plasmatiques de HMGB1 après ischémie et traitement par le rt-PA dans un modèle d'ischémie endovasculaire transitoire

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en ng/ml. $n=6$ / groupe. $P < 0,05$ versus témoins opérés.

✚ Etude de l'effet du rt-PA sur l'expression de HMGB1 dans le cortex cérébral ipsilatéra

L'expression de HMGB1 dans le cortex ipsilatéral n'est modifiée ni par l'ischémie ni par le traitement par le rt-PA par rapport à celle des souris témoins opérées que ce soit à 6 heures ou 24 heures post-ischémie (figure 75). Cependant, une forte variabilité est observée au sein des groupes d'animaux ischémiés à 6 heures comme à 24 heures.

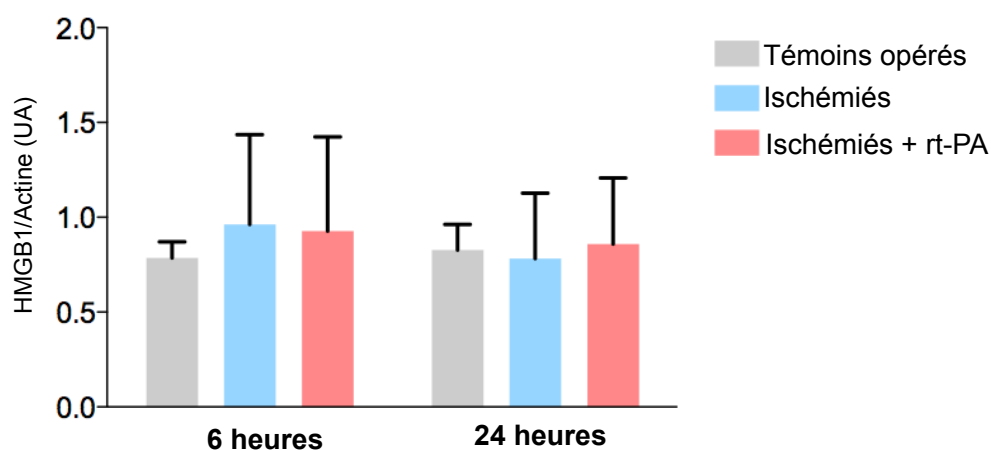


Figure 75 : Expression de HMGB1 dans le cortex ipsilatéral après ischémie et traitement par le rt-PA
Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en unités arbitraires. n=6 / groupe.

III. Discussion

Dans cette partie de mes travaux de thèse, je me suis intéressée à la protéine HMGB1 dans le but de mettre en évidence une éventuelle cascade rt-PA/PARP/HMGB1 dans les cellules bEnd.3 ; en effet, 1) il est aujourd'hui bien établi que le rt-PA est capable d'activer la PARP (Crome et al., 2007) (dans notre modèle de culture de bEnd.3, nous avons d'ailleurs montré que les effets du rt-PA sur la production de microvésicules endothéliales sont en partie médiés par la PARP (cf première partie des résultats) et 2) deux études ont montré que la poly(ADP-ribosyl)ation de HMGB1 favorisait sa sécrétion par les fibroblastes (Ditsworth et al., 2007 ; Davis et al., 2012). Nous avons donc fait l'hypothèse que le rt-PA pourrait entraîner une sécrétion de HMGB1 via la PARP dans nos cellules bEnd.3.

La protéine HMGB1 est une protéine située majoritairement au niveau nucléaire, elle est cependant très rapidement mobilisable. En effet, lorsque les cellules sont en nécrose, activées ou en état d'inflammation, HMGB1 est sécrétée dans le milieu extracellulaire soit par un mécanisme de sécrétion active soit par libération passive dans le cas d'une nécrose (voir pour revue Yang et al., 2005 ; Kang et al., 2014). De même, l'apoptose de différentes cellules (HeLa, Jurkat et Panc-1) induite par l'association du TNF et du cycloheximide, est aussi associée à une sécrétion de HMGB1, caspases-dépendante dans ce cas (Bell et al., 2006).

Contrairement à notre hypothèse, nos résultats *in vitro* montrent que le rt-PA n'induit pas la sécrétion de HMGB1 par les cellules bEnd.3 ; en revanche, il modifie son état de solubilité au sein de la cellule. Ainsi après traitement par le rt-PA, HMGB1 passe d'une fraction protéique soluble à une fraction protéique insoluble. Cette fraction insoluble, riche en histone, pourrait correspondre à une fraction nucléaire, ce qui suggérerait que le rt-PA maintient HMGB1 dans le noyau.

Il faut remarquer que l'effet du rt-PA sur HMGB1 dans nos conditions est toujours associé à une augmentation de la mortalité des cellules bEnd.3. Il serait intéressant de préciser le type de mort cellulaire induite par le rt-PA dans nos conditions et de rechercher notamment la présence d'une mort apoptotique. En effet, contrairement aux résultats de Bell et al. cités plus haut, dans l'étude de Scaffidi et al. (2002), les cellules HeLa soumises à un stimulus pro-apoptotique (association du TNF et du cycloheximide) ne secrètent pas HMGB1, qui reste localisée au niveau nucléaire (Scaffidi et al., 2002). Les auteurs confirmaient ce résultat grâce à une expérience d'immunocytologie : après perméabilisation des membranes cellulaires puis traitement pro-apoptotique, HMGB1 demeurait

bien au niveau nucléaire. Une telle confirmation n'a pu être obtenue dans nos conditions, en raison des profondes modifications morphologiques des cellules bEnd.3 après traitement par le rt-PA et perméabilisation. De même, nous avons réalisé sans succès des expériences de fractionnement cellulaire à l'aide de kits commercialisés afin de confirmer la localisation nucléaire de HMGB1 après traitement par le rt-PA (résultats non présentés) ; le contrôle du fractionnement avec différents marqueurs (histone pour la fraction nucléaire, actine pour la fraction cytosolique...) ont mis en évidence que dans nos conditions les fractions obtenues n'étaient pas pures.

Dans la littérature, plusieurs études montrent que le rt-PA est capable d'induire l'apoptose :

-1) Liu et collaborateurs (2004) ont montré que le t-PA augmente l'activité apoptotique au niveau des neurones et des vaisseaux dans un modèle d'ischémie endovasculaire chez la souris (Liu et al., 2004). Dans cette même étude, le t-PA (20 µg/ml) potentialise *in vitro* l'activité apoptotique sur a) des cultures de neurones traités par le NMDA ; b) des cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales murines soumises à des conditions d'hypoxie. Cette activité apoptotique impliquerait non seulement la voie des caspases, mais également facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor).

-2) Yoeruek et al. (2008) ont montré que les cellules endothéliales humaines de cornée (HCEC, Human Corneal Endothelial Cells) traitées par le rt-PA présentaient des taux élevés de corps apoptotiques (Yoeruek et al., 2008). Toutefois, cet effet est observé à des concentrations plus élevées que celles que nous avons utilisées dans nos études (à partir de 100 µg/ml).

Dans la suite de nos expérimentations, nous avons recherché les interactions rt-PA /PARP /HMGB1 dans nos cellules bEnd.3. Cependant, nos précédents résultats étant en contradiction avec notre hypothèse initiale (*ie* une activation de la PARP par le rt-PA entraînant la poly(ADP-ribosyl)ation de HMGB1 et sa sécrétion), nous avons recherché la contribution de la PARP dans le changement de l'état de solubilité de HMGB1 induit par le rt-PA dans les cellules bEnd.3. En effet, la PARP étant capable de poly(ADP-ribosyler le facteur AIF, ce qui provoque sa translocation vers le noyau et l'induction d'une apoptose caspase-indépendante (Yu et al., 2006 ; Fatokun et al., 2014), on peut se demander si ce type d'apoptose pourrait, comme l'apoptose caspase-dépendante induite par le TNF et le cycloheximide dans l'étude de Scaffidi et al., conduire à la rétention de HMGB1 dans le noyau. L'association d'un inhibiteur de PARP au rt-PA ne modifie pas significativement la localisation de HMGB1 au sein des cellules bEnd.3, mais une tendance est néanmoins observée avec la concentration de 40 µg/ml de rt-PA.

Hormis la poly(ADP-ribosyl)ation, d'autres modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation peuvent modifier la distribution cellulaire de HMGB1, ainsi que sa sécrétion (Bonaldi et al, 2003). Les travaux de Scaffidi et al. (2002) ne montrent pas de modification de l'état d'acétylation de HMGB1 dans les cellules Hela apoptotiques ; par contre, ils mettent en évidence que c'est la desacétylation des histones dans ces conditions d'apoptose qui est responsable de la liaison de HMGB1 à la chromatine.

Pour compléter nos études, il serait intéressant de rechercher après traitement de nos cellules par le rt-PA non seulement la survenue d'une mort de type apoptotique (*via* la mise en évidence d'une activation des caspases ou de la translocation d'AIF) mais aussi l'état d'acétylation de la chromatine.

Parallèlement à ces études *in vitro*, nous avons recherché dans nos modèles d'ischémie cérébrale réalisés chez la souris une sécrétion plasmatique de HMGB1 après ischémie et traitement par le rt-PA. Nous avons tout d'abord choisi d'utiliser un modèle d'ischémie endovasculaire permanent, l'effet délétère du rt-PA dans ce modèle étant très bien caractérisé au laboratoire : son administration tardive (6 heures post-ischémie) augmente la dégradation des composants de la BHE (protéines de jonction serrées (ZO-1, Claudine 5) et adhérentes (VE-cadherine)), les transformations hémorragiques et le déficit fonctionnel (Haddad et al., 2013 ; Teng et al., 2013). Le dosage par ELISA de HMGB1 dans le plasma des souris ne montre pas d'augmentation de cette protéine ni après ischémie, ni après traitement par le rt-PA, que ce soit 2 heures ou 18 heures après administration du thrombolytique (il est à noter que le groupe de souris « témoins opérés » euthanasiés à 8 heures présente des taux plasmatiques de HMGB1 élevés, suggérant un effet important de la chirurgie à ce temps). Très peu d'études ont mis en évidence une sécrétion de HMGB1 dans les modèles d'ischémie permanente. Ainsi, dans un modèle par électrocoagulation de l'ACM, Muhammad et al. ont montré une augmentation sérique de HMGB1 uniquement à 4 heures post-ischémie (Muhammad et al., 2008) alors que Liesz et al. n'ont pas mis en évidence de sécrétion de HMGB1 dans le sérum des souris ischémisées, que ce soit à 30 minutes, 2 heures, 24 heures ou 72 heures post-ischémie (Liesz et al., 2015). Par contre, dans cette dernière étude, Liesz et collaborateurs montraient que les taux sériques de HMGB1 étaient augmentés à ces mêmes temps dans un modèle d'ischémie endovasculaire transitoire (90 min d'occlusion) (Liesz et al., 2015). D'autres études ayant également mis en évidence une sécrétion de HMGB1 dans le sérum, le plasma ou le LCR dans des modèles d'ischémie cérébrale endovasculaire transitoire (Kim *et al.*, 2006, 2008 ; Zhang *et al.*, 2011 ; Fujioka *et al.*, 2012 ; Shin *et al.*, 2014 ; Gong *et al.*, 2014), nous avons décidé de reprendre nos études dans un modèle d'ischémie transitoire (1 heure d'occlusion de l'ACM par voie

endovasculaire). Par ailleurs, dans l'étude précédente, nous avons utilisé de la kétamine (associée à la xylazine), pour ses propriétés anesthésiques. Or des études récentes rapportent que la kétamine est capable de bloquer la sécrétion de HMGB1 *in vitro* par les cellules HUVEC ou les macrophages traités par le LPS ainsi qu'*in vivo* dans un modèle de septicémie chez le rat par ligature du caecum (Zhang et al., 2014b ; Liu et al., 2016). De plus, la kétamine s'oppose à différents effets de HMGB1 sur les cellules endothéliales (rupture de la BHE, baisse de l'expression des molécules d'adhésion, migration et adhésion des neutrophiles) (Zhang et al., 2014b ; Liu et al., 2016). Nous avons donc décidé pour cette nouvelle étude dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire d'anesthésier les souris avec l'isoflurane.

Dans ces conditions, nous avons mis en évidence une augmentation des taux plasmatiques de HMGB1 6 et 24 heures après le début de l'ischémie. Toutefois, le rt-PA ne potentialise pas cet effet. Ce résultat est en accord avec ceux de Nakano et collaborateurs qui, dans un modèle d'ischémie transitoire (4 heures d'occlusion), n'ont pas mis en évidence d'effet du t-PA sur la sécrétion plasmatique de HMGB1 à 24 heures (Nakano et al., 2015). En ce qui concerne l'expression de HMGB1 au niveau du parenchyme cérébral après ischémie, des études montrent une diminution à partir de 12 heures post-ischémie, puis un retour aux taux de base 3 jours après (Kim et al., 2006, 2008 ; Gong et al., 2014). Nos résultats ne montrent aucune modification de l'expression de HMGB1 dans le tissu cérébral du côté ipsilatéral à la lésion, que ce soit après l'ischémie seule ou associée au traitement par le rt-PA. Qiu et collaborateurs n'ont également pas mis en évidence de changement de l'expression tissulaire de HMGB1 à 4 heures, alors que dans le LCR une augmentation importante était observée (Qiu et al., 2008). Il serait donc intéressant de réaliser une mesure de HMGB1 dans le LCR.

Pour résumer nos principaux résultats concernant HMGB1, nous avons montré *in vitro* que le traitement des cellules bEnd.3 par le rt-PA aux concentrations de 40 et 80 µg/ml pendant 24 heures n'entraîne pas la sécrétion de HMGB1 dans le milieu de culture. *In vivo*, le rt-PA ne potentialise pas la sécrétion plasmatique de HMGB1 induite par l'ischémie dans le modèle d'ischémie endovasculaire transitoire. Même s'il est très délicat de comparer des études *in vivo* et *in vitro*, nous pouvons tout de même conclure que ces deux résultats vont dans le même sens.

IV. Etude complémentaire : Recherche de l'effet du rt-PA sur la sécrétion d'un autre facteur endothélial : le VEGF

Au cours de mes travaux de thèse, je me suis également intéressée à un autre facteur sécrété par les cellules endothéliales : le VEGF-A (vasculaire endothelial growth factor A). Le VEGF-A est un facteur de croissance aux propriétés angiogéniques. Il entraîne la prolifération, la migration et augmente la perméabilité des cellules endothéliales (Senger et al., 1996 ; Hermann et Zechariah, 2009). Au cours de l'ischémie cérébrale, l'expression du VEGF-A est augmentée dans les neurones mais également au niveau des constituants de la BHE (cellules endothéliales, astrocytes, péricytes) (Lennmyr et al., 1998 ; Kanazawa et al., 2011). Ces cellules sont capables de sécréter le VEGF dans des conditions d'hypoxie (Ijichi et al., 1995 ; Nakimi et al., 1995 ; Ogunshola et al., 2002). Une fois sécrété, le VEGF interagit avec ses récepteurs VEGFR1 ou Flt-1 (Fms-like Tyrosine Kinase 1) et VEGFR2 ou Flk-1 (Fetal Liver Kinase 1), exprimés principalement par les cellules endothéliales.

Au cours des phases tardives de l'ischémie cérébrale, le VEGF-A exerce un effet bénéfique en stimulant notamment l'angiogénèse, la neurogénèse (voir pour revue Greenberg et Jin, 2013). Cependant, au cours de la phase aiguë de l'ischémie, le VEGF-A exerce un effet délétère en augmentant la perméabilité de la BHE et les transformations hémorragiques (Zhang et al., 2000 ; Chi et al., 2005). En effet, il a été montré que l'administration du VEGF-A dans les 24 heures qui suivent l'ischémie cérébrale entraîne chez le rongeur une augmentation du volume de lésion, une rupture de la BHE et l'apparition de TH (Zhang et al., 2000 ; Abumiya et al., 2005). De plus, d'autres études montrent que le VEGF-A est impliqué dans les transformations hémorragiques induites par le rt-PA dans des modèles d'ischémie cérébrale chez le rongeur (Kanazawa et al., 2011 ; Won et al., 2014). L'utilisation d'anticorps anti-VEGF-A diminue l'activation des MMP-9, la dégradation des composants de la BHE tels que le collagène de type IV et l'EBA (Endothelial Barrier Antigen) et réduit les transformations hémorragiques (Kanazawa et al., 2011). Récemment, Suzuki et collaborateurs ont montré que les cellules bEnd.3 soumises à des conditions OGD puis traitées par le rt-PA présentaient une augmentation de l'expression du VEGF-A ainsi qu'une phosphorylation de son récepteur VEGFR-2, et que cet effet impliquerait le récepteur LRP (Suzuki et al., 2015). Ainsi, nous avons examiné si dans notre modèle le rt-PA augmentait la sécrétion de VEGF-A par les cellules bEnd.3. Par ailleurs, des interactions PARP-VEGF ont été décrites dans la littérature. Dans un modèle d'ischémie du muscle squelettique, il a été montré une diminution de l'expression du VEGF chez les souris traitées par le PJ34 et chez les souris PARP^{-/-} (Hua et al., 2005). Dans une autre étude, il a été montré dans un

modèle de pancréatite que l'inhibition de la PARP par le 3 amino-benzamide réduisait considérablement l'expression tissulaire du VEGF (Mazzon et al., 2006). Wei et collaborateurs ont montré que l'utilisation de siRNA dirigés contre la PARP bloquait l'expression cellulaire et la sécrétion du VEGF par les cellules humaines cancéreuses de l'ovaire (Wei et al., 2016). De plus, l'inhibition de la PARP bloquerait la prolifération et la migration des cellules HUVEC induite par le VEGF (Pyriochou et al., 2008, Rajesh et al., 2006a et 2006b).

Dans ce contexte, nous nous sommes demandés si le rt-PA entraînait une sécrétion du VEGF-A par les cellules bEnd.3, et si cet effet impliquait la PARP. Nous avons également recherché l'effet du rt-PA sur la sécrétion de VEGF-A dans un modèle d'ischémie chez la souris.

1. Etude *in vitro* de l'effet du rt-PA sur l'expression et la sécrétion de VEGF-A

a. Protocole expérimental

Nous avons évalué la sécrétion de VEGF-A dans les surnageants des cellules traitées par la gamme de rt-PA (20, 40, 80 µg/ml, lot 2 : #601772) utilisé pour l'étude de HMGB1 (voir protocole expérience I.3.A). Pour cela, une technique de Western Blot a été réalisée avec un anticorps anti-VEGF-A (Anticorps de lapin anti-VEGF-A ; sc-152 ; Santa Cruz) (n=6/condition).

b. Résultats

Le Western Blot des surnageants a révélé la présence de deux bandes qui pourraient correspondre au VEGF-A. Nous avons quantifié la bande la plus intense qui migre avec une masse moléculaire de 30 kDa et qui pourrait correspondre au VEGF-A. (figure 76)

Les résultats de la quantification montrent que le rt-PA à la concentration de 20 µg/ml ne modifie pas le taux de VEGF-A dans le surnageant par rapport aux contrôles. Aux concentrations de 40 et 80 µg/ml, le rt-PA entraîne une sécrétion de VEGF-A qui est statistiquement significative ($P < 0,05$) (figure 76).

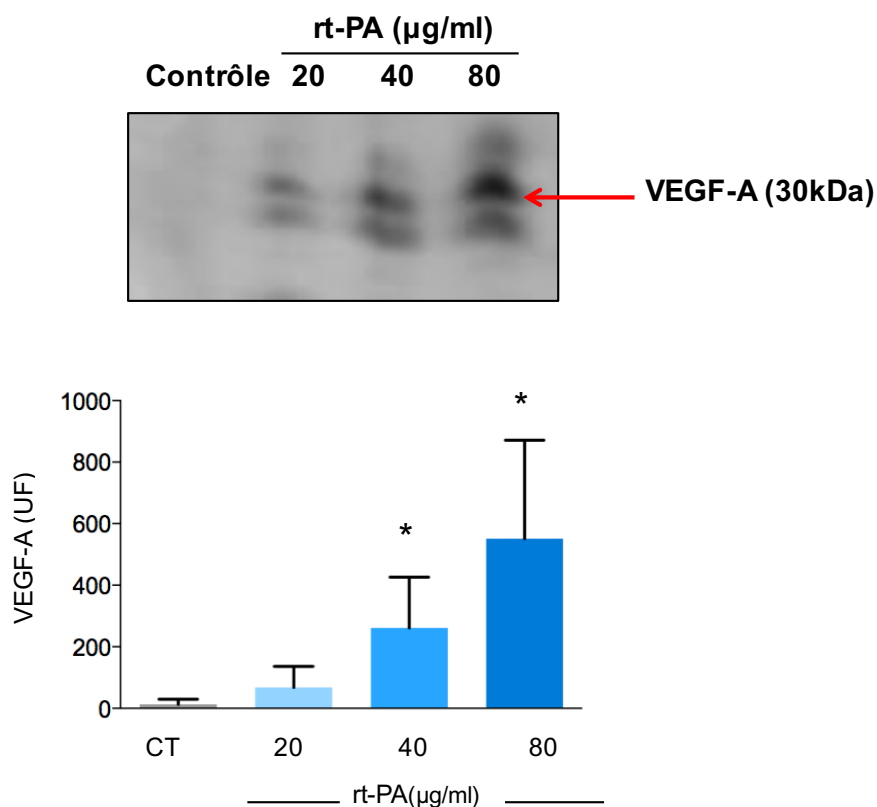


Figure 76 : Effet d'une gamme de rt-PA sur la sécrétion de VEGF-A par les cellules bEnd.3
 Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en unités de fluorescence (UF). CT= contrôle. n=6/condition. * :P<0,05 vs CT.

2. Etude de l'implication de la PARP dans la sécrétion de VEGF-A par les cellules bEnd.3

A) Evaluation de la sécrétion du VEGF-A par Western Blot

a. Protocole expérimental

Les cellules ont étéensemencées comme précédemment dans des plaques de 24 puits en présence de SVF. Vingt-quatre heures après, elles ont été traitées par le rt-PA à la concentration de 40 µg/ml associé ou non au PJ34 (10µM) dans du milieu sans SVF. Le PJ34 a été additionné dans le milieu 1 heure avant le rt-PA et l'inhibition a été maintenue pendant toute la durée du traitement, c'est-à-dire 24 heures. Les cellules contrôles n'ont subi qu'un changement de milieu à T-1h et T0 (figure 77). A la fin du traitement, les surnageants ont été récupérés puis concentrés dans des tubes de concentration et le VEGF-A a été mesuré par une technique de Western Blot. Les taux de VEGF-A sont exprimés en unité de fluorescence (n=5/condition).

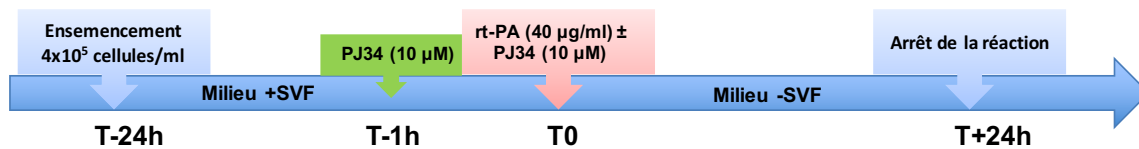


Figure 77 : Protocole de traitement des cellules par le rt-PA associées ou non au PJ34

b. Résultats

Le Western Blot a révélé comme précédemment une bande qui migre à une masse moléculaire de 30 kDa, qui correspondrait au VEGF-A (figure 78).

La quantification de cette bande montre que le PJ34 seul n'a pas d'effet propre sur la sécrétion de VEGF-A par les cellules bEnd.3. Le rt-PA à la concentration de 40 μg/ml tend à augmenter la sécrétion de VEGF-A dans le surnageant (P=0,059). Le PJ34 ne modifie pas cet effet (figure 78).

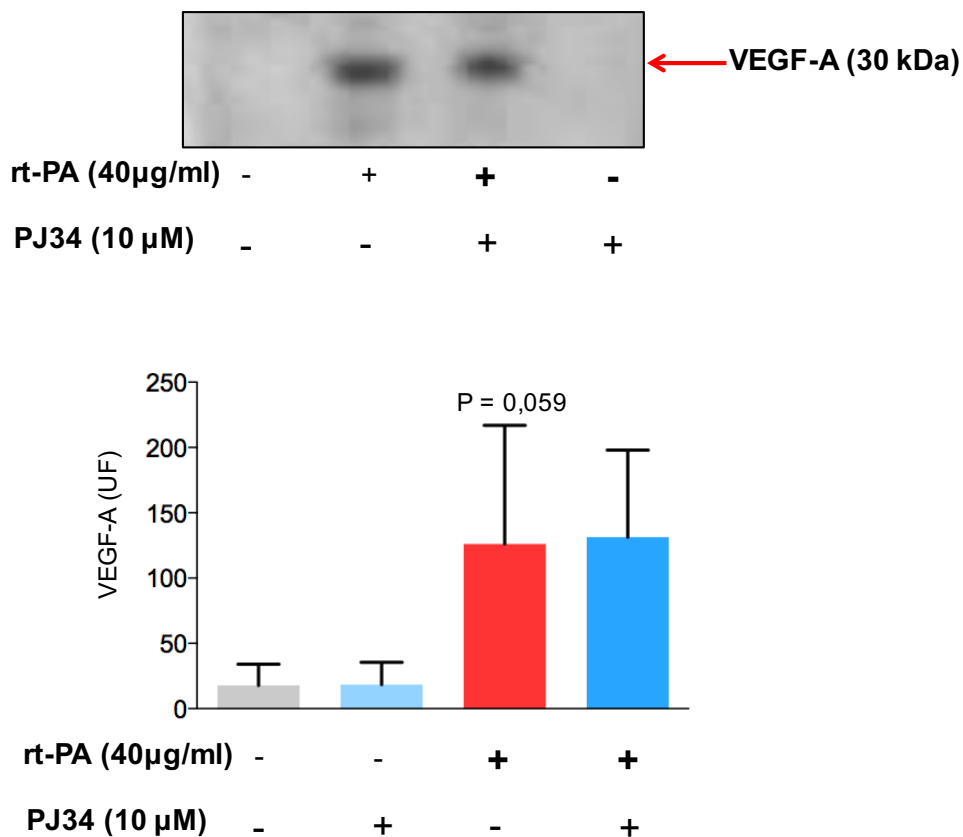


Figure 78 : Implication de la PARP dans la sécrétion du VEGF-A par les cellules bEnd.3 après traitement par le rt-PA

Les résultats (moyenne ± sd) sont exprimés en unité de fluorescence (UF). n=5/condition.

B) Evaluation de la sécrétion de VEGF-A dans les surnageants concentrés par une technique d'ELISA

a. Protocole expérimental

Dans cette nouvelle expérience, nous avons préparé de nouveaux échantillons, en stimulant les cellules comme dans le précédent protocole.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits en présence de SVF. Vingt-quatre heures après, elles ont été traitées par le rt-PA à la concentration de 40 µg/ml associé ou non au PJ34 (10 µM) dans du milieu sans SVF. Le PJ34 a été additionné dans le milieu 1 heure avant le rt-PA et l'inhibition a été maintenue pendant toute la durée du traitement, c'est-à-dire 24 heures. Les cellules contrôles n'ont subi qu'un changement de milieu à T-1h et T0.

A la fin du traitement, les surnageants ont été récupérés, puis concentrés dans des tubes de concentration et le VEGF-A a été mesuré par une technique ELISA à l'aide d'un kit (Quantikine ELISA mouse VEGF, MMV00, R et D system) (n=4/condition).

b. Résultats

Les résultats de l'ELISA montrent que le rt-PA à la concentration de 40 µg/ml n'augmente pas les taux de VEGF-A dans les surnageants et l'association au PJ34 n'a pas d'effet non plus (n=4/ condition) (figure 79).

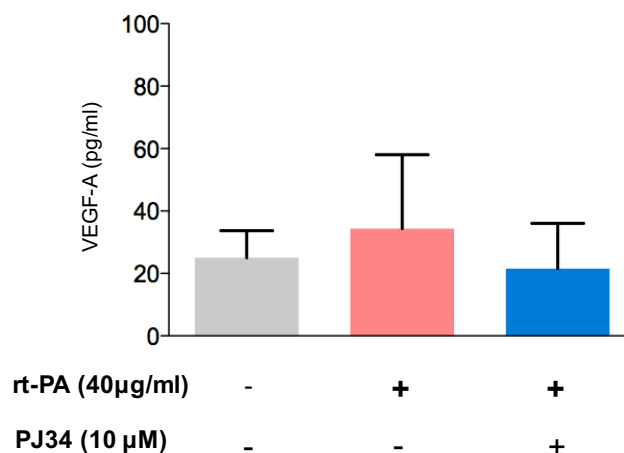


Figure 79 : Implication de la PARP dans la sécrétion de VEGF-A par les cellules bEnd.3 après traitement par le rt-PA

Les résultats (moyenne ± sd) sont exprimés en pg/ml. n=4/condition.

3. Evaluation de la sécrétion plasmatique du VEGF-A après ischémie cérébrale et traitement par le rt-PA

a. Protocole expérimental

Le VEGF-A a été dosé à l'aide d'un kit ELISA, dans les plasmas des souris utilisées l'étude de HMGB1 dans le modèle d'ischémie endovasculaire transitoire (1 heure d'occlusion) (voir protocole expérience II.2, études *in vivo*). Nous avons évalué la sécrétion de VEGF-A après ischémie et traitement par le rt-PA à 6 heures et à 24 heures.

b. Résultats

Les résultats du dosage révèlent que les taux plasmatiques de VEGF-A ne sont pas modifiés après ischémie par rapport aux témoins opérés. L'administration de rt-PA n'a également aucun effet que ce soit à 6 ou à 24 heures (n= 5-6 /groupe) (figure 80).

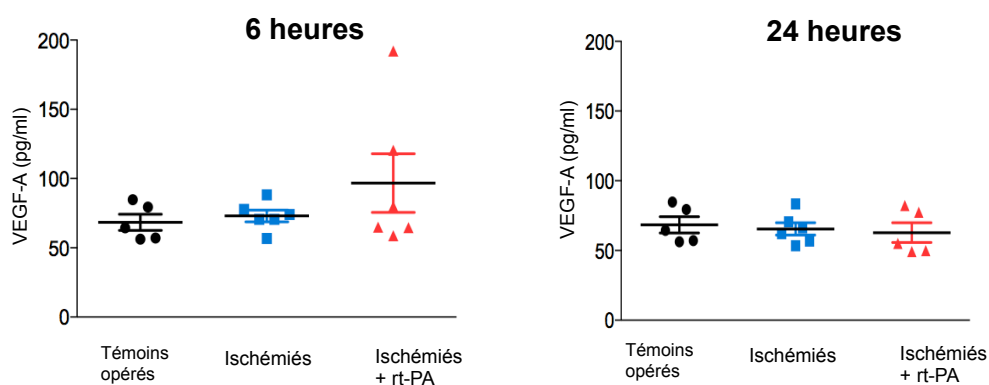


Figure 80 : Evaluation de la sécrétion plasmatique de VEGF-A par une technique d'ELISA après ischémie et traitement par le rt-PA

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en pg/ml. n=5-6/groupe.

4. Discussion

Le VEGF-A est un des facteurs angiogéniques les plus étudiés dans la famille du VEGF qui inclut entre autres le VEGF-B, -C, -D, le PlGF (Placental Growth Factor). Le VEGF-A se présente sous 4 principales isoformes chez l'homme : les isoformes 121, 165, 189 et 206 qui contiennent respectivement 121, 156, 189 et 206 acides aminés dans leur séquence. Les isoformes 121 et 165, qui correspondent aux isoformes 120 et 164 chez le rongeur, sont les plus caractérisées au cours de l'ischémie cérébrale.

Nos premières études de Western Blot sur les surnageants concentrés des cellules bEnd.3 montrent que le traitement de ces cellules par le rt-PA entraîne une sécrétion de VEGF-A. Cet effet est statistiquement significatif aux concentrations de 40 et 80 $\mu\text{g/ml}$. Pour réaliser cette technique de Western Blot, nous avons utilisé un anticorps anti-VEGF-A qui reconnaît les isoformes 121, 165 et 189 chez l'homme et le rongeur. Les indications de la fiche technique du fournisseur indiquent la détection d'un monomère qui migre à 21 kDa et d'un dimère à 42 kDa. Nos résultats de Western Blot ont toutefois révélé deux bandes qui migrent approximativement à 30 kDa. Après revue de la littérature, nous avons constaté des résultats très variables selon les études en ce qui concerne les masses moléculaires aux quelles migrent les différentes isoformes du VEGF-A. Par exemple, dans l'étude de Soh et collaborateurs il a été mis évidence avec le même anticorps que celui que nous avons utilisé, trois bandes dans des lysats des cellules HUVEC et d'autres lignées cellulaires, ce qui correspondrait aux trois isoformes 121, 165, 189 ; les poids moléculaires de ces bandes ne sont cependant pas précisés (Soh et al., 1997). Kanazawa et collaborateurs ont quant à eux identifié, toujours avec le même anticorps, dans du tissu cérébral de rat, deux bandes : l'isoforme 165 qui migrerait à 46 kDa et l'isoforme 121 qui migrerait à 38 kDa (Kanazawa et al., 2011). Enfin, dans une autre étude il a été mis en évidence dans des astrocytes une bande qui migre à 31 kDa et correspondrait au VEGF-A (Li et al., 2014). Au vu de ces données, nous avons décidé de quantifier les deux bandes obtenues en Western Blot. Les résultats de quantification des deux bandes allant dans le même sens, nous avons décidé de ne présenter que la quantification de la bande la plus intense, qui migre à 30 kDa et qui pourrait correspondre au VEGF-A. En ce qui concerne le type d'isoforme auquel correspondrait cette bande, d'autres expériences seraient nécessaires afin de le préciser, notamment le dépôt de protéines recombinantes suivi d'un Western Blot.

Dans une seconde étude, nous avons cherché à confirmer la sécrétion de VEGF-A induite par le rt-PA à la concentration 40 $\mu\text{g/ml}$ par un dosage ELISA, mais nous n'avons malheureusement pas obtenu le même résultat qu'avec le Western Blot. Cette discordance des résultats pourrait être liée à une

variabilité de l'effet à la concentration de 40 µg/ml, comme observée avec HMGB1, ou bien à un manque de spécificité de la technique de Western Blot que nous avons utilisée.

Toutefois, nos résultats de Western Blot sont en accord avec ceux de Won et collaborateurs qui montrent par la même technique une sécrétion de VEGF-A par les cellules bEnd.3 soumises à des conditions de déprivation d'oxygène et de glucose (OGD) associées au rt-PA à la concentration de 20 µg/ml (Won et al., 2014). La masse moléculaire des bandes obtenues en Western Blot ainsi que l'anticorps utilisé ne sont pas précisés dans cette étude. Néanmoins, le Western Blot met en évidence une bande double dans les surnageants, comme nous avons pu l'observer dans nos expériences.

Par ailleurs, nous avons recherché si la PARP était impliquée dans cette sécrétion du VEGF-A induite par le rt-PA. Dans notre modèle, nous avons retrouvé une augmentation de la sécrétion du VEGF-A après traitement par le rt-PA proche de la significativité ($P = 0,059$) mais aucun effet du PJ34, suggérant l'absence de contribution de la PARP à la sécrétion du VEGF induite par le rt-PA.

Des études montrant que le VEGF intervient en amont de la PARP en augmentant son expression protéique et ses ARN messagers dans les cellules HUVEC (Hörmann et al., 2011 ; Mey et al., 2013), il serait intéressant de tester cette cascade dans nos cellules après traitement par le rt-PA.

Enfin, nos résultats *in vivo* montrent que ni l'ischémie ni le rt-PA n'entraînent de sécrétion plasmatique de VEGF-A dans notre modèle chez la souris. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Chaitanya et collaborateurs qui montrent une augmentation des taux sériques des isoformes 164/165 et 165b du VEGF-A à 24 heures dans un modèle d'ischémie transitoire chez la souris (2 heures d'occlusion, Chaitanya et al., 2013). Il est à noter qu'il a également été rapporté en clinique une augmentation des taux plasmatiques de VEGF-A chez les patients victimes d'AVC (Slevin et al., 2000 ; Lee et al., 2010b ; Matsuo et al., 2013). En ce qui concerne l'effet du rt-PA, des études ont mis en évidence après thrombolyse expérimentale une augmentation de l'expression du VEGF-A dans le tissu cérébral (Kanazawa et al., 2011 ; Won et al., 2014), mais aucune étude n'a, à ce jour, recherché une éventuelle modification de VEGF au niveau plasmatique.

Pour résumer nos principaux résultats sur le VEGF-A, nous avons mis en évidence une sécrétion de VEGF-A dans le surnageant des cellules bEnd.3 traitées par le rt-PA aux concentrations de 40 et 80 µg/ml, en utilisant une technique de Western Blot. Nous n'avons pas mis en évidence l'implication de la PARP dans cet effet. *In vivo*, l'ischémie et le rt-PA n'augmentent pas les taux plasmatiques de VEGF-A dans nos modèles.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de mes travaux de thèse a été de préciser les mécanismes impliqués dans les effets délétères du rt-PA en particulier, sa toxicité vasculaire et endothéliale. Une meilleure compréhension des mécanismes qui sous-tendent ces effets délétères permettra à terme : (1) l'augmentation de la fenêtre thérapeutique du rt-PA, (2) l'amélioration de l'efficacité de la thrombolyse, (3) la diminution du risque de TH.

Dans une première partie de mes travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à la production *in vitro* de microvésicules endothéliales. Nous avons pu mettre en évidence que le rt-PA augmentait la libération des MVE par les cellules bEnd.3 par un mécanisme impliquant la plasmine, la PARP et la p38-MAPK.

Comme nous l'avons évoqué plus haut, ces travaux nécessitent d'être complétés par des expériences *in vitro* afin de déterminer notamment le rôle de ces MVE dans la toxicité endothéliale du rt-PA. En outre, d'autres travaux pourraient être menés *in vivo*, en particulier l'étude de ces MVE dans des modèles d'ischémie cérébrale. En effet, exceptée l'étude de Schock et al. (2014), il n'a jamais été mis en évidence de libération de MVE dans un modèle d'ischémie cérébrale. De plus, aucune étude ne s'est intéressée à l'effet d'une administration tardive de rt-PA sur leur libération. Il serait donc particulièrement intéressant de rechercher la libération de MVE dans nos modèles d'ischémie (modèle par injection de thrombine ou modèle endovasculaire) associée ou non à un traitement par le rt-PA.

Par la suite, si une libération de microvésicules est mise en évidence après thrombolyse par le rt-PA, il serait intéressant d'étudier leurs propriétés ainsi que leurs rôles dans les effets délétères du rt-PA en particulier dans la survenue des transformations hémorragiques. Il est à noter que dans une étude clinique, il a été suggéré une association possible entre la présence de certaines microvésicules endothéliales (VE-cadhérine_endogline) et la survenue de transformations hémorragiques (Simak et al., 2006).

Afin de vérifier cette hypothèse plusieurs études peuvent être envisagées :

1) Isoler des MVE produites *in vitro* après traitement de cellules endothéliales par le rt-PA et les administrer chez les souris ischémiées afin d'examiner si : 1) elles augmentent la perméabilité de la BHE, 2) elles aggravent les TH après ischémie puis thrombolyse par le rt-PA. Il est à noter que Pan et

collaborateurs ont rapporté que les MVE libérées dans les conditions de déprivation d'oxygène et de glucose (OGD) augmentaient non seulement la perméabilité de la BHE mais également le volume de lésion et le déficit neurologique chez les souris ischémiées (Pan et al., 2016).

2) Inversement, des MVE pourraient être isolées du sang de souris ischémiées après traitement ou non par le rt-PA et leurs effets étudiés sur les cellules endothéliales. Ainsi, une étude de Edrissi et collaborateurs a montré que les MVE isolées du sang de rat ischémiés modifient la perméabilité des cellules endothéliales (Edrissi et al., 2016).

Dans la deuxième partie de mes travaux de thèse, nous avons étudié la protéine HMGB1, une DAMPs jouant le rôle de cytokine inflammatoire au cours de l'ischémie cérébrale.

Contrairement à nos hypothèses de départ, *in vitro* le rt-PA n'a pas entraîné la sécrétion de HMGB1 par les cellules bEnd.3, et *in vivo* il n'a pas augmenté les concentrations plasmatiques de cette protéine à la suite de l'ischémie. De façon surprenante, nos résultats *in vitro* suggèrent au contraire que le rt-PA pourrait maintenir HMGB1 au niveau nucléaire, et que la PARP pourrait être impliquée dans cet effet, même si cela reste à confirmer.

La poursuite de ce travail serait de rechercher les conséquences de ce changement de l'état de solubilité de HMGB1. Deux types d'effets peuvent être envisagés :

Une conséquence délétère : il est bien établi qu'à l'état normal, HMGB1 au niveau nucléaire joue un rôle dans le maintien de l'architecture de la chromatine et dans la transcription de gènes. La modification de l'état de solubilité de HMGB1 et de son affinité plus importante pour la chromatine après traitement par le rt-PA, pourrait altérer sa fonction nucléaire de base. D'autant plus que des études suggèrent que HMGB1 aurait plus d'affinité pour l'ADN endommagé, ce qui pourrait faciliter la reconnaissance des lésions au niveau de l'ADN par les systèmes de réparation ou au contraire bloquer leur accessibilité à ces zones lésées (voir pour revue Stros, 2010).

Un effet bénéfique : en provoquant la rétention nucléaire de HMGB1, le rt-PA bloque sa sécrétion dans le milieu extracellulaire. La protéine ne peut donc pas interagir avec ses différents récepteurs extracellulaires afin d'exercer son activité cytokine, ce qui pourrait réduire son activité inflammatoire.

Enfin, nous nous sommes intéressés à un autre facteur sécrété par les cellules endothéliales, le VEGF-A, un facteur initialement décrit comme un facteur de perméabilité vasculaire aux propriétés angiogéniques. Les modifications morphologiques des cellules bEnd.3 traitées par le rt-PA pouvant s'apparenter à la formation de structures vasculaires, cette éventuelle activité pro-angiogénique du rt-PA pourrait mettre en jeu le VEGF.

Nos résultats de Western Blot suggèrent l'existence d'une sécrétion de VEGF par les cellules bEnd.3 après rt-PA mais reste à confirmer, notamment avec d'autres anticorps. Par ailleurs, les résultats de nos expérimentations *in vivo* n'ont pas montré d'augmentation des taux plasmatiques de VEGF-A ni après ischémie ni après traitement par le rt-PA.

En conclusion, mes travaux de thèse ont montré l'impact du rt-PA sur trois effecteurs différents : les microvésicules endothéliales, HMGB1 et le VEGF. Il reste à déterminer le rôle de chacune de ces modifications dans la toxicité vasculaire du rt-PA *in vitro* et *in vivo* après une ischémie cérébrale. Nos travaux rapportent que la PARP est impliquée dans la vésiculation endothéliale liée au rt-PA et potentiellement dans ses effets sur HMGB1. La connaissance de ces mécanismes permettra de mettre aux points des stratégies à associer au rt-PA afin de rendre la thrombolyse plus sûre.

ANNEXE

ANNEXE

Contre-indications à la thrombolyse intraveineuse par le rt-PA (Actilyse®) lors de l'ischémie cérébrale, selon les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) publiées en mai 2009 (www.has-sante.fr).



Contre-indications de l'altéplase retenues dans l'AMM de l'ACTILYSE®

« Hypersensibilité à la substance active ou à l'un des excipients.

Comme tous les agents thrombolytiques, ACTILYSE® est contre-indiqué dans tous les cas associés à un risque hémorragique élevé :

- trouble hémorragique significatif actuel ou au cours des 6 derniers mois
- diathèse hémorragique connue
- traitement concomitant par des anticoagulants oraux (par exemple warfarine)
- hémorragie sévère ou potentiellement dangereuse, manifeste ou récente
- antécédents ou suspicion d'hémorragie intracrânienne
- suspicion d'hémorragie sous-arachnoïdienne ou antécédents d'hémorragie sous-arachnoïdienne liée à un anévrisme
- antécédents de lésion sévère du système nerveux central (par exemple néoplasie, anévrisme, intervention chirurgicale intracrânienne ou intrarachidienne)
- massage cardiaque externe traumatique récent (moins de 10 jours), accouchement, ponction récente d'un vaisseau non accessible à la compression (par exemple, ponction de la veine sous-clavière ou jugulaire)
- hypertension artérielle sévère non contrôlée
- endocardite bactérienne, péricardite
- pancréatite aiguë
- ulcères gastro-intestinaux documentés au cours des 3 derniers mois, varices œsophagiennes, anévrisme artériel, malformations artérielles ou veineuses
- néoplasie majorant le risque hémorragique
- hépatopathie sévère, y compris insuffisance hépatique, cirrhose, hypertension portale (varices œsophagiennes) et hépatite évolutive
- intervention chirurgicale ou traumatismes importants au cours des 3 derniers mois.

Dans l'indication d'accident vasculaire cérébral ischémique à la phase aiguë les contre-indications complémentaires sont :

- symptômes d'accident vasculaire cérébral ischémique apparus plus de 3 heures avant l'initiation du traitement ou dont l'heure d'apparition est inconnue
- déficit neurologique mineur ou symptômes s'améliorant rapidement avant l'initiation du traitement
- accident vasculaire cérébral jugé sévère cliniquement (par exemple NIHSS > 25) et/ou par imagerie
- crise convulsive au début de l'accident vasculaire cérébral
- signes d'hémorragie intracrânienne (HIC) au scanner
- symptômes suggérant une hémorragie sous-arachnoïdienne, même en l'absence d'anomalie au scanner
- administration d'héparine au cours des 48 heures précédentes avec un temps de thromboplastine dépassant la limite supérieure de la normale
- patient diabétique présentant des antécédents d'accident vasculaire cérébral
- antécédent d'accident vasculaire cérébral au cours des 3 derniers mois
- plaquettes inférieures à 100 000/mm³
- pression artérielle systolique > 185 mmHg ou pression artérielle diastolique > 110 mmHg, ou traitement d'attaque (par voie intraveineuse) nécessaire pour réduire la pression artérielle à ces valeurs seuils
- glycémie inférieure à 50 ou supérieure à 400 mg/dl.

Utilisation chez l'enfant, l'adolescent et le patient âgé

ACTILYSE® n'est pas indiqué pour le traitement de l'accident vasculaire cérébral à la phase aiguë chez les patients de moins de 18 ans ou de plus de 80 ans. »¹

¹ La plupart des patients inclus dans les essais contrôlés randomisés étaient âgés de 18 à 80 ans.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abdel-Monem** H., Dasgupta S.K., Le A., Prakasam A. and Thiagarajan P. (2010) Phagocytosis of platelet microvesicles and beta2- glycoprotein I. *Thromb. Haemost.*, **104**, 335-341.
- Abid Hussein** M. N., Böing A. N., Sturk A., Hau C. M. and Nieuwland R. (2007) Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thromb. Haemost.*, **98**, 1096-1107.
- Abid Hussein** M.N., Böing A.N., Biró E., Hoek F.J., Vogel G.M., Meuleman D.G. Sturk A. and Nieuwland R. (2008) Phospholipid composition of in vitro endothelial microparticles and their in vivo thrombogenic properties. *Thromb. Res.*, **121**, 865-871
- Abumiya** T., Yokota C., Kuge Y. and Minematsu, K. (2005) Aggravation of hemorrhagic transformation by early intraarterial infusion of low-dose vascular endothelial growth factor after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.*, **1049**, 95–103.
- Acheampong** P. and Ford G.A. (2012) Pharmacokinetics of alteplase in the treatment of ischaemic stroke. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **8**, 271–281.
- Adams** H.P., Bendixen B.H., Kappelle L.J., Biller J., Love B.B., Gordon D.L., Marsh E.E. (1993) Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*, **24**, 35–41.
- Aizawa** S., Nishino H., Saito K., Kimura K., Shirakawa H. and Yoshida M. (1994) Stimulation of transcription in cultured cells by high mobility group protein 1: essential role of the acidic carboxyl-terminal region. *Biochemistry*, **33**, 14690–14695
- Al Faraj** A., Gazeau F., Wilhelm C., Devue C., Guérin C.L., Péchoux C., Paradis V., Clément O., Boulanger C.M. and Rautou P.E. (2012) Endothelial cell-derived microparticles loaded with iron oxide nanoparticles: feasibility of MR imaging monitoring in mice. *Radiology*, **236**, 169-178.
- Alano** C.C., Kauppinen T.M., Valls A.V. and Swanson R.A. (2006) Minocycline inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations. *Proc. Natl Acad Sci USA*, **103**, 9685–9690.
- Albers** G.W., von Kummer R., Truelsen T., Jensen J.K., Ravn G.M., Grønning B.A., Chabriat H., Chang K.C., Davalos A.E., Ford G.A., Grotta J., Kaste M., Schwamm L.H., Shuaib A. and DIAS-3 Investigators (2015) Safety and efficacy of desmoteplase given 3-9 h after ischaemic stroke in patients with occlusion or high-grade stenosis in major cerebral arteries (DIAS-3): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Neurol.*, **14**, 575-584.
- Alexandrov** A.V. and Grotta J.C. (2002) Arterial reocclusion in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Neurology*, **59**, 862–867.
- Amabile** N., Guérin A.P., Leroyer A., Mallat Z., Nguyen C., Boddaert J., London G.M., Tedgui A. and Boulanger C.M. (2005) Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **16**, 3381–3388.
- Amaro** S. and Chamorro Á. (2011) Translational Stroke Research of the Combination of Thrombolysis and Antioxidant Therapy. *Stroke*, **42**, 1495-1499.
- Amaro** S., Laredo C., Renú A., Llull L., Rudilosso S., Obach V., Urra X., Planas A.M., Chamorro Á. And URICO-ICTUS investigators. (2016) Uric Acid Therapy Prevents Early Ischemic Stroke Progression: A tertiary analysis of the URICO-ICTUS trial (Efficacy Study of Combined Treatment With Uric Acid and r-tPA in Acute Ischemic Stroke). *Stroke*, **47**, 2874-2876.
- Amé** J.C., Spenlehauer C. and de Murcia G. (2004) The PARP superfamily. *Bioessays*, **26**, 882–893.
- Andersson** U., Wang H., Palmblad K., Aveberger A.C., Bloom O., Erlandsson-Harris H., Janson A., Kokkola R., Zhang M., Yang H. and Tracey K.J. (2000) High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J. Exp.Med.*, **192**, 565–570.
- Andersson** A., Bluwstein A., Kumar N., Teloni F., Traenkle J., Baudis M., Altmeyer M. and Hottiger M.O. (2016) PKC ν and HMGB1 antagonistically control hydrogen peroxide-induced poly-ADP-ribose formation. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 7630-7645.

- Andrabi S.A., Umanah G.K., Chang C., Stevens D.A., Karuppagounder S.S., Gagné J.P., Poirier G.G., Dawson V.L. and Dawson T.M. (2014)** Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 10209–10214.
- Arancio O., Zhang H.P., Chen X., Lin C., Trinchese F., Puzzo D., Liu S., Hegde A., Yan S.F., Stern A., Luddy J.S., Lue L.F., Walker D.G., Roher A., Buttini M., Mucke L., Li W., Schmidt A.M., Kindy M., Hyslop P.A., Stern D.M. and Du Yan S.S. (2004)** RAGE potentiates Abeta-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice. *EMBO J.*, **23**, 4096-4105.
- Armstead W.M., Riley J., Kiessling J.W., Cines D.B., Higazi A.A. (2010).** Novel plasminogen activator inhibitor-1-derived peptide protects against impairment of cerebrovasodilation after photothrombosis through inhibition of JNK MAPK. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **299**, 480-5
- Assessment of the Safety and Efficacy of a New thrombolytic (ASSENT-2) Investigators, Van de Werf F., Adgey J., Ardissino D., Armstrong P.W., Aylward P., Barbash G., Betriu A., Binbrek A.S., Califf R., Diaz R., Fanebust R., Fox K., Granger C., Heikkilä J., Husted S., Jansky P., Langer A., Lupi E., Maseri A., Meyer J., Mlczoch J., Moccetti D., Myburgh D., Oto A., Paolasso E., Pehrsson K., Seabra-Gomes R., Soares-Piegas L., Sugrue D., Tendera M., Topol E., Toutouzas P., Vahanian A., Verheugt F., Wallentin L., White H. (1999)** Single-bolus tenecteplase compared with front-loaded alteplase in acute myocardial infarction: the ASSENT-2 double-blind randomised trial. *Lancet*, **354**, 716-722.

B

- Bae J.S. and Rezaie A.R. (2011)** Activated protein C inhibits high mobility group box 1 signaling in endothelial cells. *Blood*, **118**, 3952-3959.
- Bakhti M., Winter C. and Simons M. (2011)** Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J. Biol. Chem.*, **286**, 787–796.
- Balami J.S., Sutherland B.A. and Buchan A.M. (2013)** Complications associated with recombinant tissue plasminogen activator therapy for acute ischaemic stroke. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **12**, 155–169.
- Barnay-Verdier S., Maréchal V. and Borde C. (2009)** HMGB1 : un lien entre inflammation septique et non septique. *Revue Francophone des laboratoires*, **417**, 59-68.
- Bauer E.M., Shapiro R., Billiar T.R. and Bauer P.M. (2013)** High mobility group Box 1 inhibits human pulmonary artery endothelial cell migration via a Toll-like receptor 4- and interferon response factor 3- dependent mechanism(s). *J. Biol. Chem.*, **288**, 1365–1373.
- Béjot Y., Touzé E., Jacquin A., Giroud M. and Mas J.L. (2009)** Epidemiology of stroke. *Med. Sci. (Paris)*, **25**, 727-732.
- Bell C.W., Jiang W., Reich C.F. 3rd and Pisetsky D.S. (2006)** The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **291**, C1318-C1325.
- Benarroch E.E., (2007).** Tissue plasminogen activator: beyond thrombolysis. *Neurology.*, **69**, 799–802.
- Benchenane K., Berezowski V., Ali C., Fernández-Monreal M., López-Atalaya J.P., Brillault J., Chuquet J., Nouvelot A., MacKenzie E.T., Bu G., Cecchelli R., Touzani O. and Vivien D. (2005a)** Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation*, **111**, 2241–2249.
- Benchenane K., Berezowski, V., Fernández-Monreal, M., Brillault, J., Valable, S., Dehouck, M.-P., Cecchelli, R., Vivien, D., Touzani, O. and Ali, C. (2005b)** Oxygen glucose deprivation switches the transport of tPA across the blood-brain barrier from an LRP-dependent to an increased LRP-independent process. *Stroke*, **36**, 1065–1070.
- Berger N.A. (1985)** Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat. Res.*, **101**, 4–15.
- Betzen C., White R., Zehendner C.M., Pietrowski E., Bender B., Luhmann H.J., Kuhlmann C.R.W. 2009.** Oxidative stress upregulates the NMDA receptor on cerebrovascular endothelium. *Free Radic. Biol. Med.*, **47.**, 1212–1220.
- Bianchi M.E., Falciola L., Ferrari S. and Lilley D.M. (1992)** The DNA binding site of HMG1 protein is composed of two similar segments (HMG boxes), both of which have counterparts in other eukaryotic regulatory proteins. *EMBO J.*, **11**, 1055–1063.
- Bianchi M.E. and Manfredi A. (2004)** Chromatin and cell death. *Biochim. Biophys. Acta*, **1677**, 181–186.

- Bianco F.**, Pravettoni E., Colombo A., Schenk U., Möller T., Matteoli M., Verderio C. (2005) Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J. Immunol.*, **174**, 7268–7277.
- Bianco F.**, Perrotta C., Novellino L., Francolini M., Riganti L., Menna E., Saglietti L., Schuchman E.H., Furlan R., Clementi E., Matteoli M. and Verderio C. (2009) Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO j.* **28**, 1043–1054.
- Bierhaus A.**, Humpert P.M., Morcos M., Wendt T., Chavakis T., Arnold B., Stern D.M. and Nawroth P.P. (2005) Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J. Mol. Med.*, **83**: 876-86.
- Biró E.**, Sturk-maquelin K.N., Vogel G.M., Meuleman D.G., Dmit M.J., Hack C.E., Sturk A. and Nieuwland R. (2003) Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J. Thromb. Haemost.*, **1**, 2561-8.
- Bivard A.**, Huang X., Levi C.R., Spratt N., Campbell B.C.V., Cheripelli B.K., Kalladka D., Moreton F.C., Ford I., Bladin C.F., Davis S.M., Donnan G.A., Muir K.W. and Parsons M.W. (2017) Tenecteplase in ischemic stroke offers improved recanalization: Analysis of 2 trials. *Neurology*, **89**, 62-67.
- Blanco P.**, Palucka K., Pascual V. and Banchereau J. (2008) Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **19**, 41–52.
- Boffa L.C.** and Bolognesi C. (1985) Methylating agents: their target amino acids in nuclear proteins. *Carcinogenesis*, **6**, 1399–1401.
- Bogousslavsky J.**, Van Melle G. and Regli F. (1988) The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke*, **19**, 1083–1092.
- Bonaldi T.**, Talamo F., Scaffidi P., Ferrera D., Porto A., Bachi A., Rubartelli A., Agresti A. and Bianchi M.E. (2003). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.*, **22**, 5551–5560
- Bonnaud I.**, Giraudeau B., Julié V., Soulat L., Beaufils J.-M., Brock T., Goralski M., Perrotin D., les médecins référents membres du GEUC (2005) [Epidemiology and management of stroke patients in emergency departments of the Centre region of France]. *Rev. Neurol. (Paris)*, **161**, 311–317.
- Bonne-Andrea C.**, Harper F., Sobczak J. and De Recondo A.M. (1984a) Rat liver HMG1: a physiological nucleosome assembly factor. *EMBO J.*, **3**, 1193–1199
- Bonne-Andrea C.**, Harper F., Sobczak J. and De Recondo A.M. (1984b) The role of HMG1 protein in nucleosome assembly and in chromatin replication. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **179**, 479–488.
- Borgiani B.**, Colombo E., Verderio C. and Furlan R. (2012) Microvesicles: novel biomarkers for neurological disorders. *Front. Physiol.*, **3**, 63.
- Boulanger C.M.**, Scoazec A., Ebrahimian T., Henry P., Mathieu E., Tedgui A. and Mallat Z. (2001) Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation*, **104**, 2649-2652
- Boulanger C.M.**, Amabile N. and Tedgui A. (2006) Circulating Microparticles A Potential Prognostic Marker for Atherosclerotic Vascular Disease. *Hypertension*, **48**, 180-186.
- Boulanger C.M.**, Leroyer A.-S., Amabile N. and Tedgui, A. (2008) Circulating endothelial microparticles: a new marker of vascular injury. *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)*, **57**, 149–154.
- Brea D.**, Blanco M., Ramos-Cabrer P., Moldes O., Arias S., Pérez-Mato M., Leira R., Sobrino T. and Castillo J. (2011) Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **31**, 1424-1431.
- Brennan A.M.**, Suh S.W., Won S.J., Narasimhan P., Kauppinen T.M., Lee H., Edling Y., Chan P.H. and Swanson R.A. (2009) NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat. Neurosci.*, **12**, 857-863.
- Brodsky S.V.**, Malinowski K., Golightly M., Jesty J. and Goligorsky M.S. (2002) Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation*, **106**, 2372-2378
- Brodsky S.V.**, Zhang F., Nasjletti A. and Goligorsky M.S. (2004) Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **286**, H1910–H1915.
- Brouns R.** and De Deyn P.P. (2009) The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin. Neurol. Neurosurg.*, **111**, 483–495.
- Brown R.C.**, Morris A.P. and O’Neil R.G. (2007) Tight junction protein expression and barrier Properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain. Res.*, **1130**, 17–30.

- Brown** M. D., Fearheller D.L., Thakkar S., Veerabhadrapa P. and Park J. Y. (2011) Racial differences in tumor necrosis factor- α -induced endothelial microparticles and interleukin-6 production. *Vasc. Health Risk Manag.*, **7**, 541–550.
- Bu** G., Williams S., Strickland D.K. and Schwartz A.L. (1992) Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7427-7431.
- Bu** G., Warshawsky I. and Schwartz A.L. (1994) Cellular receptors for the plasminogen activators. *Blood*, **83**, 3427–3436
- Burger** D., Montezano A.C., Nishigaki N., He Y., Carter A. and Touyz R.M. (2011) Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via Ang II receptor type I/NADPH oxidase/ Rho kinase pathways targeted to lipid rafts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **31**, 1898-1907.
- Burger** D, Schock S., Thompson C.S., Montezano A.C., Hakim A.M. and Touyz R.M. (2013) Microparticles : biomarkers and beyond., *Clin. Sci. (London)*, **124**, 423–441.
- Burysek** L., Syrovets T., and Simmet T. (2002) The Serine Protease Plasmin Triggers Expression of MCP-1 and CD40 in Human Primary Monocytes via Activation of p38 MAPK and Janus Kinase (JAK)/STAT Signaling Pathways. *J Biol Chem.*, **277**, 33509-17.
- Bustin** M. (2001) Revised Nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 152–153

C

- Calogero** S., Grassi F., Aguzzi A., Voigtlander T., Ferrier P., Ferrari S. and Bianchi M.E. (1999) The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat. Genet.*, **22**, 276-280.
- Camós** S. and Mallolas J. (2010) Experimental Models for Assaying Microvascular Endothelial Cell Pathophysiology in Stroke. *Molecules.*, **15**, 9104-9134.
- Campbell** M. and Peterson A.C. (1993) Expression of a lacZ transgene reveals floor plate cell morphology and macromolecular transfer to commissural axons. *Development*, **119**, 1217-1228.
- Caso** J.R., Pradillo J.M., Hurtado O., Lorenzo P., Moro M.A. and Lizasoain I. (2007) Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation*, **115**, 1599-1608
- Catanese** L., Tarsia J. and Fisher M. (2017) Acute Ischemic Stroke Therapy Overview. *Circ. Res.*, **120**, 541-558
- Catena** R., Escoffier E., Caron C., Khochbin S., Martianov I. and Davidson I. (2009) HMGB4, a novel member of the HMGB family, is preferentially expressed in the mouse testis and localizes to the basal pole of elongating spermatids. *Biol. Reprod.*, **80**, 358–366
- Cato** L., Stott K., Watson M. and Thomas J.O. (2008) The interaction of HMGB1 and linker histones occurs through their acidic and basic tails. *J. Mol. Biol.*, **384**, 1262–1272.
- Chaitanya** G.V., Cromer W.E., Parker C.P., Couraud P.O., Romero I.A., Weksler B., Mathis J.M., Minagar K.A., and Alexander J.S. (2013) A Recombinant Inhibitory Isoform of Vascular Endothelial Growth Factor 164/165 Aggravates Ischemic Brain Damage in a Mouse Model of Focal Cerebral Ischemia. *Am. J. Pathol.*, **183**, 1010-1024.
- Chambon** P., Weill J.D. and Mandel P. (1963) Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **11**, 39-43.
- Chamorro** A., Amaro S., Castellanos M., Segura T., Arenillas J., Martí- Fábregas J., Gállego J., Krupinski J., Gomis M., Cánovas D., Carné X., Deulofeu R., Romàn L.S., Oleaga L., Torres F., planas A.M., URICO-ICTUS Investigators (2014) Safety and efficacy of uric acid in patients with acute stroke (URICO-ICTUS): a randomized, double-blind phase 2b/3 trial. *Lancet Neurol.*, **13**, 453–460.
- Chargaff** E. and West R. (1946) The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J. Biol. Chem.*, **166**, 189–197.
- Chen** H., Yoshioka H., Kim G.S., Jung J.E., Okami N., Sakata H., Maier C.M., Narasimhan P., Goeders C.E. and Chan P.H. (2011). Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid. Redox Signal*, **14**, 1505-1517.
- Chen** Y., Won S.J., Xu Y. and Swanson R.A. (2014) Targeting microglial activation in stroke therapy: pharmacological tools and gender effects. *Curr. Med. Chem.*, **21**, 2146–215.
- Cheng** T., Petraglia A.L., Li Z., Thiyagarajan M., Zhong Z., Wu Z., Liu D., Maggirwar S.B., Deane R., Fernández J.A.,

- LaRue B., Griffin J.H., Chopp M. and Zlokovic B.V. (2006) Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nat. Med.*, **12**, 1278-1285.
- Cherian** P., Hankey G.J., Eikelboom J.W., Thom J., Baker R.I., McQuillan A., Staton J. and Yi Q. (2003) Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes. *Stroke*, **34**, 2132–2137.
- Chevilley** A., Lesept F., Lenoir S., Ali C., Parcq J. and Vivien D. (2015) Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival. *Front. Cell. Neurosci.*, **9**, 415.
- Chi** O.Z., Hunter C., Liu X., Weiss H.R. (2005) Effects of VEGF and nitric oxide synthase inhibition on blood-brain barrier disruption in the ischemic and non-ischemic cerebral cortex. *Neurol. Res.*, **27**, 864–868.
- Chiang** H.S. and Maric M. (2011) Lysosomal thiol reductase negatively regulates autophagy by altering glutathione synthesis and oxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, **51**, 688–699.
- Chiarugi** A. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The “suicide hypothesis” revisited. *Trends Pharmacol. Sci.*, **23**, 122–129.
- Chiarugi** A. and Moskowitz M.A. (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-kappaB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. *J. Neurochem.*, **85**, 306–317.
- Chiva-Blanch** G., Suades R., Crespo J., Peña E., Padró T., Jiménez-Xarrié E., Martí-Fàbregas J. and Badimon L. (2016) Microparticle Shedding from Neural Progenitor Cells and Vascular Compartment Cells Is Increased in Ischemic Stroke. *PLoS One*, **11**, e0148176.
- Christou** I., Alexandrov A.V., Burgin W.S., Wojner A.W., Felberg R.A., Malkoff M. and Grotta J.C. (2000) Timing of recanalization after tissue plasminogen activator therapy determined by transcranial doppler correlates with clinical recovery from ischemic stroke. *Stroke*, **31**, 1812–1816.
- Cipolla** M.J., Lessov N., Clark W.M. and Haley E.C. (2000) Postischemic attenuation of cerebral artery reactivity is increased in the presence of tissue plasminogen activator. *Stroke*, **31**, 940–945.
- Ciucci** A., Gabriele I., Percario Z.A., Affabris E., Colizzi V. and Mancino G. (2011) HMGB1 and cord blood: its role as immuno-adjuvant factor in innate immunity. *PLoS One*, **6**, 23766.
- Cocucci** E., Racchetti G. and Meldolesi J. (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.*, **19**, 43-51.
- Cohen-Armon** M., Visocek L., Rozensal D., Kalal A., Geistrikh I., Klein R., Bendetz-Nezer S., Yao Z. and Seger R. (2007) DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Mol. Cell*, **25**, 297–308.
- Coleman** M.L., Sahai E.A., Yeo M., Bosch M., Dewar A. and Olson M.F. (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 339–345.
- Coltel** N., Combes V., Wassmer S.C., Chimini G. and Grau G.E. (2006) Cell vesiculation and immunopathology: implications in cerebral malaria. *Microbes Infect.*, **8**, 2305-2316.
- Combes** V., Simon A.C., Grau G.E., Arnoux D., Camoin L., Sabatier F., Mutin M., Sanmarco M., Sampol J., Dignat-George F. (1999). In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J.Clin. Invest.*, **104**, 93–102.
- Couturier** J.Y., Ding-Zhou L., Croci N., Plotkine M. and Margail I. (2003) 3-Aminobenzamide reduces brain infarction and neutrophil infiltration after transient focal cerebral ischemia in mice. *Exp. Neurol.*, **184**, 973–980.
- Crome** O., Doepfner T.R., Schwarting S., Müller B., Bähr M. and Weise J. (2007) Enhanced poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation contributes to recombinant tissue plasminogen activator-induced aggravation of ischemic brain injury in vivo. *J. Neurosci. Res.*, **85**, 1734–1743.
- Cronin** C.A. (2010) Intravenous tissue plasminogen activator for stroke: a review of the ECASS III results in relation to prior clinical trials. *J. Emerg. Med.*, **38**, 99–105.
- Cuadrado** E., Rosell A., Penalba A., Slevin M., Alvarez-Sabín J., Ortega-Aznar A., Montaner J. (2009) Vascular MMP-9/TIMP-2 and neuronal MMP-10 up-regulation in human brain after stroke: a combined laser microdissection and protein array study. *J. Proteome Res.*, **8**, 3191–3197.
- Curtin** N.J. and Szabo C. (2013) Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond. *Mol. Aspects Med.*, **34**, 1217–1256.
- Curtis** A.M., Wilkinson P.F., Gui M., Gales T.L., Hu E. and Edelberg J.M. (2009) p38 mitogen activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *J. Thromb. Haemost.*, **7**, 701–709.

D

- d'Adda di Fagagna F.**, Hande M.P., Tong W.M., Lansdorp P.M., Wang Z.Q. and Jackson S.P. (1999) Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. *Nat. Genet.*, **23**, 76-80.
- Dalkara T.** and Arsava E.M. (2012) Can restoring incomplete microcirculatory reperfusion improve stroke outcome after thrombolysis? *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **32**, 2091–2099.
- Dalli J.**, Norling L.V., Renshaw D., Cooper D., Leung K.Y. and Perretti M. (2008) Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood*, **112**, 2512–2519.
- Dantzer F.**, Menissier-de Murcia J., Barlow C., Wynshaw-Boris A and de Murcia. (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase activity is not affected in ataxia telangiectasia cells and knockout mice. *Carcinogenesis*., **20**, 177–180.
- Dasgupta S.K.**, Abdel-Monem H., Niravath P., Le A., Bellera R.V., Langlois K., Nagata S., Rumbaut R.E. and Thiagarajan P. (2009) Lactadherin and clearance of platelet- derived microvesicles. *Blood*, **113**, 1332-1339.
- Dasgupta S.K.**, Le A., Chavakis T., Rumbaut R.E. and Thiagarajan P. (2012) Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. *Circulation*, **125**, 1664-1672.
- Davalos A. R.**, Kawahara M., Malhotra G.K., Schaum N., Huang J., Ved U., Beausejour C.M., Coppe J.P., Rodier F. and Campisi J. (2013) p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *J. Cell Biol.*, **201**, 613–629.
- Davidovic L.**, Vodenicharov M., Affar E.B. and Poirier G.G. (2001) Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp. Cell. Res.*, **268**, 7–13.
- Davis K.**, Banerjee S., Friggeri A., Bell C., Abraham E. and Zerfaoui M. (2012) Poly(ADP-Ribosyl)ation of high mobility group box 1 (HMGB1) protein enhances inhibition of efferocytosis. *Mol. Med.*, **18**, 359-369.
- Deane R.**, Du Yan S., Subramanian R.K., LaRue B., Jovanovic S., Hogg E., Welch D., Manness L., Lin C., Yu J., Zhu H., Ghiso J., Frangione B., Stern A., Schmidt A.M., Armstrong D.L., Arnold B., Liliensiek B., Nawroth P., Hofman F., Kindy M., Stern D. and Zlokovic B. (2003) RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat. Med.*, **9**, 907-913.
- Degryse B.**, Bonaldi T., Scaffidi P., Müller S., Resnati M., Sanvito F., Arrigoni G. and Bianchi M.E. (2001) The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, **152**, 1197–1206.
- Dejouvencel T.**, Doeuvre L., Lacroix R., Plawinski L., Dignat-George F., Lijnen H. R, and Angle's-Cano E. (2010) Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation. *Blood*, **115**, 2048-2056.
- del Turco S.**, Basta G., Lazzarini G., Evangelista M., Rainaldi G., Tanganelli P., Camera M., Tremoli E. and De Caterina R. (2007) Parallel decrease of tissue factor surface exposure and increase of tissue factor microparticle release by the n-3 fatty acid docosahexaenoate in endothelial cells. *Thromb. Haemost.*, **98**, 210–219.
- del Zoppo G.J.**, Frankowski H., Gu YH., Osada T., Kanazawa M., Milner R., Wang X., Hosomi N., Mabuchi T., Koziol JA. (2012). Microglial cell activation is a source of metalloproteinase generation during hemorrhagic transformation. *Cereb. Blood Flow Metab.*, **32**, 919-932.
- del Zoppo G.J.**, Izawa Y. and Hawkins B.T. (2013) Hemostasis and alterations of the central nervous system. *Semin. Thromb. Hemost.*, **39**, 856-875.
- de Murcia J.M.**, Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F.J., Masson M., Dierich A., LeMeur M., Walztinger C., Chambon P. and de Murcia G. (1997) Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7303–7307.
- Deregibus M.C.**, Cantaluppi V., Calogero R., Lo Iacono M., Tetta C., Biancone L., Bruno S., Bussolati B., Camussi G. (2007) Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*, **110**, 2440-2448.
- Devaraj S.**, Kumaresan P.R. and Jialal I. (2011) C-reactive protein induces release of both endothelial microparticles and circulating endothelial cells in vitro and in vivo: further evidence of endothelial dysfunction. *Clin. Chem.*, **57**, 1757-1761.
- De Vos M.**, Schreiber V. and Dantzer F. (2012) The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem. Pharmacol.*, **84**, 137-146.

- Diener H.C.**, Lees K.R., Lyden P., Grotta J., Davalos A., Davis S.M., Shuaib A., Ashwood T., Wasiewski W., Alderfer V., Hardemark H.G., Rodichok L. and SAINT I and II Investigators (2008) NXY-059 for the treatment of acute stroke: pooled analysis of the SAINT I and II Trials. *Stroke*, **39**, 1751–1758.
- Dignat-George F.**, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol. 2004. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J. Thromb. Haemost.*, **2**, 1844–5.
- Dignat-George F.** and Boulanger C. M. (2011). The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **31**, 27–33.
- Dirnagl U.**, Iadecola C. and Moskowitz M.A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.*, **22**, 391–397.
- Distler J. H.**, Huber L. C., Hueber A. J., Reich C. F. 3rd, Gay S., Distler O. and Pisetsky D. S. (2005). The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis*, **10**, 731–741.
- Ditsworth D.**, Zong W.X., Thompson C.B. 2007. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) induces release of the pro-inflammatory mediator HMGB1 from the nucleus. *J Biol Chem.*, **282**, 17845–17854.
- Docagne F.**, Parcq J., Lijnen R., Ali C. and Vivien D. (2015). Understanding the functions of endogenous and exogenous tissue-type plasminogen activator during stroke. *Stroke*, **46**, 314–320.
- Doeuvre L.** and **Angles-Cano E.** (2009) Cell-derived microparticles unveil their fibrinolytic and proteolytic function. *Med. Sci. (Paris)*, **25**, 37–44.
- Doeuvre L.**, Plawinski L., Toti F. and Anglés-Cano E. (2009) Cell-derived microparticles: a new challenge in neuroscience. *J. Neurochem.*, **110**, 457–468.
- Doeuvre L.**, Plawinski L., Goux D., Vivien D. and Anglés-Cano E. (2010) Plasmin on adherent cells: from microvesiculation to apoptosis. *Biochem. J.*, **432**, 365–373
- Dong X.Q.**, Huang M., Hu Y.Y., Yu W.H. and Zhang Z.Y. (2011) Time course of plasma microparticle concentrations after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *Acta Neurol. Scand.*, **123**, 280–288.
- Du L.**, Zhang X., Han Y.Y., Burke N.A., Kochanek P.M., Watkins S.C., Graham S.H., Carcillo J.A., Szabó C., Clark R.S., (2003) Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD⁺ depletion and cell death induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **278**, 18426–18433.
- Ducrocq S.**, Benjelloun N., Plotkine M., Ben-Ari Y. and Charriaud-Marlangue C. (2000) Poly(ADP-ribose) synthase inhibition reduces ischemic injury and inflammation in neonatal rat brain. *J. Neurochem.*, **74**, 2504–2511.
- Durukan A.** and Tatlisumak T. (2007) Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **87**, 179–197.

E

- Echeverry R.**, Wu J., Haile W.B., Guzman J. and Yepes M. (2010) Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *J. Clin. Invest.*, **120**, 2194–2205.
- Edrissi H.**, Schock S.C., Hakim A.M. and Thompson C.S. (2016) Microparticles generated during chronic cerebral ischemia increase the permeability of microvascular endothelial barriers in vitro. *Brain Res.*, **1634**, 83–93.
- Egi Y.**, Matsuura S., Maruyama T., Fujio M., Yuki S. and Akira T. (2011) Neuroprotective effects of a novel water-soluble poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, MP-124, in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia. *Brain Res.*, **1389**, 169–176.
- El Amki M.**, Lerouet D., Coqueran B., Curis E., Orset C., Vivien D., Plotkine M., Marchand-Leroux C. and Margaille I. (2012) Experimental modeling of recombinant tissue plasminogen activator effects after ischemic stroke. *Exp. Neurol.*, **238**, 138–144.
- El Amki M.**, Lerouet D., Garraud M., Teng F., Beray-Berthat V., Coqueran B., Barsacq B., Abbou C., Palmier B., Marchand-Leroux C., Margaille I. Focus on vasculoprotection by the poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor PJ34 after stroke and thrombolysis in mice. Soumis au British Journal of Pharmacology.
- Eliasson M.J.**, Sampei K., Mandir A.S., Hurn P.D., Traystman R.J., Bao J., Pieper A., Wang Z.Q., Dawson T.M., Snyder S.H. and Dawson V.L. (1997). Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat. Med.*, **3**, 1089–1095.
- Ellerman J.E.**, Brown C.K., de Vera M., Zeh H.J., Billiar T., Rubartelli A. and Lotze M.T. (2007) Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clin. Cancer Research*, **13**, 2836–2848.

- Endres M.**, Wang Z.Q., Namura S., Waeber C. and Moskowitz M.A. (1997) Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **17**, 1143–1151.
- Erdbrügger U.** and Lannigan J. (2016) Analytical challenges of extracellular vesicle detection: A comparison of different techniques. *Cytometry*, **89**, 123–134.
- Erdélyi K.**, Bakondi E., Gergely P., Szabó C. and Virág L. (2005) Pathophysiologic role of oxidative stress-induced poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation: focus on cell death and transcriptional regulation. *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 751–759.
- Esposito K.**, Ciotola M., Giugliano F., Schisano B., Improta L., Improta M.R., Beneduce F., Rispoli M., De Sio M. and Giugliano D. (2007) Endothelial microparticles correlate with erectile dysfunction in diabetic men. *Int. J. Impot. Res.*, **19**, 161–166.
- Essayagh S.**, Brisset A.-C.; Terrisse A.-D., Dupouy D., Tellier L., Navarro C., Arnal J.-F. and Sié P. (2005) Microparticles from apoptotic vascular smooth muscle cells induce endothelial dysfunction, a phenomenon prevented by β 3-integrin antagonists. *Thromb. Haemost.*, **94**, 853-858.

F

- Fadok V.A.**, Bratton D.L., Rose D.M., Pearson A., Ezekewitz R.A. and Henson P.M. (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, **405**, 85-90.
- Faraco G.**, Fossati S., Bianchi M.E., Patrone M., Pedrazzi M., Sparatore B., Moroni F. and Chiarugi A. (2007) High mobility group box 1 protein is released by neural cells upon different stresses and worsens ischemic neurodegeneration *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurochem.*, **103**, 590–603
- Fatokun A.A.**, Dawson V.L. and Dawson T.M. (2014) Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br. J. Pharmacol.*, **171**, 2000–2016.
- Fauré J.**, Lachenal G., Court M., Hirrlinger J., Chatellard-Causse C., Blot B., Grange J., Schoehn G., Goldberg Y., Boyer V., Kirchhoff F., Raposo G., Garin J. and Sadoul R. (2006) Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol. Cell. Neurosci.*, **31**, 642–648.
- Fernandez-Monreal M.**, Lopez-Atalaya J.P., Benchenane K., Cacquevel M., Dulin F., Le Caer J.-P., Rossier J., Jarrige A.-C., MacKenzie E.T., Colloc'h N., Ali C. and Vivien D. (2004) Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J. Biol. Chem.*, **279**, 50850-50856.
- Fery-Lemonnier E.** (2009) La prévention et la prise en charge des accidents vasculaires cérébraux en France. Rapport à Madame la ministre de la Santé et des Sports. Paris: La Documentation Française 549 p. <http://www.ladocumentationfrancaise.fr/rapportspublics/094000505/index.shtml>
- Festoff B.W.**, Sajja R.K., van Dreden P. and Cucullo L. (2016) HMGB1 and thrombin mediate the blood-brain barrier dysfunction acting as biomarkers of neuroinflammation and progression to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation*, **13**, 194.
- Fischer S.**, Wobben M., Marti H.H., Renz D. and Schaper W. (2002). Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1. *Microvasc. Res.*, **63**, 70–80.
- Fisher M.D.** and Bastan B. (2012) identifying and utilizing the ischemic penumbra. **NEUROLOGY**, **79**, S79-S85
- Fiuza C.**, Bustin M., Talwar S., Tropea M., Gerstenberger E., Shelhamer J.H. and Suffredini A.F. (2003) Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood*, **101**, 2652–2660.
- Flaumenhaft R.**, Dilks J.R., Richardson J., Alden E., Patel-Hett S.R., Battinelli E., Klement G.L., Sola-Visner M. and Italiano J.E. Jr. (2009) Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood*, **113**, 1112–1121.
- Freeman R.**, Niego B., Croucher D.R., Pedersen L.O., Medcalf R.L. (2014) t-PA, but not desmoteplase, induces plasmin-dependent opening of a blood-brain barrier model under normoxic and ischaemic conditions. *Brain Res.*, **1565**, 63-73.
- Freyssinet J.M.** (2003) Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J. Thromb. Haemost.*, **1**, 1655-1662.
- Fucikova J.**, Moserova I., Truxova I., Hermanova I., Vancurova I., Partlova S., Fialova A., Sojka L., Cartron P.F., Houska M., Rob L., Bartunkova J. and Spisek R. (2014) High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *Int. J. Cancer*, **135**, 1165-1177.

- Fujioka M.**, Nakano T., Hayakawa K., Irie K., Akitake Y., Sakamoto Y., Carl M., Yonekawa Y., Banno F., Kokame K., Miyata T., Nishio K., Okuchi K., Iwasaki K., Fujiwara M., Siesjo B.K. (2012) ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia–reperfusion injury. *Neurol Sci.*, **33**, 1107-15.
- Fukushima S.**, Coppen S.R., Varela-Carver A., Yamahara K., Sarathchandra P., Smolenski R.T., Yacoub M.H. and Suzuki K. (2006) A novel strategy for myocardial protection by combined antibody therapy inhibiting both P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 via retrograde intracoronary route. *Circulation*, **114**, I251–I256.

G

- García-Yébenes I.**, Sobrado M., Zarruk J.G., Castellanos M., Pérez de la Ossa N., Dávalos A., Serena J., Lizasoain I., and Moro M.A. (2011) A mouse model of hemorrhagic transformation by delayed tissue plasminogen activator administration after in situ thromboembolic stroke. *Stroke*, **42**, 196–203.
- Gardella S.**, Andrei C., Ferrera D. and Lotti L. (2002) The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.*, **3**, 995–1001.
- Garraud M.** (2014) Etude de la toxicité vasculaire de l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant après ischémie cérébrale. *Thèse de Doctorat Université Paris Descartes*
- Giansanti V.**, Torriglia A. and Scovassi A.I. (2011) Conversation between apoptosis and autophagy: “is it your turn or mine?” *Apoptosis*, **16**, 321-333
- Gibson B.A.** and Kraus W.L. (2012) New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 411–424.
- Gielen M.** (2010). Molecular operation of ionotropic glutamate receptors: proteins that mediate the excitatory synaptic neurotransmission. *Medecine/Sciences.*, **26**, 65-72.
- Ginsberg M.D.** and Pulsinelli W.A. (1994) The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic time window for acute stroke. *Ann. Neurol.*, **36**, 553–554.
- Girouard H.**, Wang G., Gallo E.F., Anrather J., Zhou P., Pickel V.M. and Iadecola C. (2009) NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *J. Neurosci.*, **29**, 2545-2552.
- Goldstein R.S.**, Gallowitsch-Puerta M., Yang L., Rosas-Ballina M., Huston J.M., Czura C.J., Lee D.C., Ward M.F., Bruchfeld A.N., Wang H., Lesser M.L., Church A.L., Litroff A.H., Sama A.E. and Tracey K.J. (2006) Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia. *Shock*, **25**, 571-574.
- Goldstein L.B.**, Bushnell C.D., Adams R.J., Appel L.J., Braun L.T., Chaturvedi S., Creager M.A., Culebras A., Eckel R.H., Hart R.G., Hinchey J.A., Howard V.J., Jauch E.C., Levine S.R., Meschia J.F., Moore W.S., Nixon J.V., Pearson T.A., American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Epidemiology and Prevention, Council for High Blood Pressure Research, Council on Peripheral Vascular Disease and Interdisciplinary Council on Quality of Care and Outcomes Research (2011) Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, **42**, 517-584.
- Goodwin G.H.**, Sanders C. and Johns E.W. (1973) A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur. J. Biochem.*, **38**, 14-19.
- Gong W.**, Li Y., Chao F., Huang G. and He F. (2009) Amino acid residues 201–205 in C-terminal acidic tail region plays a crucial role in antibacterial activity of HMGB1. *J. Biomed Sci.*, **16**, 83.
- Gong G.**, Xiang L., Yuan L., Hu L., Wu C., Yin L., Dong H. (2014). Protective Effect of Glycyrrhizin, a Direct HMGB1 Inhibitor, on Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion- Induced Inflammation, Oxidative Stress, and Apoptosis in Rats. *PLoS One.*, **9**, 89450.
- Goto S.**, Xue R., Sugo N., Sawada M., Blizzard K.K., Poitras M.F., Johns D.C., Dawson T.M., Dawson V.L., Crain B.J., Traystman R.J., Mori S., Hurn P.D. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase impairs early and long-term experimental stroke recovery. *Stroke*, **33**, 1101–1106.
- Gougeon M.-L.** and Bras M. (2011) Natural killer cells, dendritic cells, and the alarmin high-mobility group box 1 protein: A dangerous trio in HIV-1 infection? *Curr. Opin. HIV AIDS*, **6**, 364–372.
- Greenberg G.**, Jin K. (2013) Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke. *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, 1753-61.

- Gupte R.**, Liu Z. and Kraus W.L. (2017) PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. *Genes Dev.*, **31**, 101–126.
- Gurman P.**, Miranda O.R., Nathan A., Washington C., Rosen Y. and Elman N.M. (2015) Recombinant tissue plasminogen activators (rtPA): a review. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **97**, 274-285
- Gürsoy-Ozdemir Y.**, Can A. and Dalkara T. (2004) Reperfusion- induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke*, **35**, 1449-1453.
- György B.**, Szabó T.G., Pásztói M., Pál Z., Misják P., Aradi B., László V., Pállinger E., Pap E., Kittel A., Nagy G., Falus A. and Buzás E.I. (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci*, **68**, 2667–2688.

H

- Hacke W.**, Donnan G., Fieschi C., Kaste M., von Kummer R., Broderick J.P., Brott T., Frankel M., Grotta J.C., Haley E.C. Jr, Kwiatkowski T., Levine S.R., Lewandowski C., Lu M., Lyden P., Marler J.R., Patel S., Tilley B.C., Albers G., Bluhmki E., Wilhelm M., Hamilton S., ATLANTIS trials Investigators, ECASS trials Investigators and NINDS rt-PA Study Group Investigators. (2004) Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet*, **363**, 768-774.
- Hacke W.**, Kaste M., Bluhmki E., Brozman M., Dávalos A., Guidetti D., Larrue V., Lees K.R., Medeghri Z., Machnig T., Schneider D., Von Kummer R., Wahlgren N., Toni D. and ECASS investigators (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.*, **359**, 1317–1329.
- Haddad M.**, Rhinn H., Bloquel C., Coqueran B., Szabó C., Plotkine M., Scherman D. and Margail I. (2006) Anti-inflammatory effects of PJ34, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, in transient focal cerebral ischemia in mice. *Br. J. Pharmacol.*, **149**, 23–30.
- Haddad M.**, Beray-Berthat V., Coqueran B., Palmier B., Szabo C., Plotkine M. and Margail I. (2008) Reduction of hemorrhagic transformation by PJ34, a poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor, after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **588**, 52–57.
- Haddad M.**, Beray-Berthat V., Coqueran B., Plotkine M., Marchand-Leroux C. and Margail I. (2013) Combined therapy with PJ34, a poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor, reduces tissue plasminogen activator-induced hemorrhagic transformations in cerebral ischemia in mice. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **27**, 393–401.
- Hajjar K.A.**, Jacovina A.T. and Chacko J. (1994) An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J. Biol. Chem.*, **269**, 21191-21197.
- Hamby A.M.**, Suh S.W., Kauppinen T.M. and Swanson R.A. (2007) Use of a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor to suppress inflammation and neuronal death after cerebral ischemia-reperfusion. *Stroke*, **38**, 632–636.
- Hanspal M.** and Hanspal J.S. (1994) The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. *Blood*, **84**, 3494-3504.
- Haraba R.**, Suica V.I., Uyy E., Ivan L. and Antohe F. (2011) Hyperlipidemia stimulates the extracellular release of the nuclear high mobility group box 1 protein. *Cell Tissue Res.*, **346**, 361–368.
- Hartmann A.**, Rundek T., Mast H., Paik M.C., Boden-Albala B., Mohr J.P. and Sacco R.L. (2001) Mortality and causes of death after first ischemic stroke. The Northern Manhattan Stroke Study. *Neurology*, **57**, 2000-2005.
- Hassa P.O.**, Covic M., Hasan S., Imhof R. and Hottiger M.O. (2001) The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *J. Biol. Chem.*, **276**, 45588–45597.
- Hassa P.O.** and Hottiger M.O. (2002) The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 1534–1553.
- Hassa P.O.**, Haenni S.S., Buerki C., Meier N.I., Lane W.S., Owen H., Gersbach M., Imhof R. and Hottiger M.O. (2005) Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. *J. Biol. Chem.*, **280**, 40450–40464.
- Hassa P.O.**, Haenni S.S., Elser M. and Hottiger M.O. (2006) Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 789-829.
- Hassa P.O.** and Hottiger M.O. (2008) The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front. Biosci.*, **13**, 3046-3082.

- Hayakawa K.**, Qiu J. and Lo E.H. (2010) Biphasic actions of HMGB1 signaling in inflammation and recovery after stroke. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1207**, 50-57.
- He Q.**, You H., Li X.M., Liu T.H., Wang P. and Wang B.E. (2012) HMGB1 promotes the synthesis of pro-IL-1 β and pro-IL-18 by activation of p38 MAPK and NF- κ B through receptors for advanced glycation end-products in macrophages. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **13**, 1365–1370.
- Hebert M.**, Lesept F., Vivien D. and Macrez R. (2016) The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA). *Rev. Neurol. (Paris)*, **172**, 186-197.
- Heeres J.T.** and Hergenrother P.J. (2007) Poly(ADP-ribose) makes a date with death. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **11**, 644–653.
- Hegedű C.** and Virág L. (2014) Inputs and outputs of poly(ADP-ribosyl)ation: Relevance to oxidative Stress. *Redox Biol.*, **2**, 978-982.
- Hermann D.M.** and Zechariah A. (2009) Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **29**, 1620-43.
- Herring J.M.**, McMichael M.A. and Smith S.A. (2013) Microparticles in health and disease. *J. Vet. Intern. Med.*, **27**, 1020-1033.
- Hoppe G.**, Talcott K.E., Bhattacharya S.K., Crabb J.W. and Sears J.E. (2006) Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein Hmgb1. *Exp. Cell Res.*, **312**, 3526–3538.
- Hörmann M.**, Mey L., Kharip Z., Hildenberg A., Nemeth K., Heidt M., Renz H. and Al-Fakhri N. (2011) Vascular endothelial growth factor confers endothelial resistance to apoptosis through poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Thromb. Haemost.*, **9**, 1391-1403.
- Horstman L.L.** and Ahn Y.S. (1999) Platelet microparticles: A wide-angle perspective. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **30**, 111–142.
- Horstman L.L.**, Jy W., Minagar A., Bidot C.J., Jimenez J.J., Alexander J.S. and Ahn Y.S. (2007) Cell-derived microparticles and exosomes in neuroinflammatory disorders. *Int. Rev. Neurobiol.*, **79**, 227–268.
- Horstman L.L.**, Jy W., Bidot C.J., Nordberg M.L., Minagar A., Alexander J.S., Kelley R.E. and Ahn Y.S. (2009) Potential roles of cell-derived microparticles in ischemic brain disease. *Neurol. Res.*, **31**, 799-806.
- Hossmann K.-A.** (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann. Neurol.*, **36**, 557-565.
- Hoyer F.F.**, Nickenig G. and Werner N. (2010) Microparticles – messengers of biological information. *J. Cell. Mol. Med.*, **14**, 2250-2256.
- Hristov M.**, Erl W., Linder S., Weber PC. (2004). Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood.*, **104**, 2761-6.
- Hu G.**, Wu Z., Yang F., Zhao H., Liu X., Deng Y., Shi M. and Zhao G. (2013) Ginsenoside Rd blocks AIF mitochondrio-nuclear translocation and NF- κ B nuclear accumulation by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1 after focal cerebral ischemia in rats. *Neurol. Sci.*, **34**, 2101–2106.
- Hua H.T.**, Albadawi H., Entabi F., Conrad M., Stoner MC., Meriam BT., Sroufe R., Houser S., Lamuraglia GM., Watkins MT. Polyadenosine diphosphate-ribose polymerase inhibition modulates skeletal muscle injury following ischemia reperfusion. *Arch Surg.*, **2005**; **140**(4):344-51.
- Huang M.**, Hu Y.-Y. and Dong X.-Q. (2009) High concentrations of procoagulant microparticles in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with acute basal ganglia hemorrhage are associated with poor outcome. *Surg. Neurol.*, **72**, 481–489.
- Huang J.M.**, Hu J., Chen N., Hu M.L. (2013) Relationship between plasma high-mobility group box-1 levels and clinical outcomes of ischemic stroke. *J. Crit. Care*, **28**, 792–797.
- Huber J.**, Vales A., Mitulovic G., Blumer M., Schmid R., Witztum J.L., Binder B.R. and Leitinger N. (2002) Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 101–107.
- Hugel B.**, Martínez M.C., Kunzelmann C., Freyssinet J.-M., (2005). Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda, Md.)*, **20**, 22–27.
- Hui L.**, Yao Y., Wang S., Yu Y., Dong N., Li H. and Sheng Z. (2009) Inhibition of Janus kinase 2 and signal transduction and activator of transcription 3 protect against cecal ligation and puncture-induced multiple organ damage and mortality. *J. Trauma*, **66**, 859–865.
- Huttunen H.J.**, Fages C. and Rauvala H. (1999) Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF- κ B require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, **274**, 19919-19924.

Huttunen H.J., Fages C., Kuja-Panula J., Ridley A.J. and Rauvala H. (2002) Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res.*, **62**, 4805–4811.

I

Ijichi A., Sakuma S. and Tofilon P.J. (1995) Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression in normal rat astrocyte cultures. *Glia*, **14**, 87–93.

Ishiguro M., Mishiro K., Fujiwara Y., Chen H., Izuta H., Tsuruma K., Shimazawa M., Yoshimura S., Satoh M., Iwama T. and Hara H. (2010) Phosphodiesterase-III inhibitor prevents hemorrhagic transformation induced by focal cerebral ischemia in mice treated with tPA. *Plos One*, **5**, e15178.

Ito I., Fukazawa J. and Yoshida M. (2007) Post-translational methylation of high mobility group box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils. *J. Biol. Chem.*, **282**, 16336–16344

Ito A., Niizuma K., Shimizu H., Fujimura M., Hasumi K. and Tominaga T. (2014) SMTP-7, a new thrombolytic agent, decreases hemorrhagic transformation after transient middle cerebral artery occlusion under warfarin anticoagulation in mice. *Brain Res.*, **1578**, 38-48.

Iwashita A., Tojo N., Matsuura S., Yamazaki S., Kamijo K., Ishida J., Yamamoto H., Hattori K., Matsuoka N. and Mutoh S. (2004) A novel and potent poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, FR247304 (5-chloro-2-[3-(4-phenyl-3,6-dihydro-1(2H)-pyridinyl)propyl]-4(3H)-quinazolinone), attenuates neuronal damage in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **310**, 425–436.

J

Jansen F., Yang X., Hoyer F.F., Paul K., Heiermann N., Becher M.U., Hussein N.A., Kebschull M., Bedorf J., Franklin B.S., Latz E., Nickenig G. and Werner N. (2012) Endothelial microparticle uptake in target cells is annexin I/phosphatidylserine receptor dependent and prevents apoptosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **32**, 1925- 1935.

Jiang Q., Zhang R.L., Zhang Z.G., Ewing J.R., Jiang P., Divine G.W., Knight R.A., Chopp M., 2000. Magnetic resonance imaging indexes of therapeutic efficacy of recombinant tissue plasminogen activator treatment of rat at 1 and 4 hours after embolic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **20**, 21–27.

Jiang W. and Pisetsky DS. (2006) The role of IFN-alpha and nitric oxide in the release of HMGB1 by RAW 264.7 cells stimulated with polyinosinic-polycytidylic acid or lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, **177**, 3337–3343.

Jiang W., Bell C.W and Pisetsky D.S. (2007) The Relationship between Apoptosis and High-Mobility Group Protein 1 Release from Murine Macrophages Stimulated with Lipopolysaccharide or Polyinosinic-Polycytidylic Acid. *J Immunol.*, **178**, 6495-6503

Jimenez J.J., Jy W., Mauro L.M., Soderland C., Horstman L.L. and Ahn Y.S. (2003) Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb. Res.*, **109**, 175–180.

Ju B.G., Solum D., Song E.J., Lee K.J., Rose D.W., Glass C.K. and Rosenfeld M.G. (2004) Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase IIdelta-dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell*, **119**, 815–829.

Jung K.H., Chu K., Lee S.T., Park H.K., Bahn J.J., Kim D.H., Kim J.H., Kim M., Kun Lee S. and Roh J.K. (2009) Circulating endothelial microparticles as a marker of cerebrovascular disease. *Ann. Neurol.*, **66**, 191–199.

Jy W., Horstman L.L., Jimenez J.J., Ahn Y.S., Biró E., Nieuwland R., Sturk A., Dignat-George F., Sabatier F., Camoin-Jau L., Sampol J., Hugel B., Zobairi F., Freyssinet J.M., Nomura S., Shet A.S., Key N.S. and Hebbel R.P. (2004) Measuring circulating cell-derived microparticles. *J. Thromb. Haemost.*, **2**, 1842-1851.

Jy W., Jimenez J.J., Mauro L.M., Horstman L.L., Cheng P., Ahn E.R., Bidot C.J. and Ahn, Y.S. (2005) Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation. *J. Thromb.Haemost.*, **3**, 1301–1308.

K

- Kagitani H.**, Tagawa M., Hatanaka K., Ikari T., Saito A., Bando H., Okada K. and Matsuo O. (1985) Expression in *E. coli* of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity. *FEBS Lett.*, **189**, 145-149.
- Kale G.**, Naren AP., Sheth P., and Rao RK. (2003) Tyrosine phosphorylation of occludin attenuates its interactions with ZO-1, ZO-2, and ZO-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 324-329.
- Kamide T.**, Kitao Y., Takeichi T., Okada A., Mohri H., Schmidt A.M., Kawano T., Munesue S., Yamamoto Y., Yamamoto H., Hamada J. and Hori O. (2012) RAGE mediates vascular injury and inflammation after global cerebral ischemia. *Neurochem. Int.*, **60**: 220-228.
- Kanazawa M.**, Igarashi H., Kawamura K., Takahashi T., Kakita A., Takahashi H., Nakada T., Nishizawa M. and Shimohata T. (2011) Inhibition of VEGF signaling pathway attenuates hemorrhage after tPA treatment. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **31**, 1461-1474.
- Kanazawa M.**, Takahashi T., Nishizawa M. and Shimohata T. (2017) Therapeutic Strategies to Attenuate Hemorrhagic Transformation After Tissue Plasminogen Activator Treatment for Acute Ischemic Stroke. *J. Atheroscler. Thromb.*, **24**, 240-253.
- Kang H.C.**, Lee Y.I., Shin J.H., Andrabi S.A., Chi Z., Gagné J.P., Lee Y., Ko H.S., Lee B.D., Poirier G.G., Dawson V.L. and Dawson T.M. (2001) Iduna is a poly(ADP-ribose) (PAR)-dependent E3 ubiquitin ligase that regulates DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 14103-14108.
- Kang R.**, Chen R., Zhang Q., Hou W., Wu S., Cao L., Huang J., Yu Y., Fan X.-G., Yan Z., Sun X., Wang H., Wang Q., Tsung A., Billiar T.R., Zeh H.J. 3rd, Lotze M.T. and Tang D. (2014) HMGB1 in Health and Disease. *Mol. Aspects Med.*, **40**, 1–116.
- Kassem-Moussa H.** and Graffagnino C. (2002) Non occlusion and spontaneous recanalization rates in acute ischemic stroke: a review of cerebral angiography studies. *Arch. Neurol.*, **59**, 1870–1873.
- Kauppinen T.M.**, Chan W.Y., Suh S.W., Wiggins A.K., Huang E.J. and Swanson R.A. (2006) Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 7136–7141.
- Kaur J.**, Zhao Z., Klein G.M., Lo E.H. and Buchan A.M. (2004) The neurotoxicity of tissue plasminogen activator? *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **24**, 945–963.
- Kawaichi M.**, Ueda K. and Hayaishi O. (1981) Multiple autopoly(ADP-Ribosyl)ation of rat liver poly(ADP-ribose) synthetase. Mode of modification and properties of automodified synthetase. *J. Biol. Chem.*, **256**, 9483–9489.
- Kawase T.**, Sato K., Ueda T. and Yoshida M. (2008) Distinct domains in HMGB1 are involved in specific intramolecular and nucleosomal interactions. *Biochemistry*, **47**, 13991–13996.
- Kazama H.**, Ricci J.-E., Herndon J.M., Hoppe G., Green D.R. and Ferguson T.A. (2008) Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity*, **29**, 21–32.
- Kerschen E.J.**, Fernandez J.A., Cooley B.C., Yang X.V., Sood R., Mosnier L.O., Castellino F.J., Mackman N., Griffin J.H. and Weiler H. (2007) Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. *J. Exp. Med.*, **204**, 2439–2448.
- Khalessi A.A.**, Natarajan S.K., Orion D., Binning M.J., Siddiqui A., Levy E.I., Hopkins L.N., 2011. Acute stroke intervention. *JACC. Cardiovascular interventions.*, **4**, 261–269.
- Khatri P.**, Neff J., Broderick J.P., Khoury J.C., Carrozzella J., Tomsick T. and IMS-I Investigators (2005) Revascularization end points in stroke interventional trials: recanalization versus reperfusion in IMS-I. *Stroke*, **36**, 2400–2403.
- Khoshnam S.E.**, Winlow W., Farzaneh M., Farbood Y. and Moghaddam H.F. (2017) Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol. Sci.*, **38**, 1167-1186.
- Kim M.Y.**, Zhang T. and Kraus W.L. (2005) Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev.*, **19**, 1951-1967.
- Kim J.B.**, Sig Choi J., Yu Y.M., Nam K., Piao C.S., Kim S.W., Lee M.H., Han P.L., Park J.S. and Lee J.K. (2006) HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. *J. Neurosci.*, **26**, 6413-6421.
- Kim J.-B.**, Lim C.M., Yu Y.-M. and Lee J.-K. (2008) Induction and Subcellular Localization of High-Mobility Group

- Box-1 (HMGB1) in the Postischemic Rat Brain. *J. Neurosci. Res.*, **86**, 1125–1131.
- Kim J.H.**, Kim S.J., Lee I.S., Lee M.S., Uematsu S., Akira S. and Oh K.I. (2009) Bacterial endotoxin induces the release of high mobility group box 1 via the IFN-beta signaling pathway. *J. Immunol.*, **182**, 2458–2466.
- Kim J.**, Sohn E., Kim C.S., Jo K. and Kim J.S. (2011a) The role of high-mobility group box-1 protein in the development of diabetic nephropathy. *Am. J. Nephrol.*, **33**, 524–529.
- Kim I.D.**, Shin J.Y., Kim S.W., Choi S., Ahn J., Han P.L, Park J.S and Lee J.K. (2011b). Intranasal delivery of HMGB1 siRNA confers target gene knockdown and robust neuroprotection in the postischemic brain. *Mol. Ther.*, **20**, 829-39.
- Kim S.W.**, Jin Y., Shin J.Y., Kim I.D., Lee H.K., Park S. Han P.L, Lee J.K. (2012) Glycyrrhizic acid affords robust neuroprotection in the postischemic brain via anti-inflammatory effect by inhibiting HMGB1 phosphorylation and secretion. *Neurobiology of disease.*, **46**, 147-56
- Kim Y.M.**, Kim J.H., Park S.W., Kim H.J. and Chang K.C. (2015) Retinoic acid inhibits tissue factor and HMGB1 via modulation of AMPK activity in TNF- α activated endothelial cells and LPS-injected mice. *Atherosclerosis*, **241**, 615-623.
- Kim S.Y.**, Cheon S.Y., Kim E.J., Lee J.H., Kam E.H., Kim J.M., Park M. and Koo B.M. (2017) Isoflurane Postconditioning Inhibits tPA-Induced Matrix Metalloproteinases Activation After Hypoxic Injury via Low-Density Lipoprotein Receptor Related Protein and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. *Neurochem. Res.*, **42**, 1533-1542.
- Kimura K.**, Aoki J., Sakamoto Y., Kobayashi K., Sakai K., Inoue T., Iguchi Y. and Shibazaki K. (2012) Administration of edaravone, a free radical scavenger, during t-PA infusion can enhance early recanalization in acute stroke patients--a preliminary study. *J. Neurol. Sci.*, **313**, 132-136.
- King R.S.** and Newmark P.A. (2012) The cell biology of regeneration. *J. Cell Biol.*, **196**, 553–562.
- Kleine H.**, Poreba E., Lesniewicz K., Hassa P.O., Hottiger M.O., Litchfield D.W., Shilton B.H. and Lüscher B. (2008) Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation. *Mol. Cell*, **32**, 57–69.
- Klune J.R.**, Dhupar R., Cardinal J., Billiar T.R. and Tsung A. (2008) HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol. Med.*, **14**, 476-484.
- Koga H.**, Sugiyama S., Kugiyama K., Watanabe K., Fukushima H., Tanaka T., Sakamoto T., Yoshimura M., Jinnouchi H. and Ogawa H. (2005) Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **45**, 1622–1630.
- Koh S.-H.**, Park Y., Song C.W., Kim J.G., Kim K., Kim J., Kim M.-H., Lee S.R., Kim D.W., Yu H.-J., Chang D.-I., Hwang S.J. and Kim S.H. (2004) The effect of PARP inhibitor on ischaemic cell death, its related inflammation and survival signals. *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 1461–1472.
- Koh S.-H.**, Chang D.-I., Kim H.-T., Kim J., Kim M.-H., Kim K.S., Bae I., Kim H., Kim D.W. and Kim S.H. (2005) Effect of 3-aminobenzamide, PARP inhibitor, on matrix metalloproteinase-9 level in plasma and brain of ischemic stroke model. *Toxicology*, **214**, 131–139.
- Kokawa T.**, Nomura S., Yanabu M. and Yasunaga K. (1993) Detection of platelet antigen for antiplatelet antibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura by flow cytometry, antigen-capture ELISA, and immunoblotting: a comparative study. *Eur. J. Haematol.*, **50**, 74–80.
- Komjáti K.**, Mabley J.G., Virág L., Southan G.J., Salzman A.L. and Szabó C. (2004). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition protect neurons and the white matter and regulates the translocation of apoptosis-inducing factor in stroke. *Int. J. Mol. Med.*, **13**, 373-382.
- Koudstaal P.J.**, Stibbe J. and Vermeulen M. (1988) Fatal ischaemic brain oedema after early thrombolysis with tissue plasminogen activator in acute stroke. *BMJ*, **297**, 1571–1574.
- Krishnakumar R.** and Kraus W.L. (2010) The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol. Cell*, **39**: 8-24.
- Kruithof E.K.** and Dunoyer-Geindre S. (2014) Human tissue-type plasminogen activator. *Thromb. Haemost.*, **112**, 243-254.
- Kuehl L.**, Salmond B. and Tran L. (1984) Concentrations of high-mobility-group proteins in the nucleus and cytoplasm of several rat tissues. *J. Cell Biol.*, **99**, 648–654.
- Kuriyama N.**, Nagakane Y., Hosomi A., Ohara T., Kasai T., Harada S., Takeda K., Yamada K., Ozasa K., Tokuda T., Watanabe Y., Mizuno T. and Nakagawa M. (2010) Evaluation of factors associated with elevated levels of platelet-derived microparticles in the acute phase of cerebral infarction. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, **16**, 26–32.

Kvajo M., Albrecht H., Meins M., Hengst U., Troncoso E., Lefort S., Kiss J.Z., Petersen C.C.H. and Monard D. (2004) Regulation of Brain Proteolytic Activity Is Necessary for the In Vivo Function of NMDA Receptors. *J. Neurosci.*, **24**, 9734–9743.

L

- Lackman R.L.**, Jamieson A.M., Griffith J.M., Geuze H. and Cresswell P. (2007) Innate immune recognition triggers secretion of lysosomal enzymes by macrophages. *Traffic*, **8**, 1179–1189.
- Lackner P.**, Dietmann A., Beer R., Fischer M., Broessner G., Helbok R., Marxgut J., Pfausler B. and Schmutzhard E. (2010) Cellular microparticles as a marker for cerebral vasospasm in spontaneous subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, **41**, 2353–2357.
- Lacroix R.**, Sabatier F., Mialhe A., Basire A., Pannell R., Borghi H., Robert S., Lamy E., Plawinski L., Camoin-Jau L., Gurewich V., Angles-cano E. and Dignat-George F. (2007) Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles : a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, **110**, 2432–2439.
- Lacroix R.** and Dignat-George F. (2012). Microparticles as a circulating source of procoagulant and fibrinolytic activities in the circulation. *Thromb. Res.*, **129**, S27–S29.
- Lacroix R.**, Plawinski L., Robert S., Doeuvre L., Sabatier F., Martinez de Lizarrondo S., Mezzapesa A., Anfosso F., Leroyer A.S., Poullin P., Jourde N., Njock M.S., Boulanger C.M., Anglés-Cano E., and Dignat-George F. (2012) Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis. *Haematologica* , **97**, 1864–1872.
- Lai Y.**, Chen Y., Watkins S.C., Nathaniel P.D., Guo F., Kochanek P.M., Jenkins L.W., Szabó C. and Clark R.S. (2008) Identification of poly-ADP-ribosylated mitochondrial proteins after traumatic brain injury. *J. Neurochem.*, **104**, 1700–1711.
- Lai C.P.** and Breakefield X.O. (2012) Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies. *Front. Physiol.*, **27**, article 228.
- Lapchak P.A.**, Araujo D.M., Song D., Wei J. and Zivin J.A. (2002) Neuroprotective effects of the spin trap agent disodium-[(tert-butylimino) methyl]benzene-1,3-disulfonate N-oxide (generic NXY-059) in a rabbit small clot embolic stroke model: combination studies with the thrombolytic tissue plasminogen activator. *Stroke*, **33**, 1411–1415.
- Lawrie A.S.**, Albany A., Cardigan R.A., Mackie I.J. and Harrison P. (2009) Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang*, **96**, 206–212
- Lecoffre C.**, de Peretti C., Gabet A., Grimaud O., Woimant F., Giroud M., Béjot Y. and Olié V. (2017) Mortalité par accident vasculaire cérébral en France en 2013 et évolutions 2008-2013. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, **5**, 95-100. http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2017/5/2017_5_2.html.
- Lee Y.J.**, Jy W., Horstman L.L., Janania J., Reyes Y., Kelley R.E. and Ahn Y.S. (1993) Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thromb. Res.*, **72**, 295–304.
- Lee S.Y.**, Jeon H.M., Kim C.H., Jeong E.K., Ju M.K., Park S.Y., Jung S.Y., Kim Y.J., Lim S.C., Han S.I. and Kang H.S. (2010a) CuZnSOD and MnSOD inhibit metabolic stress-induced necrosis and multicellular tumour spheroid growth. *Int. J. Oncol.*, **37**, 195-202.
- Lee SC.**, Lee KY., Kim YJ., Kim SH., Koh SH., Lee YJ. (2010b). Serum VEGF levels in acute ischaemic strokes are correlated with long-term prognosis. *Eur J Neurol.*, **17**, 45-51.
- Lee S.Y.**, Jeon H.M., Kim C.H., Ju M.K., Bae H.S., Park H.G., Lim S.C., Han S.I. and Kang H.S. (2011) Homeobox gene Dlx-2 is implicated in metabolic stress-induced necrosis. *Mol. Cancer*, **10** :113.
- Lee S.-T.**, Chu K., Jung K.-H., Kim J.-M., Moon H.-J., Bahn J.-J., Im W.-S., Sunwoo J., Moon J., Kim M., Lee S.K. and Roh J.-K. (2012) Circulating CD62E+ microparticles and cardiovascular outcomes. *PLoS One*, **7**, e35713.
- Lee S.K.**, Yang S.-H., Kwon I., Lee O.-H. and Heo J.H. (2014) Role of tumour necrosis factor receptor-1 and nuclear factor- κ B in production of TNF- α -induced pro-inflammatory microparticles in endothelial cells. *Thromb. Haemost.*, **112**, 580-588.
- Lenglet S.**, Montecucco F., Mach F., Schaller K., Gasche Y. and Copin J.-C. (2014) Analysis of the expression of nine secreted matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in the brain of mice subjected to ischaemic stroke. *Thromb. Haemost.*, **112**, 363-378.

- Lenmyr F., Ata K, funa K., Olsson Y., Terrent A.** (1998). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **57**, 874-82.
- Lenzsér G., Kis B., Snipes J.A., Gáspár T., Sándor P., Komjáti K., Szabó C. and Busija D.W.** (2007) Contribution of poly(ADP-ribose) polymerase to postischemic blood-brain barrier damage in rats. *J. Cereb. blood flow Metab.*, **27**, 1318–1326.
- Leong H.S., Podor T.J., Manocha B. and Lewis J.D.** (2011) Validation of flow cytometric detection of platelet microparticles and liposomes by atomic force microscopy. *J. Thromb. Haemost.*, **9**, 2466-2476.
- Leroyer A.S., Isobe H., Leseche G., Castier Y., Wassef M., Mallat Z., Binder B.R., Tedgui A. and Boulanger C.M.** (2007) Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **49**, 772-777.
- Leroyer A.S., Ebrahimian T.G., Cochain C., Recalde A., Blanc Brude O., Mees B., Vilar J., Tedgui A., Levy B.I., Chimini G., Boulanger C.M. and Silvestre J.S.** (2009) Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation*, **119**, 2808-2817.
- Li J., Kokkola R., Tabibzadeh S., Yang R., Ochani M., Qiang X., Harris H.E., Czura C.J., Wang H., Ulloa L., Warren H.S., Moldawer L.L., Fink M.P., Andersson U., Tracey K.J. and Yang H.** (2003) Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol. Med.*, **9**, 37–45.
- Li X., Klaus J.A., Zhang J., Xu Z., Kibler K.K., Andrabi S.A., Rao K., Yang Z.-J., Dawson T.M., Dawson V.L. and Koehler R.C.** (2010) Contributions of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and -2 to nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and injury from focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.*, **113**, 1012–1022.
- Li Q, Syrovets T., Simmet T., Ding J., Xu J., Chen W., Zhu D., Gao P.** (2013). Plasmin induces intercellular adhesion molecule 1 expression in human endothelial cells via nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinases-dependent pathways. *Exp. Biol. Med.*, **238**, 176 – 186.
- Li Y.A., Pan R., Qin X.J. Yang W.L., Qi Z., Liu W., Liu K.J.** (2014). Ischemic neurons activate astrocytes to disrupt endothelial barrier via increasing VEGF expression. *J Neurochem.*, **129**, 120-129.
- Li P. and Qin C.** (2015) Elevated Circulating VE-Cadherin + CD144 + Endothelial Microparticles in Ischemic Cerebrovascular Disease *Thromb. Res.*, **135**, 375–381.
- Liesz A., Dalpke A., Mracsko E., Antoine D.J., Roth S., Zhou W., Yang H., Na S.Y., Akhisaroglu M., Fleming T., Eigenbrod T., Nawroth P.P., Tracey K.J. and Veltkamp R.** (2015) DAMP signaling is a key pathway inducing immune modulation after brain injury. *J. Neurosci.*, **35**, 583-598.
- Lijnen H. R.** (2001) Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb. Haemost.*, **86**, 324–333.
- Limana F., Germani A., Zacheo A., Kajstura J., Di Carlo A., Borsellino G., Leoni O., Palumbo R., Battistini L., Rastaldo R., Muller S., Pompilio G., Anversa P., Bianchi M.E. and Capogrossi M.C.** (2005) Exogenous high- mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit+ cell proliferation and differentiation. *Circ. Res.*, **97**, 73–e83.
- Lin H.** (2007). Nicotinamide adenine dinucleotide: beyond a redox coenzyme. *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 2541-2554.
- Lin L., Jin Y. and Hu K.** (2015). Tissue-type Plasminogen Activator (tPA) Promotes M1 Macrophage Survival through p90 Ribosomal S6 Kinase (RSK) and p38 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Pathway. *J Biol Chem.*, **290**, 7910–7917
- Liu D., Cheng T., Guo H., Fernández J.A., Griffin J.H., Song X. and Zlokovic B.V.** (2004) tPA neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat. Med.*, **10**, 1379-1383
- Liu H., Yao Y.M., Yu Y., Dong N., Yin H.N. and Sheng Z.Y.** (2007a) Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway in regulation of expression and inflammation-promoting activity of high mobility group box protein 1 in rat peritoneal macrophages. *Shock*, **27**, 55–60.
- Liu K., Mori S., Takahashi H.K., Tomono Y., Wake H., Kanke T., Sato Y., Hiraga N., Adachi N., Yoshino T. and Nishibori M.** (2007b). Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J.*, **21**, 3904-3916.
- Liu D., Gharavi R., Pitta M., Gleichmann M. and Mattson M.P.** (2009) Nicotinamide prevents NAD⁺ depletion and protects neurons against excitotoxicity and cerebral ischemia: NAD⁺ consumption by SIRT1 may endanger energetically compromised neurons. *Neuromolecular Med.*, **11**, 28–42.
- Liu Z., Wang Z., Han G., Huang L., Jiang J. and Li S.** (2016). Ketamine attenuates HMGB1-induced inflammatory responses in endothelial cells. *J. Surg. Research.*, **200**, 593-603.

- Lonskaya I.** and Potaman V.N. (2005) Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *J. Biol. Chem.*, **280**, 17076–17083.
- Loseva O.**, Jemth A.S., Bryant H.E., Schüler H., Lehtiö L., Karlberg T. and Helleday T. (2010) PARP-3 is a mono-ADP-ribosylase that activates PARP-1 in the absence of DNA. *J. Biol. Chem.*, **285**, 8054–8060.
- Loukili N.**, Rosenblatt-Velin N., Li J., Clerc S., Pacher P., Feihl F., Waeber B. and Liaudet L. (2011) Peroxynitrite induces HMGB1 release by cardiac cells in vitro and HMGB1 upregulation in the infarcted myocardium in vivo. *Cardiovascular Res.*, **89**, 586–594.
- Love S.**, Barber R. and Wilcock G.K. (1999) Neuronal accumulation of poly(ADP-ribose) after brain ischaemia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **25**, 98–103.
- Love S.**, Barber R. and Wilcock G.K. (2000) Neuronal death in brain infarcts in man. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **26**, 55–66.
- Lu B.**, Antoine D.J., Kwan K., Lundback P., Wahamaa H., Schierbeck H., Robinson M., Van Zoelen M.A., Yang H., Li J., Erlandsson-Harris H., Chavan S.S., Wang H., Andersson U. and Tracey K.J. (2014) JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 3068-3073.
- Lucas S.M.**, Rothwell N.J. and Gibson R.M. (2006) The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br. J. Pharmacol.*, **147**, S232–S240.
- Lukasik M.**, Rozalski M., Luzak B., Michalak S., Kozubski W. and Watala C. (2010) Platelet activation and reactivity in the convalescent phase of ischaemic stroke. *Thromb. Haemost.*, **103**, 644–650.
- Lukic-Panin V.**, Deguchi K., Yamashita T., Shang J., Zhang X., Tian F., Liu N., Kawai H., Matsuura T., Abe K. (2010). Free radical scavenger edaravone administration protects against tissue plasminogen activator induced oxidative stress and blood brain barrier damage. *Curr Neurovascl Res.*, **7**, 319–329.

M

- Machado L.S.**, Sazonova I.Y., Kozak A., Wiley D.C., El-Remessy A.B., Ergul A., Hess D.C., Waller J.L. and Fagan S.C. (2009) Minocycline and Tissue-Type Plasminogen Activator for Stroke: assessment of interaction potential. *Stroke*, **40**, 3028-3033
- MacKman N.** and Davis G.E. (2011) Blood coagulation and blood vessel development: is tissue factor the missing link? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **31**, 2364-2366.
- Mahagne M.-H.** (2008) La thrombolyse de l'infarctus cérébral aigu en 2008 : état des lieux et perspectives. *Sang thrombose vaisseaux*, **20**, 527-533.
- Mandal S. K.**, Rao L. V. M., Tran T. T. T. and Pendhurti U.R. (2005), A novel mechanism of plasmin-induced mitogenesis in fibroblasts. *J. Thromb. Haemost.*, **3**,163–169.
- Mao Z.** and Hine C. (2011) SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science*, **332**, 1443-1446.
- Margaill I.**, Plotkine M., Lerouet D. (2005) Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 429-443.
- Markiewicz M.**, Richard E., Marks N. and Ludwicka-Bradley A. (2013) Impact of endothelial microparticles on coagulation, inflammation, and angiogenesis in age-related vascular diseases. *J. Aging Res.*, **2013**, 734509.
- Marzesco A.-M.**, Janich P., Wilsch-Bräuninger M., Dubreuil V., Langenfeld K., Corbeil D. and Huttner W.B. (2005) Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J. Cell Sci.*, **118**, 2849–2858.
- Marzesco A.M.** (2013) Prominin-1-containing membrane vesicles: origins, formation, and utility. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **777**, 41–54.
- Mathew C.G.**, Goodwin G.H. and Johns E.W. (1979) Studies on the association of the high mobility group non-histone chromatin proteins with isolated nucleosomes. *Nucleic Acids Res.*, **6**, 167–179.
- Matsuo R.**, Ago T., Kamouchi M., Kuroda J., Kuwashiro T., Hata J., Sugimori H., Fukuda K., Gotoh S., Makiyama N., Fukuhara M., Awano H., Isomura T., Suzuki K., Yasaka M., Okada Y., Kiyohara Y and Kitazono T. (2013). Clinical significance of plasma VEGF value in ischemic stroke - research for biomarkers in ischemic stroke (REBIOS) study. *BMC. Neurol.*, **13**, 32.
- Matsuura S.**, Egi Y., Yuki S., Horikawa T., Satoh H. and Akira T. (2011) MP-124, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitor, ameliorates ischemic brain damage in a non-human primate model. *Brain Res.*, **1410**, 122-31.

- Matys T.** and Strickland S. (2003) Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage. *Nat. Med.*, **9**, 371–372.
- Maugeri N.**, Rovere-Querini P., Baldini M., Baldissera E., Sabbadini M. G., Bianchi M. E., and Manfredi A.A. (2014) Oxidative stress elicits platelet/leukocyte inflammatory interactions via HMGB1: a candidate for microvessel injury in systemic sclerosis. *Antioxid. Redox Signal.*, **20**, 1060–1074
- Mause S.F.** and Weber C. (2010) Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res.*, **107**, 1047–1057.
- Mazzon E.**, Genovese T., Di Paola R., Muià C., Crisafulli C., Malleo G., Esposito E., Meli E., Sessa E. and Cuzzocrea S. (2006) Effects of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase, in a mouse model of acute pancreatitis induced by cerulean. *Eur. J. Pharmacol.*, **549**, 149-156.
- Mehta S.L.**, Manhas N. and Raghur R. (2007) Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res. Rev.*, **54**, 34–66.
- Menini T.**, Ikeda H., Kimura S. and Gugliucci A. (2014) Circulating soluble RAGE increase after a cerebrovascular event. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **52**, 109-116.
- Ménissier de Murcia J.**, Ricoul M., Tartier L., Niedergang C., Huber A., Dantzer F., Schreiber V., Amé J.-C., Dierich A., LeMeur M., Sabatier L., Chambon P., de Murcia G. (2003) Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J.*, **22**, 2255–2263.
- Merenmies J.**, Pihlaskari R., Laitinen J., Wartiovaara J. and Rauvala H. (1991) 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, **266**, 16722–16729.
- Mey L.**, Hörmann M., Schleicher N., Reuter P., Dönges S., Kinscherf R., Gassmann M., Gerriets T. and Al-Fakhri N. (2013) Neuropilin-1 modulates vascular endothelial growth factor-induced poly(ADP-ribose)-polymerase leading to reduced cerebrovascular apoptosis. *Neurobiol. Dis.*, **59**, 111-25.
- Mezentsev A.**, Merks R.M., O’Riordan E., Chen J., Mendeleev N., Goligorsky M.S. and Brodsky S.V. (2005) Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **289**, H1106-H1114.
- Meziani F.**, Tesse A. and Andriantsitohaina R. (2008) Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacological rep.*, **60**, 75-84.
- Miyazaki T.**, Kimura Y., Ohata H., Hashimoto T., Shibata K., Hasumi K. and Honda K. (2011) Distinct effects of tissue-type plasminogen activator and SMT-7 on cerebrovascular inflammation following thrombolytic reperfusion. *Stroke*, **42**, 1097-1104.
- Mohan K.M.**, Crichton S.L., Grieve A.P., Rudd A.G., Wolfe C.D. and Heuschmann P.U. (2009) Frequency and predictors for the risk of stroke recurrence up to 10 years after stroke: the South London Stroke Register. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **80**, 1012-1018.
- Montaner J.**, Molina C.A., Monasterio J., Abilleira S., Arenillas J.F., Ribó M., Quintana M. and Alvarez-Sabín J. (2003) Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation*, **107**, 598–603.
- Montesano R.**, Pepper M. S., Mijhle-Steinleint U., Risau W., Wagner E. F., and Orci’ L. (1990). Increased Proteolytic Activity Is Responsible for the Aberrant Morphogenetic Behavior of Endothelial Cells Expressing the Middle T Oncogene. *Cell.*, **62**, 435-445.
- Montrucchio G.**, Lupia E., De Martino A., Silvestro L., Savu S.R., Cacace G., De Filippi P.G., Emanuelli G. and Camussi G. (1996) Plasmin promotes an endothelium-dependent adhesion of neutrophils. Involvement of platelet activating factor and P-selectin. *Circulation*, **93**, 2152–2160.
- Mooberry M.J.** and Key N.S. (2015) Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis. *Cytometry A.*, **89**, 111-122.
- Morel O.**, Toti F., Hugel B. and Freyssinet J.-M. (2004). Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr. Opin. Hematol.*, **11**, 156–164.
- Morel O.**, Jesel L., Freyssinet J.-M. and Toti F. (2011) Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **31**, 15–26.
- Moroni F.** (2008) Poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP-1) and postischemic brain damage. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **8**, 96–103.
- Moroni F.** and Chiarugi A. (2009) Post-ischemic brain damage: targeting PARP-1 within the ischemic neurovascular units as a realistic avenue to stroke treatment. *FEBS J.*, **276**, 36–45.
- Muhammad S.**, Barakat W., Stoyanov S., Murikinati S., Yang H., Tracey K.J., Bendszus M., Rossetti G., Nawroth

- P.P., Bierhaus A. and Schwaninger M. (2008) The HMGB1 Receptor RAGE Mediates Ischemic Brain Damage. *J. Neurosci.*, **28**, 12023–12031.
- Müller S.**, Scaffidi P., Degryse B., Bonaldi T., Ronfani L., Agresti A., Beltrame M. and Bianchi M.E. (2001) The double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J.*, **20**, 4337-4340.
- Mullins G.E.**, Sunden-Cullberg J., Johansson A.-S., Rouhiainen A., Erlandsson-Harris H., Yang H., Tracey K. J., Rauvalaz H., Palmblady J., Andersson J. and Treutiger C. J. (2004) Activation of human umbilical vein endothelial cells leads to relocation and release of high-mobility group box chromosomal protein 1. *Scand. J. Immunol.*, **60**, 566–573.
- Murata Y.**, Rosell A., Scannevin R.H., Rhodes K.J., Wang X. and Lo E.H. (2008) Extension of the thrombolytic time window with minocycline in experimental stroke. *Stroke*, **39**, 3372-3377.

N

- Nagy Z.**, Kolev K., Csonka E., Pék M. and Machovich R. 1995. Contraction of Human Brain Endothelial Cells Induced by Thrombogenic and Fibrinolytic Factors. *Stroke.*, **26**, 265-270.
- Nagayama T.**, Simon R.P., Chen D., Henshall D.C., Pei W., Stetler R.A. and Chen J. (2000) Activation of poly(ADPribose) polymerase in the rat hippocampus may contribute to cellular recovery following sublethal transient global ischemia. *J. Neurochem.*, **74**, 1636-1645.
- Nakajima H.**, Nagaso H., Kakui N., Ishikawa M., Hiranuma T. and Hoshiko S. (2004) Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells. *J. Biol. Chem.*, **279**, 42774–42786.
- Nakano T.**, Irie K., Hayakawa K., Sano K., Nakamura Y., Tanaka M., Yamashita Y., Satho T., Fujioka M., Muroi C., Matsuo K., Ishikura H., Futagami K. and Mishima K. (2015) Delayed treatment with ADAMTS13 ameliorates cerebral ischemic injury without hemorrhagic complication. *Brain Res.*, **1624**, 330-335
- Namiki A.**, Brogi E., Kearney M., Kim E.A., Wu T., Couffinhal T., Varticovski L. and Jeffrey M.I. (1995) Hypoxia Induces Vascular Endothelial Growth Factor in Cultured Human Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 31189–31195.
- Nassar T.**, Akkawi S., Shina A., Haj-Yehia A., Bdeir K., Tarshis M., Heyman S.N., Higazi A.A. (2004) In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone. *Blood*, **103**, 897–902.
- Nicole O.**, Docagne F., Ali C., Margail I., Carmeliet P., MacKenzie E.T., Vivien D. and Buisson A. (2001) The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat. Med.*, **7**, 59–64.
- Niego B.**, Freeman R., Puschnann B.T., Turnley A.M., Medcalf R.L. (2012) t-PA-specific modulation of a human blood-brain barrier model involves plasmin-mediated activation of the Rho kinase pathway in astrocytes. *Blood.*, **119**, 4752-4761.
- Nomura S.**, Tandon N.N., Nakamura T., Cone J., Fukuhara S. and Kambayashi J. (2001) High shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*, **158**, 277–287.
- Nomura S.**, Shouzu A., Taomoto K., Togane Y., Goto S., Ozaki Y., Uchiyama S. and Ikeda Y. (2009) Assessment of an ELISA kit for platelet-derived microparticles by joint research at many institutes in Japan. *J. Atheroscler. Thromb.*, **16**, 878-887

O

- O’Connell D.J.**, Rozenvayn N. and Flaumenhaft R. (2005) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates activation-induced platelet microparticle formation. *Biochemistry*, **44**, 6361–6370.
- Ogunshola O.O.**, Antic A., Donoghue M.J., Fan S.Y., Kim H., Stewart W.B., Madri J.A. and Ment L.R. (2002) Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *J. Biol. Chem.*, **277**, 11410–11415.
- Oh Y.J.**, Youn J.H., Ji Y., Lee S.E., Lim K.J., Choi J.E., Shin J.S. (2009) HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calcium-dependent mechanism. *J. Immunol.*, **182**, 5800–5809.

Omidi Y., Campbell L., Barar J., Connell D., Akhtar S. and Gumbleton M. (2003) Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, bEnd3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. *Brain Res.*, **990**, 95–112.

Osumi K., Ozeki Y., Saito S., Nagamura Y., Ito H., Kimura Y., Ogura H. and Nomura S. (2001) Development and assessment of enzyme immunoassay for platelet-derived microparticles. *Thromb. Haemost.*, **85**, 326–330.

P

Palumbo R., Sampaolesi M., De Marchis F., Tonlorenzi R., Colombetti S., Mondino A., Cossu G. and Bianchi M.E. (2004) Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J. Cell Biol.*, **164**, 441–449.

Pan Q., He C., Liu H., Liao X., Dai B., Chen Y., Yang Y., Zhao B., Bihl J. and Ma X. (2016) Microvascular endothelial cells-derived microvesicles imply in ischemic stroke by modulating astrocyte and blood brain barrier function and cerebral blood flow. *Mol. Brain*, **9**, 63.

Parcq J., Bertrand T., Montagne A., Baron A.F., Macrez R., Billard J.M., Briens A., Hommet Y., Wu J., Yepes M., Lijnen H.R., Dutar P., Anglés-Cano E. and Vivien D. (2012) Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death Differ.*, **19**, 1983–1991.

Parcq J., Bertrand T., Baron A.F., Hommet Y., Anglés-Cano E. and 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.

Park J.S., Svetkauskaite D., He Q., Kim J.Y., Strassheim D., Ishizaka A. and Abraham E. (2004a) Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J. Biol. Chem.*, **279**, 7370–7377.

Park E.-M., Cho S., Frys K., Racchumi G., Zhou P., Anrather J. and Iadecola C. (2004b) Interaction between inducible nitric oxide synthase and poly(ADP-ribose) polymerase in focal ischemic brain injury. *Stroke*, **35**, 2896–2901.

Park S. and Lippard S.J. (2011) Redox state-dependent interaction of HMGB1 and cisplatin-modified DNA. *Biochemistry*, **50**, 2567–2574.

Parkkinen H. and Rauvala H. (1991) Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphotericin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphotericin. *J. Biol. Chem.*, **266**, 16730–16735.

Parkkinen J., Raulo E., Merenmies J., Nolo R., Kajander E.O., Baumann M. and Rauvala H. (1993) Amphotericin the 30-kDa protein in a family of HMG1-type polypeptides enhanced expression in transformed cells, leading edge localization, and interactions with plasminogen activation. *J. Biol. Chem.*, **268**, 19726–19738.

Parsons M., Spratt N., Bivard A., Campbell B., Chung K., Miteff F., O'Brien B., Bladin C., McElduff P., Allen C., Bateman G., Donnan G., Davis S. and Levi C. (2012) A randomized trial of tenecteplase versus alteplase for acute ischemic stroke. *New Engl. J. Med.* **366**, 1099–1107.

Paschen W., Oláh L. and Mies G. (2000) Effect of transient focal ischemia of mouse brain on energy state and NAD levels: no evidence that NAD depletion plays a major role in secondary disturbances of energy metabolism. *J. Neurochem.*, **75**, 1675–1680.

Passalacqua M., Zicca A., Sparatore B., Patrone M., Melloni E., Pontremoli S. 1997. Secretion and binding of HMG1 protein to the external surface of the membrane are required for murine erythroleukemia cell differentiation. *FEBS Lett.*, **400**, 275–279.

Pawelczyk M., Baj Z., Chmielewski H., Kaczorowska B. and Klimek A. (2009) The influence of hyperlipidemia on platelet activity markers in patients after ischemic stroke. *Cerebrovasc. Dis.*, **27**, 131–137.

Peterson D.B., Sander T., Kaul S., Wakim B.T., Halligan B., Twigger S., Pritchard K.A. Jr, Oldham K.T. and Ou J.S. (2008) Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF- α -derived endothelial microparticles. *Proteomics*, **8**, 2430–2446.

Perez-Casal M., Downey C., Cutillas-Moreno B., Zuzel M., Fukudome K. and Toh C.H. (2009) Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. *Haematologica*, **94**, 387–394.

- Pineda D.**, AmpurdanÉS C., Medina M. G., Serratosa J., Tusell J. M., Saura J., Planas A. M. and Navarro P. (2012). Tissue plasminogen activator induces microglial inflammation via a noncatalytic molecular mechanism involving activation of mitogen-activated protein kinases and Akt signaling pathways and AnnexinA2 and Galectin-1 receptors. *Glia.*, **60**, 526–540.
- Pinard E.** and Engrand N. (1999) Physiopathology of cerebral ischemia. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.*, **18**, 574-582.
- Pinoit J.M.**, Bejot Y., Rouaud O., Benatru I., Osseby G.V., Bonin B., Gisselmann A. and Giroud M. (2006) Post-stroke depression, another handicap. *Presse Med.*, **35**, 1789-1793.
- Porro C.**, Trotta T. and Panaro M.A. (2015) Microvesicles in the brain: Biomarker, messenger or mediator ? *J. Neuroimmunol.*, **288**, 70-78.
- Pyriochou A.**, Olah G., Deitch E.A., Szabó C. and Papapetropoulos A. (2008) Inhibition of angiogenesis by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ-34. *Int. J. Mol. Med.*, **22**, 113-118.

Q

- Qin W.D.**, Mi S.H., Li C., Wang G.X., Zhang J.N., Wang H., Zhang F., Ma Y., Wu D.W. and Zhang M. (2015) Low shear stress induced HMGB1 translocation and release via PECAM-1/ PARP-1 pathway to induce inflammation response. *PLoS One*, **10**, e0120586.
- Qiu J.**, Nishimura M., Wang Y., Sims J.R., Qiu S., Savitz S.I., Salomone S. and Moskowitz M.A. (2008) Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **28**, 927-938.

R

- Racz B.**, Hanto K., Tapodi A., Solti I., Kalman N., Jakus P., Kovacs K., Debreceni B., Gallyas F., Sumegi B., 2010. Regulation of MKP-1 expression and MAPK activation by PARP-1 in oxidative stress: a new mechanism for the cytoplasmic effect of PARP-1 activation. *Free Radic Biol Med.*, **49**, 1978–1988.
- Rajesh M.**, Mukhopadhyay P., Godlewski G., Bátkai S., Haskó G., Liaudet L. and Pacher P. (2006a) Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition decreases angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, 1056-1062.
- Rajesh M.**, Mukhopadhyay P., Bátkai S., Godlewski G., Haskó G., Liaudet L. and Pacher P. (2006b) Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase inhibits angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, 352-357.
- Rand M.L.**, Wang H., Bang K.W., Packham M.A. and Freedman J. (2006) Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. *J. Thromb. Haemost.*, **4**, 1621-1623.
- Rank A.**, Nieuwland R., Crispin A., Grutzner S., Iberer M., Toth B. and Pihusch R. (2011) Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets*, **22**, 111-116.
- Rapizzi E.**, Fossati S., Moroni F. and Chiarugi A. (2004) Inhibition of poly(ADP-ribose) glycohydrolase by gallotannin selectively up-regulates expression of proinflammatory genes. *Mol. Pharmacol.*, **66**, 890-898.
- Ratajczak J.**, Wysoczynski M., Hayek F., Janowska-Wieczorek A. and Ratajczak M.Z. (2006a) Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, **20**, 1487–1495
- Ratajczak J.**, Miekus K., Kucia M., Zhang J., Reza R., Dvorak P. and Ratajczak M.Z. (2006b) Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, **20**, 847–856.
- Rautou P.E.**, Vion A.C., Amabile N., Chironi G., Simon A., Tedgui A. and Boulanger C.M. (2011a) Microparticles, vascularfunction, and atherothrombosis. *Circ. Res.*, **109**, 593–606.
- Rautou P.**, Leroyer A.S, Ramkhelawon B., Devue C., Duflaut D., Vion A.C., Nalbone G., Castier Y., Leseche G., Lehoux S., Tedqui A. and Boulanger C.M. (2011b) Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circ. Res.*, **108**, 335–343.
- Rauvala H.** and Rouhiainen A. (2007) RAGE as a receptor of HMGB1 (Amphoterin): roles in health and disease. *Curr. Mol. Med.*, **7**, 725–734.
- Read C.M.**, Cary P.D., Crane-Robinson C., Driscoll P.C., and Norman D.G. (1993) Solution structure of a DNA-

binding domain from HMG1. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3427–3436.

- Rha** J.-H. and Saver J.L. (2007) The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke*, **38**, 967–973.
- Riffell** J.L., Lord C.J. and Ashworth A. (2012) Tankyrase-targeted therapeutics: expanding opportunities in the PARP family. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11**, 923–936.
- Romanos** E., Planas AM, Amaro S, Chamorro A. (2007). Uric acid reduces brain damage and improves the benefits of rt-PA in a rat model of thromboembolic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **27**, 14–20.
- Rosell** A., Cuadrado E., Ortega-Aznar A., Hernández-Guillamon M., Lo E.H. and Montaner J. (2008) MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke*, **39**, 1121–1126.
- Rouhiainen** A., Imai S., Rauvala H. and Parkkinen J. (2000) Occurrence of amphoterin (HMG1) as an endogenous protein of human platelets that is exported to the cell surface upon platelet activation. *Thromb. Haemost.*, **84**, 1087–1094.
- Roussel** B.D., Mysiorek C., Rouhiainen A., Jullienne A., Parcq J., Hommet Y., Culot M., Berezowski V., Cecchelli R., Rauvala H., Vivien D. and Ali C. (2011) HMGB-1 promotes fibrinolysis and reduces neurotoxicity mediated by tissue plasminogen activator. *J. Cell Sci.*, **124**, 2070–2076.
- Rubiera** M., Alvarez-Sabín J., Ribo M., Montaner J., Santamarina E., Arenillas J.F., Huertas R., Delgado P., Purroy F. and Molina C.A. (2005) Predictors of early arterial reocclusion after tissue plasminogen activator-induced recanalization in acute ischemic stroke. *Stroke*, **36**, 1452–1456.

S

- Sairanen** T., Szepesi R., Karjalainen-Lindsberg M.-L., Saksi J., Paetau A. and Lindsberg P.J. (2009) Neuronal caspase-3 and PARP-1 correlate differentially with apoptosis and necrosis in ischemic human stroke. *Acta Neuropathol.*, **118**, 541–552.
- Samper** E., Goytisolo F.A., Ménissier-de Murcia J., González-Suárez E., Cigudosa J.C., de Murcia G. and Blasco M.A. (2001) Normal telomere length and chromosomal end capping in poly(ADP-ribose) polymerase deficient mice and primary cells despite increased chromosomal instability. *J. Cell Biol.*, **154**, 49–60.
- Samson** A.L., Nevin S.T., Croucher D., Niego B., Daniel P.B., Weiss T.W., Moreno E., Monard D., Lawrence D.A. and Medcalf R.L. (2008) Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *J. Neurochem.*, **107**, 1091–1101.
- Sapet** C., Simoncini S., Loriod B., Puthier D., Sampol J., Nguyen C., Dignat-George F. and Anfosso F. (2006) Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood*, **108**, 1868–1876.
- Sapojnikova** N., Kartvelishvili T., Asatiani N., Zinkevich V., Kalandadze I., Gugutsidze D., Shakarishvili R. and Tsiskaridze A. (2014) Correlation between MMP-9 and extracellular cytokine HMGB1 in prediction of human ischemic stroke outcome. *Biochim. Biophys. Acta*, **1842**, 1379–1384.
- Saqqur** M., Molina C.A., Salam A., Siddiqui M., Ribo M., Uchino K., Calleja S., Garami Z., Khan K., Akhtar N., O'Rourke F., Shuai A., Demchuk A.M., Alexandrov A.V. and CLOTBUST Investigators (2007) Clinical deterioration after intravenous recombinant tissue plasminogen activator treatment: a multicenter transcranial Doppler study. *Stroke*, **38**, 69–74.
- Saver** J.L. (2006) Time is brain—quantified. *Stroke*, **37**, 263–266.
- Sawada** H., Nishimura N., Suzuki E., Zhuang J., Hasegawa K., Takamatsu H., Honda K. and Hasumi K. (2014). SMTP-7, a novel small-molecule thrombolytic for ischemic stroke: a study in rodents and primates. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **34**, 235–241.
- Scaffidi** P., Misteli T. and Bianchi M.E. (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, **418**, 191–195.
- Schiera** G., Proia P., Alberti C., Mineo M., Savettieri G. and Di Liegro I. (2007) Neurons produce FGF2 and VEGF and secrete them at least in part by shedding extracellular vesicles. *J. Cell. Mol. Med.*, **11**, 1384–1394.
- Schock** S.C., Edrissi H., Burger D., Cadonic R., Hakim A. and Thompson C. (2014) Microparticles generated during chronic cerebral ischemia deliver proapoptotic signals to cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **450**, 912–917.
- Schreiber** V., Dantzer F., Ame J.-C. and de Murcia G. (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 517–528.

- Schulze** J., Zierath D., Tanzi P., Cain K., Shibata D., Dressel A. and Becker K. (2013) Severe stroke induces long-lasting alterations of high-mobility group box 1. *Stroke*, **44**, 246-248.
- Scolding** N.J., Morgan B.P., Houston W.A., Lington C., Campbell A.K. and Compston D.A. (1989) Vesicular removal by oligodendrocytes of membrane attack complexes formed by activated complement. *Nature*, **339**, 620-622.
- Scott** G.S., Kean R.B., Fabis M.J., Mikheeva T., Brimer C.M., Phares T.W., Spitsin S.V. and Hooper D.C. (2004) ICAM-1 upregulation in the spinal cords of PLSJL mice with experimental allergic encephalomyelitis is dependent upon TNF-alpha production triggered by the loss of blood-brain barrier integrity, *J. Neuroimmunol.*, **155**, 32-42.
- Scott** G.S., Bowman S.R., Smith T., Flower R.J. and Bolton C. (2007) Glutamate-stimulated Peroxynitrite production in a brain-derived endothelial cell line is dependent on N-methyl-D aspartate (NMDA) receptor activation. *Biochem. Pharmacol.*, **73**, 228-236.
- Sebbagh** M., Renvoize C., Hamelin J., Riche N., Bertoglio J. and Breard J. (2001) Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing, *Nat. Cell Biol.*, **3**, 346-352.
- Semino** C., Angelini G., Poggi A. and Rubartelli A. (2005) NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood*, **106**, 609-616.
- Seok** S.M., Kim J.M., Park T.Y., Baik E.J. and Lee S.H. (2013) Fructose-1,6-bisphosphate ameliorates lipopolysaccharide-induced dysfunction of blood-brain barrier. *Arch. Pharm. Res.*, **36**, 1149-1159.
- Senger** D.R., Ledbetter S.R., Claffey K.P., Papadopoulos-Sergiou A., Peruzzi C.A. and Detmar M. (1996) Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am. J. Pathol.*, **149**, 293-305.
- Sheehan** J.J., Zhou C., Gravanis I., Rogove A.D., Wu Y.P., Bogenhagen D.F. and Tsirka S.E. (2007) Proteolytic activation of monocyte chemoattractant protein-1 by plasmin underlies excitotoxic neurodegeneration in mice. *J. Neurosci.*, **27**, 1738-1745.
- Sheflin** L.G., Fucile N.W., Spaulding S.W. (1993) The specific interactions of HMG 1 and 2 with negatively supercoiled DNA are modulated by their acidic C-terminal domains and involve cysteine residues in their HMG 1/2 boxes. *Biochemistry*, **32**, 3238-3248.
- Shet** A.S., Aras O., Gupta K., Hass M.J., Rausch D.J., Saba N., Koopmeiners L., Key N.S. and Hebbel R.P. (2003) Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*, **102**, 2678-2683.
- Shin** J.-H., Lee H.K., Lee H.B., Jin Y. and Lee J.K. (2014) Ethyl pyruvate inhibits HMGB1 phosphorylation and secretion in activated microglia and in the postischemic brain. *Neurosci. Lett.*, **558**, 159-163.
- Shirafuji** T., Hamaguchi H., Kanda F., 2008. Measurement of platelet-derived microparticle levels in the chronic phase of cerebral infarction using an enzyme-linked immunosorbent assay. *The Kobe Journal of Medical Sciences.*, **54**, E55-61.
- Siao** C.J. and Tsirka S.E. (2002) Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *J. Neurosci.*, **22**, 3352-3358.
- Silva** E., Arcaroli J., He Q., Svetkauskaite D., Coldren C., Nick J.A., Poch K., Park J.S., Banerjee A., Abraham E. (2007) HMGB1 and LPS induce distinct patterns of gene expression and activation in neutrophils from patients with sepsis-induced acute lung injury. *Intensive Care Med.*, **33**, 1829-1839.
- Simak** J., Gelderman M.P., Yu H., Wright V. and Baird A.E. (2006) Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J. Thromb. Haemost.*, **4**, 1296-1302.
- Simbulan-Rosenthal** C.M., Rosenthal D.S., Hilz H., Hickey R., Malkas L., Applegren N., Wu Y., Bers G., Smulson M.E. (1996) The expression of poly(ADP-ribose) polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of the multiprotein DNA replication complex. *Biochemistry*, **35**, 11622-11633.
- Sims** P.J. and T. Wiedmer. (1995) Induction of cellular procoagulant activity by the membrane attack complex of complement. *Semin. Cell Biol.*, **6**, 275-282.
- Simoncini** S., Njock M.S., Robert S., Camoin-Jau L., Sampol J., Harle J.R., Nguyen C., Dignat-George F. and Anfosso F. (2009) TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circ. Res.*, **104**, 943-951.

- Singh V.**, Roth S., Veltkamp R. and Liesz A. (2016) HMGB1 as a key mediator of immune mechanisms in ischemic stroke. *Antioxid. Redox Signal.*, **24**, 635-51.
- Slevin M.**, Krupinski J., Slowik A., Kumar P., Szczudlik A. and Gaffney J. (2000) Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 in serum of patients with acute ischemic stroke. *Stroke*, **31**, 1863-1870.
- Sodhi R.K.**, Singh N. and Jaggi A.S. (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications. *Vascul. Pharmacol.*, **53**, 77-87.
- Soh E.Y.**, Duh Q.Y., Sobhi S.A., Young D.M., Epstein H.D., Wong M.G., Garcia Y.K., Min Y.D., Grossman R.F., Siperstein A.E. and Clark O.H. (1997) Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 3741-3747.
- Soriano A.O.**, Jy W., Chirinos J.A., Valdivia M.A., Velasquez H.S., Jimenez J.J., Horstman L.L., Kett D.H., Schein R.M. and Ahn, Y.S. (2005) Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit. Care Med.*, **33**, 2540-2546.
- Sterner R.**, Vidali G. and Allfrey V.G. (1979) Studies of acetylation and deacetylation in high mobility group proteins. Identification of the sites of acetylation in HMG-1. *J. Biol. Chem.*, **254**, 11577-11583.
- Straino S.**, Di Carlo A., Mangoni A., De Mori R., Guerra L., Maurelli R., Panacchia L., Di Giacomo F., Palumbo R., Di Campi C., Uccioli L., Biglioli P., Bianchi M.E., Capogrossi M.C. and Germani A. (2008) High-mobility group box 1 protein in human and murine skin: involvement in wound healing. *J. Invest. Dermatol.*, **128**, 1545-1553.
- Stros M.**, Stokrova J. and Thomas J.O. (1994) DNA looping by the HMG-box domains of HMG1 and modulation of DNA binding by the acidic C-terminal domain. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 1044-1051.
- Stros M.** (1998) DNA bending by the chromosomal protein HMG1 and its high mobility group box domains. Effect of flanking sequences. *J. Biol. Chem.*, **273**, 10355-10361.
- Stros M.** (2010) HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1799**, 101-113
- Strosznajder R.P.**, Czubowicz K., Jesko H. and Strosznajder J.B. (2010) Poly(ADP-Ribose) Metabolism in Brain and Its Role in Ischemia Pathology. *Mol. Neurobiol.*, **41**, 187-196.
- Sumii T.** and Lo E.H. (2002) Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke*, **33**, 831-836.
- Sun M.**, Zhao Y., Gu Y. and Xu C. (2012) Anti-inflammatory mechanism of taurine against ischemic stroke is related to down-regulation of PARP and NF- κ B. *Amino Acids*, **42**, 1735-1747.
- Sundberg E.**, Fasth A.E., Palmblad K., Harris H.E. and Andersson U. (2009) High mobility group box chromosomal protein 1 acts as a proliferation signal for activated T lymphocytes. *Immunobiology*, **214**, 303-309.
- Suzuki Y.**, Nagai N., Umemura K., Collen D. and Lijnen H. (2007) Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *J. Thromb. Haemost.*, **5**, 1732-1739.
- Suzuki Y.**, Nagai N., Yamakawa K., Kawakami J., Lijnen H.R. and Umemura K. (2009) Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein. *Blood*, **114**, 3352-3358.
- Suzuki Y.**, Nagai N. and Umemura K. (2011) Novel situations of endothelial injury in stroke--mechanisms of stroke and strategy of drug development: intracranial bleeding associated with the treatment of ischemic stroke: thrombolytic treatment of ischemia-affected endothelial cells with tissue-type plasminogen activator. *J. Pharmacol. Sci.*, **116**, 25-29.
- Suzuki Y.**, Nagai N., Yamakawa K., Muranaka Y., Hokamura K. and Umemura K. (2015) Recombinant tissue-type plasminogen activator transiently enhances blood-brain barrier permeability during cerebral ischemia through vascular endothelial growth factor-mediated endothelial endocytosis in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **35**, 2021-2031.
- Suzuki Y.**, Nagai N. and Umemura K. (2016) A Review of the Mechanisms of Blood-Brain Barrier Permeability by Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment for Cerebral Ischemia. *Front. Cell Neurosci.*, **10**, 2.
- Szatanek R.**, Baran J., Siedlar M. and Baj-Krzyworzeka M. (2015) Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review). *Int. J. Mol. Med.*, **36**, 11-17.
- Szotowski B.**, Antoniuk S., Goldin-Lang P., Tran Q.V., Pels K., Rosenthal P., Bogdanov V.Y., Borchert H.H., Schultheiss H.P. and Rauch U. (2007) Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. *Cardiovasc. Res.*, **73**, 806-812.

T

- Takahashi T.**, Kobayashi S., Fujino N., Suzuki T., Ota C., Tando Y., He M., Yamada M., Kurosawa S., Yamaya M and Kubo H. (2013). Differences in the released endothelial microparticle subtypes between human pulmonary microvascular endothelial cells and aortic endothelial cells in vitro. *Exp. Lung Res.*, **39**, 155-161.
- Tanuma S.I.**, Enomoto T. and Yamada M.A. (1978) Changes in the level of poly ADP-ribosylation during a cell cycle. *Exp. Cell Res.*, **117**, 421–430.
- Tanuma S.** and Johnson G.S. (1983) ADP-ribosylation of nonhistone high mobility group proteins in intact cells. *J. Biol. Chem.*, **258**, 4067–4070.
- Tanuma S.**, Kawashima K. and Endo H. (1985a) Comparison of ADP-ribosylation of chromosomal proteins between intact and broken cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 896–902.
- Tanuma S.**, Yagi T. and Johnson G.S. (1985b) Endogenous ADP ribosylation of high mobility group proteins 1 and 2 and histone H1 following DNA damage in intact cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **237**, 38–42.
- Tanuma S.**, Kawashima K. and Endo H. (1986) Acceptor proteins for (ADP-ribose)_n in the HeLa S3 cell cycle. *J. Biochem.*, **99**, 915–922.
- Tamura Y.**, Chiba Y., Tanioka T., Shimizu N., Shinozaki S., Yamada M., Kaneki K., Mori S., Araki A., Ito H. and Kaneki M. (2011) NO donor induces Nec-1-inhibitable, but RIP1-independent, necrotic cell death in pancreatic beta-cells. *FEBS Lett.*, **585**, 3058–3064.
- Tang D.**, Shi Y., Kang R., Li T., Xiao W., Wang H. and Xiao X. (2007a). Hydrogen peroxide stimulates macrophages and monocytes to actively release HMGB1. *J. Leukoc. Biol.*, **81**, 741–747.
- Tang S.C.**, Arumugam T.V., Xu X., Cheng A., Mughal M.R., Jo D.G., Lathia J.D., Siler D.A., Chigurupati S., Ouyang X., Magnus T., Camandola S. and Mattson MP. (2007b) Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **104**, 13798-13803.
- Tang D.**, Kang R., Livesey K.M., Cheh C.W., Farkas A., Loughran P., Hoppe G., Bianchi M.E., Tracey K.J., Zeh H.J. 3rd and Lotze M.T. (2010) Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J. Cell Biol.*, **190**, 881-892.
- Taraboletti G.**, D’Ascenzo S., Borsotti P., Giavazzi R., Pavan A. and Dolo V. (2002) Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am. J. Pathol.*, **160**, 673–680
- Teng H.**, Chopp M., Hozeska-Solgot A., Shen L., Lu M., Tang, C., Zhang Z.G., (2012) Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 contribute to sonic hedgehog-induced in vitro cerebral angiogenesis. *PLoS One.*, **7**, e33444.
- Teng F.**, Beray-Berthat V., Coqueran B., Lesbats C., Kuntz M., Palmier B., Garraud M., Bedfert C., Slane N., Bérézowski V., Szeremeta F., Hachani J., Scherman D., Plotkine M., Doan B.-T., Marchand-Leroux C. and Margaille I. (2013) Prevention of rt-PA induced blood-brain barrier component degradation by the poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor PJ34 after ischemic stroke in mice. *Exp. Neurol.*, **248**, 416–428.
- Teng F.**, Zhu L., Su J., Zhang, X, Li N., Nie Z. and Jin L. (2016) Neuroprotective Effects of Poly(ADP-ribose)polymerase Inhibitor Olaparib in Transient Cerebral Ischemia. *Neurochem. Res.*, **41**, 1516–1526.
- Tissot J.D.**, Rubin O. and Canellini G. (2010) Analysis and clinical relevance of microparticles from red blood cells. *Curr. Opin. Hematol.*, **17**, 571–577.
- Tokime T.**, Nozaki K., Sugino T., Kikuchi H., Hashimoto N. and Ueda K. (1998) Enhanced poly(ADP-ribosylation) after focal ischemia in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **18**, 991–997.
- Treutiger C.J.**, Mullins G.E., Johansson A.S., Rouhiainen A., Rauvala H.M., Erlandsson-Harris H., Andersson U., Yang H., Tracey K.J., Andersson J. and Palmblad J.E. (2003) High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium. *J. Intern. Med.*, **254**, 375–385.
- Turner R.J.** and Sharp F.R. (2016) Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. *Front. Cell. Neurosci.*, **4**, 10.

U

- Uchida M.**, Hanai S., Uematsu N., Sawamoto K., Okano H., Miwa M. and Uchida K. (2001) Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase disrupts organization of cytoskeletal F-actin and tissue polarity in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, **277**, 6696-6702.

- Ueda T.**, Chou H., Kawase T., Shirakawa H. and Yoshida M. (2004) Acidic C-tail of HMGB1 is required for its target binding to nucleosome linker DNA and transcription stimulation. *Biochemistry*, **43**, 9901–9908.
- Ulloa L.**, Ochani M., Yang H., Tanovic M., Halperin D., Yang R., Czura C.J., Fink M.P. and Tracey K.J. (2002) Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 12351-12356.
- Ullrich O.**, Diestel A., Eyüpoglu I.Y. and Nitsch R. (2001) Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 1035–1042.

V

- van den Akker J.**, van Weert A., Afink G., Bakker E.N., van der Pol E., Böing A.N., Nieuwland R. and VanBavel E. (2012) Transglutaminase 2 is secreted from smooth muscle cells by transamidation-dependent microparticle formation. *Amino Acids*, **42**, 961–973.
- VanWijk M.J.**, VanBavel E., Sturk A. and Nieuwland R. (2003) Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.*, **59**, 277–287.
- Venereau E.**, Casalgrandi M., Schiraldi M., Antoine D.J., Cattaneo A., De Marchis F., Liu J., Antonelli A., Preti A., Raeli L., Shams S.S., Yang H., Varani L., Andersson U., Tracey K.J., Bachi A., Uguccioni M. and Bianchi M.E. (2012) Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J. Exp. Med.*, **209**, 1519–1528.
- Veres B.**, Radnai B., Gallyas F., Varbiro G., Berente Z., Osz E., Sumegi B., (2004) Regulation of kinase cascades and transcription factors by a poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, 4-hydroxyquinazoline, in lipopolysaccharide-induced inflammation in mice. *J Pharmacol Exper Ther.*, **310**, 247–255.
- Vion A.C.**, Ramkhelawon B., Loyer X., Chironi G., Devue C., Loirand G., Tedgui A., Lehoux S., Boulanger C.M. (2013) Shear Stress Regulates Endothelial Microparticle Release. *Circ. Res.*, **112**, 1323-1333
- Vivien D.**, Gauberti M., Montagne A., Defer G. and Touzé E. (2011) Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **31**, 2119-2134.
- Vogelgesang A.**, May V.E., Grunwald U., Bakkeboe M., Langner S., Wallaschofski H., Kessler C., Bröker B.M. and Dressel A. (2010) Functional status of peripheral blood T-cells in ischemic stroke patients. *PLoS One*, **5**, e8718.
- Von Kummer R.**, Mori E., Truelsen T., Jensen J.S., Bjørn A. Grønning B.A., Fiebach J.B., Lovblad K.O., Pedraza S., Romero J.M., Chabriat H., Chang K.C., Dávalos A., Ford G.A., Grotta J., Kaste M., Schwamm L.H., Shuaib A., Albers G.W. and DIAS-4 Investigators. (2016) Desmoteplase 3 to 9 Hours After Major Artery Occlusion Stroke: The DIAS-4 Trial (Efficacy and Safety Study of Desmoteplase to Treat Acute Ischemic Stroke). *Stroke*, **47**, 2880-2887.

W

- Walker J.W.**, Jijon H.B. and Madsen K.L. (2006) AMP-activated protein kinase is a positive regulator of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 336–341.
- Walko T.D.** 3rd, Di Caro V., Piganelli J., Billiar T.R., Clark R.S., and Rajesh K.A. (2015). Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1–Sirtuin 1 Functional Interplay Regulates LPS-Mediated High Mobility Group Box 1 Secretion. *Mol. Med.*, **20**, 612-624.
- Wang H.** (1999) HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, **285**, 248–251.
- Wang X.**, Lee S.R., Arai K., Lee S.R., Tsuji K., Rebeck G.W. and Lo E.H. (2003). Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat. Med.*, **9**, 1313–1317.
- Wang X.**, Tsuji K., Lee S.-R., Ning M., Furie K.L., Buchan A.M. and Lo E.H. (2004). Mechanisms of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator reperfusion therapy for ischemic stroke. *Stroke*, **35**, 2726–2730.
- Wang Q.**, Tang X.N. and Yenari M.A. (2007a). The inflammatory response in stroke. *J. Neuroimmunol.*, **184**, 53-68.
- Wang Q.**, Zeng M., Wang W. and Tang J. (2007b). The HMGB1 acidic tail regulates HMGB1 DNA binding specificity by a unique mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **360**, 14–19.
- Wang Y.**, Dawson V.L., Dawson T.M. (2009). Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp. Neurol.*, **218.**, 193-202.

- Wang L.**, Zhang X., Liu L., Cui L., Yang R., Li M. and Du W. (2010) Tanshinone II A down-regulates HMGB1, RAGE, TLR4, NF- κ B expression, ameliorates BBB permeability and endothelial cell function, and protects rat brains against focal ischemia. *Brain Res.*, **1321**, 143-151.
- Wang C.M.**, Jiang M. and Wang HJ. (2013) Effect of NF κ B inhibitor on high mobility group protein B1 expression in a COPD rat model. *Mol. Med. Rep.*, **7**, 499-502.
- Wang J.**, Zhang X., Mu L., Zhang M., Gao Z., Zhang J., Yao X., Liu C., Wang G., Wang D., Kong Q., Liu Y., Li N., Sun, B., Li H., (2014) t-PA acts as a cytokine to regulate lymphocyte-endothelium adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol.*, **152**, 90–100.
- Wang W.**, Li M., Chen Q. and Wang J. (2015) Hemorrhagic Transformation after Tissue Plasminogen Activator Reperfusion Therapy for Ischemic Stroke: Mechanisms, Models, and Biomarkers. *Mol. Neurobiol.*, **52**, 1572-1579.
- Warlow C.**, Sudlow C., Dennis M., Wardlaw J., Sandercock P., 2003. Stroke. *Lancet.*, **362**, 1211–1224.
- Watanabe M.**, Yamashita K., Kamachi H., Kuraya D., Koshizuka Y., Shibasaki S., Asahi Y., Ono H., Emoto S., Ogura M., Yoshida T., Ozaki M., Umezawa K., Matsushita M. and Todo S. (2013a) Efficacy of DHMEQ, a NF-kappaB inhibitor, in islet transplantation: II. Induction DHMEQ treatment ameliorates subsequent alloimmune responses and permits long-term islet allograft acceptance. *Transplantation*, **96**, 454-462.
- Watanabe T.**, Dohgu S., Takata F., Nishioku., Nakashima A., Futagami K., Yamauchi A. and Kataoka Y. (2013b) Paracellular Barrier and Tight Junction Protein Expression in the Immortalized Brain Endothelial Cell Lines bEND.3, bEND.5 and Mouse Brain Endothelial Cell 4. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 492-495.
- Wayne L.** (2016) Chandler Measurement of Microvesicle Levels in Human Blood Using Flow Cytometry. *Cytometry B, Clin. Cytom.*, **90**, 326-336.
- Wechsler L.R.** (2011) Intravenous thrombolytic therapy for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.*, **364**, 2138-2146.
- Wei W.**, Li Y., Lv S., Zhang C. and Tian Y. (2016). PARP-1 may be involved in angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Oncol. Lett.*, **12**, 4561-4567.
- Weir H.M.**, Kraulis P.J., Hill C.S., Raine A.R., Laue E.D. and Thomas J.O. (1993) Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *EMBO J.*, **12**, 1311-1319.
- Werner N.**, Wassmann S., Ahlers P., Kosiol S. and Nickenig G.(2006). Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26**, 112-116.
- Whitacre C.M.**, Hashimoto H., Tsai M.L., Chatterjee S., Berger S.J.and Berger N.A. (1995). Involvement of NAD-poly(ADP-ribose) metabolism in P53 regulation and its consequences. *Cancer Res.*, **55**, 3697-3701.
- Wiernikowski J.T.**, Crowther M., Clase C.M., Ingram A., Andrew M., Chan A.K., 2000. Stability and sterility of recombinant tissue plasminogen activator at -30 degrees C. *Lancet.*, **355**, 2221–2222.
- Willekens F.L.**, Were J.M., Kruijt J.K., Roerdinkholder-Stoelwinder B., Groenen-Döpp Y.A., van den Bos A.G., Bosman G.J. and van Berkel T.J. (2005) Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood*, **105**, 2141-2145.
- Williams J.B.**, Jauch E.C., Lindsell C.J. and Campos B. (2007) Endothelial microparticle levels are similar in acute ischemic stroke and stroke mimics due to activation and not apoptosis/necrosis. *Acad. Emerg. Med.*, **14**, 685–690.
- Witwer K.W.**, Buzás E.I., Bemis L.T., Bora A., Lässer C., Lötvall J., Nolte-’t Hoen E.N, Piper M.G., Sivaraman S., Skog J., Théry C., Wauben M.H. & Hochberg F. (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles.*, **2**, 1-2013
- Wolf P.** (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.*, **13**, 269-288.
- Wolfson R.K.**, Mapes B. and Garcia J.G. (2013) Excessive mechanical stress increases HMGB1 expression in human lung microvascular endothelial cells via STAT3. *Microvas. Res.*, **92**, 50-55.
- Won S.**, Lee J.H., Wali B., Stein D.G. and Sayeed I. (2014) Progesterone attenuates hemorrhagic transformation after delayed tPA treatment in an experimental model of stroke in rats: involvement of the VEGF-MMP pathway. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **34**, 72–80.
- Wu F.**, Zhao Z.H., Ding S.T., Wu H.H. and Lu J.J. (2013) High mobility group box 1 protein is methylated and transported to cytoplasm in clear cell renal cell carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **10**, 5789–5795.

Y

- Yamaguchi T.**, Awano H., Matsuda H. and Tanahashi N. (2017) Edaravone with and without 6 Mg/Kg Alteplase within 4.5Hours after Ischemic Stroke: A Prospective Cohort Study (PROTECT4.5). *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, **26**, 756-765.
- Yang H.**, Wang H., Czura C.J. and Tracey K.J. (2005). The cytokine activity of HMGB1. *J. Leukoc. Biol.*, **78**, 1–8.
- Yang Y.**, Estrada EY., Thompson JF., Liu W., Rosenberg GA. (2007a). Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.*, **27**, 697-709.
- Yang D.**, Chen Q., Yang H., Tracey K.J., Bustin M. and Oppenheim J.J. (2007b) High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J. Leukoc. Biol.*, **81**, 59–66.
- Yang H.**, Hreggvidsdottir H.S., Palmblad K., Wang H., Ochani M., Li J. Lu B., Chavan S., Rosas-Ballina M., Al-Abed Y., Akira S. and Bierhaus A. (2010) A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **107**, 11942-11947.
- Yang Q.W.**, Lu F.L., Zhou Y., Wang L., Zhong Q., Lin S., Xiang J., Li J.C., Fang C.Q. and Wang J.Z. (2011). HMGB1 mediates ischemia-reperfusion injury by TRIF-adaptor independent Toll-like receptor 4 signaling. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **31**, 593-605.
- Yang H.**, Antoine D.J., Andersson U. and Tracey K.J. (2013) The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.*, **93**, 865-873
- Yang F.**, Li X., Wang L.K., Wang L.W., Han X.Q., Zhang H. and Gong Z.J. (2014a). Inhibitions of NFkappaB and TNF-alpha result in differential effects in rats with acute on chronic liver failure induced by D- Gal and LPS. *Inflammation*, **37**, 848-857.
- Yang Z.**, Li L., Chen L., Yuan W., Dong L., Zhang Y., Wu H and Wang C. (2014b). PARP1 Mediates LPS-Induced HMGB1 Release by Macrophages through Regulation of HMGB1 Acetylation. *J. Immunol.*, **193**, 6114-6123.
- Yang M.**, Liu L., Xie M., Sun X., Yu Y., Kang R., Yang L., Zhu S., Cao L and Tang D. (2015) Poly-ADP-ribosylation of HMGB1 regulates TNFSF10/TRAIL resistance through autophagy. *Autophagy*, **11**, 214-224.
- Yao L.**, Setiadi H., Xia L., Laszik Z., Taylor F.B. and McEver R.P. (1999). Divergent Inducible Expression of P-Selectin and E-Selectin in Mice and Primates. *Blood*, **94**, 3820-3828.
- Yepes M.**, Sandkvist M., Moore E.G., Bugge T.H., Strickland D.K. and 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.
- Yepes M.**, Roussel B.D., Ali C. and Vivien D. (2009) Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci.*, **32**, 48–55.
- Yin M.**, Loyer X. and Boulanger C.M. (2015). Extracellular vesicles as new pharmacological targets to treat atherosclerosis. *Eur. J. Pharmacol.*, **763**, 90–103.
- Yip H.-K.**, Sun C.-K., Tsai T.-H., Sheu J.-J., Kao Y.-H., Lin Y.-C., Shiu Y.-L., Chen Y.-L., Chai H.-T., Chua S., Ko S.-F., Leu S., (2013) Tissue plasminogen activator enhances mobilization of endothelial progenitor cells and angiogenesis in murine limb ischemia. *Inter J Cardiol.*, **168**, 226–236.
- Yoeruek E.**, Spitze M.S., Tatar O., Biedermann T., Grisanti S., Lüke M., Bartz-Schmidt U.K., and Szurman P. (2008) Toxic Effects of Recombinant Tissue Plasminogen Activator on Cultured Human Corneal Endothelial Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**, 1392-1397.
- Yong P.J.**, Koh C.H and Shim W. (2013) Endothelial microparticles: missing link in endothelial dysfunction? *Eur. J. Prev. Cardiol.*, **20**, 496–512.
- Youn J.H.** and Shin J.S. (2006) Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J. Immunol.*, **177**, 7889–7897.
- Yu S.W.**, Andrabi S.A., Wang H., Kim N.S., Poirier G.G., Dawson T.M. and Dawson V.L. (2006) Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**,18314-18319.
- Yu Y.**, Tang D. and Kang R. (2015) Oxidative stress- mediated HMGB1 biology. *Front. physiol.*, **6**, 93.
- Yuan H.**, Vance K.M., Junge C.E., Geballe M.T., James P.S., Hepler J.R., Yepes M., Low C.M., and Traynelis S.F. (2009). The Serine Protease Plasmin Cleaves the Amino-terminal Domain of the NR2A Subunit to Relieve Zinc Inhibition of the N-Methyl-D-aspartate Receptors. *J. Biol. Chem.*, **284**, 12862–12873.

Yun J.W., Xiao A., Tsunoda I., Minagar A. and Alexander J.S. (2016) From trash to treasure: The untapped potential of endothelial microparticles in neurovascular diseases. *Pathophysiology*, **23**, 265–274.

Z

Zhai D.X., Kong Q.F., Xu W.S., Bai S.S., Peng H.S., Zhao K., Li G.Z., Wang D.D., Sun B., Wang J.H., Wang G.Y. and Li H.L. (2008). RAGE expression is up-regulated in human cerebral ischemia and pMCAO rats. *Neurosci. Lett.*, **445**, 117-121.

Zhang, R.L., Zhang, Z.G., Chopp, M., Zivin, J.A., 1999. Thrombolysis with tissue plasminogen activator alters adhesion molecule expression in the ischemic rat brain. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* **30**, 624–629.

Zhang Z.G., Zhang L., Jiang Q., Zhang R., Davies K., Powers C., Bruggen N. and Chopp M. (2000) VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.*, **106**, 829-838.

Zhang X., Polavarapu R., She H., Mao Z. and Yepes M. (2007a) Tissue- type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein mediate cerebral ischemia- induced nuclear factor-kappaB pathway activation. *Am. J. Pathol.*, **171**, 1281-1290.

Zhang S., Lin Y., Kim Y.S., Hande M.P., Liu Z.G. and Shen H.M. (2007b) c-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation. *Cell. Death and Differ.*, **14**, 1001–1010.

Zhang X., Wheeler D., Tang Y., Guo L., Shapiro R.A., Ribar T.J., Means A.R., Billiar T.R. and Angus D.C. (2008). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) IV mediates nucleocytoplasmic shuttling and release of HMGB1 during lipopolysaccharide stimulation of macrophages. *J. Immunol.*, **182**, 5015-5023.

Zhang C., An J., Strickland D.K. and Yepes M. (2009) The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates tissue-type plasminogen activator-induced microglial activation in the ischemic brain. *Am. J. Pathol.*, **174**, 586-594.

Zhang Q. and Wang Y. (2010). HMG modifications and nuclear function. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1799**, 28-36.

Zhang J., Takahashi H.K., Keyue L., Wake H., Rui L., Tomoko M., Isao D., Tadashi Y., Aiji O., Shuji M. and Masahiro N. (2011) Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood–brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. *Stroke*, **42**, 1420-1428.

Zhang T., Berrocal J.G., Yao J., DuMond M.E., Krishnakumar R., Ruhl D.D., Ryu K.W., Gamble M.J. and Kraus W.L. (2012) Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent gene expression through promoter-directed recruitment of a nuclear NAD⁺ synthase. *J. Biol. Chem.*, **287**, 12405-12416.

Zhang J., Wu Y., Weng Z., Zhou T., Feng T., Lin Y. (2014a) Glycyrrhizin protects brain against ischemia-reperfusion injury in mice through HMGB1-TLR4-IL-17A signaling pathway. *Brain Res.*, **1582**, 176-186.

Zhang Z., Zhang L., Zhou C. and Wu H. (2014b) Ketamine inhibits LPS-induced HGMB1 release in vitro and in vivo. *Int. Immunopharmacol.*, **23**, 14-26.

Zhou J.R., Zhang L.D., Wei H.F., Wang X., Ni H.L., Yang F., Zhang T. and Jiang C.L. (2013) Neuropeptide Y induces secretion of high-mobility group box 1 protein in mouse macrophage via PKC/ERK dependent pathway. *J. Neuroimmunol.*, **260**, 55-59.

Zuo W., Chen J., Zhang S., Tang J., Liu H., Zhang D. and Chen N. (2014). IMM-H004 prevents toxicity induced by delayed treatment of tPA in a rat model of focal cerebral ischemia involving PKA-and PI3K-dependent Akt activation. *Eur. J. Neurosci.*, **39**, 2107–2118.

