

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

FACULTE DE SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

THESE DE DOCTORAT

École Doctorale « Médicament, Toxicologie, Chimie et Environnement »

Spécialité : Pharmacologie

Présentée par

Marie LECHAFTOIS

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

**ROLE DE LA POLY(ADP-RIBOSE)POLYMERASE DANS L'ACTIVATION ET
L'AGREGATION PLAQUETTAIRES A LA SUITE D'UNE ISCHEMIE CEREBRALE**

Soutenue le 25 novembre 2013

Devant le jury composé du :

Pr Delphine BORGEL	Rapporteur
Pr Dominique DEPLANQUE	Rapporteur
Pr Pascale GAUSSEM	Examineur
Pr Vincent BEREZOWSKI	Examineur
Pr Catherine MARCHAND-LEROUX	Examineur
Dr Dominique LEROUET	Co-directrice de recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé à ce Doctorat, depuis l'initiation du projet il y a 3 ans, jusqu'à sa soutenance.

C'est ainsi que j'exprime mes profonds et sincères remerciements,

À Madame le Professeur Delphine BORGEL et Monsieur le Professeur Dominique DEPLANQUE,
Qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.

À Madame le Professeur Pascale GAUSSEM et Monsieur le Professeur Vincent BEREZOWSKI,
Pour avoir accepté de siéger dans ce jury en tant qu'examineurs.

À Madame le Docteur Dominique LEROUET et Monsieur le Professeur Michel PLOTKINE,
Pour leur co-encadrement depuis mes débuts dans la recherche,
Pour leur disponibilité et leurs conseils,
Pour les discussions, les nombreuses relectures et corrections de l'ensemble de mes travaux.

À Madame le Professeur Catherine MARCHAND-LEROUX,
Pour m'avoir acceptée dans le laboratoire lors de mes (nombreux !) stages et lors de la thèse,
Pour ses conseils et son aide,
Pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer un travail de recherche dans un domaine passionnant.

À Madame le Docteur Christilla BACHELOT-LOZA
Pour m'avoir accompagnée dans le monde des plaquettes, pour son aide précieuse et sa disponibilité.

À Bérard COQUERAN, Alice EMPTOZ, Nizar MAHROUK et Margaux ALLAIN,
Qui ont participé à ce travail avec beaucoup d'application et ont ainsi permis de l'enrichir.

À Madame le Professeur Isabelle Margail et aux Docteurs Virginie BERAY-BERTHAT, Valérie BESSON, Nicole CLAPERON, Claire LECONTE et Raymond MONGEAU,

À Nicole CROCI, Françoise MERLIER, sans oublier les "anciens" Maya TOUAZI et Mathieu SOUSTRAT,
Pour leurs précieux conseils et leurs remarques pertinentes,
Pour leur aide et leur bonne humeur depuis mes 1^{ers} pas au laboratoire,
Pour tous les cafés, tablettes de chocolat et autres raclettes partagés.

Au Docteur et Artiste Bruno PALMIER,
Pour ses connaissances scientifiques, ses discussions toujours très enrichissantes (dignes de Jean-Pierre Luminet !), pour son aide précieuse avant, pendant et après les manips,
Pour son optimisme, sa disponibilité, son soutien et sa bonne humeur sans faille.

À Madame le Professeur Mehrnaz JAFARIAN-TEHRANI (ex-voisine de bureau),

Pour ses éclats de rire et sa gentillesse,

Pour son soutien, ses remarques toujours très constructives et ses qualités scientifiques (notamment minocycliniques),

À tous les étudiants, ex-étudiants, docteurs ou futurs docteurs avec qui ce fut un immense plaisir de partager cette aventure doctorale au labo et en dehors,

Pour leurs encouragements et leur bonne humeur qui ont rendu certains moments moins difficiles,

Pour leur amitié, nos riches échanges et nos grands moments :

Hamoudi, le Libanais ambianqueur fou (Shtahtelouh ya habibi shtahtelouh), **Haymen Phelps**, roi des bassins que je ne remercierai jamais assez pour les longues heures passées sur ce manuscrit aux moments les plus critiques, **Kikita** (45, ça te dit quelque chose ?), **Fei** (Ou So Wé !), **Marie Garrraud** la Cantalaise dite "numéro 2", **Gemmita** et ses tortillas de « ouf » notamment, **Alice**, la 4^{ème} mousquetaire du bureau des filles, **Angelo** (Potato..., potato ? On ne sait toujours pas), **Cindy** ex-badmintonneuse devenue petit koala, **Tiphaine** la maman, **Mag** la future maman, **Kaka** la Bretonne reine du Kik à farce, **Camille** « Naon, Naon, j'ai pao touchéao », **Marine** toujours là malgré la distance inter-labo, **Federica**, **Silvia**, **Sandra(s)**...

Merci pour tous nos souvenirs aux tonalités franco-libano-gréco-chino-égypto-espagnolo-bretonno-antillo-cantalo-italo-corses, et pour tous ceux qui restent à venir... Kampé !

Merci à mes coloc's Khalil et Mouna El Chaftaoui,

Pour leur soutien, leur bonne humeur quotidienne et la grande patience dont ils ont fait preuve, en particulier ces 4 derniers mois...

Merci à Lucie et Mathieu,

Pour être là, auprès de "l'éternelle étudiante".

Merci à toute ma famille, ma grand-mère, mes frères, François (bon courage pour la Thèse !) et Vincent à qui je pense bien fort en ce moment, Angélique et mes (toujours) adorables neveux Méline (les Patamiams sont prêts ?) et Ange.

Enfin, merci à mes Parents,

Pour leur soutien et leurs encouragements en toutes circonstances, pour m'avoir permis de faire ce dont j'avais envie,

Pour leur générosité, leur bonne humeur, leur courage... Pour me donner un si bel exemple à suivre.

TABLE DES MATIERES

RESUME

PUBLICATION ET COMMUNICATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION 1

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES 3

PREMIER CHAPITRE : ACCIDENTS VASCULAIRES CEREBRAUX (AVC) 3

I. GENERALITES	3
I.1 Définition	3
I.2 Epidémiologie des AVC	5
I.3 Les facteurs de risque des AVC ischémiques	6
I.3.1 Facteurs de risque non modifiables	6
I.3.2 Facteurs de risque modifiables	7
II. PRISE EN CHARGE DES AVC ISCHEMIQUES	7
II.1 Manifestations cliniques	7
II.2 Prise en charge thérapeutique	8
III. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'AVC ISCHEMIQUE	9
III.1 Définition des zones de cœur et de pénombre	9
III.2 Mécanismes post-ischémiques	10
III.2.1 Excitotoxicité	11
III.2.2 Stress oxydant	11
III.2.3 Inflammation	12
III.2.4 Apoptose	13
III.3 Complications des AVC ischémiques	13
IV. MODELES EXPERIMENTAUX D'ISCHEMIE CEREbraLE	14
IV.1 Modèles <i>in vitro</i>	14
IV.2 Modèles <i>in vivo</i>	14
IV.2.1 Modèles d'ischémie cérébrale globale	15
IV.2.2 Modèles d'ischémie cérébrale focale	15
V. STRATEGIES THERAPEUTIQUES DANS L'AVC ISCHEMIQUE	17
V.1 Approche vasculaire	17
V.1.1 Thrombolyse pharmacologique	18
V.1.2 Dispositifs mécaniques endovasculaires et sonothrombolyse	19
V.2 Approche cellulaire	20

DEUXIEME CHAPITRE : ACTIVATION ET AGREGATION PLAQUETTAIRES 24

I. PLAQUETTES SANGUINES	25
I.1 Généralités	25
I.2 Les constituants plaquettaires	25
II. PLAQUETTES SANGUINES ET LESIONS VASCULAIRES : ROLE DE L'HEMOSTASE	29
II.1 Interaction des plaquettes avec la paroi vasculaire	29
II.1.1 Liaison entre GPIIb/IIIa et le vWF	30
II.1.2 Liaison stable du collagène à ses récepteurs	32
II.1.3 GPIIb/IIIa	34
II.2 Amplification de l'activité plaquettaire	35
II.2.1 Transduction du signal par la voie des tyrosine-kinases	35
II.2.2 Transduction du signal par la voie de la thrombine	36
II.2.3 Transduction du signal par la voie de l'ADP et de l'ATP	37

II.2.4	Transduction du signal par la voie du thromboxane A2	40
II.3	Stabilisation et dégradation du thrombus	40
II.3.1	Stabilisation du thrombus	40
II.3.2	Dégradation du thrombus	41
III.	PLAQUETTES SANGUINES ET INFLAMMATION : ROLE DES MOLECULES D'ADHESION	41
III.1	P-sélectine	43
III.1.1	Structure	43
III.1.2	Principaux ligands	44
III.1.3	Fonctions.....	44
III.2	ICAM-1 et VCAM-1.....	48
III.2.1	Structure et ligands d'ICAM-1	48
III.2.2	Structure et ligands de VCAM-1	49
III.2.3	Fonctions d'ICAM-1 et de VCAM-1	50
IV.	METHODES D'EXPLORATION DES FONCTIONS PLAQUETTAIRES ET DE L'HEMOSTASE	52
IV.1	Evaluation des fonctions plaquettaires et de l'hémostase chez l'Homme	53
IV.1.1	Numération et analyse morphologique des plaquettes	53
IV.1.2	Temps de saignement.....	53
IV.1.3	Exploration de l'adhésion plaquettaire.....	54
IV.1.4	Exploration de l'agrégation plaquettaire	55
IV.1.5	Analyse de la formation et de la stabilité du caillot plaquettaire	57
IV.1.6	Cytométrie de flux	57
IV.2	Evaluation des fonctions plaquettaires et de l'hémostase chez la souris.....	58
IV.2.1	<i>In vitro</i>	58
IV.2.2	Modèles de temps de saignement.....	58
IV.2.3	Modèles de thromboembolie pulmonaire.....	59
IV.2.4	Modèles de thrombose artérielle	59
V.	STRATEGIES ANTIPLAQUETTAIRES DANS LE TRAITEMENT DES AVC ISCHEMIQUES	60
V.1	Traitement aigu des AVC ischémiques.....	61
V.1.1	Stratégies anti GPIb	61
V.1.2	Stratégies anti GPVI.....	61
V.1.3	Stratégies anti GPIIb/IIIa	62
V.2	Traitement pour la prévention secondaire des AVC ischémiques	62
V.2.1	Prévention secondaire après un AVCi d'origine cardio-embolique	63
V.2.2	Prévention secondaire après un AVCi d'origine non cardio-embolique	63
TROISIEME CHAPITRE : LA POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASE (PARP)		68
I.	PRESENTATION DES DIFFERENTES PARP	68
I.1	Les PARP activées par les cassures d'ADN	70
I.1.1	La PARP-1.....	70
I.1.2	La PARP-2.....	71
I.1.3	La PARP-3	71
I.2	Les tankyrases.....	72
I.3	Les PARP de type CCCH	72
I.4	Les macroPARP	73
I.5	Les autres PARP	73
II.	LA POLY(ADP-RIBOSYL)ATION	73
II.1	Synthèse des PARs	74
II.2	Dégradation des PARs.....	76
III.	MECANISMES BENEFIQUES DE LA PARP EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES.....	77
III.1	Réparation de l'ADN et stabilité du génome	77
III.2	Régulation de la transcription génique.....	78
III.3	Régulation du cycle cellulaire	79
IV.	MECANISMES DELETERES DE LA PARP EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES	79
IV.1	PARP et mort cellulaire	79
IV.2	PARP et inflammation.....	80
V.	INHIBITEURS DE LA PARP.....	81
VI.	ROLE DE LA PARP DANS L'ISCHEMIE CEREbraLE	84
VII.	ROLE DE LA PARP DANS L'ACTIVATION ET L'AGREGATION PLAQUETTAIRES	87
BUT DU TRAVAIL		91

MATERIEL ET METHODES.....	93
I. EVALUATION DE L'AGREGATION PLAQUETTAIRE <i>IN VITRO</i>	93
I.1 Prélèvement de sang et préparation du Plasma Riche en Plaquettes (PRP)	93
I.1.1 Chez l'Homme.....	93
I.1.2 Chez la Souris.....	94
I.2 Préparation des réactifs.....	95
I.2.1 Agonistes	95
I.2.2 Inhibiteurs de PARP	95
I.3 Tests d'agrégation.....	96
I.3.1 Principe.....	96
I.3.2 Protocole	97
I.3.3 Expression des résultats	97
I.4 Evaluation de l'état de phosphorylation de VASP dans les plaquettes	98
I.4.1 Principe.....	98
I.4.2 Protocole	99
I.4.3 Expression des résultats.....	100
II. TESTS D'EXPLORATION DES FONCTIONS PLAQUETTAIRES <i>IN VIVO</i>	101
II.1 Modèle de temps de saignement	101
II.2 Modèles de thromboembolie pulmonaire	102
II.3 Modèle de thrombose carotidienne induite par le chlorure ferrique	103
III. MODELE DE THROMBOSE DE L'ACM INDUITE PAR LE $FeCl_3$.....	104
IV. MODELE ENDOVASCULAIRE D'ISCHEMIE CEREbraLE focALE TRANSITOIRE.....	105
V. ÉVALUATION DES DEFICITS FONCTIONNELS	107
V.1 Test des cercles.....	107
V.2 Score neurologique sur 13 points.....	108
V.2.1 Circling.....	108
V.2.2 Réflexe d'agrippement.....	109
V.2.3 Perte d'appui.....	109
V.2.4 Placement visuel	110
V.2.5 Suspension par la queue	110
V.3 Tests d'agrippement.....	111
V.3.1 Test du « grip ».....	111
V.3.2 Test du « string ».....	112
V.4 Test de la poutre.....	112
V.5 Test du mât.....	113
V.6 Score global	114
VI. REALISATION D'HEMORRAGIES INTRACEREBRALES PAR VOIE MECANIQUE	114
VII. EXSANGUINOPERFUSION DES ANIMAUX	115
VIII. EVALUATION DU VOLUME DE LESION CEREbraLE	115
VIII.1 Coloration au chlorure de triphényltétrazolium.....	116
VIII.2 Coloration au violet de crésyl	117
VIII.3 Quantification du volume de lésion.....	118
IX. DOSAGE DE LA P-SELECTINE SOLUBLE DANS LE SERUM.....	118
X. WESTERN BLOT	120
X.1 Prélèvement et préparation des échantillons	120
X.1.1 Prélèvement et préparation des échantillons pour le Western Blot de CD41	120
X.1.2 Prélèvement et préparation des échantillons pour le Western Blot des molécules d'adhésion ..	121
X.2 Préparation des témoins positifs.....	122
X.2.1 Préparation des témoins positifs pour le Western Blot de CD41.....	122
X.2.2 Préparation des témoins positifs pour le Western Blot des molécules d'adhésion.....	123
X.3 Dosage des protéines par l'acide bicinchoninique (BCA).....	123
X.4 Réalisation du Western blot	124
X.4.1 Electrophorèse	124
X.4.2 Electrotransfert	125
X.4.3 Immunomarquage.....	125
X.4.4 Révélation par chimioluminescence ou ECL.....	126
X.4.5 Révélation par chimiofluorescence ou ECF	126
X.4.6 Protocole de déshybridation des membranes	127
XI. IMMUNOHISTOCHIMIE	127
XI.1 Immunofluorescence de CD41	127
XI.2 Immunofluorescence de CD41/collagène IV	128

XII. ANALYSE STATISTIQUE	128
RESULTATS ET DISCUSSION.....	131
PREMIERE PARTIE : EVALUATION DU ROLE DES INHIBITEURS DE PARP DANS L'AGREGATION PLAQUETTAIRE <i>IN VITRO</i>.....	131
I. CHEZ L'HOMME.....	132
I.1 Mise au point des conditions expérimentales	132
I.2 Etude de l'effet du PJ34 sur l'agrégation plaquettaire <i>in vitro</i> sur du sang humain et comparaison avec ceux du 3-AB, de la minocycline et de l'INO-1001	133
I.2.1 Résultats : Article	133
I.2.2 Principaux résultats et discussion	135
II. CHEZ LA SOURIS	138
II.1 Mise au point des conditions expérimentales	138
II.2 Etude de l'effet du PJ34 sur l'agrégation plaquettaire <i>in vitro</i> sur du sang de souris et comparaison avec ceux du 3-AB, de la minocycline et de l'INO-1001	139
II.2.1 Résultats	139
II.2.2 Discussion	140
DEUXIEME PARTIE : ETUDE DES EFFETS D'INHIBITEURS DE PARP DANS DES MODELES EXPERIMENTAUX <i>IN VIVO</i>	143
I. ETUDE DES EFFETS DU PJ34 ET DE LA MINOCYCLINE SUR L'HEMOSTASE.....	143
I.1. Étude des effets du PJ34 et de la minocycline sur le temps de saignement	143
I.1.1 Validation du modèle.....	144
I.1.2 Effets du PJ34 et de la minocycline sur le temps de saignement	145
I.2. Étude des effets du PJ34 et de la minocycline dans des modèles de thromboembolie pulmonaire	147
I.2.1 Modèle de thromboembolie pulmonaire induite par l'ADP	148
I.2.2 Modèle de thromboembolie pulmonaire induite par un mélange collagène/adréaline.....	150
I.3 Etude des effets du PJ34 et de la minocycline dans un modèle de thrombose artérielle induite par le FeCl ₃	153
I.3.1 Mise au point du modèle	153
I.3.2 Effets du PJ34 et de la minocycline dans un modèle de thrombose artérielle par le FeCl ₃ à 15%...	154
I.4 Discussion	155
II. ETUDE DE L'INTERACTION DU PJ34 ET DU RT-PA DANS UN MODELE DE THROMBOSE DE L'ACM PAR LE FeCl₃.....	158
II.1 Mise au point	158
II.2 Résultats	160
II.3 Discussion	163
III. CARACTERISATION DU MODELE D'ISCHEMIE CEREBRALE FOCAL TRANSITOIRE EN TERMES D'ACTIVATION ET D'ADHESION DES PLAQUETTES. 164	164
III.1 Prise en main du modèle d'ischémie cérébrale focale transitoire par voie endovasculaire	165
III.1.1 Résultats.....	166
III.1.2 Discussion.....	167
III.2 Evaluation du déficit neurologique 24 heures après l'ischémie cérébrale	168
III.2.1 Résultats.....	168
III.2.2 Discussion.....	170
III.3 Evaluation de la cinétique d'adhésion des plaquettes et de l'expression des molécules d'adhésion P-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1 à la suite d'une ischémie cérébrale transitoire	171
III.3.1 Evaluation de l'adhésion des plaquettes sur les cellules endothéliales cérébrales.....	171
III.3.2 Evaluation de l'activation plaquettaire par le dosage de la sP-sélectine sérique	179
III.3.3 Evaluation de l'expression des molécules d'adhésion au niveau cérébral par Western blot	181
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	193
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	199

RESUME

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) constituent la 3^{ème} cause de mortalité dans les pays industrialisés, et sont à 80% de type ischémique (AVCi). A l'heure actuelle, le seul traitement disponible est l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA), dont l'utilisation est très limitée, en raison d'une fenêtre thérapeutique étroite et de l'augmentation du risque de transformations hémorragiques (TH). Après un AVCi, les cliniciens sont confrontés, entre autres, à 3 objectifs d'ordre vasculaire : (1) reperfusion des tissus ischémiés, (2) éviter les TH, ainsi que (3) les réocclusions précoces ou tardives. Les travaux du laboratoire ont précédemment établi qu'après une ischémie cérébrale (IC), l'hyperactivation de la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP), une enzyme nucléaire, est (1) neurotoxique et (2) contribue aux TH spontanées ou induites par le rt-PA. Par ailleurs, des études suggèrent que les inhibiteurs de PARP pourraient également réduire les phénomènes de réocclusion, en inhibant l'activation/agrégation plaquettaires, et ceci *via* 2 mécanismes : (1) « PARP-indépendant », lié à une analogie structurale de certains inhibiteurs de PARP avec des agonistes plaquettaires, comme l'ADP, et (2) « PARP-dépendant », lié à leur effet anti-inflammatoire. Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe aucune donnée dans l'IC. Dans ce contexte, ce travail a consisté à évaluer les effets de plusieurs inhibiteurs de PARP sur l'activation et l'agrégation plaquettaires. Il nous est notamment apparu nécessaire de rechercher si la réduction des TH par les inhibiteurs de PARP pourrait être liée, au moins en partie, à une activité pro-agrégante, qui compromettrait leur association avec le rt-PA. A l'inverse, une activité anti-agrégante pourrait améliorer la reperfusion ou diminuer les risques de réocclusion.

Dans la 1^{ère} partie, nos résultats montrent *in vitro* que deux inhibiteurs de PARP (PJ34 et minocycline) sont anti-agrégants plaquettaires, et que cet effet serait « PARP-indépendant », puisque deux autres inhibiteurs de PARP, le 3-aminobenzamide et l'INO-1001, n'ont pas modifié l'agrégation. De plus, sur du sang humain, mais pas murin, le PJ34 exerce un effet anti-agrégant, qui pourrait être lié à un antagonisme du récepteur à l'ADP, P2Y12.

La 2^{ème} partie a été réalisée sur des modèles *in vivo* chez la souris. L'utilisation de 3 tests d'exploration des fonctions plaquettaires (temps de saignement, modèles de thromboembolie pulmonaire et de thrombose carotidienne par le FeCl₃) a mis en évidence l'absence d'effet du PJ34 et de la minocycline sur les fonctions plaquettaires, et notamment, pas d'effet pro-agrégant pouvant expliquer la réduction des TH. Dans un modèle de thrombose de l'artère cérébrale moyenne par le FeCl₃, le PJ34 n'entrave pas la thrombolyse par le rt-PA, mais au contraire, pourrait tendre à l'améliorer. Parallèlement, dans un modèle d'IC chez la souris, nos travaux ont mis en évidence une augmentation cérébrale de l'adhésion

des plaquettes et de l'expression d'ICAM-1. La suite de cette étude sera d'étudier si les inhibiteurs de PARP, en protégeant la paroi vasculaire, pourraient réduire les phénomènes de réocclusion.

L'ensemble de ce travail s'inscrit dans une thématique plus globale de notre laboratoire qui vise à identifier l'intérêt d'associer un inhibiteur de PARP au rt-PA pour une meilleure prise en charge de la thrombolyse post-AVCi.

Discipline : Pharmacologie

Mots-clés : Accidents vasculaires cérébraux
 Hémostase
 Agrégation plaquettaire
 Poly(ADP-ribose)polymérase (PARP)
 Molécules d'adhésion

PUBLICATION ET COMMUNICATIONS

- **Publication**

Lechaftois M., Bachelot-Loza C., Margail I., Marchand-Leroux C., Lerouet D. PJ34 : a potent PARP inhibitor with antiplatelet effect through P2Y12 antagonism? [Soumis à *British Journal of Pharmacology*].

- **Communication orale**

Lechaftois M., Bachelot-Loza C., Margail I., Marchand-Leroux C., Plotkine M., Lerouet D. Inhibiteurs de poly(ADP-ribose)polymérase et agrégation plaquettaire, 4^e Journée de l'Ecole Doctorale Médicament Toxicologie Chimie Environnement, Paris, Avril 2013.

- **Communications affichées**

Lechaftois M., Bachelot-Loza C., Margail I., Marchand-Leroux C., Plotkine M., Lerouet D. PJ34, a poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor, exerts antiplatelet effects through ADP receptor P2Y12 antagonism, Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T), Angers, Avril 2013. In: *Fund Clin Pharmacol*, 27, Suppl. 1: 115.

Lechaftois M., Bachelot-Loza C., Margail I., Marchand-Leroux C., Plotkine M., Lerouet D. Antiplatelet effect of PJ34, a poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor, through ADP receptor P2Y12 antagonism, Printemps de la Cardiologie - Recherche fondamentale et clinique, Marseille, Avril 2013. In: *Arch Cardiovasc Dis*, Suppl. 5, special issue n°1 : 5.

Lechaftois M., Bachelot-Loza C., Margail I., Marchand-Leroux C., Plotkine M., Lerouet D. Inhibiteurs de la poly(ADP-ribose)polymérase et agrégation plaquettaire. Réunion d'hiver de la Société Cerveau et Maladies Cérébrovasculaires (SCMC), Paris, Février 2013.

Lechaftois M., Bachelot-Loza C., Margail I., Marchand-Leroux C., Plotkine M., Lerouet D. Do PARP inhibitors have an effect on platelet aggregation ? 3^e Journée Scientifique de l'IMTCE, Paris, Juin 2012.

Lechaftois M., Bachelot-Loza C., Margaill I., Marchand-Leroux C., Plotkine M., Lerouet D. Do poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors possess anti-aggregant effects ? 7th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair, Potsdam, Allemagne, Mai 2012.

Lechaftois M., Bachelot-Loza C., Margaill I., Marchand-Leroux C., Plotkine M., Lerouet D. Poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors and platelet aggregation. Printemps de la Cardiologie - Recherche fondamentale et clinique, Bordeaux, Avril 2012. In: *Arch Cardiovasc Dis*, Suppl. 3, special issue n°1: 13, 0166.

Lechaftois M., Bachelot-Loza C., Margaill I., Marchand-Leroux C., Plotkine M., Lerouet D. Effects of PARP inhibitors on platelet aggregation. Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T), Dijon, Avril 2012. In: *Fund Clin Pharmacol*, 26, Suppl. 1: 94, P355.

LISTE DES ABREVIATIONS

3-AB	3-aminobenzamide
4-HOQ	4-hydroxyquinazoline
5-AIQ	5-aminoisoquinolinone
AA	Acide arachidonique
AC	Adénylate cyclase
Ac	Anticorps
ACC	Artère carotide commune
ACE	Artère carotide externe
ACI	Artère carotide interne
ACM	Artère cérébrale moyenne
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AIF	Apoptosis inducing factor
AIT	Accident ischémique transitoire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	Analyse de variance
ARN (m)	Acide ribonucléique (messenger)
ASA	Acide acétylsalicylique
ATP	Adénosine triphosphate
AUC	Aire sous la courbe
AVC	Accident vasculaire cérébral
AVCi	Accident vasculaire cérébral ischémique

BCA	Acide bicinchoninique
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BRCT	Breast cancer type1 C-terminus
BSA	Albumine sérique bovine
CF	Cytométrie de flux
CI50	Concentration inhibant de 50% l'activité enzymatique
COX	Cyclo-oxygénase
CPA	Cone and plate(let) analyser
DAG	Diacylglycérol
DO	Densité optique
DP	Dipyridamole
DSC	Débit sanguin cérébral
ECASS III	European cooperative acute stroke studyy
ECF	Enhanced chimio fluorescence
ECL	Enhanced chimio luminescence
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
EFS	Etablissement français du sang
ESPRIT	European/australasian stroke prevention in reversible ischemia
FDA	Food and drug administration
FeCl ₃	Chlorure de fer(III)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FT	Facteur tissulaire

GP	Glycoprotéine
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HAS	Haute autorité de santé
HRP	Horseradish peroxydase
HTA	Hypertension artérielle
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
i.a.	Intra-artérielle
i.p.	Intrapéritonéale
i.v.	Intraveineuse
IC	Ischémie cérébrale
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule-1
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IP3	Inositol triphosphate
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
ITAM	Immuno receptor tyrosine-based activation motif
kDa	Kilodalton
LFA-1	Leukocyte function associated molecule-1
LPS	Lipopolysaccharide
MA	Aggrégation maximale
Mac-1	Macrophage antigen-1
MMP	Métalloprotéase de la matrice

NaCl	Chlorure de sodium
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLS	Signal de localisation nucléaire
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NMNAT-1	Nicotinamide mononucléotide adényltransférase-1
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Monoxyde d'azote synthase
O ₂ ^{•-}	Radical superoxyde
OGD	Oxygen glucose deprivation
OH [•]	Radical hydroxyle
ONOO ⁻	Anion peroxydinitrite
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAR	Proteinase activated receptor
PAR(ylation)	Poly(ADP-ribosyl)ation
PARG	Poly(ADP-ribose)glycohydrolase
PARP	Poly(ADP-ribose)polymérase
PARs	Poly(ADP-ribose)s
PBM	PARs binding motif
PBS	Phosphate buffer saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PF4	Facteur plaquettaire 4
PFA	Paraformaldéhyde
PGI ₂	Prostacycline
PJ34	N-(6-oxo-5,6-dihydro-phénanthridin-2-yl)-N,N-diméthylacétamide

PKC	Protéine kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PM	Poids moléculaire
PMN	Polymorphonucléaire
PPAR γ	Peroxisome proliferation-activated receptor gamma
PPP	Plasma pauvre en plaquettes
PRI	Index de réactivité plaquettaire
PRP	Plasma riche en plaquettes
P-sélectine	Sélectine plaquettaire
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PVDF	Polyvinylidène difluoride
RCPG	Récepteur couplé à une protéine G
Rt-PA	Activateur tissulaire du plasminogène recombinant
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodécylsulfate
SFLLRN	Séquence sérine-phénylalanine-leucine-leucine-arginine-asparagine
siRNA	Small interfering ARN
SPIRIT	Stroke prevention in reversible ischemia trial
STAIR	Stroke therapy academic industry round table
TBS	Tris buffer saline
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TH	Transformation hémorragique
TMB	Tétraméthylbenzidine

TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TP	Récepteur du TxA2
t-PA	Activateur tissulaire du plasminogène
TTBS	Tampon salin contenant de Tween® 20
TTC	Chlorure de triphényltétrazolium
TxA2	Thromboxane A2
UA	Unité arbitraire
uPA	urokinase
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VE-cadhérine	Vascular endothelial cadhérine
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLA-4	Very late antigen-4 ou $\alpha 4\beta 1$
vWF	Facteur von Willebrand
WB	Western Blot
XRCC1	X-ray repair cross complementing protein 1

INTRODUCTION

En 2010, la ministre de la Santé a lancé un plan de lutte quadriennal contre les accidents vasculaires cérébraux (AVC) suite à un état des lieux alarmant. En effet, actuellement en France, on estime à 150 000 le nombre de nouvelles victimes d'AVC par an, soit 400 par jour. Dans le monde, ce sont 15 millions de personnes qui sont victimes d'AVC chaque année. Parmi elles, 75% des survivants gardent des séquelles invalidantes. En raison du vieillissement de la population, ces chiffres augmentent chaque année. Parmi ces AVC, 80% sont d'origine ischémique et 20% d'origine hémorragique. Face aux AVC ischémiques (AVCi), les cliniciens ne disposent à l'heure actuelle que d'un thrombolytique, l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA), qui permet la reperfusion des tissus ischémiés. Cependant, son utilisation reste très limitée (<2% des patients), en raison d'une fenêtre thérapeutique étroite et de l'augmentation du risque de transformations hémorragiques (TH). De plus, chez les patients thrombolysés par le rt-PA, la reperfusion n'est efficace que chez 46% d'entre eux (Rha et Saver, 2007).

Malheureusement, à l'heure actuelle, aucune des très nombreuses molécules qui se sont montrées neuroprotectrices chez l'animal n'a franchi le cap des essais cliniques (Ginsberg *et al.*, 2008). L'échec de ces stratégies ne visant que les neurones a conduit à réorienter les recherches vers des stratégies ciblant l'unité neuroglivasculaire. Au niveau vasculaire, les objectifs sont (1) reperfusion des tissus ischémiés par le rt-PA, (2) éviter les TH, ainsi que (3) les phénomènes de réocclusion précoce ou tardive, très importants dès les premières semaines qui suivent ces AVCi. Ainsi, parmi les survivants environ 15% seront victimes d'une récurrence la première année et 25-40% dans les 5 ans. Parmi les facteurs déclenchants, l'activation et l'agrégation plaquettaires post-ischémiques, mises en évidence aussi bien dans des modèles expérimentaux que chez l'homme (Choudhri *et al.*, 1998 ; Yip *et al.*, 2005), pourraient jouer un rôle clé.

Depuis plusieurs années, notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement à une enzyme nucléaire ubiquitaire, la poly(ADP-ribose)polymérase ou PARP, qui joue un rôle physiologique bénéfique dans la réparation de l'ADN. Cependant, l'hyperactivation de cette enzyme, qui a été mise en évidence à la fois dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale (voir pour revues : Moroni et Chiarugi, 2009 et Peralta-Leal *et al.*, 2009) et chez les patients victimes d'AVC (Love *et al.*, 1999), s'est révélée délétère. Cela a notamment été montré grâce à l'utilisation du PJ34, un puissant inhibiteur de PARP, qui à ce jour, nous a permis (1) de confirmer le rôle neurotoxique de l'hyperactivation de cette enzyme après une ischémie cérébrale (Haddad *et al.*, 2006), et (2) de mettre en évidence son rôle délétère vasculaire,

en montrant pour la 1^{ère} fois que la PARP contribue aux TH spontanées (Haddad *et al.*, 2008) ou induites par le rt-PA (Haddad *et al.*, 2013 ; Teng *et al.*, 2013), en favorisant la dégradation des composants de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Dans ce contexte, nous nous sommes interrogés sur les éventuels effets des inhibiteurs de PARP sur l'agrégation plaquettaire et sur leur interaction avec le rt-PA. En effet, il nous apparaît nécessaire de rechercher si la réduction des TH par les inhibiteurs de PARP n'est pas, au moins en partie, liée à une activité pro-agrégante, qui compromettrait leur association avec le rt-PA. A l'inverse, une éventuelle activité anti-agrégante des inhibiteurs de PARP constituerait un élément favorable susceptible d'améliorer la thrombolyse, en permettant (1) d'accroître le taux de recanalisation et (2) de réduire les doses de rt-PA, et donc ses effets délétères vis-à-vis de la BHE et des neurones.

A ce jour, il n'existe que très peu de données sur le rôle de la PARP dans l'activation et l'agrégation plaquettaires, et celles-ci sont plutôt en faveur d'un effet anti-agrégant des inhibiteurs de PARP. Par contre, il n'y a aucune donnée sur ces effets dans l'ischémie cérébrale.

L'ensemble de ces travaux pourrait ainsi mettre en évidence un nouvel aspect bénéfique des inhibiteurs de PARP et ainsi renforcer leur intérêt dans le traitement des AVCi, d'autant plus, que plusieurs inhibiteurs de PARP sont actuellement en essais cliniques de phase I et II en cancérologie, et sont bien tolérés par les patients (Peralta-Leal *et al.*, 2009).

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

PREMIER CHAPITRE : ACCIDENTS VASCULAIRES CEREBRAUX (AVC)

I. GENERALITES

I.1 Définition

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est officiellement défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme le « développement rapide de signes cliniques localisés ou globaux de dysfonction cérébrale avec des symptômes durant plus de 24 heures, pouvant conduire à la mort, sans autre cause apparente qu'une origine vasculaire ». En pratique, cette définition est contestable puisque les symptômes d'un AVC peuvent durer moins de 24 heures.

Les AVC sont des affections très hétérogènes qui peuvent être différenciées en 2 grands types :

- les AVC hémorragiques (hémorragie intra-parenchymateuse ou sous-arachnoïdienne) qui représentent 20% des AVC. Dans ce cas, la rupture de la paroi d'un vaisseau cérébral entraîne une hémorragie et ne permet plus l'irrigation du territoire en aval,
- les AVC ischémiques (AVCi) qui sont majoritaires, puisqu'ils représentent 80% des AVC. Ils sont provoqués par l'occlusion d'un vaisseau cérébral, par un thrombus formé *in situ* ou un embole, qui empêche l'irrigation d'une région (ischémie focale) ou de la totalité du cerveau (ischémie globale), comme dans le cas d'un arrêt cardiaque ou d'une hypotension sévère.

Par ailleurs, on différencie les AVCi des accidents ischémiques transitoires (AIT) ; un AIT étant défini comme un épisode bref de dysfonction neurologique, provoquant des symptômes durant généralement moins d'une heure et disparaissant dans les 24 heures. L'AIT peut être annonciateur d'un AVC, mais son diagnostic est malheureusement souvent ultérieur à l'AVCi lui-même.

Les AVCi concernent surtout le territoire carotidien, en particulier l'artère sylvienne ou artère cérébrale moyenne (ACM) qui est impliquée dans 70% des AVC carotidiens (Figure 1 ; Moulin et Decavel, 2004).

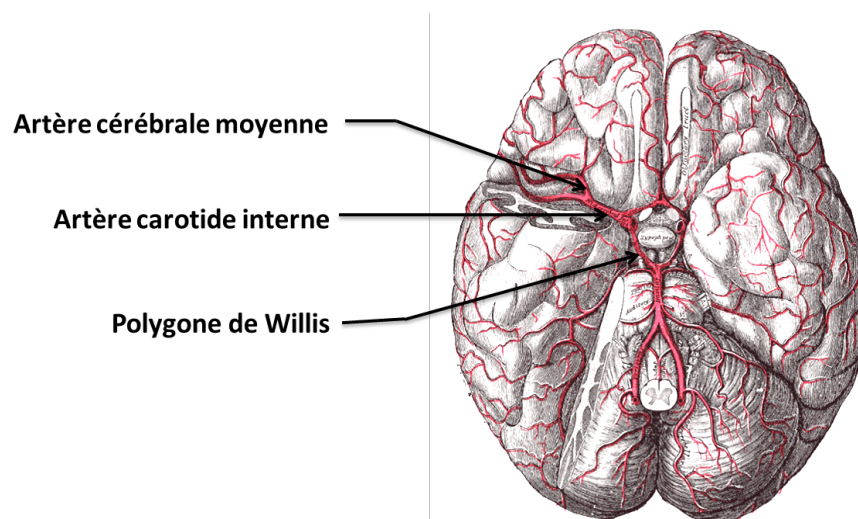


Figure 1. Schéma de la circulation cérébrale

D'après Gray's Anatomy of the Human Body (20^{ème} édition, U.S.A.)

En 1993, l'essai clinique TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) a permis de définir 5 sous-types d'AVCi en fonction de l'étiologie (Adams *et al.*, 1993). Cette classification présente l'avantage d'adapter la prise en charge du patient selon la cause à l'origine de son AVCi. Ainsi, on distingue :

- 1) les **AVCi par athérosclérose de grosses artères**. Les plaques d'athérome entraînent un rétrécissement de la lumière du vaisseau et la formation d'un thrombus. L'athérosclérose est à l'origine de 50% des AVCi.
- 2) les **AVCi par occlusion de petites artères ou infarctus lacunaires** (petite lacune due à un infarctus mesurant moins de 1,5 cm de diamètre), qui représentent 25% des AVCi.
- 3) les **AVCi par cardiopathie emboligène**, qui représentent 20% des cas. Les troubles du rythme ou de l'écoulement sanguin intracardiaque favorisent la formation d'embolies au niveau cardiaque, qui migrent alors dans la circulation jusqu'à occlure un vaisseau cérébral.
- 4) les **AVCi d'autres origines**, comme des hémopathies et thrombophilies, des artériopathies non athéromateuses (Moya-Moya), la consommation de drogues (cannabis, cocaïne) ou des maladies génétiques rares.
- 5) les **AVCi d'origine indéterminée**.

Ces deux dernières classes représentent 5% des AVCi (Warlow *et al.*, 2003).

I.2 Epidémiologie des AVC

Les données épidémiologiques suivantes sont principalement issues du registre de Dijon, qui étudie depuis 1985 l'épidémiologie des AVC en France, du site de l'association France AVC, ainsi que des rapports de l'OMS (Béjot *et al.*, 2009 ; www.franceavc.com ; World Health Organization, 1978).

En France, la prévalence des AVC est de 400 000 personnes par an et l'incidence de 150 000 nouveaux cas par an, soit 400 par jour. Cette dernière est pourtant parmi les plus basses dans le monde, presque 4 fois moindre qu'au Japon où l'incidence est la plus élevée. En France, les AVC représentent la 2nde cause de mortalité chez la femme et la 3^{ème} chez l'homme, avec 20% des victimes qui décèdent dans le mois qui suit.

Dans le monde, l'incidence est évaluée à 16 millions de nouveaux cas par an. L'OMS estime que ce taux atteindra 23 millions en 2030, notamment en raison du vieillissement de la population. En terme de mortalité, l'OMS évalue à 10% le nombre de décès dus aux AVC en 2004 et estime que ce chiffre atteindra 12% d'ici 2030.

Les taux de récurrence sont élevés au cours des premières semaines qui suivent l'AVC. Une méta-analyse incluant plus de 9000 patients victimes d'un AVCi (tous types confondus) montre que le risque cumulé de récurrences est supérieur à 10% après 1 an, supérieur à 25% après 5 ans et d'environ 40% après 10 ans (Mohan *et al.*, 2011). Cependant, ces chiffres sont variables selon l'étiologie de l'AVCi. Ainsi, les AVC d'origine cardio-embolique sont ceux pour lesquels il existe le plus grand risque de récurrence.

Les AVC sont également la 1^{ère} cause de handicap acquis chez l'adulte, puisque 3/4 des survivants gardent des séquelles définitives. Parmi eux, 1/3 devient dépendant, 1/4 ne reprend jamais d'activité professionnelle, et 25 à 50% des patients souffrent de dépression au moins au cours de la 1^{ère} année suivant l'AVC (Pinoit *et al.*, 2006).

Les AVC constituent donc un problème majeur de santé publique en termes de morbidité et de mortalité. Par ailleurs, son coût financier pour l'assurance maladie est évalué à une dépense annuelle d'environ 8,3 milliards d'euros. C'est pour cette raison qu'un plan d'actions national AVC a été mis en place en 2010 par le ministère de la Santé.

Le « plan AVC » est un quadriennal (2010 – 2014) qui s'articule autour de 4 grands axes :

- 1) améliorer la prévention et l'information de la population sur les manifestations cliniques des AVC et l'importance d'agir vite (Figure 2),

- 2) mettre en œuvre des filières de prise en charge et des systèmes d'information adaptés,
- 3) assurer l'information, la formation et la réflexion des professionnels de santé,
- 4) promouvoir la recherche et veiller à l'équilibre démographique.

Ces objectifs ont été établis à partir d'un rapport remis en octobre 2009 à la ministre de la santé et des sports, présentant un état des lieux sur la prévention et la prise en charge des AVC en France. Ce rapport présente des actions concrètes et donne des éléments de méthode pour les différents acteurs (référentiels de bonne pratique, indicateurs de suivi ou d'évaluation...).



Figure 2. Affiche de la campagne d'information des AVC

I.3 Les facteurs de risque des AVC ischémiques

On distingue classiquement les facteurs de risque non modifiables des facteurs de risque modifiables (Béjot *et al.*, 2009 ; Goldstein *et al.*, 2011).

I.3.1 Facteurs de risque non modifiables

L'incidence des AVC augmente avec l'**âge**, qui est le facteur le plus important.

Le sexe constitue également un facteur de risque, puisque la prévalence des AVC est plus élevée chez les hommes que chez les femmes.

L'ethnie est aussi un facteur de risque, puisqu'une étude américaine (White *et al.*, 2005) a montré que l'incidence des AVCi chez les personnes d'origines africaine et hispanique était 2 fois plus élevée que chez les caucasiens. Cela peut s'expliquer en partie par des facteurs génétiques, qui restent cependant assez mal connus.

Enfin, les **antécédents familiaux** constituent aussi un facteur de risque, puisqu'un antécédent paternel ou maternel multiplie par 2 le risque de faire un AVC.

I.3.2 Facteurs de risque modifiables

Les facteurs de risques modifiables sont importants à identifier, car ils constituent le seul moyen de prévenir la survenue (prévention primaire) ou la récurrence (prévention secondaire) d'un AVCi. Ces facteurs de risque sont responsables d'environ 80% des maladies cérébrovasculaires et coronariennes.

L'**hypertension artérielle** (HTA) constitue le facteur de risque principal chez les patients victimes d'un AVC, puisqu'elle multiplie environ par 7 le risque d'AVC.

En France, on estime à 14 millions le nombre d'hypertendus, parmi lesquels seulement 8 millions sont traités. Or, d'après l'OMS, la simple régulation de l'HTA permettrait de sauver 4 personnes sur 10.

Souvent associés à l'HTA, le **diabète de type 2** et l'**hypercholestérolémie** sont également des facteurs de risque d'AVC.

Les **pathologies cardiaques**, en particulier la fibrillation auriculaire, prédisposent également aux AVC.

Le **tabagisme** est également un facteur de risque reconnu, alors que d'autres sont moins bien documentés. Citons pour exemple, la sédentarité, l'obésité, la consommation excessive d'alcool (une consommation faible ou modérée serait plutôt bénéfique), la contraception et le traitement hormonal substitutif.

Les facteurs sociaux, économiques et culturels, tels que la globalisation, l'urbanisation, le vieillissement des populations, la pauvreté et le stress sont également à prendre en considération.

II. PRISE EN CHARGE DES AVC ISCHEMIQUES

II.1 Manifestations cliniques

Les AVC se manifestent par des symptômes d'apparition brutale :

- **Atteinte du système nerveux central** : troubles de la conscience, stupeur, coma, confusion ou agitation, voire même des crises d'épilepsie,
- **Troubles de la vision** : réduction du champ visuel, diminution ou perte de la vision mono- ou binoculaire,

- **Troubles du langage** : troubles de l'élocution, perte brutale de la parole,
- **Troubles de la motricité** : paralysie ou 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.

Ce tableau clinique très varié, qui dépend notamment du territoire touché, rend compliqué le diagnostic d'un AVC. De manière générale, tous les symptômes d'apparition soudaine ou rapide doivent évoquer un AVC et impliquent une prise en charge précoce et adaptée des patients afin de limiter les séquelles.

Une échelle, la NIHSS (National Institut 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'AVC.

II.2 Prise en charge thérapeutique

Le temps de prise en charge est un des facteurs les plus importants conditionnant le devenir du patient. C'est aussi le principal obstacle à l'accès à un traitement efficace. Une fois arrivés aux urgences, les patients doivent avoir accès à l'imagerie dans les plus brefs délais, afin de discriminer un AVCi d'un AVC hémorragique. Le scanner est l'imagerie la plus utilisée, car la plus disponible, mais l'IRM (Imagerie par résonance magnétique) reste l'imagerie la plus recommandée en raison de sa performance. En effet, l'IRM présente l'avantage, entre autres, d'évaluer la zone de pénombre, qui peut être potentiellement sauvée (voir paragraphe III.1). Par ailleurs, des techniques angiographiques peuvent également être utilisées pour visualiser l'occlusion.

La prise en charge des patients comprend 5 étapes :

- 1) En fonction des examens, l'éligibilité ou non du patient à la **thrombolyse par l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant ou rt-PA** est déterminée. La thrombolyse a pour objectif de lyser le thrombus pour permettre la reperfusion du territoire ischémié. A l'heure actuelle, le seul traitement pharmacologique autorisé est le rt-PA (Actilyse®) qui présente une fenêtre d'administration de 4h30, même si les meilleurs résultats sont observés dans les 90 minutes qui suivent l'apparition des 1^{ers} symptômes. En pratique, moins de 2% des patients victimes d'AVCi bénéficient d'une thrombolyse par le rt-PA, notamment en raison de leur prise en charge au-delà de cette fenêtre thérapeutique étroite. En effet, au-delà, le rapport bénéfice/risque du rt-PA devient dangereux.

- 2) Le suivi des **paramètres vitaux** du patient, tels que la température corporelle, la pression artérielle, la saturation en oxygène, les fonctions cardiaque et respiratoire. D'autres variables, comme la glycémie, sont également surveillées.
- 3) La **prévention des complications**, telles que l'œdème cérébral et l'augmentation de la pression intracrânienne, la survenue de crises d'épilepsie, d'embolie pulmonaire, de thrombose veineuse, mais aussi des complications à plus long terme comme les risques de dépression.
- 4) La **rééducation** adaptée des patients par une prise en charge par l'ensemble du corps médical et paramédical (kinésithérapeutes, ergothérapeutes, orthophonistes). Cet accompagnement multidisciplinaire s'est révélé bénéfique dans la récupération des patients, d'autant plus si elle est initiée précocement.
- 5) La **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/American Stroke Association et l'ESO (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 ce qui concerne le traitement, à l'exception des AVC cardio-emboliques où les anticoagulants sont préférés, l'aspirine (acide acétylsalicylique ou ASA ; 50 et 325 mg/jour), associé au non au dipyridamole ou le clopidogrel doivent être administrés en 1^{ère} intention. Cependant, la supériorité de l'association de ces différentes molécules est encore discutée (voir Chapitre 2 paragraphe V.2).

III. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'AVC ISCHEMIQUE

III.1 Définition des zones de cœur et de pénombre

Le cerveau est l'organe qui, proportionnellement à sa masse, consomme le plus d'oxygène et de glucose, ce qui le rend particulièrement sensible à une baisse du débit sanguin cérébral (DSC). Selon la sévérité de la chute du DSC, le devenir cellulaire est différent et on définit ainsi 2 zones (Figure 3) :

- La région cérébrale où le DSC chute en dessous de 20% de sa valeur normale (estimée à 50 ml/100g/min) est définie comme étant le **cœur de la lésion**. Cette hypoperfusion sévère entraîne une mort cellulaire rapide par nécrose,
- A la périphérie du cœur de la lésion se trouve la **zone de pénombre**, où le DSC est compris entre 20 et 45% de la valeur normale. Dans cette zone, les cellules en souffrance conservent leur intégrité morphologique, mais présentent des dysfonctions électriques, énergétiques et de synthèse. Si la reperfusion du tissu est restaurée dans les quelques heures suivant l'AVC, la zone de pénombre sera

sauvée et les cellules retrouveront une activité normale (voir pour revues: Paciaroni *et al.*, 2009 ; Heiss, 2011). En revanche, si cette zone n'est pas reperfusée à temps, elle évoluera vers une lésion irréversible. La zone de pénombre est la cible des traitements neuroprotecteurs et de reperfusion.

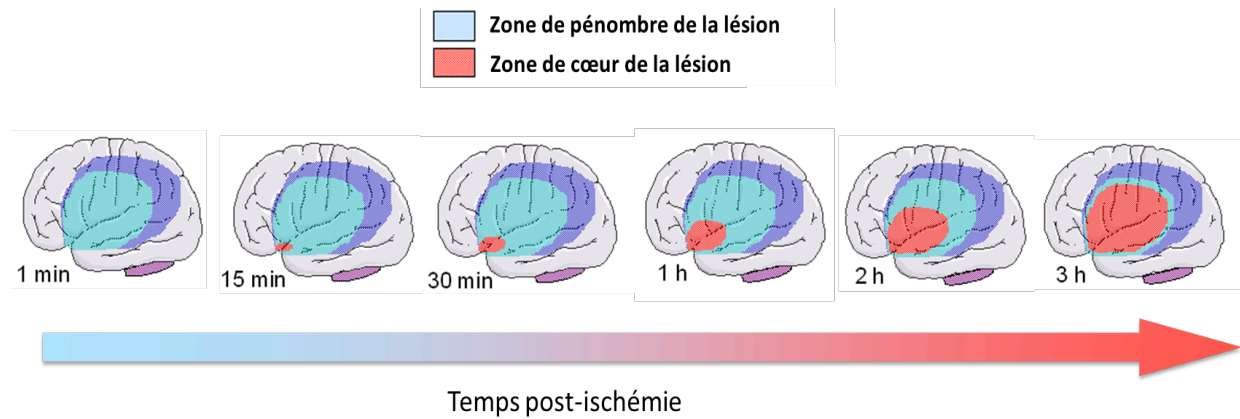


Figure 3. Evolution de la zone de pénombre et du cœur de la lésion en fonction du temps
D'après Kunz *et al.*, 2010

III.2 Mécanismes post-ischémiques

La lésion cérébrale post-ischémique est le résultat d'une cascade d'évènements se succédant dans le temps et dans l'espace (Figures 4 et 5; voir pour revues : Pinard et Engrand, 1999 ; Durukan et Tatlisumak, 2007 ; Rami *et al.*, 2008 ; Broughton *et al.*, 2009 ; Brouns et De Deyn, 2009). Très rapidement, dans les premières minutes suivant l'AVC, le mécanisme d'excitotoxicité est mis en place, suivi du stress oxydant, puis, plus tardivement, intervient la phase d'inflammation, et enfin l'apoptose (Dirnagl *et al.*, 1999).

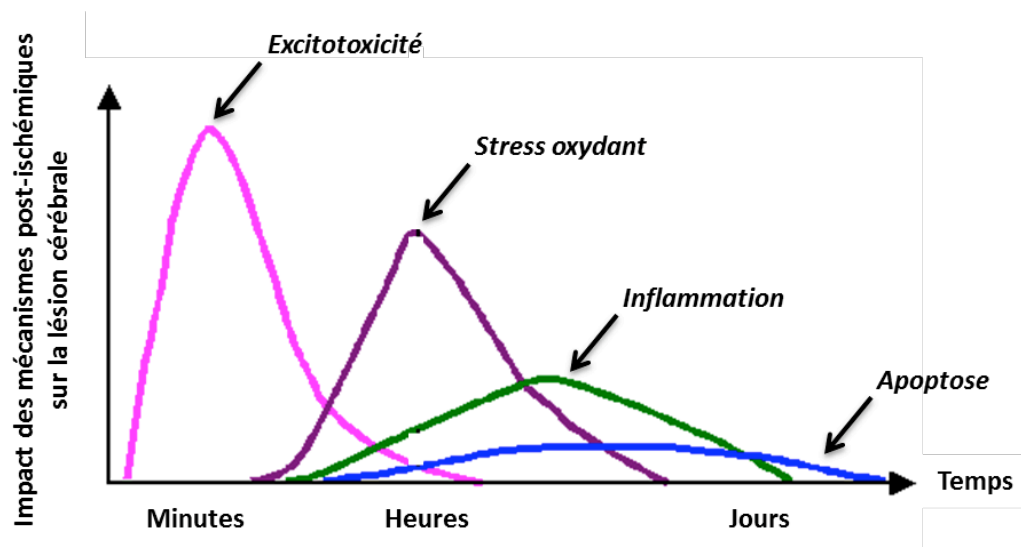


Figure 4. Cinétique des mécanismes délétères en fonction du temps après l'ischémie cérébrale
D'après Brouns et De Deyn, 2009

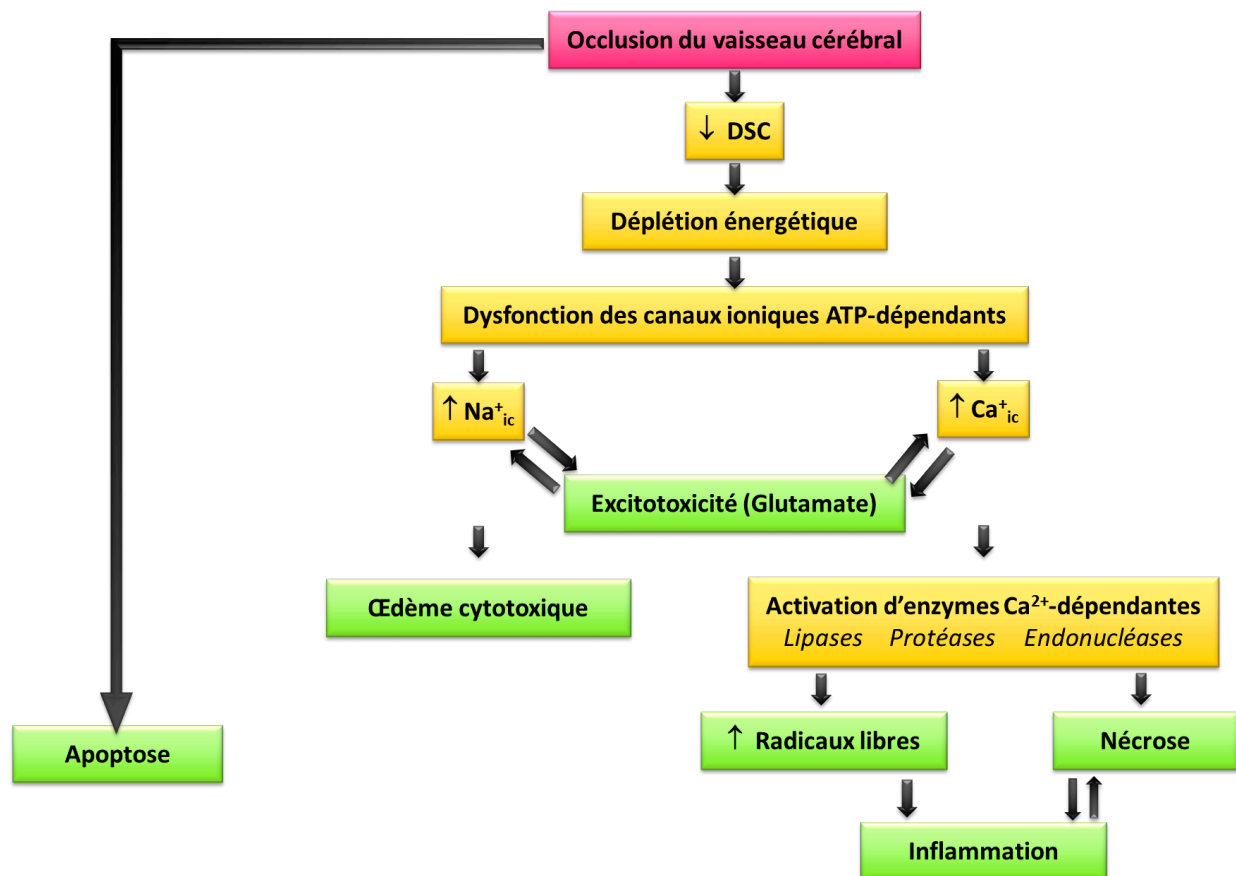


Figure 5. Cascade ischémique

DSC : Débit Sanguin Cérébral ; ic : intracellulaire

III.2.1 Excitotoxicité

Dans le territoire ischémié, les neurones se retrouvent privés d'oxygène et de glucose et ils deviennent alors incapables de synthétiser de l'ATP. Cette déplétion énergétique entraîne une dysfonction des canaux ioniques ATP-dépendants, notamment Na^+/K^+ et Ca^{2+} . La perturbation de l'homéostasie ionique provoque une dépolarisation membranaire et la libération massive de neurotransmetteurs excitateurs, en particulier le glutamate. En se fixant sur ses récepteurs neuronaux NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et AMPA [acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque], le glutamate renforce l'entrée de Na^+ , donc d'eau, et de Ca^{2+} dans les cellules. Cela conduit respectivement à un gonflement cellulaire à l'origine d'un œdème cytotoxique, et à l'activation de nombreuses enzymes Ca^{2+} -dépendantes (protéines kinases ; protéases ; phospholipase A2 ou PLA2 ; cyclo-oxygénase ou COX ; monoxyde d'azote synthase ou NOS) responsables d'altérations structurales et fonctionnelles, conduisant à un stress oxydant et à la mort cellulaire (Dirnagl *et al.*, 1999 ; Doyle *et al.*, 2008).

III.2.2 Stress oxydant

Le stress oxydant post-ischémique est lié à une production excessive d'espèces chimiques très instables, les radicaux libres, tels que l'anion superoxyde (O_2^-), le monoxyde d'azote (NO), les radicaux

hydroxyle ($\text{OH}^\cdot$), et les peroxynitrites ($\text{ONOO}^\cdot$) issus de l'association des radicaux $\text{O}_2^\cdot$ et NO . Les radicaux libres sont principalement produits par la mitochondrie, les neutrophiles, les macrophages, les cellules endothéliales et les neurones (Kowaltowski *et al.*, 2009).

En conditions physiologiques, il existe un équilibre entre la formation des radicaux libres et leur neutralisation par des anti-oxydants endogènes enzymatiques (glutathion peroxydase, superoxyde dismutase, catalase) et non enzymatiques (glutathion, vitamines E et C ; Chen *et al.*, 2011).

Cependant, à la suite d'une ischémie cérébrale, le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'activation de différentes enzymes, telles que la NOS ou la COX, et l'infiltration de neutrophiles et de macrophages, provoquent une production massive de radicaux libres (voir pour revue : Pradeep *et al.*, 2012) qui dépasse les capacités des systèmes anti-oxydants endogènes, ce qui est à l'origine d'un stress oxydant. Ce dernier est responsable, notamment par l'action des $\text{ONOO}^\cdot$, de mécanismes cytotoxiques, tels que la peroxydation des lipides membranaires, l'oxydation de protéines et des lésions de l'ADN, conduisant à la mort cellulaire.

III.2.3 Inflammation

La phase d'inflammation, notamment liée à la présence de cellules nécrotiques et de radicaux libres, intervient plus tardivement après l'ischémie cérébrale, et joue un rôle important dans la maturation de la lésion cérébrale. Elle débute par l'activation de facteurs de transcription de gènes pro-inflammatoires, tels que NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) qui déclenche l'expression de cytokines pro-inflammatoires (O'Neill et Kaltschmidt, 1997 ; Wang *et al.*, 2007). Celles-ci induisent à leur tour l'expression, entre autres, de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales, telles qu'ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1), et les P- et E-sélectines (voir Chapitre 2 paragraphe III). Ces molécules sont impliquées dans l'adhésion des plaquettes, mais aussi des leucocytes polymorphonucléaires (PMN) sur les cellules endothéliales permettant leur infiltration dans le parenchyme cérébral (Frijns et Kappelle, 2002). Ces PMN infiltrés sont une source de médiateurs pro-inflammatoires, tels que les métalloprotéases de la matrice (MMP) qui dégradent les constituants de la matrice extracellulaire, de radicaux libres, et de l'activation d'enzymes comme la NOS ou la COX-2. Notons qu'une étude récente remet en cause ces données en montrant que les PMN n'infiltrant pas le parenchyme cérébral mais restent dans l'espace périvasculaire (Enzmann *et al.*, 2013).

Ces événements contribuent à la lésion post-ischémique, à la formation de l'œdème et d'hémorragies intracérébrales.

III.2.4 Apoptose

En fonction de la nature et de l'intensité du stimulus, du type cellulaire, ainsi que du statut énergétique de la cellule, la mort cellulaire s'oriente plutôt vers la nécrose, qui est une mort prématurée, ou l'apoptose, une mort programmée. Au cours de l'ischémie cérébrale, la mort par nécrose intervient de manière précoce surtout dans le cœur de la lésion, alors que l'apoptose s'installe plus tardivement, particulièrement dans la zone de pénombre (Dirnagl *et al.*, 1999).

L'apoptose peut être déclenchée par un mécanisme caspase-dépendant ou caspase-indépendant. Les réactions caspase-dépendantes aboutissent à l'activation de la caspase 3, qui entraîne notamment l'activation d'endonucléases, responsables de la dégradation de l'ADN et la mort cellulaire. Dans la voie caspase-indépendante, c'est la translocation d'AIF (Apoptosis Inducing Factor) de la mitochondrie vers le noyau qui entraîne la fragmentation de l'ADN, et par conséquent, la mort de la cellule. Cette voie étant liée à l'activation de la PARP, elle sera plus détaillée dans le Chapitre 3.

III.3 Complications des AVC ischémiques

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une barrière qui limite et régule les échanges entre le compartiment sanguin et le parenchyme cérébral. Elle permet, par exemple, le passage de l'eau, de l'oxygène et du glucose, alors qu'elle s'oppose au passage de molécules de grande taille comme l'albumine. La BHE est constituée de cellules endothéliales étroitement liées entre elles par des protéines de jonctions, de la lame basale sur laquelle reposent les cellules endothéliales, de péricytes et de pieds astrocytaires.

A la suite d'une ischémie cérébrale, les mécanismes délétères décrits précédemment, comme la production de radicaux libres, entraînent l'activation des MMP. Ces MMP, en dégradant la lame basale et les protéines de jonction, affectent l'intégrité de la BHE et augmentent ainsi sa perméabilité (Rivera *et al.*, 2004 ; Weiss *et al.*, 2009).

L'altération de la BHE provoque :

- 1) La formation d'un **œdème cérébral** caractérisé par une augmentation du contenu en eau dans le cerveau. Celle-ci peut survenir dans la cellule, due à l'accumulation d'eau et de Na^+ suite au dysfonctionnement des pompes Na^+/K^+ ATP-dépendantes ; on parle alors d'œdème cytotoxique. L'œdème peut aussi être causé par l'extravasation d'eau, de plasma et de protéines dans le milieu extravasculaire : on parle alors d'œdème vasogénique. Ce type d'œdème provoque, en particulier, une augmentation du volume cérébral et donc une augmentation de la pression intracrânienne (Gasche et Copin, 2003).

- 2) L'apparition d'hémorragies intracérébrales ou **transformations hémorragiques** (TH), qui peuvent soit survenir de manière spontanée après l'ischémie cérébrale (Horning *et al.*, 1993), soit être aggravées par l'administration de rt-PA qui multiplie par 6 le risque de survenue de TH (Hacke *et al.*, 2004). Cette toxicité vasculaire du rt-PA serait liée, entre autres, à l'augmentation de l'activité de certaines MMP qui dégradent la membrane basale et les protéines de jonction.

La survenue d'un œdème cérébral et de TH sont 2 causes majeures de décès précoces chez les patients victimes d'un AVC (Gasche et Copin, 2003).

IV. MODÈLES EXPÉRIMENTAUX D'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE

Les modèles d'ischémie cérébrale ont été développés, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, afin d'étudier les mécanismes physiopathologiques mis en jeu, de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques et d'évaluer l'effet de nouveaux traitements.

IV.1 Modèles *in vitro*

Les modèles *in vitro* sont surtout développés sur des cultures ou des co-cultures de différents types cellulaires présents dans le cerveau, comme les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes, la microglie ou bien encore les cellules endothéliales. Ces cultures sont placées dans des conditions mimant celles d'une ischémie cérébrale, où l'oxygène et le glucose font défaut : on parle alors d'OGD (Oxygen glucose deprivation). Les cultures peuvent être également soumises à l'hypoxie seule, à l'aide d'une chambre à hypoxie, à un stress excitotoxique par l'ajout de NMDA ou de glutamate, ou bien encore à un stress oxydant en présence de peroxyde d'hydrogène H₂O₂.

Des études peuvent également être réalisées sur des coupes de tissu cérébral.

IV.2 Modèles *in vivo*

In vivo, les modèles d'ischémie cérébrale peuvent être réalisés chez différentes espèces animales, parmi lesquelles les rongeurs, le cochon et les primates non humains qui présentent l'avantage d'avoir un cerveau très proche de celui de l'Homme et d'être très pertinents dans l'étude des déficits neurologiques post-ischémiques. Cependant, pour des raisons éthiques, d'infrastructures et de coût, l'utilisation de primates non humains reste restreinte aux études précliniques ayant déjà été validées chez des espèces inférieures, avant le passage en étude clinique.

Bien qu'ils présentent un rapport substance grise/substance blanche très différent de celui de l'Homme (respectivement 90/10 et 40/60), les rongeurs, et en particulier les souris, sont très utilisés pour 3 raisons majeures :

- 1) la vascularisation cérébrale est proche de celle de l'Homme, notamment grâce à la présence du polygone de Willis,
- 2) les souris peuvent être modifiées génétiquement, ce qui permet d'éteindre ou de surexprimer un gène, et donc, la protéine qu'il code. Cette technique peut être utilisée pour évaluer le rôle d'une protéine ou bien induire des facteurs de morbidité, comme de l'HTA, du diabète ou une hyperlipidémie,
- 3) d'un point de vue pratique, les infrastructures sont moins lourdes et moins onéreuses.

Dans ce contexte, seuls les modèles utilisés chez les rongeurs seront évoqués dans cette partie.

On distingue les modèles d'ischémie cérébrale globale, qui affecte l'ensemble de l'encéphale, et les modèles d'ischémie cérébrale focale, qui touche un territoire cérébral donné.

IV.2.1 Modèles d'ischémie cérébrale globale

Ces modèles reproduisent des lésions cérébrales provoquées par une chute du DSC dans l'ensemble du cerveau, comme lors d'un arrêt cardiaque, d'une sévère hypotension ou encore d'une strangulation (voir pour revue McBean et Kelly, 1998).

Chez le rat, les 2 modèles les plus utilisés sont (1) le modèle « 4 vaisseaux », qui consiste à occlure de manière permanente les 2 artères vertébrales par électrocoagulation et à ligaturer de manière transitoire les 2 artères carotides communes (ACC), et (2) le modèle « 2 vaisseaux » combinant le clampage bicarotidien avec une hypotension artérielle.

Chez d'autres espèces présentant un polygone de Willis incomplet, comme la gerbille, l'occlusion des 2 ACC suffit à provoquer une ischémie globale.

IV.2.2 Modèles d'ischémie cérébrale focale

Ces modèles consistent à provoquer une chute locale du DSC. L'occlusion est réalisée sur une artère cérébrale, le plus souvent l'ACM puisqu'elle est l'artère la plus fréquemment touchée chez l'Homme. L'ischémie peut être réalisée de manière permanente ou transitoire, c'est-à-dire que l'occlusion est suivie d'une phase de reperfusion.

Les modèles sont classés selon l'abord utilisé :

- **Modèles par voie extravasculaire**

Les modèles par voie extravasculaire consistent à réaliser une craniectomie, afin d'accéder à l'ACM.

Dans le modèle initial développé en 1981 par Tamura, l'ischémie est réalisée par électrocoagulation de l'ACM (Tamura *et al.*, 1981). Bien que ce modèle induise des lésions reproductibles, il présente l'inconvénient majeur de ne pouvoir réaliser qu'une ischémie permanente. Il a donc été modifié par la suite, afin de permettre la reperfusion du tissu cérébral. Dans ce cas, l'occlusion est réalisée à l'aide d'une ligature (Shigeno *et al.*, 1985), d'un microclip (Dietrich *et al.*, 1989) ou d'un crochet (Kaplan *et al.*, 1991). Dans ces modèles, la variabilité de la taille de la lésion cérébrale peut être réduite en associant à l'occlusion de l'ACM, l'occlusion d'une ou des 2 ACC.

Plus tard, l'application locale d'endothéline-1, un puissant agent vasoconstricteur, a été utilisée afin de provoquer un vasospasme à l'origine de l'occlusion de l'ACM (Macrae *et al.*, 1993). Même si, contrairement aux modèles précédents, ce modèle présente l'avantage de ne pas entraîner de lésion mécanique au niveau des vaisseaux, il nécessite en revanche une maîtrise rigoureuse des doses et de la durée d'application de l'endothéline-1.

L'inconvénient principal de ces modèles est que la craniectomie peut entraîner une dessiccation du cerveau, une hypothermie, ainsi qu'un risque d'infection. C'est pourquoi d'autres modèles ne nécessitant pas de craniectomie ont été développés.

- **Modèles par voie endovasculaire**

Le modèle initialement développé chez le rat en 1986 (Koizumi *et al.*, 1986) puis adapté à la souris (Clark *et al.*, 1997), consiste à introduire un filament dans l'artère carotide interne (ACI) jusqu'à occlure l'origine de l'ACM. Les avantages de ce modèle sont (1) qu'il ne nécessite pas de craniectomie et (2) que le filament peut soit être retiré après un temps déterminé (classiquement moins de 3 heures), pour permettre la reperfusion, soit être laissé en place, afin d'induire une ischémie permanente. Cependant, il n'est pas adapté à l'étude de la thrombolyse. De plus, si l'extrémité du filament n'est pas protégée, son insertion peut potentiellement rompre une artère et ainsi provoquer des hémorragies. Même si ce modèle est aujourd'hui le modèle d'ischémie cérébrale focale le plus utilisé, il ne reproduit pas les mécanismes d'occlusion observés chez l'Homme, qui sont le plus souvent causés par thromboembolisme.

- **Modèles thromboemboliques**

Dans ces différents modèles thromboemboliques, l'occlusion est provoquée par un caillot sanguin.

Le premier consiste à injecter des caillots sanguins autologues (ou hétérologues) directement dans l'ACI, sans craniectomie, afin d'occlure l'ACM (Kudo *et al.*, 1982). La principale difficulté de cette

technique est de contrôler la localisation des caillots, ce qui provoque des infarctus hétérogènes. Ce modèle a donc été amélioré en injectant, à l'aide d'un cathéter, un seul gros caillot de taille standardisée, à proximité de l'origine de l'ACM (Zhang *et al.*, 1997).

L'occlusion peut également être induite chimiquement, par injection intraveineuse d'un colorant photosensible, le rose bengal, suivie de l'irradiation locale par un rayon lumineux sur le crâne de l'animal (Watson *et al.*, 1985). L'activation locale du rose bengal produit des radicaux libres, perturbe la fonction endothéliale et entraîne la formation d'un thrombus. L'inconvénient de cette technique est la rupture de la BHE et la formation précoce d'un œdème vasogénique, ce qui conduit rapidement à une ischémie sévère dépourvue de zone de pénombre. Cela rend ainsi l'étude de stratégies neuroprotectrices très limitée dans ce modèle.

Une nouvelle approche, introduite par Orset et collaborateurs en 2007 (Orset *et al.*, 2007), consiste à injecter, après craniectomie, de la thrombine directement dans l'ACM de la souris, ce qui génère un caillot *in situ*. L'avantage de ce modèle est qu'il est très proche de la physiopathologie humaine et permet l'étude de thrombolytiques.

Très récemment, Karatas et collaborateurs ont décrit un nouveau modèle, inspiré d'un modèle de thrombose carotidienne (Karatas *et al.*, 2011). Ce modèle consiste à appliquer une pastille de papier filtre imbibée d'une solution de chlorure ferrique (FeCl_3) sur la dure-mère, au niveau de l'ACM. Le FeCl_3 entraîne la formation de radicaux libres et la lésion de l'endothélium, ce qui génère un thrombus. Cependant, ce thrombus, plutôt riche en plaquettes, expliquerait pourquoi dans ce modèle, seule la moitié des souris présente une thrombolyse efficace après l'administration du rt-PA.

V. STRATEGIES THERAPEUTIQUES DANS L'AVC ISCHEMIQUE

Les stratégies thérapeutiques développées pour le traitement des AVCi comprennent 2 axes de recherche : une approche orientée vers les problématiques d'ordre vasculaire et une autre vers les problématiques d'ordre cellulaire (Steiner et Hacke, 1998).

V.1 Approche vasculaire

Cette stratégie a pour objectif de reperfusionner l'artère cérébrale occluse, afin de restaurer le DSC dans la zone ischémisée. Pour cela, différentes stratégies peuvent être exploitées : le développement de nouveaux thrombolytiques pharmacologiques ou le développement de dispositifs mécaniques endovasculaires ; ces différentes approches pouvant être utilisées seules ou combinées.

V.1.1 Thrombolyse pharmacologique

- **Thrombolyse intraveineuse (i.v.)**

Après l'échec des agents thrombolytiques de 1^{ère} génération (la streptokinase et l'urokinase), a été développé le rt-PA ou altéplase ou Actilyse®, son nom commercial. C'est actuellement le seul traitement pharmacologique validé dans le cadre du traitement aigu des AVCi, d'abord en 1996 aux Etats-Unis, puis en 2002 en Europe.

Le rt-PA est une sérine protéase de 68 kDa. C'est une forme recombinante du tPA endogène qui agit donc en convertissant le plasminogène sous une forme active, la plasmine, qui va dégrader la fibrine insoluble en produits de dégradation solubles (Figure 6).

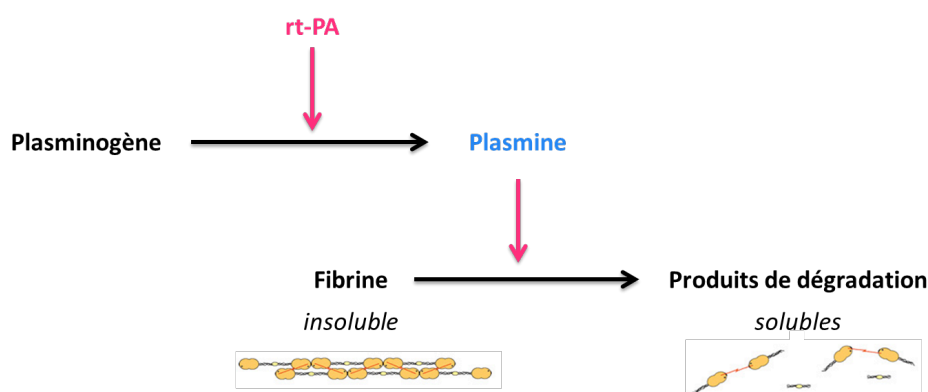


Figure 6. Mécanisme d'action du rt-PA

La 1^{ère} étude montrant les effets bénéfiques du rt-PA est l'étude NINDS (National Institute of Neurological Disorders and Stroke), dans laquelle le rt-PA était administré à la dose de 0,9 mg/kg dans les 3 heures suivant l'apparition des symptômes. Depuis, d'autres études, notamment l'étude ECASS-III (European Cooperative Acute Stroke Study), ont montré le bénéfice d'une administration jusqu'à 4h30 après l'apparition des symptômes (Hacke *et al.*, 2008). Cependant, cette fenêtre thérapeutique reste restreinte et le rt-PA est toujours associé à une forte augmentation des TH.

C'est pourquoi de nouveaux thrombolytiques présentant une meilleure activité fibrinolytique et avec un faible risque de TH sont recherchés. Citons à titre d'exemples le desmotéplase, actuellement en essai de phase III pour une administration entre 3 et 9 heures post-ischémie (Von Kummer *et al.*, 2012) ou le retéplase, qui a été testé en association avec un antiplaquettaire, l'abciximab, dans les 3 à 24 heures suivant l'AVC dans le cadre de l'étude ROSIE (Reperfusion of Stroke Safety Study Imaging Evaluation ; Martinez-Sanchez *et al.*, 2007).

- **Thrombolyse intra-artérielle (i.a.)**

Cette nouvelle voie consiste à administrer le thrombolytique au plus près du caillot, à l'aide d'un cathéter. Cette technique permet une meilleure lyse du thrombus et une meilleure recanalisation (Furlan *et al.*, 1999).

- **Association des voies intraveineuse et intra-artérielle**

Cette association permet une administration rapide *via* la voie i.v., associée à une action efficace de proximité de la voie i.a. La méta-analyse de Rha et Saver (2007) a montré que les taux de recanalisation atteignaient 46% par voie i.v., 63% par voie i.a. et 67% par voies i.v./i.a. D'autres études sont actuellement en cours.

La thrombolyse i.a. présente l'avantage de pouvoir associer un dispositif mécanique de recanalisation.

V.1.2 Dispositifs mécaniques endovasculaires et sonothrombolyse

En parallèle de la recherche de nouveaux agents pharmacologiques, des approches visant la thrombectomie mécanique ont été développées et commercialisées (voir pour revue : Ansari *et al.*, 2011). Elles utilisent différentes techniques :

- le retrait du thrombus (ex : MERCI® pour Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischemia),
- la thromboaspiration (ex : Penumbra®),
- le piégeage du caillot (ex : Solitaire®),
- un dispositif de potentialisation de la fibrinolyse comprenant un cathéter permettant l'administration du thrombolytique pharmacologique à proximité du caillot et l'envoi d'ultrasons, afin de fragiliser le caillot (ex : EKOS®)

A l'heure actuelle, seuls les dispositifs MERCI® et Penumbra® sont validés par la FDA (Food and Drug Administration) pour leur utilisation aux Etats-Unis. En France, la Haute Autorité de Santé (HAS) a conseillé l'utilisation de ces dispositifs mécaniques chez les patients inéligibles au traitement par le rt-PA (Rapport 2009 sur la prise en charge des AVC, www.has-sante.fr).

Les principaux avantages de la thrombectomie mécanique sont (1) une revascularisation rapide et élevée, supérieure à 80% (Alshekhlee *et al.*, 2012) et (2) une fenêtre thérapeutique élargie puisqu'elle peut atteindre 8 heures post-ischémie (Smith *et al.*, 2005 ; Smith, 2006).

Cependant, elle n'est pas sans inconvénient, puisque le passage plus ou moins aisé du cathéter peut entraîner une dissection du vaisseau, un spasme vasculaire ou bien encore la fragmentation d'une plaque d'athérome préexistante. De plus, le caillot, une fois fragmenté, peut induire des ischémies en aval du 1^{er} site d'occlusion (Kondziella *et al.*, 2013). Ces techniques ne sont donc pas dépourvues de

risques d'hémorragie et de réocclusion précoce. Par ailleurs, elles ne peuvent être utilisées que pour l'occlusion de grosses artères (Gravanis et Tsirka, 2008) et nécessitent une très bonne maîtrise des manipulateurs.

Enfin, en 2013, trois études cliniques ont montré que ces techniques mécaniques n'étaient pas supérieures au traitement standard par le rt-PA en i.v. (Broderick *et al.*, 2013 ; Ciccone *et al.*, 2013 ; Kidwell *et al.*, 2013).

La sonothrombolyse peut également être associée à un traitement par le rt-PA. Cette technique consiste à appliquer des ultrasons à travers le crâne pour favoriser la pénétration du produit dans le caillot et ainsi augmenter son efficacité (Porter et Xie, 2012). Toutefois, à ce jour, cette technique reste associée à une augmentation des TH et nécessite des études d'évaluation bénéfice/risque (Molina *et al.*, 2009).

V.2 Approche cellulaire

En parallèle de l'approche vasculaire, une 2^{nde} stratégie de recherche est orientée sur la neuroprotection, et plus récemment, la vasculoprotection. L'objectif de cette approche est de préserver les cellules cérébrales en souffrance, en ciblant différentes étapes de la cascade physiopathologique post-ischémique.

Jusqu'à aujourd'hui, cet objectif s'est toujours soldé par un échec, puisque sur le millier de molécules s'étant révélées protectrices dans les études précliniques, telles que des antagonistes calciques, des antagonistes glutamatergiques, des inhibiteurs de l'adhésion leucocytaire ou des stratégies anti-inflammatoires, aucune n'a été validée en phase clinique (O'Collins *et al.*, 2006 ; voir pour revue Ginsberg, 2008).

Pour expliquer ces échecs à répétition, plusieurs hypothèses ont été avancées, dont les suivantes (Sutherland *et al.*, 2012) :

- 1) Les différences anatomiques, physiologiques et pharmacodynamiques entre les différentes espèces sont trop peu prises en compte,
- 2) Les animaux utilisés en préclinique sont des populations très homogènes, souvent mâles, jeunes, sans comorbidité, alors que les populations touchées par les AVC sont très hétérogènes en clinique,
- 3) Les modèles expérimentaux d'occlusion sont très standardisés avec des lésions reproductibles, des étiologies et des mécanismes physiopathologiques uniformes, ce qui n'est pas le cas en clinique,

- 4) Les traitements et leurs protocoles d'administration ne sont pas équivalents.

Ces pistes de réflexion ont conduit à la publication des recommandations STAIR (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable) en 1999, qui sont régulièrement remises à jour. Elles préconisent, entre autres :

- 1) L'évaluation des effets d'un traitement dans différents modèles expérimentaux (ischémies permanente et transitoire),
- 2) L'évaluation de plusieurs doses de traitement,
- 3) L'évaluation des conséquences histologiques et fonctionnelles d'un traitement à long terme,
- 4) L'évaluation des traitements sur des animaux d'âge et de sexe différents,
- 5) La publication des résultats négatifs,
- 6) L'évaluation des traitements bénéfiques chez les rongeurs, puis chez les primates non humains,
- 7) L'évaluation des effets toxiques et dose-réponse des molécules,
- 8) L'évaluation de la pertinence de la voie d'administration et de la fenêtre thérapeutique.

Une autre explication possible des échecs successifs est que la recherche s'est longtemps concentrée sur la protection des neurones uniquement, occultant les autres cellules cérébrales qui sont pourtant elles aussi touchées par l'ischémie. Ainsi, les nouvelles stratégies de recherche se réorientent vers la protection de l'unité neuroglivasculaire.

Ces dernières années, une nouvelle stratégie a consisté à rechercher des traitements pouvant être administrés en association avec le rt-PA. L'objectif de cette stratégie est double :

- 1) obtenir une action synergique ou au moins complémentaire entre les 2 (ou plus) agents pour une meilleure reperfusion. Cela permettrait de diminuer les doses de rt-PA administrées, et par conséquent, les effets indésirables associés, comme les TH.
- 2) l'administration précoce de cet agent pourrait prévenir les lésions dans la zone de pénombre et ainsi, permettre l'extension de la fenêtre thérapeutique du rt-PA. Evidemment, cela suppose que l'agent associé au rt-PA puisse être administré sans risque à tous les patients, avant l'imagerie, par exemple dans l'ambulance.

Voici quelques exemples de pistes de recherche récentes pour le traitement aigu des AVC (voir pour revue Ishrat *et al.*, 2012).

Le développement de piègeurs de radicaux libres a été lancé dans le but de s'opposer au phénomène de stress oxydant post-ischémique. Cette stratégie s'est révélée bénéfique dans des modèles expérimentaux d'ischémie où elle protégeait la BHE et diminuait les TH induites par le rt-PA (Lapchak *et al.*, 2001 ; Yagi *et al.*, 2009 ; Yamashita *et al.*, 2009), ce qui a conduit à des études cliniques.

Le **NX-059** a ainsi été testé dans un 1^{er} essai de phase III, l'étude SAINT-I (Stroke-Acute Ischemic NXY Treatment) où il était associé au rt-PA. Cependant, les résultats encourageants n'ont pas été retrouvés lors de l'étude SAINT-II, dans laquelle le NX-059 n'a montré aucun bénéfice chez les patients atteints d'un AVC par rapport au groupe placebo (Shuaib *et al.*, 2007).

De la même façon, l'étude de l'**edaravone**, qui s'était révélé bénéfique dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale (Lukic-Panin *et al.*, 2010; Lapchak et Zivin, 2009) a aussi été stoppée en phase clinique, en raison de l'absence d'amélioration des patients (Lapchak, 2010).

Actuellement, l'association du rt-PA avec l'**acide urique**, un anti-oxydant, est en essai clinique de phases II et III. Expérimentalement, l'association avait notamment montré une amélioration fonctionnelle (Romanos *et al.*, 2007).

En 2001, l'**enlimomab**, un **anticorps dirigé contre ICAM-1**, afin d'inhiber l'infiltration leucocytaire, a été testé dans l'essai clinique EAST (Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators). Cependant, l'essai a été abandonné en phase III du fait d'une surmortalité du groupe traité.

Les **statines**, qui sont des inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase), en association avec le rt-PA, se sont révélées bénéfiques dans des modèles expérimentaux, notamment l'**atorvastatine** et la **rosuvastatine** (Kilic *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2009). Même si leur utilisation fait encore débat, il semblerait que les statines, administrées précocement à fortes doses dans le traitement aigu des AVCi, soient bénéfiques et ne présentent pas de risque pour les patients.

Le **rosiglitazone**, un **antidiabétique** antagoniste des récepteurs PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) s'est révélé bénéfique dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat, notamment en diminuant les MMP et l'inflammation, ainsi que l'œdème cérébral et en entraînant une amélioration fonctionnelle (Wang *et al.*, 2009a). D'une manière générale, il est assez clairement établi que l'hyperglycémie doit être contrôlée dans la prise en charge aiguë d'un patient victime d'un AVC.

La **minocycline**, une tétracycline pléiotrope possédant des effets anti-inflammatoires, et inhibiteurs de PARP (voir Chapitre 3) et de MMP, s'est révélée bénéfique en préclinique. En clinique, les résultats

semblent encourageants, notamment dans l'étude de phase II MINOS (Minocycline to Improve Neurologic Outcome Study) où la minocycline (10 mg/kg par voie i.v.) améliore le déficit neurologique 3 mois après l'AVC. De plus, son association avec le rt-PA n'aggrave pas les TH chez ces patients (Fagan *et al.*, 2010). Bien que prometteurs, ces résultats n'ont pas été confirmés puisque dans une étude récente incluant 95 patients victimes d'AVC, la minocycline s'est révélée sans risque mais n'a pas montré d'effet protecteur (Kohler *et al.*, 2013). De plus larges études devraient être menées.

D'autres pistes sont actuellement explorées et pourraient être testées en clinique, comme la voie du protéasome, qui est impliquée dans la dégradation intracellulaire des protéines et qui régule également certains médiateurs inflammatoires. L'association du rt-PA au **Bortezomib, un inhibiteur du protéasome**, s'est révélée bénéfique dans un modèle d'ischémie chez le rat (Zhang *et al.*, 2006 et 2010).

D'autres axes orientés vers la potentialisation pure du rt-PA, comme avec la **neuroserpine, un inhibiteur endogène du t-PA**, a montré *in vitro* une diminution des effets délétères du rt-PA comme la dégradation de la BHE par les MMP (Rodríguez-González *et al.*, 2011). Evidemment, cela nécessite des études *in vivo* avant de peut-être pouvoir tester ce composé en clinique.

Au-delà de la prévention secondaire, l'utilisation d'**agents antiplaquettaires** dans le traitement aigu des AVCi est une stratégie très étudiée. Les caractéristiques des principales molécules testées seront développées dans le Chapitre suivant, paragraphe V.1.

DEUXIEME CHAPITRE : ACTIVATION ET AGREGATION PLAQUETTAIRES

L'hémostase primaire est un phénomène physiologique essentiel au maintien de l'intégrité d'un vaisseau, et ceci, grâce à la formation d'un clou plaquettaire, qui permet l'arrêt rapide du saignement au niveau d'une brèche vasculaire. Ce processus regroupe l'ensemble des interactions entre la paroi vasculaire, les plaquettes sanguines et les facteurs de la coagulation.

La thrombose est un processus pathologique, qui est la conséquence d'une altération de la régulation de l'hémostase. Dans les pathologies thrombotiques telles que l'AVC, les dysfonctionnements peuvent affecter 3 facteurs, dont l'association forme la « triade de Virchow » (Figure 7) :

- 1) le vaisseau et ses propriétés pro- ou anti-thrombotiques,
- 2) le flux sanguin et les conséquences des différentes forces de cisaillement appliquées au vaisseau,
- 3) le sang et les interactions entre les différentes cellules sanguines permettant l'hémostase.

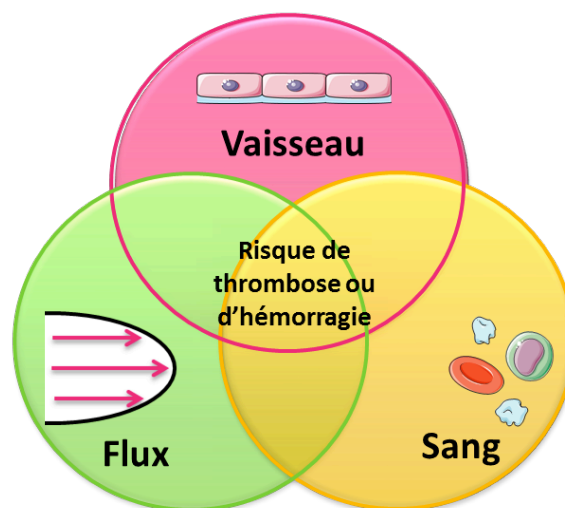


Figure 7. Schéma de la triade de Virchow
Modifié d'après Wolberg *et al.*, 2012

I. PLAQUETTES SANGUINES

La plupart des données sont issues des 2 revues suivantes : Broos et al., 2011 ; Wang et al., 2012.

I.1 Généralités

Les plaquettes sanguines humaines sont de petites cellules anucléées, mesurant entre 2 et 4 μm de diamètre. Elles ont été décrites pour la 1^{ère} fois par Osler au début des années 1870: il a ainsi observé des cellules de forme discoïde qui circulaient individuellement dans le sang, mais qui s'agrégeaient en dehors des vaisseaux. Une dizaine d'années plus tard, Bizzozero (1882) a montré que ces cellules étaient capables d'adhérer sur un endothélium lésé de vaisseaux mésentériques chez le cobaye, soulignant ainsi le rôle des plaquettes dans l'hémostase et la thrombose. La même équipe a également décrit les mégacaryocytes, mais ce n'est qu'en 1906 que Wright les identifie comme les précurseurs des plaquettes. Aujourd'hui, le mécanisme exact de la production des plaquettes n'est pas clairement déterminé, mais il est établi que les plaquettes sont issues de la fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes contenus dans la moelle osseuse.

Environ 2/3 des plaquettes circulent dans le sang à l'état inactivé, sous forme discoïde, à raison de 150 à 400 $\times 10^6$ par millilitre chez une personne saine. Le 1/3 restant est séquestré de manière réversible dans la rate. Leur durée de vie est de 8 à 10 jours.

Chez la souris, les plaquettes sont beaucoup plus nombreuses (entre 1 000 à 1 500 $\times 10^6/\text{ml}$), mais plus petites (en moyenne 1,5 μm de diamètre ; Tsakiris, 1999 et Thon et Italiano, 2010). Le volume moyen des plaquettes murines est 2 fois inférieur à celui des plaquettes humaines (respectivement 4-5 fl et 7,5-10 fl). Leur durée de vie est également 2 fois moins longue, puisqu'elle est estimée à 4-5 jours.

Il existe également d'autres différences entre les deux espèces, notamment en termes de récepteurs plaquettaires, qui seront discutées par la suite.

I.2 Les constituants plaquettaires

Comme toutes les cellules, les plaquettes sont délimitées par une **membrane plasmique**, dont les phospholipides chargés négativement sont situés dans le feuillet interne. Cependant, cette répartition est dynamique, notamment pour la phosphatidylsérine qui, lors de l'activation plaquettaire, est transloquée du feuillet interne vers le feuillet externe, conférant aux plaquettes une activité procoagulante.

Un **système canaliculaire** formé par des invaginations de la membrane plasmique au travers du cytoplasme permet ainsi à la plaquette de disposer d'une importante surface membranaire en contact avec le milieu extérieur (Figure 8). Ce système est impliqué dans les phénomènes d'endocytose d'éléments plasmatiques et d'exocytose du contenu des granules plaquettaire.

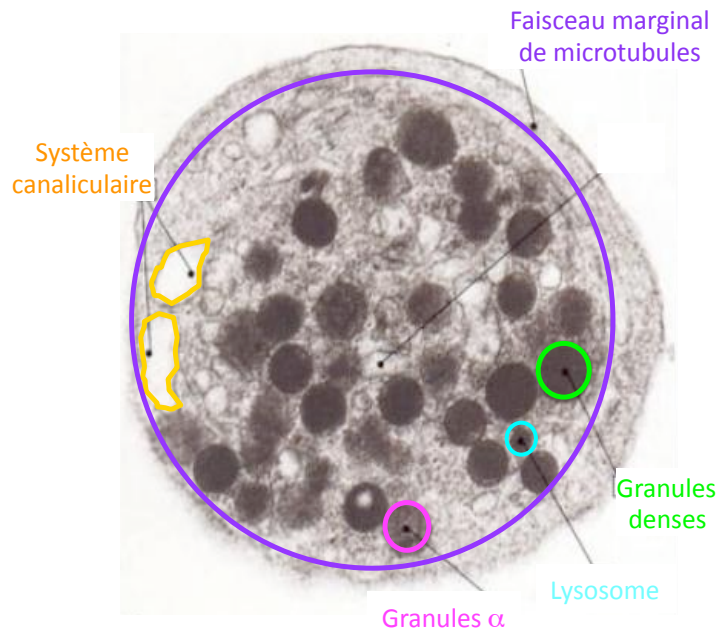


Figure 8. Ultrastructure d'une plaquette en microscopie électronique
D'après Stevens et Lowe, 1997

Le **cytosquelette** est constitué de microfilaments d'actine et d'un anneau périphérique de microtubules qui maintiennent les plaquettes au repos sous forme discoïde (Figure 8). Lors de leur activation, les réarrangements de ces réseaux permettent les phénomènes de l'activation plaquettaire : la concentration des organites, l'émission de prolongements cytoplasmiques (pseudopodes) et la dégranulation. La plaquette prend alors une forme sphérique avec projection de pseudopodes (Figure 9). Le changement de forme des plaquettes augmente considérablement sa surface externe, ce qui facilite les contacts avec les cellules environnantes et les molécules de la matrice extracellulaire.



Figure 9. Changement de forme des plaquettes lors de leur activation

Le **système tubulaire dense**, dérivé du réticulum endoplasmique des mégacaryocytes, est un système de membranes non connecté à la surface, qui permet le stockage du Ca^{2+} intracellulaire. Il est également impliqué dans la synthèse des prostaglandines.

Les plaquettes contiennent peu de mitochondries, de nombreux grains de glycogène, et des **granules de sécrétion**, qui sont de 3 types : les granules α , les granules denses et les lysosomes (Figure 8). Lors des phénomènes d'amplification de l'activation plaquettaire, les granules fusionnent avec la membrane plaquettaire externe et déversent leur contenu en molécules bioactives dans le milieu extérieur (Tableau I).

Les granules α sont des granules très abondantes, puisqu'on en dénombre entre 20 et 200 par plaquette chez l'Homme. Chez la souris, elles sont identiques en termes de morphologie et de contenu, mais elles sont moins nombreuses (environ 12-120/plaquette). C'est le principal réservoir intracellulaire des protéines libérées lors de l'activation plaquettaire. Le contenu est très hétérogène entre chaque granule (environ 280 protéines différentes), et comprend notamment des protéines spécifiques des plaquettes (platelet factor 4 ou PF4), des glycoprotéines d'adhésion (fibrinogène ; facteur von Willebrand vWF ; fibronectine), des facteurs de coagulation (facteurs V, XI, XIII), des facteurs de croissance (platelet derived growth factor ou PDGF ; vascular endothelial growth factor ou VEGF), des inhibiteurs de la fibrinolyse, la P-sélectine et la glycoprotéine membranaire GPIIb/IIIa. Ces différentes protéines sont libérées dans la circulation sanguine mais participent également à la modification de la composition de la membrane plaquettaire avec, par exemple, l'expression de la P-sélectine ou de la GPIIb/IIIa à sa surface, permettant l'interaction avec d'autres cellules. Cependant, la libération de ces substances est modulée en fonction de l'environnement et du stimulus (voir pour revue Italiano et Battinelli, 2009). Ainsi, les plaquettes contribuent à des phénomènes aussi variés que l'hémostase primaire, la coagulation, l'inflammation ou l'angiogenèse.

Les granules denses sont de plus petite taille que les granules α et moins nombreuses (2-10/plaquette humaine ; 1-5/plaquette murine). Elles contiennent surtout de l'ADP, de l'ATP, de la sérotonine, du Ca^{2+} , du Mg^{2+} , du pyrophosphate, l'interleukine IL-1 β ou le PF4.

Tableau I. Molécules contenues dans les granules plaquettaires α et densesD'après Smyth *et al.*, 2009

α -Granules	Dense bodies
Platelet-specific proteins	ADP
Platelet factor 4	ATP
β -Thromboglobulin family*	Calcium
Multimerin	Serotonin
Adhesive glycoproteins	Pyrophosphate
Fibrinogen	GDP
von Willebrand factor	Magnesium
von Willebrand factor propeptide	Other secreted or released proteins
Fibronectin	Protease nexin I
Thrombospondin-1	Gas6
Vitronectin	Amyloid β -protein precursor (protease nexin II)
Coagulation factors	Tissue factor pathway inhibitor
Factor V	Factor XIII
Protein S	α_1 -Protease inhibitor
Factor XI	Complement I inhibitor
Mitogenic factors	High molecular weight kininogen
Platelet-derived growth factor	α_2 -Macroglobulin
Transforming growth factor- β	Vascular permeability factor
Endothelial cell growth factor	Interleukin-1 β
Epidermal growth factor	Histidine-rich glycoprotein
Insulin-like growth factor I	Chemokines
Angiogenic factors	MIP-1 α (CCL3)
Vascular endothelial growth factor	RANTES (CCL5)
Platelet factor 4 (inhibitor)	MCP-3 (CCL7)
Fibrinolytic inhibitors	Gro- α (CXCL1)
α_2 -Plasmin inhibitor	Platelet factor 4 (CXCL4)
Plasminogen activator inhibitor-1	ENA-78 (CXCL5)
Albumin	NAP-2 (CXCL7)
Immunoglobulins	Interleukin-8 (CXCL8)
Granule membrane-specific proteins	TARC (CCL17)
P-selectin (CD62P)	
CD63 (LAMP-3)	
GMP 33	

Adapted from Parise *et al.* [3], with permission. *Platelet basic protein, low-affinity platelet factor 4, β -thromboglobulin, and β -thromboglobulin-F. CCL, C-C motif ligand; CXCL, C-X-C motif ligand; ENA, epithelial cell-derived neutrophil-activating (peptide); GMP, granule membrane protein; Gro, growth-related oncogene; LAMP, lysosome-associated membrane protein; MCP, monocyte chemoattractant protein; MIP, macrophage inflammatory protein; NAP, neutrophil-activating peptide; RANTES, regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted; TARC, thymus and activation-regulated chemokine.

Les lysosomes contiennent des hydrolases acides, des protéases, des sérines peptidases ou bien encore des phosphatases et jouent un rôle important dans la lyse des thrombi.

De nombreux **récepteurs** sont ancrés dans la membrane plasmique et participent à l'adhésion et/ou à l'activation des plaquettes après fixation de leurs ligands (Figure 10). Le rôle de ces différents récepteurs sera détaillé dans la suite de ce chapitre (paragraphe II).

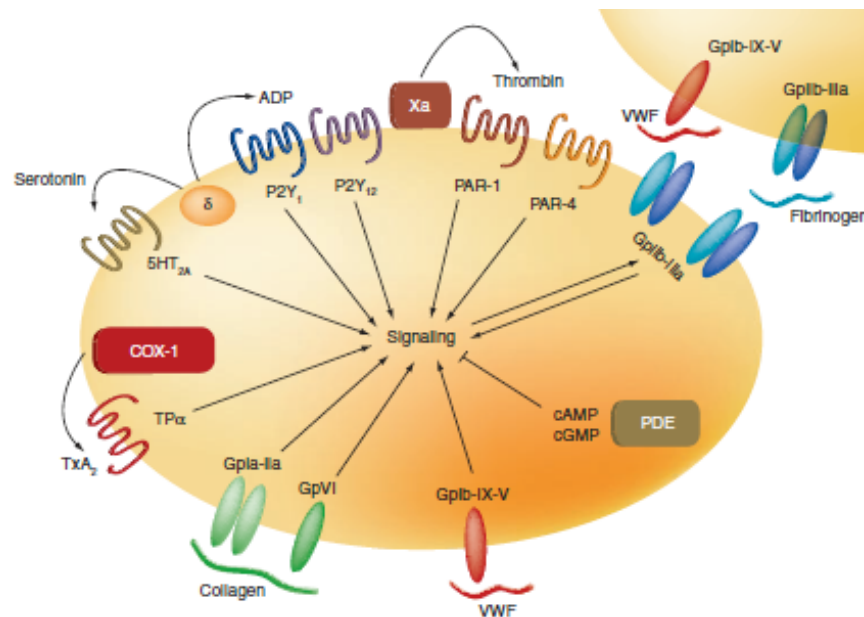


Figure 10. Schéma des récepteurs plaquettaire

D'après Choi et Kermode, 2011

δ : granules denses ; PAR : récepteur de la thrombine ; TP : récepteur du TxA₂ ; TxA₂ : thromboxane A₂ ; vWF : facteur von Willebrand

Dans ce chapitre, nous ne traiterons que des mécanismes hémostatiques et thrombotiques mettant en jeu les plaquettes sanguines qui constituent le sujet de ce travail.

II. PLAQUETTES SANGUINES ET LESIONS VASCULAIRES : ROLE DE L'HEMOSTASE

II.1 Interaction des plaquettes avec la paroi vasculaire

En conditions normales, la couche de cellules endothéliales constitue une surface anti-thrombotique en séparant physiquement le sang circulant de la matrice sous-endothéliale thrombogène, constituée de macromolécules adhésives, telles que les collagènes, le vWF, la laminine ou la fibronectine. Les cellules endothéliales assurent la thromborésistance en libérant notamment du NO, de la prostacycline (PGI₂) et des ectoADPases qui dégradent l'ADP et inhibent l'activation plaquettaire (Figure 11). Ainsi, les plaquettes circulent dans les vaisseaux sans adhérer ni à la paroi vasculaire, ni entre elles.

Cependant, lors d'une lésion vasculaire, ce sous-endothélium thrombogène est mis à nu et permet l'adhésion des plaquettes, ce qui va réduire l'hémorragie et favoriser la réparation tissulaire.

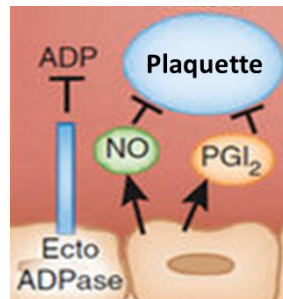


Figure 11. Endothélium sain thromborésistant

D'après Jackson, 2011

NO : monoxyde d'azote ; PGI₂ : prostacycline

Dans les petites artères et les micro-vaisseaux, mais aussi dans les vaisseaux athérosclérotiques ou sténosés, où le flux sanguin est élevé ($> 1000 \text{ s}^{-1}$), les globules rouges repoussent les plaquettes à la périphérie du vaisseau, ce qui favorise l'établissement de liaisons avec les molécules de la paroi.

Ces liaisons s'établissent en 3 étapes majeures :

- L'étape d'initiation *via* la liaison entre GPIb α et le vWF
- L'étape de stabilisation *via* la liaison du collagène à ses récepteurs plaquettaires GPIIb/IIIa et GPVI
- L'étape d'adhésion ferme *via* GPIIb/IIIa

Ces étapes s'accompagnent des phénomènes d'amplification du signal.

II.1.1 Liaison entre GPIb α et le vWF

L'interaction des plaquettes avec la paroi vasculaire débute par la liaison du récepteur situé sur les plaquettes, la glycoprotéine GPIb α , et le vWF contenu dans la matrice extra-cellulaire ou exposé lié au collagène. Cela permet de ralentir et de recruter les plaquettes circulantes et constitue donc une étape d'initiation avant l'établissement de liaisons plus fermes.

Le **vWF** est une glycoprotéine multimérique formée de l'assemblage de dimères. Il est synthétisé par les mégacaryocytes et les cellules endothéliales, et stocké dans les granules α des plaquettes et les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, d'où il peut être libéré dans la circulation sanguine. Il est également présent dans le sous-endothélium.

Sous l'action des forces de cisaillement, le vWF se déploie pour s'activer et démasque ainsi son domaine A1 indispensable à son interaction avec GPIb α . Le vWF est d'autant plus actif qu'il est formé par des multimères de haut poids moléculaire. Il peut également se lier au collagène.

Il a été montré que la fixation du vWF à GPIb α entraîne une cascade de signalisation via la voie des Src kinases et de la PLC gamma (PLC γ), provoquant la formation d'inositol triphosphate (IP₃) et de

diacylglycérol (DAG), et par la suite, la libération de Ca^{2+} et la réorganisation du cytosquelette d'actine (Mangin *et al.*, 2003). Cette cascade va aussi contribuer à l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ qui permet l'adhésion stable au vWF (Kasirer-Friede *et al.*, 2004).

GPIb α est une glycoprotéine transmembranaire dont 25 000 copies sont présentes sur chaque plaquette. GPIb α fait partie du complexe GPIb/IX/V, constitué de 2 sous-unités GPIb α (130 kDa), 2 sous-unités GPIb β (25 kDa), 2 sous-unités GPIX (22 kDa) et 1 sous-unité GPV (88 kDa ; Figure 12). Son extrémité extracellulaire N-terminale (Nter) porte les sites de liaison pour le domaine A1 du vWF, son principal ligand, pour initier l'adhésion plaquettaire dans des conditions de flux élevés.

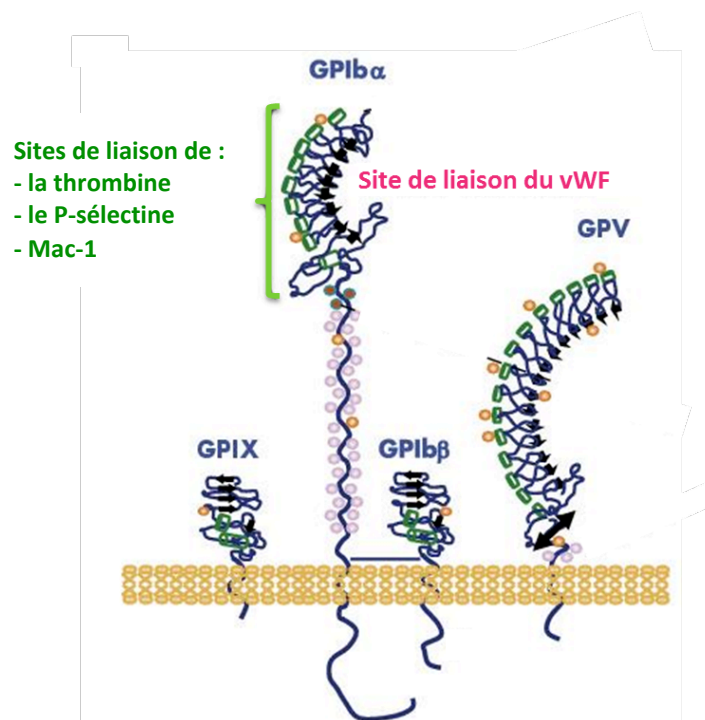


Figure 12. Complexe GPIb/IX/V

Modifié d'après Lanza *et al.*, 2008

Mac-1 : Macrophage antigen-1 ; vWF : Facteur von Willebrand

GPIb α est également impliquée dans l'adhésion des plaquettes sur l'endothélium par son site de liaison pour la P-sélectine endothéliale (Berndt *et al.*, 2001) et dans l'adhésion des plaquettes aux leucocytes *via* Mac-1 (Macrophage antigen-1 ; Figure 13). Cette interaction sera détaillée dans le paragraphe III de ce chapitre.

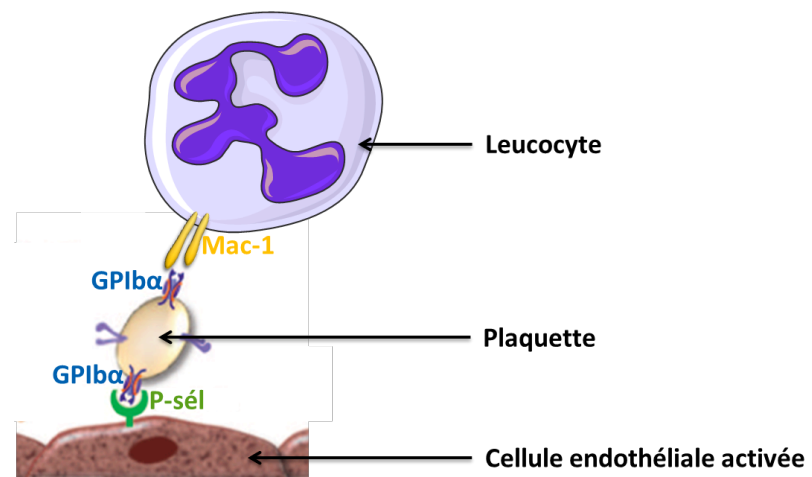


Figure 13. Implication de GPIbα dans l'adhésion cellulaire

Modifié d'après Kaplan et Jackson, 2011

Mac-1 : Macrophage antigen-1 ; P-sél : P-sélectine

Les patients atteints du syndrome Bernard-Soulier, une maladie héréditaire rare caractérisée par un déficit en GPIbα ou de la maladie de Willebrand, marquée par un déficit en vWF, présentent des saignements plus ou moins sévères.

De nombreuses études ont montré une diminution de la thrombose chez les souris où l'interaction GPIbα-vWF était altérée, associée ou non à une diminution du temps de saignement (Chauhan *et al.*, 2006 ; Denis *et al.*, 1998 ; Cauwenberghs *et al.*, 2000).

II.1.2 Liaison stable du collagène à ses récepteurs

La liaison GPIbα-vWF ayant permis d'amener les plaquettes à proximité du site de la lésion et au sous-endothélium exposé, des liaisons stables entre le collagène et ses récepteurs peuvent alors être engagées.

Le collagène est une macromolécule adhésive très thrombogène et un agoniste plaquettaire puissant. Neuf isoformes ont été identifiées dans la paroi vasculaire, dont les collagènes fibrillaires de type I et III, qui sont les constituants majeurs de la matrice extracellulaire des vaisseaux sanguins, et le collagène IV, qui est la forme principale dans la membrane basale sous-endothéliale.

Les plaquettes possèdent deux récepteurs au collagène : l'intégrine α2β1 appelée aussi GPIIb/IIIa, et la glycoprotéine GPVI, qui a été caractérisée plus récemment.

- **Récepteur GPIIb/IIIa**

Ce récepteur est constitué d'une sous-unité α_2 (160 kDa) et d'une sous-unité β_1 (110 kDa), possédant chacune un important domaine extracellulaire et de courts domaines transmembranaire et intracytoplasmique. GPIIb/IIIa est exprimée à la surface des plaquettes, à raison de 2 000 à 4 000 copies, mais aussi dans les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les lymphocytes. Comme les autres récepteurs de type intégrine, la liaison avec son ligand se fait par un passage de la conformation de faible affinité à une conformation activée de forte affinité.

Son rôle exact dans la signalisation est encore discuté en raison de résultats discordants.

- **Récepteur GPVI**

GPVI est une glycoprotéine transmembranaire d'environ 60 kDa de la superfamille des immunoglobulines (Ig), exprimée spécifiquement dans les cellules de la lignée mégacaryocytaire à environ 4 000 copies/plaquette. Elle possède 2 domaines extracellulaires de type Ig, qui portent le site d'adhésion au collagène, et une courte queue intracytoplasmique (Figure 14).

GPVI dimérisée est associée à la chaîne γ des récepteurs Fc, FcR γ , qui porte un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif).

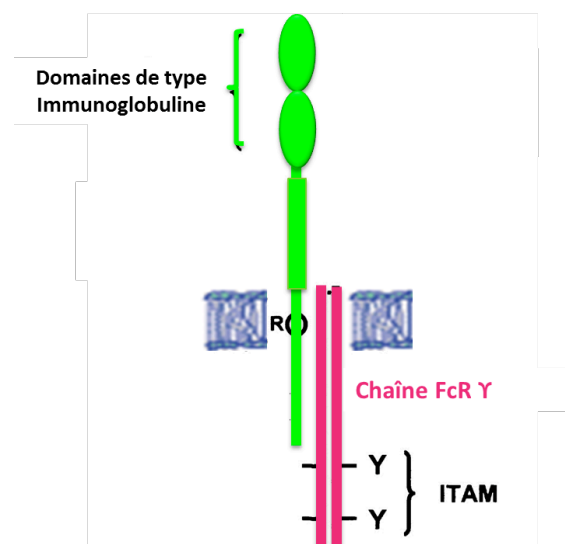


Figure 14. Complexe GPVI-FcR γ

Modifié d'après Nieswandt et Watson, 2003

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

La phosphorylation de ce motif ITAM entraîne une cascade qui conduit à l'activation de la PLC γ 2, d'une protéine kinase C (PKC) et à la mobilisation interne des stocks de Ca^{2+} , qui participent à la sécrétion et à l'agrégation des plaquettes.

L'étude de plaquettes déficientes en GPVI ou en FcR γ a montré l'implication de ce récepteur dans l'agrégation et l'étalement des plaquettes, la sécrétion et l'activation de GPIIb/IIIa (Nieswandt *et al.*, 2001). Cependant, le changement de forme et la sécrétion des plaquettes induits par le collagène semblent très dépendants des voies d'amplification par l'ADP ou le thromboxane A2 (TxA2 ; Jarvis *et al.* 2002 ; Nieswandt *et al.*, 2002 ; Cho *et al.*, 2003).

II.1.3 GPIIb/IIIa

GPIIb/IIIa (ou α Ib β 3 ou CD41/CD61) est le récepteur plaquettaire le plus abondant, puisque chaque plaquette en possède entre 40 000 et 80 000 copies, avec un pool mobilisable dans les granules α . Les sous-unités GPIIb et GPIIIa ont de longs domaines extracellulaires, ainsi que de courts domaines transmembranaires et cytoplasmiques (Figure 15). Ces domaines sont très conservés entre l'Homme et la souris.

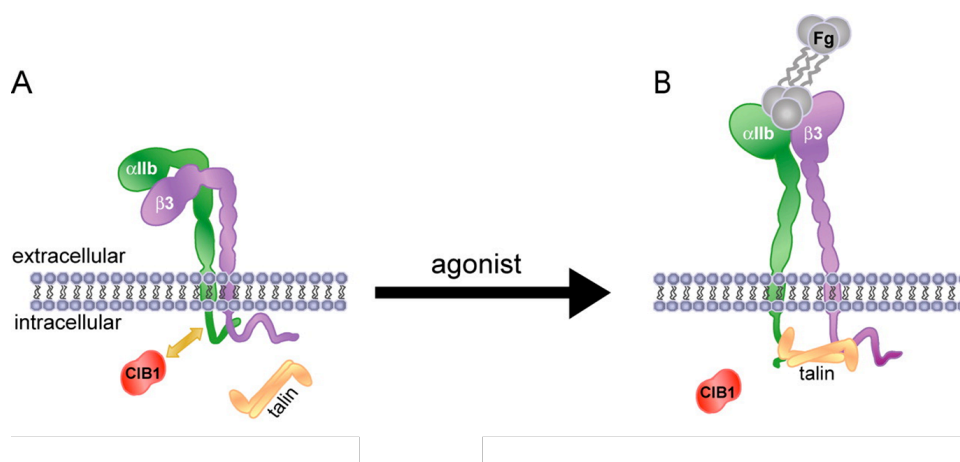


Figure 15. Structure et activation de GPIIb/IIIa
D'après Yuan *et al.*, 2006

Présente à l'état constitutif sur les plaquettes au repos dans une conformation inactivée, GPIIb/IIIa n'a alors pas d'affinité pour ses ligands, le vWF et le fibrinogène.

Son activation, induite par un agoniste soluble comme l'ADP, la thrombine ou le TxA2, ou par l'adhésion du collagène sur GPVI ou du vWF sur GPIb-IX-V, permet le déclenchement d'une cascade de signalisation appelée « inside-out ». Ce processus Ca^{2+} -dépendant entraîne un changement de conformation de l'intégrine, qui passe d'une forme repliée, où les chaînes α et β sont liées par un « pont salin », à une forme dépliée où la taline, une protéine du cytosquelette, sépare les 2 chaînes, permettant ainsi à l'intégrine de se lier à son ligand (Figure 15 ; Beglova *et al.*, 2002 ; Shattil et Newman, 2004).

GPIIb/IIIa lie principalement le fibrinogène. Le vWF et les autres protéines adhésives (fibrine, fibronectine et vitronectine) se fixent sur GPIIb/IIIa *via* un autre site de liaison.

La liaison du fibrinogène et du vWF sur l'intégrine entraîne un phénomène d'« outside-in ». Cette cascade conduit à l'étalement des plaquettes, une sécrétion des granules induisant l'activation des récepteurs GPIIb/IIIa qui se regroupent alors dans la membrane. En conséquence, des plaquettes supplémentaires sont recrutées permettant la stabilisation de l'agrégat plaquettaire, et finalement, la formation du thrombus.

Ainsi, l'intégrine GPIIb/IIIa joue un rôle clé dans la persistance de la signalisation et le renforcement des propriétés adhésives des plaquettes et l'agrégation plaquettaire.

Les patients présentant une absence ou un dysfonctionnement de GPIIb/IIIa sont atteints de la thrombasthénie de Glanzmann, une maladie hémorragique grave (Nurden, 2005).

II.2 Amplification de l'activité plaquettaire

Plusieurs voies de transduction conduisent à l'amplification de l'activation plaquettaire : celle des récepteurs associés aux Tyrosine Kinases, celle des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) comprenant la voie de la thrombine, de l'ADP et du TxA₂, et enfin celle de l'ATP *via* les canaux ioniques.

II.2.1 Transduction du signal par la voie des tyrosine-kinases

La liaison, entre autres, du vWF à GPIb et du collagène au complexe GPVI-FcRγ entraîne l'activation en cascade de tyrosines kinases qui activent la PLCγ2, qui va à son tour produire de l'IP3 et du DAG (Figure 16). L'IP3 va se fixer sur son récepteur au niveau du système tubulaire dense et provoquer ainsi un efflux de Ca²⁺ et l'augmentation de sa concentration intracytosolique. Une partie de ce Ca²⁺ va se lier à la phosphatidylsérine externalisée, rendant cette surface procoagulante, en particulier vis-à-vis des facteurs de coagulation vitamine K-dépendants, et accélérant ainsi la cascade de la coagulation.

Tous ces phénomènes concourent à l'activation de la PLA2, au changement de forme des plaquettes, à la sécrétion des granules et à l'agrégation des plaquettes.

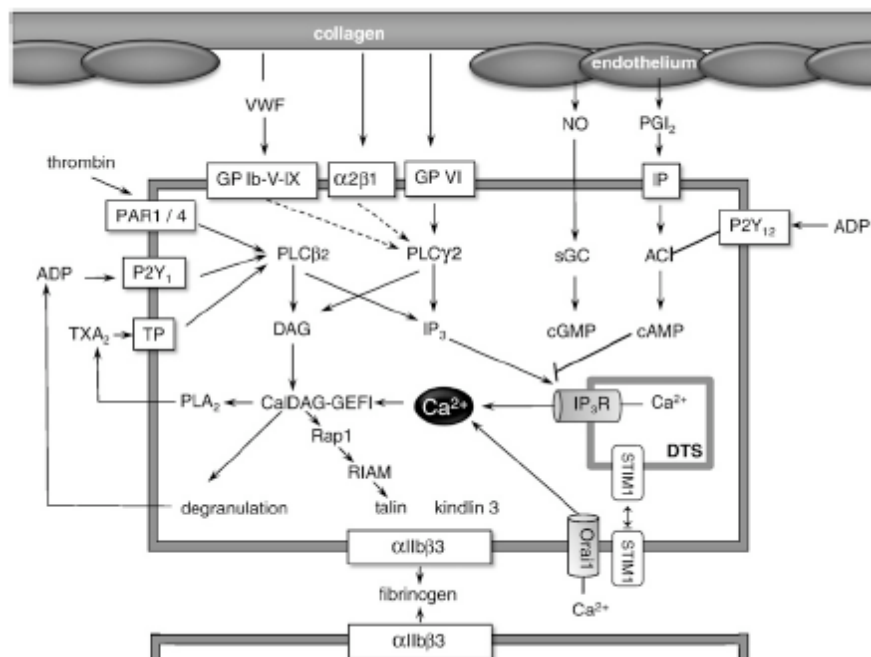


Figure 16. Voies de transduction impliquées dans l'amplification de l'activité plaquettaire

D'après Broos *et al.*, 2011

AC : adénylate cyclase ; DAG : diacyl glycérol ; DTS : système tubulaire dense ; IP : récepteur de la PGI₂ ; IP₃ : inositol triphosphate ; NO : oxyde nitrique ; PAR : récepteurs de la thrombine ; PGI₂ : prostacycline ; PLA₂ : phospholipase A₂ ; PLCβ : phospholipase Cβ ; TP : récepteur du TxA₂ ; TxA₂ : thromboxane A₂ ; VWF : facteur von Willebrand

II.2.2 Transduction du signal par la voie de la thrombine

La thrombine est produite à partir de la prothrombine à la surface des plaquettes activées *via* la cascade de coagulation. C'est l'activateur le plus puissant des plaquettes. Elle possède un site de fixation sur GPIIb, mais la voie de signalisation n'est pas très clairement établie. La réponse à la thrombine est principalement induite *via* ses récepteurs PAR (proteinase-activated receptors), qui sont des RCPG. Elle agit de manière très particulière, puisqu'elle active ses récepteurs cibles PAR en clivant leur extrémité Nter, laissant apparaître une nouvelle extrémité Nter avec une séquence consensus SFLLRN (Sérine – Phénylalanine – Leucine – Leucine – Arginine – Asparagine), qui va servir de ligand pour activer PAR (Figure 17).

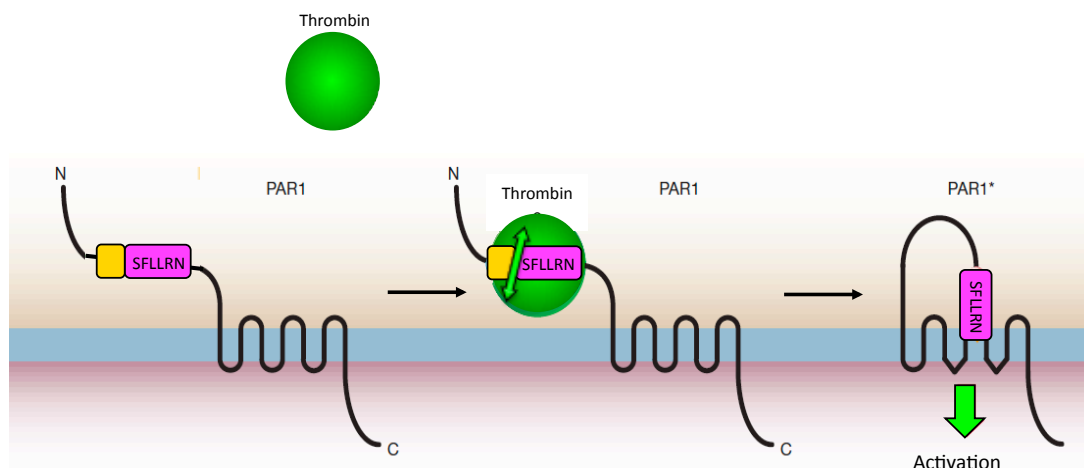


Figure 17. Mécanisme d'activation des récepteurs PAR

Modifié d'après Coughlin, 2000

PAR : Proteinase-Activated Receptor ; SFLLRN : Sérine–Phénylalanine–Leucine–Leucine–Arginine–Asparagine

Chez les mammifères, il existe 4 isoformes de récepteurs PAR, notés PAR1 à 4. Chez l'Homme, les plaquettes expriment les récepteurs PAR1 et PAR4 ; PAR1 possède une forte affinité pour la thrombine et est donc activé à de faibles concentrations alors que la mise en jeu de PAR4 nécessite des concentrations plus importantes (Coughlin, 2000). Les souris n'expriment pas PAR1, mais principalement PAR4 et PAR3. Ce dernier semble davantage agir comme un cofacteur pour permettre l'activation de PAR4 (voir pour revue Lee et Hamilton, 2012).

Des études ont montré que des souris PAR4^{-/-} ne répondent pas à la thrombine et sont ainsi protégées de la thrombose dans un modèle de thrombose induite par le FeCl₃ réalisé sur des artérioles mésentériques (Sambrano *et al.*, 2001 ; Hamilton *et al.*, 2004). De plus, dans un modèle de lésion au laser d'artérioles du crémaster, ces souris présentent une diminution de la taille des thrombi et de l'expression de la P-sélectine plaquettaire par rapport aux souris sauvages (Vandendries *et al.*, 2007).

II.2.3 Transduction du signal par la voie de l'ADP et de l'ATP

L'ADP et l'ATP, présents en concentrations très importantes dans les granules denses, sont sécrétés après activation des plaquettes. Ils exercent leurs effets *via* les récepteurs purinergiques P2 : P2X, qui sont des récepteurs canaux, et P2Y, qui sont des RCPG. Il existe 3 types de récepteurs P2 présents à la surface des plaquettes : P2X1, P2Y1 et P2Y12 (voir pour revue Gachet, 2006).

Le récepteur **P2Y1** est exprimé dans divers tissus, comme le cœur, les vaisseaux, les tissus nerveux, les testicules, les muscles lisses, la prostate et les ovaires. Lors de la fixation de l'ADP sur P2Y1, qui est couplé à une protéine G_{αq}, l'activation de la PLC β entraîne la libération de Ca²⁺ des stocks

intracellulaires, ce qui induit un changement de forme ainsi qu'une agrégation transitoire réversible des plaquettes. L'inhibition pharmacologique ou la délétion génique de P2Y1 chez les souris entraîne une diminution de la thrombose par rapport aux souris contrôles dans des modèles de lésion induite par le FeCl₃ ou laser (Lenain *et al.*, 2003 ; Hechler *et al.*, 2006).

La distribution du récepteur **P2Y12** est restreinte aux plaquettes, aux cellules gliales de certaines régions cérébrales et aux cellules musculaires lisses vasculaires. Ce récepteur est couplé à une protéine Gi. Son activation par l'ADP inhibe l'adénylate cyclase (AC) et entraîne une diminution des concentrations intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), conduisant à la déphosphorylation de la vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), qui lève l'inhibition de GPIIb/IIIa (Figure 18).

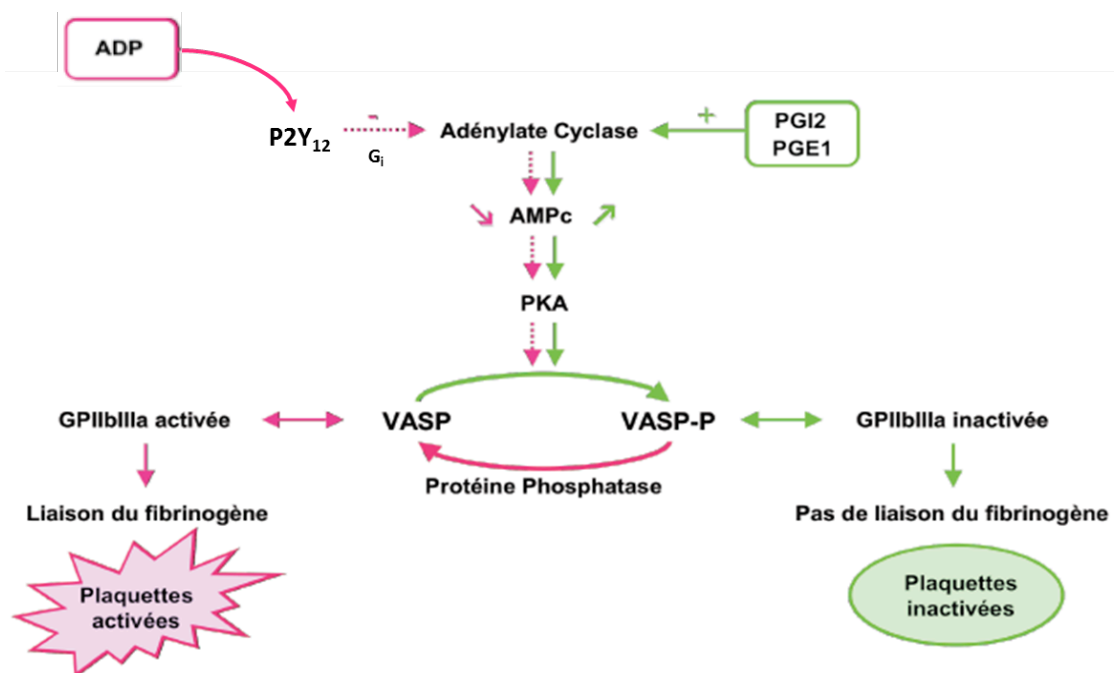


Figure 18. Cascade de (dé)phosphorylation de VASP

AMPc : AMP cyclique ; Gi : protéine Gi ; PGE1 : prostaglandine E1 ; PGI2 : prostacycline ; PKA : protéine kinase A ; VASP : vasodilator-stimulated phosphoprotein ; VASP-P : vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylée

L'activation de P2Y₁ initie une agrégation transitoire réversible, qui devient irréversible suite à l'activation de P2Y₁₂ (Figure 19).

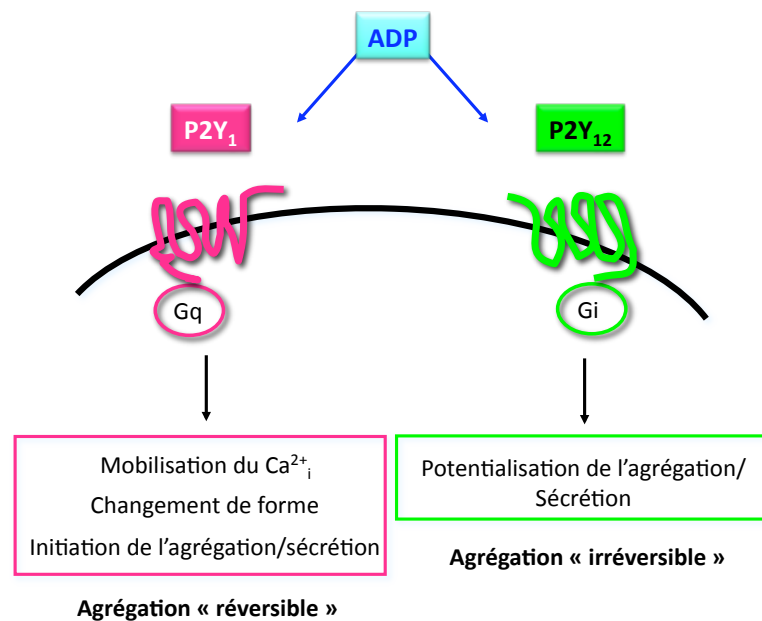


Figure 19. Conséquences de l'activation des récepteurs plaquettaire P2Y₁ et P2Y₁₂

Malgré plus de 80% d'homologie de la séquence en acides aminés des récepteurs P2Y₁₂ humains et murins (von Kügelgen, 2006), l'activation de P2Y₁₂ chez la souris ne produit pas d'agrégation irréversible. Cette différence entre les 2 espèces pourrait être liée à un nombre de copies réduit de P2Y₁₂ ou bien encore à des mécanismes de sécrétion des granules différents (Rosenblum *et al.*, 1983).

Le récepteur P2Y₁₂ est très intéressant en terme thérapeutique, puisqu'il est la cible des thiénoxydines, comme le clopidogrel, utilisées comme médicaments antiagrégants plaquettaire (voir paragraphe V.2 de ce chapitre).

Le récepteur **P2X₁** est présent au niveau du muscle lisse vasculaire, des plaquettes et du système nerveux. L'activation de ce récepteur canal par l'ATP entraîne un influx très rapide de Ca²⁺ du milieu extracellulaire vers l'intérieur des plaquettes, qui va induire un changement de forme et une sécrétion des granules.

P2X₁ est incapable d'induire l'agrégation plaquettaire seul ; il semble plutôt agir en synergie avec P2Y₁ (voir pour revue Gachet, 2006).

II.2.4 Transduction du signal par la voie du thromboxane A₂

L'augmentation des concentrations calciques intraplaquettaires active la PLA₂, qui transforme les phospholipides membranaires en acide arachidonique (AA). L'AA est un substrat de la COX-1 qui produit des endoperoxydes ensuite transformés par la thromboxane synthase en TxA₂. Ce dernier est un activateur plaquettaire très puissant qui va permettre l'amplification de la réponse en activant ses récepteurs TP, présents sur les plaquettes, mais aussi dans les poumons, la rate, le thymus et le placenta. Le récepteur TP est couplé à une protéine Gq et a pour principal effecteur la PLCβ₂, qui va générer de l'IP₃ et du DAG, et par conséquent, augmenter encore les concentrations cytosoliques de Ca²⁺, participant ainsi au changement de forme, à l'agrégation et à la sécrétion des plaquettes (Figure 16).

Depuis de nombreuses années, l'ASA, inhibiteur de la COX-1 (et de la COX-2), est utilisé comme antiagrégant plaquettaire dans la prévention des pathologies vasculaires coronaires et cérébrales, afin de diminuer la formation de TxA₂.

La sécrétion d'ADP et la synthèse de TxA₂ permettent d'assurer une agrégation plaquettaire efficace et une croissance du thrombus au niveau du site de lésion.

II.3 Stabilisation et dégradation du thrombus

II.3.1 Stabilisation du thrombus

La stabilisation et/ou la propagation du thrombus nécessite le maintien d'un état pro-agrégant *via* le déclenchement de la cascade de la coagulation. Cette cascade de réactions enzymatiques aboutit à la formation de fibrine. Elle est initiée par le facteur tissulaire (FT), qui est normalement absent de la circulation sanguine. Le FT est exprimé au niveau des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire et des fibroblastes et se retrouve donc exposé lors d'une lésion vasculaire. De plus, il peut également être synthétisé par les cellules endothéliales et les monocytes activés. La formation d'un complexe entre le FT et le facteur VII circulant conduit à l'activation du facteur X, et par suite, à la génération de thrombine ou facteur IIa (Figure 20). A partir de son substrat (le fibrinogène), la thrombine conduit à la formation de fibrine qui se structure en un réseau stabilisant le caillot plaquettaire. Par ailleurs, la thrombine a la capacité de catalyser sa propre génération et ainsi d'auto-amplifier son action, comme par exemple le maintien de GPIIb/IIIa sous sa forme activée.

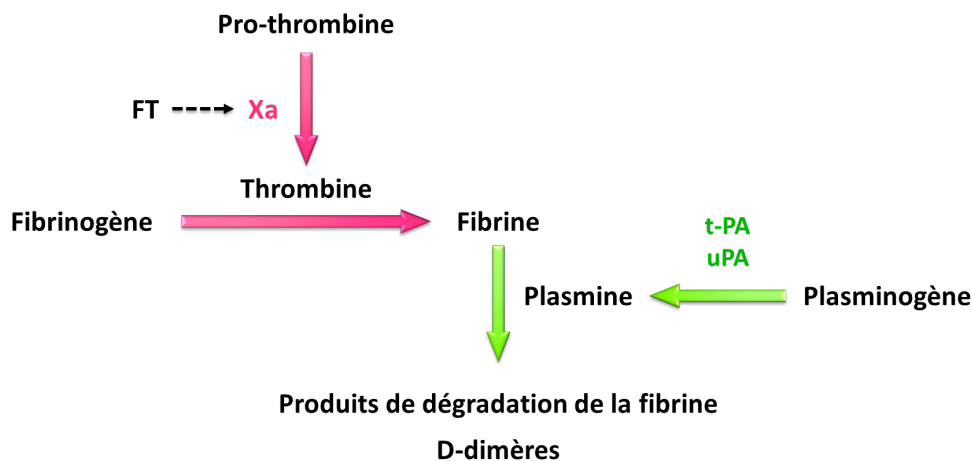


Figure 20. Cascade de stabilisation et de dégradation du thrombus

FT : facteur tissulaire ; t-PA : activateur tissulaire du plasminogène ; uPA : urokinase ; Xa : facteur X activé

Cette cascade est physiologiquement contrebalancée par 3 systèmes endogènes inhibant la coagulation : l'antithrombine, le système protéine C-protéine S et le TFPI (tissue factor pathway inhibitor).

II.3.2 Dégradation du thrombus

La fibrinolyse est le processus qui dégrade le thrombus en détruisant les polymères de fibrine (Figure 20). Elle fait intervenir le plasminogène, synthétisé par le foie, qui circule dans le sang sous forme inactive. Le plasminogène peut être activé par le tPA, synthétisé localement par les cellules endothéliales, ou par l'uPA (urokinase) dont le précurseur (la pro-urokinase) circule dans le sang, après sa synthèse par les cellules rénales notamment. Après son activation au niveau du caillot par le tPA ou l'uPA, le plasminogène se transforme en plasmine, qui est capable de dégrader le caillot de fibrine en produits de dégradation de la fibrine et en D-dimères.

Le système fibrinolytique est lui aussi physiologiquement régulé par des inhibiteurs de la plasmine ($\alpha 2$ antiplasmine, $\alpha 2$ macroglobuline) et des inhibiteurs de l'activation du plasminogène (plasminogen activator inhibitor ou PAI -1 et -2, synthétisés par les cellules endothéliales).

III. PLAQUETTES SANGUINES ET INFLAMMATION : ROLE DES MOLECULES D'ADHESION

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ischémie cérébrale induit une réaction inflammatoire qui se développe dans les heures et les jours qui suivent l'AVC, et qui contribue à la formation de la lésion. De nombreuses études ont montré que cette inflammation post-ischémique était associée à l'infiltration des leucocytes dans la zone ischémisée (voir pour revue Yilmaz et Granger, 2008). Dans cet

environnement inflammatoire, l'activation des cellules endothéliales cérébrales entraîne une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion à leur surface qui permet le recrutement, non seulement des leucocytes, mais aussi des plaquettes, dans la région ischémisée.

Les données de ce paragraphe sont principalement issues des revues suivantes : Merten et Thiagarajan, 2008 ; Yilmaz et Granger, 2008 ; Smyth *et al.*, 2009 ; Théorêt *et al.*, 2011.

Différents types de molécules d'adhésion existent et peuvent être regroupées en 3 classes (Golias *et al.*, 2011) :

- **Sélectines**

La famille des sélectines regroupe 3 membres, nommés en fonction de leur site d'expression principal : la L-sélectine est exprimée sur les leucocytes, la E-sélectine sur les cellules endothéliales, et la P-sélectine, qui a d'abord été découverte au niveau des plaquettes. On sait aujourd'hui que cette dernière est également présente au niveau des cellules endothéliales.

- **Superfamille des Immunoglobulines**

C'est la famille des molécules de surface la plus abondante et elle comprend notamment les ICAM-1 et -2, VCAM-1 et PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1).

- **Intégrines**

Les intégrines sont des hétérodimères constitués de chaînes α et β et sont très nombreuses ; il existe au moins 15 types de chaînes α et 9 types de chaînes β différentes. Parmi elles, citons 2 intégrines du sous-groupe $\beta 2$: LFA-1 (leukocyte function associated molecule-1) ou CD11a/CD18 et Mac-1 ou CD11b/CD18, exprimés sur les leucocytes.

Parmi ces molécules, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la P-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1, qui interviennent à différentes étapes du processus de recrutement des leucocytes et des plaquettes :

- 1) une liaison initiale de faible affinité permet de ralentir et de capturer les cellules circulantes. Ces adhésions précoces et faibles impliquent la P-sélectine,
- 2) une interaction secondaire de forte affinité conduit à l'adhésion ferme des cellules. Cette 2^{nde} étape met en jeu ICAM-1 et VCAM-1.

III.1 P-sélectine

La P-sélectine ou CD62P (anciennement GMP-140), est principalement exprimée au niveau des granules α des plaquettes, à raison de 10 000 molécules par plaquette activée (Merten et Thiagarajan, 2008). Elle est aussi stockée dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, mais en quantité 10 fois moins importante. Chez la souris, l'expression basale de la P-sélectine au niveau cérébral est faible par rapport à d'autres organes (Wong et Crack, 2008). En conditions inflammatoires, son expression peut être induite par des cytokines. Après activation des plaquettes et des cellules endothéliales, la P-sélectine est transloquée en quelques secondes à la surface de la cellule.

III.1.1 Structure

La P-sélectine est formée de 768 acides aminés (84 kDa), mais en raison des modifications post-traductionnelles qu'elle subit, elle est détectée à 140 kDa en Western Blot (voir chapitre Matériel et Méthodes, paragraphe X.4). Elle possède une structure commune aux sélectines : à l'extrémité Nter un motif Lectine, qui participe à la liaison des ligands présentant une région carbohydate contenant le motif antigénique sialyl-Lewis(x), un domaine EGF (epidermal growth factor), un domaine de répétition de courtes séquences consensus (de longueur variable selon la sélectine), un domaine transmembranaire et enfin, un court domaine intracytoplasmique (Figure 21 ; Tilton et Berens, 2002).

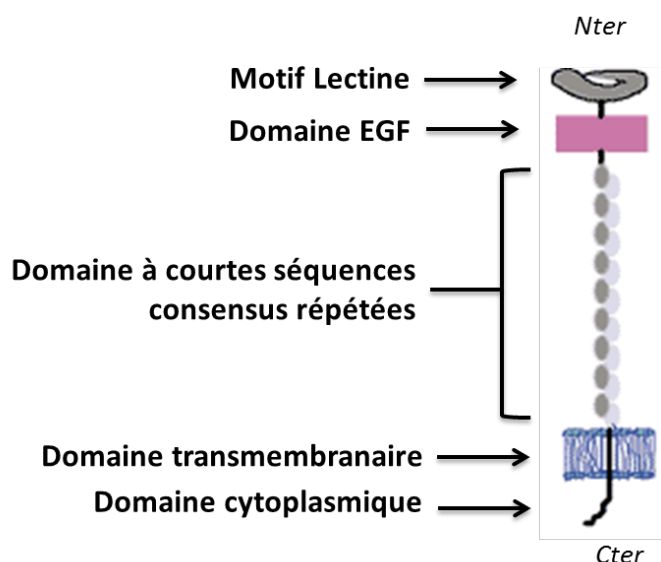


Figure 21. Structure de la P-sélectine

D'après Tilton et Berens, 2002

EGF : Epidermal Growth Factor ; Lectine : motif de reconnaissance des carbohydates Ca^{2+} -dépendant

La P-sélectine existe sous 2 formes : une forme transmembranaire et une forme soluble (sP-sélectine), dépourvue des domaines transmembranaire et cytoplasmique. Ces 2 formes semblent provenir de l'épissage alternatif de l'ARNm de la protéine et/ou de son clivage protéolytique.

III.1.2 Principaux ligands

- La protéine transmembranaire **PSGL-1** (P-selectin glycoprotein ligand-1) est le ligand le mieux caractérisé de la P-sélectine. Elle est présente sur les leucocytes, notamment les neutrophiles et les monocytes, et dans une moindre mesure (25 à 100 fois) sur les plaquettes (voir pour revue Merten et Thiagarajan, 2004). La PSGL-1 est donc impliquée :
 - 1) dans la liaison leucocytes-plaquettes, et par conséquent, dans la formation d'amas leuco-plaquettaires *via* la P-sélectine plaquettaire,
 - 2) dans le recrutement des leucocytes sur l'endothélium activé *via* la P-sélectine endothéliale.Notons que la PSGL-1 peut interagir avec toutes les formes de sélectines en conditions inflammatoires.
- La glycoprotéine plaquettaire **GPIb** est un autre ligand de la P-sélectine. Cette liaison permet donc l'adhésion des plaquettes à la paroi vasculaire activée *via* la P-sélectine endothéliale.
- Les **sulfatides**, des glycosphingolipides sulfatés, sont présents à la surface des plaquettes. Ces ligands de la P-sélectine plaquettaire sont donc impliqués dans l'interaction plaquette-plaquette.

III.1.3 Fonctions

Au-delà de son rôle dans les interactions cellulaires, la P-sélectine possède de nombreuses fonctions lui conférant un caractère thrombo-inflammatoire.

a. Rôle dans les interactions cellulaires

Grâce à sa liaison à ses différents ligands, la P-sélectine permet tous les types d'interaction entre les plaquettes, les leucocytes et les cellules endothéliales activées (Figure 22).

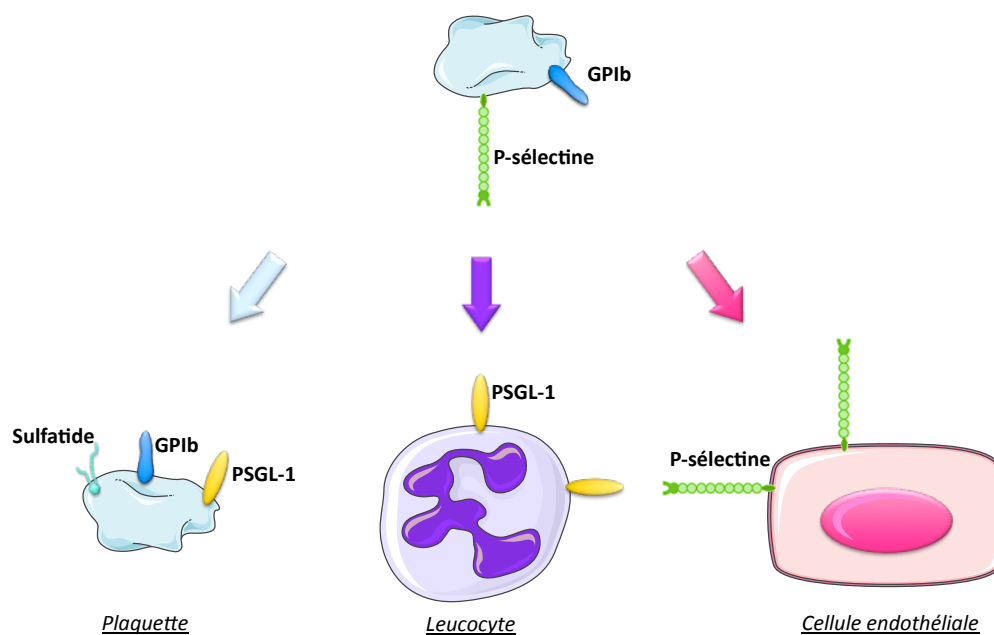


Figure 22. Implication de la P-sélectine dans les interactions cellulaires

PSGL1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand-1

Les leucocytes, *via* la PSGL-1, adhèrent à la P-sélectine :

- 1) présente sur l'endothélium activé, initiant ainsi le processus d'infiltration des leucocytes dans le parenchyme cérébral (Figure 23),
- 2) exprimée à la surface des plaquettes adhérentes à l'endothélium ou libres, pour former des amas leuco-plaquettaires (Kaplan et Jackson, 2011).

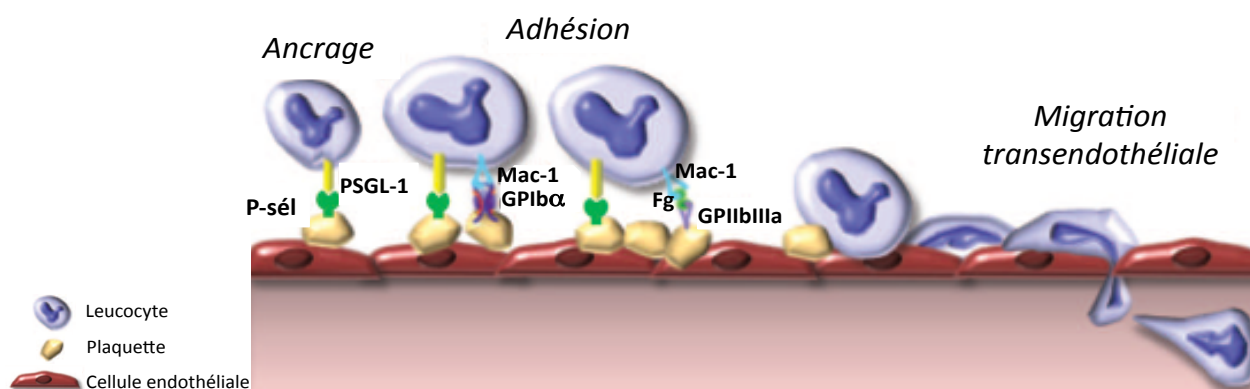


Figure 23. Interaction entre les plaquettes et les leucocytes

D'après Kaplan et Jackson, 2011

Fg : Fibrinogène ; P-sél : P-sélectine ; PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand-1

Ces adhésions leucocytaires favorisent l'**inflammation** post-ischémique et contribuent à la formation de la lésion.

D'autre part, en augmentant le nombre de cellules qui viennent adhérer à la paroi vasculaire, la P-sélectine participe également au phénomène de **thrombose**.

Plusieurs études ont montré que l'inhibition de la liaison entre plaquettes *in vivo* ou *ex vivo*, par des anticorps dirigés contre la P-sélectine ou des antagonistes des sulfatides, réduit l'agrégation plaquettaire et permet même de désagréger des thrombi déjà formés. Ainsi, cette liaison P-sélectine plaquettaire/sulfatides permettrait de stabiliser les agrégats plaquettaires formés par les ponts GPIIb/IIIa-fibrinogène.

L'accumulation des plaquettes, qu'elles soient directement attachées aux cellules endothéliales ou liées aux leucocytes adhérents, favorise un état pro-thrombotique et une réduction de perfusion des tissus, ce qui pourrait expliquer le phénomène de «no-reflow» après l'ischémie cérébrale.

Ainsi, la P-sélectine joue un rôle important dans l'agrégation plaquettaire et les interactions plaquette-leucocyte, qui sont tous les deux des mécanismes importants dans le développement de la thrombose artérielle.

b. Autres fonctions thrombo-inflammatoires

En dehors des interactions cellulaires, la P-sélectine est impliquée dans d'autres mécanismes pro-thrombotiques et pro-inflammatoires.

Tout d'abord, la liaison de la PSGL-1 leucocytaire et de la P-sélectine plaquettaire induit une cascade d'évènements, dont l'activation des intégrines leucocytaires Mac-1 et LFA-1 qui est nécessaire pour induire une adhésion stable des leucocytes. Mac-1 est la principale intégrine $\beta 2$ facilitant l'adhésion ferme à la surface des plaquettes *via* sa liaison avec de multiples ligands, dont GPIIb α . L'activation des plaquettes et la dégranulation consécutive conduisent à la libération de nombreuses substances bioactives, telles que le TxA₂, qui favorisent l'agrégation plaquettaire.

De plus, cette interaction de la P-sélectine plaquettaire avec la PSGL-1 leucocytaire induit une régulation positive du FT ainsi que la production de microparticules procoagulantes, contribuant ainsi à un état pro-thrombotique (Polgar *et al.*, 2005).

Enfin, chez les souris P-sélectine $-/-$, on constate une réduction de la formation d'amas leuco-plaquettaires, du recrutement de fibrine et de FT, qui conduisent à la formation de thrombus plus petits

et instables dans des modèles de thrombose artérielle induite par le FeCl₃ ou par laser (voir pour revues : Polgar *et al.*, 2005 ; Théorêt *et al.*, 2011).

c. Rôle dans l'ischémie cérébrale

L'expression post-ischémique de la P-sélectine dans le parenchyme cérébral a été mise en évidence dans de nombreuses études, aussi bien chez l'Homme que chez le rongeur. Cependant, il est difficile de conclure quant à sa cinétique d'expression, très variable selon les modèles et les conditions.

L'équipe d'Okada a ainsi montré une augmentation de l'expression de la P-sélectine à la surface des plaquettes et des cellules endothéliales cérébrales dès la 1^{ère} heure suivant la reperfusion et qui persiste jusqu'à 24 heures, dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le babouin (Okada *et al.*, 1994).

La comparaison de l'expression de la P-sélectine dans 3 modèles d'ischémie cérébrale transitoire (thrombotique, embolique et par suture de l'ACM ; Zhang *et al.*, 1998) a révélé une expression biphasique, avec une 1^{ère} augmentation dès 15 minutes de reperfusion avant un retour au niveau basal après 1 heure, et une 2^{nde} augmentation après 2 heures de reperfusion, avec un pic à 6 heures.

Dans l'étude de Suzuki (1998), l'expression de la P-sélectine augmente entre 8 et 24 heures de reperfusion dans les modèles transitoires, et entre 2 et 8 heures dans les modèles permanents.

Les stratégies ciblant la P-sélectine se sont révélées efficaces dans les 2 types de modèles expérimentaux, transitoires et permanents (voir pour revue Yilmaz et Granger, 2008). Ainsi, les souris P-sélectine -/- présentent une diminution du volume d'infarctus, une meilleure récupération fonctionnelle et une meilleure reperfusion cérébrale par rapport aux souris sauvages. De même, des anticorps anti-P-sélectine ont réduit la taille de la lésion associée avec une réduction des TH dans un modèle d'ischémie transitoire. Dans un modèle d'ischémie permanente, l'utilisation d'anticorps anti-P-sélectine a réduit la taille de la lésion, l'œdème cérébral, ainsi que l'infiltration leucocytaire.

L'expression de la P-sélectine au niveau systémique a également fait l'objet de nombreuses études, notamment pour évaluer l'intérêt de la sP-sélectine comme marqueur biologique diagnostic ou pronostic des AVC.

Il a ainsi été montré que les concentrations plasmatiques de sP-sélectine sont élevées chez les patients victimes d'un AVC au bout de 1, 3 et 7 jours (Kozuka *et al.*, 2002) par rapport à celles d'individus sains, mais plus à 3 mois. Dans l'étude de Wang et collaborateurs (2013), les taux plasmatiques de sP-sélectine atteignent un pic après 24 heures. Par ailleurs, aucune différence entre les patients

victimes d'un AIT ou d'un AVCi n'a été montrée, suggérant qu'il n'y a pas de corrélation entre l'activation plaquettaire et la sévérité de la lésion cérébrale.

Il a également été démontré que des taux élevés de sP-sélectine pourraient être utilisés comme marqueur biologique prédictif d'évènements cardiovasculaires majeurs. Cependant, cela reste à confirmer par d'autres études. Par ailleurs, les amas leuco-plaquettaires, qui impliquent la P-sélectine, semblent être des marqueurs de l'activation plaquettaire plus sensibles en raison de leur plus longue présence dans la circulation sanguine.

d. La P-sélectine : une cible thérapeutique potentielle ?

Le risque potentiel des inhibiteurs de P-sélectine serait d'interférer avec le recrutement physiologique des leucocytes pour combattre les infections. Cependant, l'utilisation d'anticorps anti-P-sélectine ne montre pas d'augmentation des infections dans les modèles expérimentaux.

De manière intéressante, l'association d'un anticorps anti-P-sélectine au rt-PA dans un modèle de thrombose artérielle chez le babouin a induit une thrombolyse plus rapide par rapport au rt-PA seul. Ainsi, la neutralisation de la P-sélectine pourrait non seulement prévenir la thrombose artérielle, mais également favoriser l'efficacité de la thrombolyse. Ces résultats restent évidemment à confirmer.

III.2 ICAM-1 et VCAM-1

III.2.1 Structure et ligands d'ICAM-1

ICAM-1 ou CD54 est une glycoprotéine transmembranaire de 532 acides aminés, correspondant à un poids moléculaire de 58 kDa. Elle est exprimée de manière constitutive dans plusieurs types cellulaires, dont les cellules endothéliales, mais en faible quantité dans le cerveau par rapport à d'autres organes. Son expression est inductible par les cytokines en conditions inflammatoires (Wong et Crack, 2008).

Sa structure comprend un domaine extracellulaire Nter formé de 5 boucles créées par des ponts disulfures (domaines « Ig-like »), d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracytoplasmique (Figure 24). Ses domaines D1 et D3 contiennent respectivement les sites de liaison aux intégrines leucocytaires LFA-1 et Mac-1 (Rahman et Fazal, 2009).

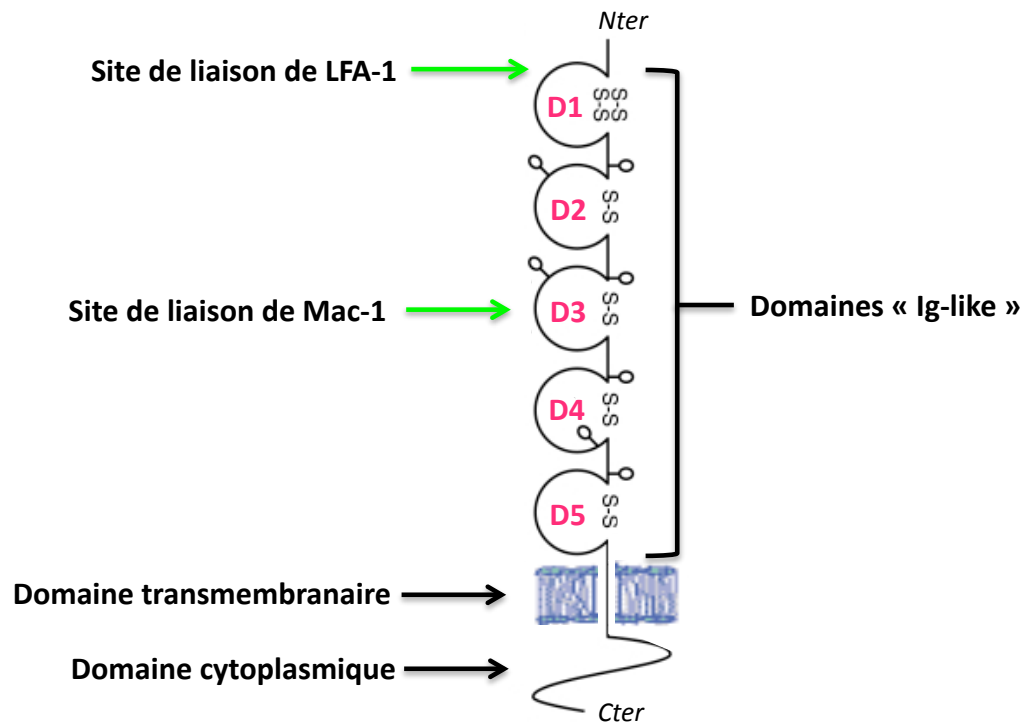


Figure 24. Structure d'ICAM-1

Modifié d'après Rahman et Fazal, 2009

Cter : extrémité C terminale ; D : domaine ; Ig : immunoglobuline ; LFA-1 : Leukocyte Function Associated molecule-1 ; Mac-1 : Macrophage antigen-1 ; Nter : extrémité N terminale

A l'heure actuelle, 8 sites de N-glycosylation ont été identifiés sur ICAM-1 (base de données Uniprot KB), expliquant pourquoi ICAM-1 est finalement détectée à environ 99 kDa. Comme pour la P-sélectine, il existe une forme soluble d'ICAM-1, sICAM-1.

Ses ligands leucocytaires sont donc LFA-1 et Mac-1. ICAM-1 interagit également avec les plaquettes en se fixant à la protéine plaquettaire GPIIb/IIIa par l'intermédiaire du fibrinogène, dont le site de liaison semble situé autour du domaine D1 (Bella *et al.*, 1999).

III.2.2 Structure et ligands de VCAM-1

VCAM-1 ou CD106 est une protéine transmembranaire de 90 kDa. Son expression constitutive à la surface des cellules endothéliales est très faible, mais elle est induite par les cytokines pro-inflammatoires.

VCAM-1 est constituée de 7 domaines « Ig-like » extracellulaires, ainsi qu'un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Figure 25). Il est à noter que VCAM-1 existe également sous une forme soluble, sVCAM-1.

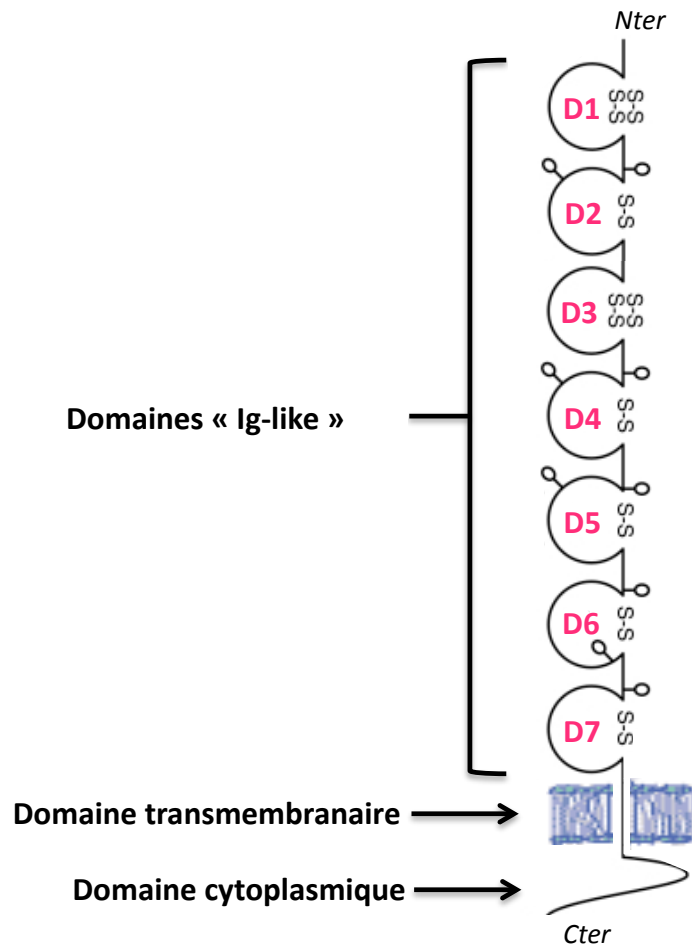


Figure 25. Structure de VCAM-1

Cter : extrémité C terminale ; D : domaine ; Ig : immunoglobuline ; Nter : extrémité N terminale

Le principal ligand de VCAM-1 est VLA-4 (very late antigen-4 ou $\alpha 4\beta 1$) qui appartient à la famille des intégrines $\beta 1$ et est exprimé par les monocytes et lymphocytes.

III.2.3 Fonctions d'ICAM-1 et de VCAM-1

a. Rôle dans l'adhésion et l'infiltration leucocytaires

ICAM-1 et VCAM-1, via leurs liaisons respectives, sont impliquées dans l'adhésion ferme des lymphocytes et des monocytes, puis dans leur infiltration dans le parenchyme cérébral (Frijns et Kappelle, 2002).

De plus, la liaison de VLA-4 à VCAM-1 déclenche une cascade d'évènements intracellulaires conduisant à l'activation des MMP et à la dégradation de certains complexes protéiques des jonctions intracellulaires, qui entraînent la dégradation des constituants de la lame basale et l'ouverture de la

BHE. Ainsi, l'augmentation de la perméabilité de la BHE facilite le passage des lymphocytes et des monocytes dans le parenchyme cérébral.

b. Rôle dans l'ischémie cérébrale

L'expression post-ischémique de VCAM-1 et d'ICAM-1 est très variable selon les études.

Justicia et collaborateurs (2006) ont observé une augmentation de VCAM-1 entre 4 et 24 heures après une ischémie transitoire. Dans une autre étude comparant des modèles d'ischémie cérébrale permanente (électrocoagulation) et transitoire (occlusions de 30 ou 90 minutes par un filament), l'ARNm d'ICAM-1 augmente 5 jours après une ischémie permanente ou transitoire de 90 minutes alors que l'ARNm de VCAM-1 était uniquement augmenté dans le modèle permanent (Zhou *et al.*, 2013).

L'augmentation de l'expression de VCAM-1 a également été détectée chez des patients victimes d'AVC (Frijns et Kappelle, 2002). Cependant, son intérêt en tant que marqueur reste controversé. En effet, une diminution des taux plasmatiques de sVCAM-1 dans les 4 premiers jours suivant un AVC permet de prédire une bonne récupération neurologique (Blum *et al.*, 2002). Campbell et collaborateurs (2006) ont aussi montré que le taux sanguin de sVCAM-1 permet d'évaluer le risque de récurrence d'AVC chez des patients présentant une maladie cardiovasculaire. Par contre, il a été montré, notamment par l'étude MITICO en 2009, que les taux d'IL-6, d'ICAM-1, de TNF α (tumor necrosis factor alpha) et de vWF, mais pas ceux de VCAM-1, sont prédictifs d'un nouvel événement vasculaire (voir pour revue Supanc *et al.*, 2011).

Les hypothèses avancées pour expliquer ces résultats opposés sont la grande variabilité interindividuelle, les critères d'inclusion et le choix des témoins et des prélèvements, qui sont non standardisés.

Plusieurs études réalisées dans différents modèles d'ischémie cérébrale transitoire ou permanente ont révélé une augmentation significative de l'expression post-ischémique d'ICAM-1 dans le cerveau et montré son implication dans le recrutement post-ischémique de cellules inflammatoires (voir pour revue Yilmaz et Granger, 2008). Chez les souris ICAM-1 $-/-$, on constate une réduction de l'adhésion leucocytaire, des infarctus et de la mortalité, ainsi qu'un DSC amélioré après une ischémie cérébrale transitoire. De même, un anticorps anti-ICAM-1, l'enlimomab, a réduit la lésion cérébrale et l'accumulation de neutrophiles dans des modèles d'ischémie cérébrale transitoires chez le rat et le lapin.

L'enlimomab a également été testé en clinique. L'essai comptait 625 patients traités pendant 5 jours par l'enlimomab ou le placebo dans les 6 heures suivant la survenue de l'AVC. Les résultats ont mis en

évidence une surmortalité et une aggravation de l'état des patients traités par rapport au groupe placebo.

A l'heure actuelle, il reste difficile de dégager clairement l'intérêt d'ICAM-1 en tant que marqueur biologique, étant donné que les études sont contradictoires et que certaines ne montrent aucune modulation des formes solubles d'ICAM-1 et de VCAM-1 (Supanc *et al.*, 2011).

Chez l'Homme, des études montrent une augmentation de l'expression d'ICAM-1 dans le cortex ipsilatéral et une augmentation des taux de sICAM-1 après un AVCi. Bitsch et collaborateurs (1998) ont mis en évidence une augmentation significative d'ICAM-1 après un AVC (avec un pic à 24 heures), mais pas après un AIT, suggérant que l'expression de sICAM-1 pourrait être liée à la sévérité de l'ischémie.

Par ailleurs, l'utilisation combinée d'anticorps anti-ICAM-1 et de rt-PA a entraîné une amélioration fonctionnelle alors qu'aucun de ces traitements ne s'est révélé efficace seul dans un modèle embolique. Ces résultats indiquent que l'association pourrait améliorer l'efficacité du rtPA. Par ailleurs, les stratégies visant à bloquer les molécules d'adhésion dans l'ischémie cérébrale se révèlent surtout protectrices dans les modèles transitoires, mais pas permanents, suggérant un bénéfice thérapeutique associé à une reperfusion.

IV. METHODES D'EXPLORATION DES FONCTIONS PLAQUETTAIRES ET DE L'HEMOSTASE

L'exploration des fonctions plaquettaires et de l'hémostase est primordiale pour le développement de nouvelles stratégies anti-thrombotiques. Dans le cadre d'un traitement d'un AVCi, ces tests permettent d'évaluer le risque hémorragique ou, au contraire, le risque thrombotique de nouvelles molécules. Ces tests permettent également de diagnostiquer une pathologie ou bien encore de suivre l'efficacité d'un traitement.

Dans cette partie, nous donnerons un aperçu des tests les plus courants utilisés chez l'Homme et en recherche préclinique.

En préambule, rappelons que les plaquettes sont très sensibles et peuvent être activées lors :

- du prélèvement des échantillons : selon la voie de prélèvement, la présence de bulles, une mauvaise anticoagulation (celle-ci doit être adaptée au type de test utilisé),

- de chocs mécaniques (agitation) ou thermiques (écarts de température),
- d'un délai trop long entre le prélèvement et l'utilisation des échantillons.

Les échantillons doivent donc être manipulés avec précaution, afin de ne pas introduire de biais dans l'étude.

IV.1 Evaluation des fonctions plaquettaires et de l'hémostase chez l'Homme

Les données suivantes sont principalement issues de la revue de Picker (2011).

IV.1.1 Numération et analyse morphologique des plaquettes

Le test de base est la numération plaquettaire, qui est réalisée par des compteurs automatés. Elle permet de vérifier que le nombre de plaquettes est normal, c'est-à-dire compris entre 150 et $400.10^9/l$ de sang chez l'Homme. Toute numération inférieure à $50.10^9/l$ est considérée comme une thrombocytopénie et expose à des risques d'hémorragie.

L'observation de la morphologie des plaquettes ou l'évaluation du volume plaquettaire moyen (mean platelet volume ou MPV) sont également des paramètres informatifs dans les pathologies cardiovasculaires (Lancé *et al.*, 2012).

IV.1.2 Temps de saignement

Cette technique consiste à faire une incision superficielle, de longueur et de profondeur standardisées, au niveau de l'avant-bras. Il s'agit d'un test « classique » pour évaluer l'hémostase primaire globale, en mesurant le temps au bout duquel le saignement s'arrête. Mais cette technique tombe en désuétude en raison de nombreux inconvénients ; elle est notamment assez peu sensible, invasive, peu reproductible et ne permet pas de répéter les mesures.

Même si de nombreux acteurs de l'hémostase, tels que les constituants de la matrice extracellulaire, ne sont pas présents, le PFA-100® (Platelet Function Analyser) peut s'approcher d'un « test de saignement *in vitro* ». Il s'agit d'un dispositif dans lequel l'échantillon de sang total citraté est aspiré à pression constante dans un capillaire pour mimer un flux sanguin élevé, puis il passe à travers une membrane de nitrocellulose pré-coatée avec des agonistes plaquettaires (collagène/ADP ou collagène/épinéphrine ; Figure 26). Dans ces conditions, les plaquettes adhèrent et s'agrègent en formant un bouchon de plaquettes qui obstrue les pores de la membrane. On mesure ainsi le temps d'occlusion, au bout duquel

le sang ne passe plus à travers cette membrane. Cette technique est simple, rapide et reproductible et ne nécessite que de faibles volumes de sang citraté, mais elle n'est pas réalisable lors d'une thrombocytopénie ou en l'absence de vWF fonctionnel, indispensable à l'agrégation dans le dispositif.

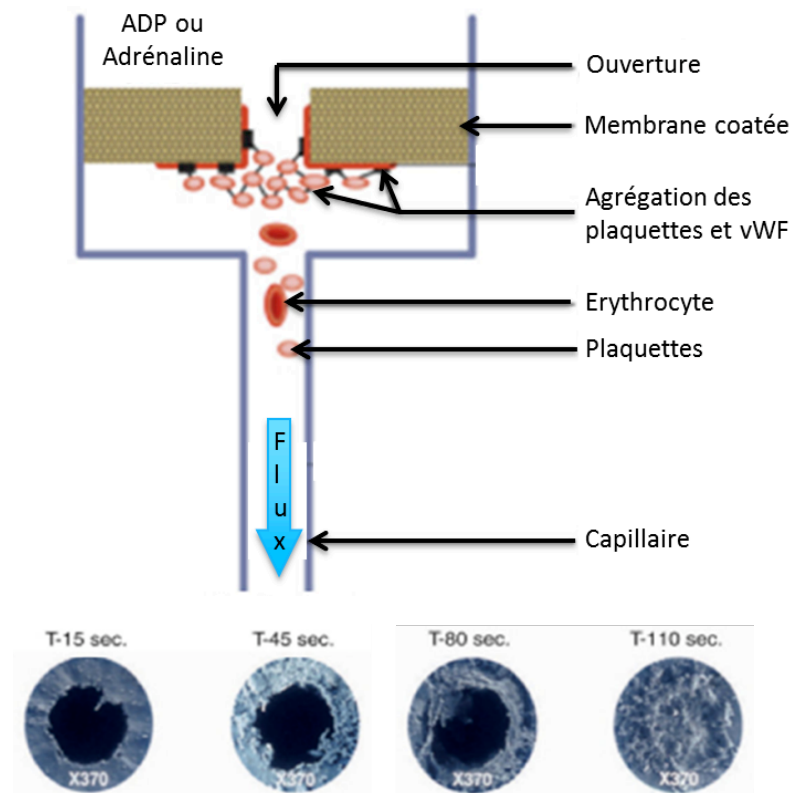


Figure 26. Principe du PFA-100 et obstruction de la membrane en fonction du temps

Issu de : <http://dc183.4shared.com/doc/E2is2dXY/preview.html>

IV.1.3 Exploration de l'adhésion plaquettaire

Le CPA (Cone and Plate(let) Analyser) permet d'évaluer l'adhésion des plaquettes en mimant les conditions *in vivo*.

L'échantillon de sang total citraté est déposé dans un puits soumis à des forces de cisaillement élevées appliquées par la rotation d'un cône (Figure 27).

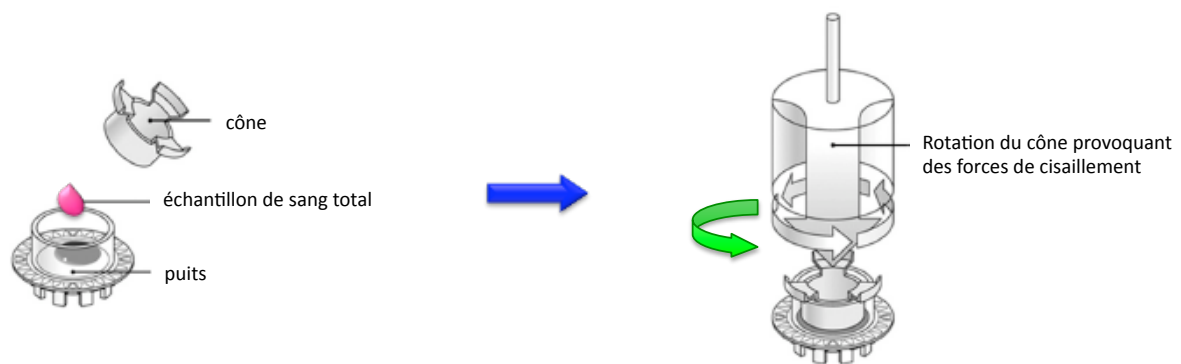


Figure 27. Principe du CPA (Cone and Plate(let) Analyser)

Modifié d'après Shenkman *et al.*, 2008

Après coloration et observation microscopique, l'analyse des images permet de calculer différents paramètres, tels que le pourcentage de la surface couverte par les plaquettes et la surface moyenne des éléments adhérents. Ainsi, ce test met en évidence les déficits en adhésion et agrégation plaquettaire ou les états prothrombotiques.

L'avantage de cette technique est qu'elle est réalisable avec un faible volume sanguin.

IV.1.4 Exploration de l'agrégation plaquettaire

L'agrégométrie à transmission lumineuse, appelée aussi agrégométrie turbidimétrique ou optique, est une technique très utilisée. Elle consiste à mesurer la capacité des plaquettes d'un échantillon de Plasma Riche en Plaquettes (PRP) ou de plaquettes lavées à agréger en présence d'un agoniste plaquettaire, en mesurant l'intensité de la lumière transmise à travers l'échantillon. Les agonistes permettent d'explorer différentes voies d'agrégation plaquettaire. Citons pour exemple, l'ADP, le collagène, les peptides activateurs des récepteurs à la thrombine (PAR) ou bien encore l'AA.

Quel que soit l'agoniste utilisé, la réponse présente :

- 1) une phase de latence, qui correspond au temps écoulé entre l'ajout de l'agoniste et le début de l'agrégation. Cette phase est plus ou moins longue en fonction des agonistes,
- 2) une phase d'agrégation.

Notons que l'agrégation induite par l'ADP présente quelques particularités. En effet, en fonction de la concentration utilisée et de la variabilité interindividuelle, elle peut présenter 1 ou 2 phases (Figure 28) :

- de faibles concentrations d'ADP entraînent un début d'agrégation, mais en l'absence d'une stimulation suffisante du récepteur P2Y1, cette agrégation est réversible (tracé vert).

- avec des concentrations d'ADP un peu plus élevées, le tracé d'agrégation est biphasique (tracé orange) : la 1^{ère} phase correspond à l'activation de P2Y1, qui provoque la sécrétion des granules plaquettaires. La libération de leur contenu permet de soutenir l'agrégation et de stimuler P2Y12. Cela correspond à la 2^{nde} phase d'agrégation, qui débute après l'épaulement, et qui est irréversible.
- lorsque les concentrations d'ADP sont importantes, l'agrégation est irréversible et ne présente qu'une seule phase (tracé rouge).

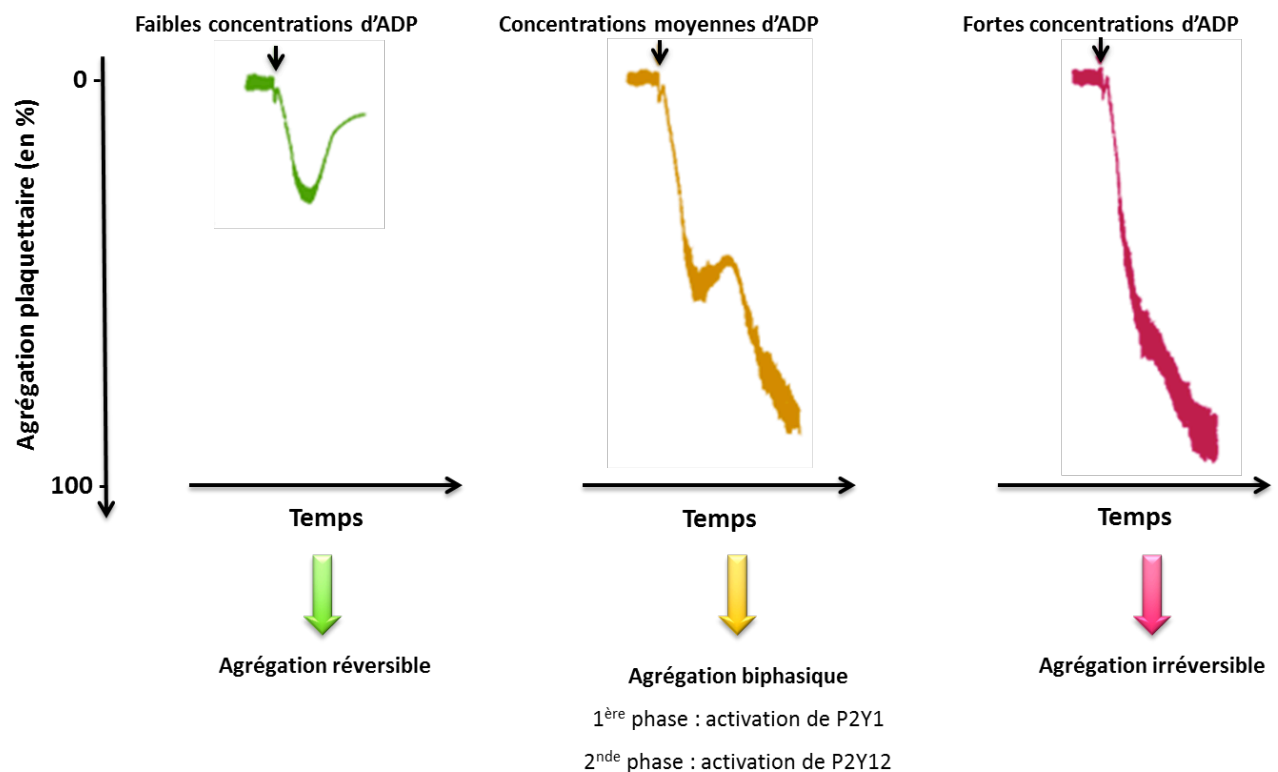


Figure 28. Caractéristiques des courbes d'agrégation en fonction des concentrations d'ADP

Cette méthode peut également être utilisée avec des échantillons de sang animal (voir chapitre Matériel et Méthodes, paragraphe I). Cependant chez la souris, l'agrégation induite par l'ADP est toujours réversible, même avec de fortes concentrations, et présente un profil similaire au tracé vert (Rosenblum *et al.*, 1983). Pourtant, comme l'Homme, les souris possèdent les récepteurs plaquettaires P2Y1 et P2Y12. Un nombre inférieur de copies ou bien encore des mécanismes de sécrétion particuliers à la souris pourrait expliquer cette différence.

L'étude différentielle des profils de réponses à chaque agoniste permet d'évaluer la voie d'agrégation mise en jeu dans un traitement ou une pathologie.

L'inconvénient principal de cette technique est la préparation du PRP. En effet, cette préparation peut activer les plaquettes et nécessite du temps, de l'équipement et des échantillons en quantité suffisante.

Afin de s'affranchir de la préparation de PRP, il existe une technique alternative par impédancemétrie, qui permet de travailler sur des échantillons de sang total. L'agrégomètre à impédance est constitué de conducteurs placés dans la cuve contenant l'échantillon et il évalue la variation de résistance électrique, qui est proportionnelle à la quantité de plaquettes adhérant à ces conducteurs.

Par ailleurs, certains agrégomètres permettent également d'évaluer la sécrétion d'ATP des granules plaquettaires par luminométrie. Le principe consiste à ajouter de la luciférine/luciférase qui, en présence d'ATP, produit de la lumière mesurable par une sonde. La quantité de lumière émise est proportionnelle à la quantité d'ATP libérée.

Mentionnons également la technique du Verify Now® qui permet de mesurer la formation d'agrégats plaquettaires entre des billes de polystyrène recouvertes de fibrinogène. Cette méthode explore donc la réactivité plaquettaire en réponse à des agonistes spécifiques de différents traitements, comme l'ASA, le clopidogrel ou l'abciximab.

IV.1.5 Analyse de la formation et de la stabilité du caillot plaquettaire

Le principe du thromboélastogramme repose sur l'augmentation de la viscosité du sang qui accompagne la formation du réseau de fibrine. Cette technique, réalisée sur du sang total, est sensible à l'activation plaquettaire, à la formation d'un caillot, à sa rétraction et à sa lyse. Les inconvénients de cette technique sont la durée (méthode chronophage), les outils et les connaissances, et la sensibilité aux perturbations extérieures. De plus, elle ne permet pas de mettre en évidence des dysfonctions mineures.

IV.1.6 Cytométrie de flux

La cytométrie de flux (CF) est une technique performante permettant d'évaluer de nombreux paramètres, tels que l'internalisation/externalisation de marqueurs, le changement de conformation de récepteurs glycoprotéiques ou bien encore la libération du contenu des granules plaquettaires. Citons par exemple la détection de la phosphorylation de la protéine VASP (voir Partie Matériel et Méthodes, paragraphe I.4), la P-sélectine, le PF4, l'activation de GPIIb/IIIa ou les amas leucoplaquettaires. Cette approche peut être très intéressante en thérapeutique, puisqu'il a été montré que certains marqueurs de l'activation plaquettaire sont augmentés dans différentes pathologies, telles que l'ischémie cérébrale (Grau *et al.*, 1998 ; Michelson et Furman, 1999).

Les tests en CF peuvent facilement être utilisés en routine, sur de faibles quantités de sang humain ou murin, mais nécessitent un équipement coûteux et du personnel formé.

IV.2 Evaluation des fonctions plaquettaires et de l'hémostase chez la souris

IV.2.1 *In vitro*

En adaptant les réglages, de nombreux tests utilisés *in vitro* chez l'Homme le sont également chez la souris (voir pour revues : Day *et al.*, 2004 ; Jirouskova *et al.*, 2007).

Les mêmes précautions doivent être prises en terme de prélèvement, d'autant plus que le volume disponible de sang est très faible (environ 1,8 ml de sang total pour une souris de 25 g). Le prélèvement s'effectue sous anesthésie générale. La voie conduisant à la moins forte activation plaquettaire est la veine cave inférieure.

Même si le système cardiovasculaire de certaines espèces comme le porc, le chien ou le singe est proche de celui de l'Homme, la souris reste, pour des raisons pratiques, l'animal le plus utilisé pour explorer les fonctions plaquettaires en préclinique. De nombreux modèles existent mais nous ne développerons que ceux utilisés dans notre étude.

IV.2.2 Modèles de temps de saignement

Le temps de saignement correspond au temps qui s'écoule entre la réalisation d'une plaie cutanée et le moment où le saignement provoqué s'arrête. Ce test est couramment utilisé pour apprécier le risque hémorragique de stratégies antiplaquettaires et il permet une exploration globale de l'hémostase primaire (Grüner *et al.*, 2004 ; Jandrot-Perrus *et al.*, 2010). Il évalue ainsi le rôle des mécanismes d'adhésion et d'agrégation des plaquettes au niveau de la lésion, conduisant à la formation du clou plaquettaire qui va limiter les pertes de sang.

Chez la souris, le temps de saignement est mesuré après incision du bout de la queue (entre 1 et 5 mm). Deux modèles existent :

- Le 1^{er} consiste à immerger la queue dans une solution de NaCl à 0,9% thermostatée à 37°C et à mesurer le temps au bout duquel on n'observe plus d'écoulement de sang. Cependant, cela peut être difficile à observer en raison de la dilution du sang dans la solution.
- Le 2nd modèle, développé par Grüner et collaborateurs (2004), consiste à absorber la goutte de sang

au bout de la queue à l'aide d'un papier filtre, sans toucher la plaie, à intervalles de temps réguliers. On note ainsi le temps au bout duquel on n'observe plus aucune trace de sang sur le papier filtre. Cette technique permet une observation plus facile, mais n'est exploitable que si la plaie n'est pas touchée, car cela peut réactiver le saignement et fausser la mesure (voir la Partie Matériel et Méthodes, paragraphe II.1).

Il faut noter que les temps de saignement sont différents selon les souches de souris utilisées. Ce test nécessite une standardisation de paramètres, tels que le type d'anesthésie, le poids corporel, la façon dont est maintenue la souris ou la température, qui peuvent affecter la mesure.

IV.2.3 Modèles de thromboembolie pulmonaire

Ces modèles mesurent la résistance d'une souris à un processus thromboembolique aigu induit par l'injection i.v. d'agonistes plaquettaires, tels que l'ADP, le collagène ou la thrombine seuls ou associés à l'adrénaline qui est un puissant vasoconstricteur. Des agrégats plaquettaires se forment dans la circulation aboutissant à l'obstruction de la microcirculation pulmonaire, à la paralysie des membres inférieurs, puis à la mort rapide de l'animal (Jandrot-Perrus *et al.*, 2010). On compare ainsi le taux de survie ou de mortalité sur une période d'observation maximale donnée, entre un groupe contrôle et un groupe traité.

IV.2.4 Modèles de thrombose artérielle

Une thrombose artérielle peut être induite à différents endroits dans le système vasculaire : les modèles les plus utilisés lèsent les artères carotides, coronaires, fémorales, ou bien les artérioles du mésentère et du crémaster. Les sites de lésions sont notamment choisis en fonction de la technique utilisée (voir pour revue Denis *et al.*, 2011) :

- 1) Lésion par impulsion laser de haute énergie

La longueur d'onde, la puissance et la durée d'exposition au laser sont assez variables et entraînent des lésions plus ou moins sévères.

- 2) Lésion mécanique par constriction ou compression d'un vaisseau par insertion d'un filament, ligature, ballonnet, clamp...

- 3) Lésion photochimique par injection d'un agent photoréactif, comme le rose bengal

La durée et l'intensité du rayonnement lumineux, ainsi que la concentration du colorant peuvent varier.

4) Lésion par application de FeCl_3

Ce modèle est le plus utilisé chez les animaux de petite taille, car il est relativement simple à réaliser. Dans ce modèle, l'application de FeCl_3 sur une artère entraîne la production massive de radicaux libres qui lèsent la paroi vasculaire, favorisant ainsi l'adhésion et l'agrégation des plaquettes, et donc la formation d'un thrombus. La cinétique de formation du thrombus peut être suivie à l'aide d'une sonde à ultrasons située en aval du dispositif, qui permet de mesurer le flux sanguin résiduel (Figure 29). On évalue ainsi le temps d'occlusion complète de l'artère, c'est-à-dire le temps au bout duquel le flux est nul.

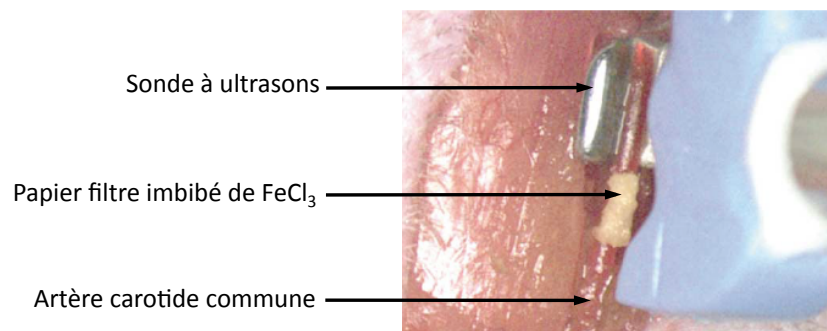


Figure 29. Dispositif du modèle de thrombose carotidienne par le FeCl_3
D'après Day *et al.*, 2004

Cette méthode s'applique principalement sur les artères carotides (voir la Partie Matériel et Méthodes, paragraphe II.3) ou fémorales. En fonction de la concentration de FeCl_3 (couramment entre 5 et 15%) et de la durée d'application, les lésions induites sont plus ou moins sévères (voir pour revue Denis *et al.*, 2011).

La difficulté majeure de tous ces tests, qu'ils soient réalisés chez l'Homme ou chez la souris, est le manque de standardisation des protocoles qui sont souvent propres à chaque laboratoire, et qui peuvent rendre les comparaisons difficiles.

V. STRATEGIES ANTIPLAQUETTAIRES DANS LE TRAITEMENT DES AVC ISCHEMIQUES

Comme nous l'avons vu précédemment il est clairement établi que l'emballement du processus physiologique de l'hémostase primaire peut conduire à des événements thrombotiques à l'origine de pathologies telles que l'AVCi (Stoll *et al.*, 2008).

La recherche des mécanismes impliqués a permis de développer des stratégies thérapeutiques anticoagulantes et antiplaquettaires dans le traitement aigu ou en prévention des récives après un AIT ou un AVCi.

Dans cette partie, nous développerons principalement les stratégies antiplaquettaires.

V.1 Traitement aigu des AVC ischémiques

Après un AVCi, la lésion continue de se développer, et ce, en dépit d'une reperfusion du tissu cérébral ; ce processus est appelé « lésion de reperfusion ». Or, il a été montré dans un modèle expérimental d'ischémie/reperfusion cérébrale que l'adhésion et l'activation plaquettaires contribuaient au développement de la lésion, probablement en participant à la formation de thrombi, mais aussi en déclenchant des processus inflammatoires. Ainsi, des stratégies antiplaquettaires ciblant les récepteurs impliqués dans l'adhésion, l'activation et l'agrégation des plaquettes, sont recherchées.

Les données concernant les stratégies anti-GPIIb et anti-GPVI ont été tirées de la revue de Nieswandt et collaborateurs (2011).

V.1.1 Stratégies anti GPIIb

L'importance de l'interaction avec le récepteur plaquettaire GPIIb en condition de flux sanguin élevé en fait une cible intéressante dans le cadre du traitement de pathologies thrombo-occlusives comme l'ischémie cérébrale.

Dans un modèle transitoire d'occlusion de l'ACM chez la souris, l'inhibition du site de liaison du vWF sur GPIIb par l'administration de fragments Fab anti-GPIIb α entraîne une diminution de 60% du volume de la lésion et une amélioration fonctionnelle des souris. Cette protection ne s'accompagne pas d'une incidence accrue d'hémorragies intracrâniennes bien que les temps de saignement chez ces animaux soient augmentés.

Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de souris vWF-/- qui ont développé des volumes d'infarctus inférieurs de 50 à 60% par rapport aux souris sauvages et une amélioration des scores neurologiques. De manière intéressante, les souris vWF-/- sont moins protégées contre l'ischémie cérébrale que les souris traitées avec un anticorps anti-GPIIb α , ce qui suggère que d'autres ligands de GPIIb α , comme Mac-1 ou la P-sélectine, pourraient être impliqués dans le développement de la lésion dans ce modèle.

V.1.2 Stratégies anti GPVI

La liaison GPVI-collagène, étant considérée comme une interaction très puissante dans le processus de thrombose, des stratégies visant son inhibition ont donc été développées.

Dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire, les souris GPVI-/- ont un volume de lésion réduit d'environ 30% par rapport au groupe contrôle, sans augmentation des hémorragies intracérébrales.

Bien que la réduction des infarctus soit moindre qu'après le blocage de GPIIb/IIIa, GPVI pourrait être une cible thérapeutique dans le traitement aigu des AVCi.

V.1.3 Stratégies anti GPIIb/IIIa

De nombreuses études précliniques ont utilisé des inhibiteurs pharmacologiques peptidiques (eptifibatide) ou non peptidiques (tirofiban) ou des anticorps (abciximab) dirigés contre GPIIb/IIIa. Si plusieurs d'entre elles ont montré une diminution de l'accumulation des plaquettes avec une réduction (ou non) du volume d'infarctus, elles s'accompagnaient souvent d'une augmentation significative d'hémorragies intracérébrales (voir pour revue Stoll *et al.*, 2008).

Contrairement à GPIIb/IIIa et GPVI, le ciblage de récepteurs impliqués dans l'agrégation plaquettaire n'améliore pas les conséquences de l'AVCi. L'utilisation de souris vWF^{-/-} (rappelons que vWF se fixe sur GPIIb/IIIa) a permis de montrer que l'interaction avec GPIIb/IIIa et le collagène est primordiale dans la progression de l'AVC aigu, mais pas GPIIb/IIIa (Nieswandt *et al.*, 2011).

En 2008, dans l'essai clinique AbESTT-II (Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial), l'utilisation de l'abciximab chez des patients souffrant d'un AVCi a été arrêtée prématurément en phase III en raison d'une augmentation des hémorragies intracrâniennes et de la mortalité, ainsi que d'un manque d'efficacité (Nieswandt *et al.*, 2011). Cependant, certaines études ont décrit des effets bénéfiques de l'association d'inhibiteurs de GPIIb/IIIa (tirofiban, abciximab) au rt-PA (voir pour revue Stoll *et al.*, 2008). Toutefois à l'heure actuelle, l'utilisation d'inhibiteurs de GPIIb/IIIa n'est pas recommandée dans le traitement des AVCi en phase aiguë. Il semble qu'une inhibition excessive de GPIIb/IIIa conduise inévitablement à une augmentation des hémorragies intracrâniennes.

V.2 Traitement pour la prévention secondaire des AVC ischémiques

Les données décrites dans ce paragraphe sont principalement issues des revues suivantes : Shimazawa et Hara., 2011 ; Yip et Benavente, 2011 et Bousser, 2012.

Les patients ayant eu un AVCi sont à haut risque de récurrences d'événements cérébrovasculaires. L'utilisation d'agents anti-thrombotiques en prévention secondaire de l'AVCi est donc fondamentale. Globalement, 2 types de traitements peuvent être initiés en fonction de l'étiologie de l'AVCi :

- Un traitement par des agents anticoagulants pour les AVCi d'origine cardio-embolique,
- Un traitement par des agents antiplaquettaires dans les autres cas d'AVCi.

Cette dernière stratégie sera plus particulièrement développée, et nous décrirons notamment les différentes associations de molécules testées.

V.2.1 Prévention secondaire après un AVCi d'origine cardio-embolique

L'essai ACTIVE-W (Atrial fibrillation Clopidogrel Trial with Irbesartan for prevention of Vascular Events) a montré la supériorité des anticoagulants par rapport aux antiplaquettaires après un AVCi cardio-embolique. En effet, la warfarine, un anti-vitamine K, diminue de 2/3 les récurrences d'AVC par rapport au placebo et de 45% par rapport à l'ASA. Cependant, le principal inconvénient de ce type de molécule est le suivi de l'INR (International Normalized Ratio). C'est pourquoi récemment, de nouveaux anticoagulants oraux, d'utilisation moins contraignante, ont été développés : le dabigatran, un inhibiteur direct de la thrombine, l'apixaban et le rivaroxaban, des inhibiteurs directs et sélectifs du facteur Xa.

Après l'essai RE-LY (Randomized Evaluation of Long Term Anticoagulant Therapy), le dabigatran a été approuvé par la FDA comme une alternative efficace et sûre à la warfarine. L'apixaban s'est révélé supérieur à la warfarine, aussi bien en termes d'efficacité que de tolérance dans l'essai ARISTOTLE (Apixaban for Reduction In STroke and Other Thromboembolic Events). L'essai ROCKET (Rivaroxaban Once-daily, Oral, Direct Factor Xa Inhibition Compared with Vitamin K Antagonism for Prevention of Stroke and Embolism Trial) testant le rivaroxaban s'est également révélé plutôt positif par rapport à la warfarine.

V.2.2 Prévention secondaire après un AVCi d'origine non cardio-embolique

Après un AIT ou un AVCi d'origine non cardio-embolique, les traitements antiplaquettaires sont les traitements de 1^{ère} intention. Ils peuvent être administrés en mono- ou bithérapie en fonction des cas.

a. Aspirine (ASA)

Son action repose sur l'inhibition irréversible des COX, dont la COX-1 plaquettaire ce qui conduit à la réduction de la synthèse de TxA2.

Les doses usuelles pour obtenir un effet antiplaquettaire sont de 75 à 150 mg/jour. De plus fortes doses ne se sont pas révélées davantage protectrices, mais ont au contraire augmenté le risque hémorragique (Srivastava, 2010).

En 1997, l'effet de l'ASA a été évalué dans les 48 heures suivant l'apparition de l'AVC dans 2 grands essais cliniques : CAST (Chinese Acute Stroke Trial ; ASA à 160 mg/jour) et IST (International Stroke

Trial ; ASA à 300 mg/jour). Ces essais ont montré un effet bénéfique modéré, mais significatif, sur la récurrence des AVC et la mortalité. Notons que les fortes doses d'ASA testées ont été critiquées. Il semblerait que cet effet bénéfique soit lié à la prévention des récurrences précoces plutôt qu'un effet limitant les conséquences neurologiques de l'AVC en lui-même.

Des méta-analyses ont confirmé que l'ASA diminuait le risque de récurrences d'AVC par rapport au placebo et ce, pour des doses supérieures à 30 mg/jour (Algra et Van Gijn, 1996).

En 2009, la méta-analyse ATT (Antithrombotic Trialists' Collaboration) a montré que l'ASA réduit de 21% le risque de récurrence des AVCi, mais double les risques d'hémorragies intracrâniennes ou gastro-intestinales. Toutefois, l'ASA reste le « gold standard » servant de référence pour évaluer l'effet d'autres molécules dans les essais cliniques.

Trois études, SPIRIT (Stroke Prevention In Reversible Ischemia Trial), WARSS (Warfarin-Aspirin Recurrent Stroke Study) et ESPRIT (European/Australasian Stroke Prevention in Reversible Ischaemia), ont évalué les effets d'une stratégie antiplaquettaire (ASA) *versus* une stratégie anticoagulante (warfarine) dans le cadre d'AVCi non cardio-emboliques. Les résultats ne montrent pas de différence en terme d'efficacité, mais une augmentation des hémorragies avec la warfarine par rapport à l'ASA (SPIRIT et ESPRIT).

b. Dipyridamole

Le dipyridamole (DP) est un antiplaquettaire inhibiteur non spécifique de phosphodiésterases.

L'ASA et le DP agissant sur des cibles différentes, leur association pourrait produire une synergie d'action. C'est pourquoi cette combinaison ASA + DP à libération prolongée a été testée dans 2 études, ESPS-2 (European Stroke Prevention Study-2) et ESPRIT, et comparée à l'ASA seul. Les résultats ont montré une réduction de plus de 20% du risque d'AVC par rapport à l'ASA en monothérapie, sans augmentation des risques hémorragiques.

Une méta-analyse de 2008 n'a pas mis en évidence de différence entre l'ASA seul et l'ASA associé au DP à libération immédiate (Verro *et al.*, 2008).

Aujourd'hui, l'ASA et son association avec le DP à libération prolongée sont des traitements validés et recommandés dans la prévention secondaire après un AVCi.

c. Thiénopyridines

Les thiénopyridines exercent leurs effets antiplaquettaires en inhibant de manière irréversible la liaison de l'ADP à son récepteur plaquettaire P2Y₁₂.

- **Ticlopidine**

Dans les essais CATS (Canadian American Ticlopidine Study) et TASS (Ticlopidine Aspirin Stroke Study) menés chez des patients victimes d'AVC mineurs, la ticlopidine s'est révélée bénéfique sur le critère composite de survenue d'AVC, d'infarctus du myocarde ou de mort de cause vasculaire.

Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés dans l'essai AAASPS (African American Antiplatelet Stroke Study) mené chez des patients à haut risque cardiovasculaire, en comparaison avec l'ASA. La ticlopidine a été la 1^{ère} thiénopyridine testée, mais elle provoque des effets indésirables, notamment des neutropénies. Suite à l'essai CLASSICS (Clopidogrel Aspirin Stent Interventional Cooperative Study), le clopidogrel, une thiénopyridine de 2^{nde} génération, lui a donc été préféré.

- **Clopidogrel**

Dans l'essai CAPRIE (Clopidogrel *versus* Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events), le clopidogrel (75 mg/jour) s'est révélé légèrement plus efficace (réduction des risques d'AVC de 7%) que l'ASA (325 mg/jour) sans différence sur la survenue d'hémorragies intracérébrales. Dans l'essai PROFESS (Prevention Regimen For Effectively Avoiding Second Strokes), le traitement par le clopidogrel a été comparé à l'association ASA + DP et n'a pas montré de différence sur les taux de récives.

Ainsi, l'utilisation du clopidogrel fait également partie des recommandations dans la prévention secondaire après un AIT ou un AVCi non cardio-embolique.

Plusieurs études ont testé l'association de l'ASA et du clopidogrel, mais les résultats ne permettent pas de conclure clairement. Toutefois, une tendance semble montrer une meilleure efficacité de l'association par rapport au clopidogrel seul, mais elle est contrebalancée par une augmentation des hémorragies (études MATCH et CHARISMA, voir pour revue Yip et Benavente, 2011). A l'heure actuelle, ces résultats ne permettent pas de recommander l'association ASA + clopidogrel.

- **Prasugrel**

Le prasugrel, une thiénopyridine de 3^{ème} génération dont le délai d'action est inférieur à celui du clopidogrel, n'a été testé que dans les pathologies cardiaques dans les essais TRITON-TIMI 38 (Wiviott

et al., 2006) et (JUMBO)-TIMI 26 (Wiviott *et al.*, 2005). Il serait intéressant d'évaluer son effet dans le cadre des AVCi.

- **Antagonistes réversibles de P2Y₁₂**

Les antagonistes réversibles de P2Y₁₂ comme le ticagrelor, le cangrélol ou l'élinogrel ont l'avantage d'être des molécules directement actives contrairement aux prodrogues comme le clopidogrel. Actuellement, seul le ticagrelor est en essai clinique dans l'étude de la survenue d'accidents ischémiques, dont les AVC, après un premier épisode cardiaque (PEGASUS : PrEvention with TicaGrelor of SecondAry Thrombotic Events in High-RiSk Patients with Prior AcUte Coronary Syndrome).

d. Autres stratégies

Des inhibiteurs d'autres récepteurs plaquettaires, comme le voraxapar, un antagoniste compétitif du récepteur à la thrombine PAR-1, ou le térotroban, un antagoniste réversible du récepteur au TxA₂, ont également été testés. Cependant, les 2 essais cliniques ont été stoppés prématurément en raison, respectivement, d'une augmentation des hémorragies intracrâniennes et d'un manque d'efficacité par rapport à l'ASA (voir pour revue Choi et Kermode, 2011).

Des résultats encourageants ont été obtenus avec le **cilostazol**, un inhibiteur de la phosphodiesterase de type 3. L'essai CSPS-2 (Cilostazol Stroke Prevention Study-2), incluant 2672 patients, a montré une réduction de plus de 25% du risque relatif d'AVC par rapport à l'ASA. Le cilostazol est actuellement en essai de phase III en association avec l'ASA. Il est intéressant de noter que le cilostazol est également un inhibiteur de la PARP (Lee *et al.*, 2007).

Comme nous l'avons vu, les résultats des études cliniques sont très variables, voire même parfois contradictoires, ce qui rend leur interprétation difficile. Afin de donner plus de puissance à ces essais cliniques, quelques recommandations peuvent être suggérées :

- 1) Différencier les étiologies à l'origine de l'AVCi,
- 2) Différencier les patients à haut et faible risques cardiovasculaires,
- 3) Homogénéiser les délais de recrutement et de randomisation des patients pour comparer les risques de récurrence liés au temps,
- 4) Tenir compte des patients âgés.

Finalement, en résumé des très nombreux essais cliniques et méta-analyses, on estime que les stratégies antiplaquettaires diminuent de 22% le risque combiné d'AVC, d'infarctus du myocarde et de mort d'origine vasculaire après un AIT ou un AVC.

TROISIEME CHAPITRE : LA POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASE (PARP)

Les données de ce chapitre sont principalement issues des revues suivantes : Schreiber *et al.*, 2006 ; Moroni, 2008 ; De Vos *et al.*, 2012 ; Luo et Kraus, 2012 ; Barkauskaite *et al.*, 2013 ; Curtin et Szabo, 2013 ; Langelier et Pascal, 2013 ; Virág *et al.* 2013.

I. PRESENTATION DES DIFFERENTES PARP

En 1963 à Strasbourg, l'équipe de Chambon décrit pour la 1^{ère} fois une activité enzymatique responsable d'une modification post-traductionnelle de protéines : la synthèse de polymères d'ADP-ribose ou poly(ADP-riboses) (PARs ; Chambon *et al.*, 1963). Les enzymes responsables de cette synthèse sont les poly(ADP-ribose)polymérases ou PARP.

La PARP est une enzyme abondamment présente dans les noyaux des cellules, notamment au niveau cérébral. La famille des PARP compte à ce jour 17 membres, qui peuvent être classés en 5 sous-familles selon leur homologie de séquence (Schreiber *et al.*, 2006 ; Figure 30) :

- 1) Les PARP activées par les cassures d'ADN (PARP-1, -2 et -3),
- 2) Les tankyrases (PARP-5a ou tankyrase-1 et PARP-5b ou tankyrase-2),
- 3) Les PARP de type CCCH (PARP-7 ou tiPARP, PARP-12 et -13),
- 4) Les macroPARP (PARP-9, -14 et -15),
- 5) Les autres PARP (PARP-4 ou v-PARP, PARP-6, -8, -10, -11 et -16), qui ne possèdent aucune homologie entre elles ou avec les autres PARP, à part un domaine PARP.

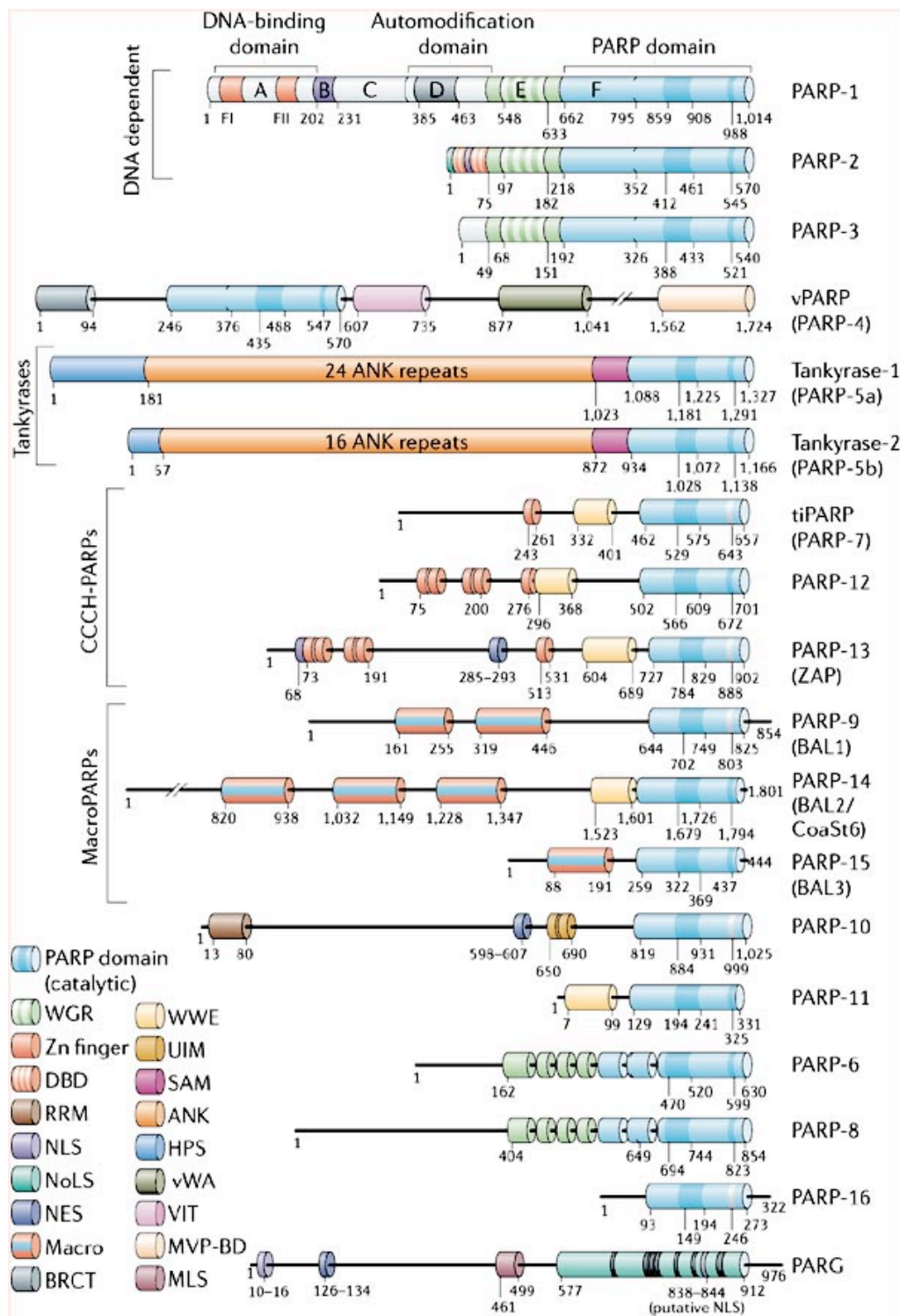


Figure 30. Structures des 17 PARP et de la poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)

D'après Schreiber *et al.*, 2006

ANK : ankyrine ; BRCT : BRCA1 C terminus ; DBD : DNA-binding domain ; HPS : résidu Histidine-Proline-Sérine ; MLS : mitochondrial localization signal ; MVP-BD : major vault protein (MVP) binding domain ; NES : nuclear export signal ; NLS : nuclear localization signal ; NoLS : nucleolar localization signal ; PARG : poly(ADP-ribose)glycohydrolase ; PARP : poly(ADP-ribose)polymerase ; SAM : sterile α -motif ; UIM : ubiquitin interacting motif ; VIT : vault inter- α -trypsin ; vWA : von Willebrand factor ; WGR : résidu Tryptophane-Glycine-Arginine ; WWE : résidu Tryptophane-Tryptophane-Acide Glutamique

I.1 Les PARP activées par les cassures d'ADN

I.1.1 La PARP-1

La PARP-1 est la plus abondante des PARP et également la plus étudiée. Elle représente au moins 85% de l'activité de poly(ADP-ribos)ylation (PARylation) totale d'une cellule. Elle comporte 1014 acides aminés chez l'Homme, comme chez la souris, et a un poids moléculaire de 113 kDa. Elle participe à de nombreux processus physiologiques : réparation de l'ADN, maintien de la stabilité génomique, régulation de la transcription, contrôle de la division et de la mort cellulaires.

La PARP-1 est constituée de 3 domaines majeurs (Figure 31) :

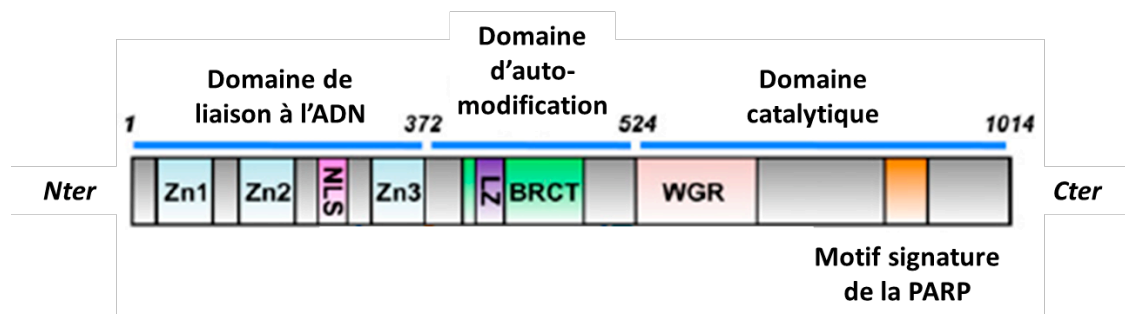


Figure 31. Structure de la PARP-1 humaine

D'après Luo et Kraus, 2012

BRCT : breast cancer susceptibility protein-C terminus ; Cter : extrémité C-terminale ; LZ : motif Leucine Zipper ; NLS : Nuclear Localisation Signal ; Nter : extrémité N-terminale ; WGR : séquence riche en Tryptophane (W), glycine (G), et Arginine ; Zn : motif en doigt de Zinc (Zn1, 2, et 3).

- **le domaine de liaison à l'ADN au niveau de la partie N-ter**

Ce domaine comprend 2 motifs en doigt de zinc, Zn1 et Zn2, qui reconnaissent les cassures de l'ADN et s'y lient. Découvert plus récemment, un 3^{ème} motif en doigt de zinc, Zn3, possède une structure différente, mais permet également une liaison à l'ADN. Ce domaine comprend également un signal de localisation nucléaire (NLS) qui explique la présence de la PARP-1 dans le noyau. Ce domaine contient une séquence de reconnaissance de la caspase 3, une protéase pro-apoptotique.

- **le domaine d'automodification**

Ce domaine contient un motif de liaison des PARs (PAR Binding Motif ou PBM), qui explique la capacité de la PARP-1 à s'auto-poly(ADP-ribos)yliser. Un motif leucine zipper (LZ) participe à l'homo- ou l'hétérodimérisation de la PARP-1. Ce domaine contient également le motif BRCT (breast cancer type 1 C-terminus), qui permet des interactions protéine-protéine entre la PARP et ses partenaires nucléaires.

- **le domaine catalytique au niveau de la partie C-terminale (C-ter)**

Ce domaine contient une région WGR riche en tryptophane (W), glycine (G), et arginine (R), une séquence nécessaire à la modulation du site actif. Ce dernier contient la « signature PARP », une séquence hautement conservée qui définit la famille des PARP et qui constitue le site de liaison au NAD^+ , le substrat indispensable au fonctionnement de la PARP.

I.1.2 La PARP-2

La PARP-2 (62 kDa) a été découverte après avoir observé une activité de PARylation résiduelle de 10-15% dans des fibroblastes issus de souris PARP-1 $-/-$.

Sa structure renferme également un motif NLS à son extrémité Nter et le domaine catalytique contenant le motif PARP (Figure 32). La PARP-2 présente de nombreuses différences avec la PARP-1, notamment sa taille (environ 2 fois moins importante), son domaine de liaison à l'ADN et son affinité pour des protéines acceptrices.

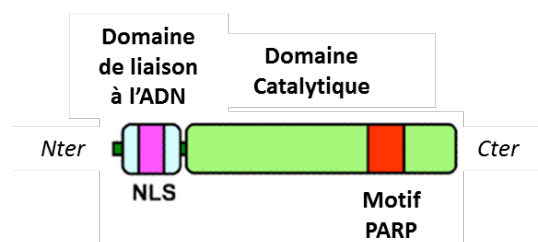


Figure 32. Structure de la PARP-2 humaine

D'après Krishnakumar et Kraus, 2010

Cter : extrémité C-terminale ; NLS : Nuclear Localisation Signal ; Nter : extrémité N-terminale.

Comme la PARP-1, la PARP-2 est activée par les cassures d'ADN et contribue au maintien de la stabilité génomique.

Les PARP-1 et -2 agissent par hétérodimérisation et partagent plusieurs partenaires nucléaires communs, ce qui suggère que les 2 protéines assurent probablement des fonctions complémentaires, essentielles de surcroît, puisque la double délétion génique des PARP-1 et -2 s'est révélée létale pour les embryons.

I.1.3 La PARP-3

La PARP-3 (60 kDa) possède une structure moléculaire plutôt similaire à celle de la PARP-2. Elle est surtout localisée dans le centrosome, d'où sa fonction au niveau du cycle cellulaire, et elle est quasiment absente du cerveau.

I.2 Les tankyrases

Les PARP-5 ont été nommées tankyrases, car elles ont pour partenaire la protéine télomérique humaine TRF1 (Telomere Repeat binding Factor 1) d'où TRF1-interacting, ankyrin-related ADP-ribose polymerase.

La **tankyrase-1** ou PARP-5a (142 kDa) a pour fonction principale de maintenir la longueur des télomères *via* l'ADP-ribosylation de TRF1. L'utilisation d'un siRNA pour éteindre l'expression de la tankyrase-1 a montré qu'elle exerce une fonction essentielle lors de la ségrégation des chromosomes pendant la mitose.

La **tankyrase-2** ou PARP-5b (127 kDa) partage la plupart des partenaires protéiques de la tankyrase-1. Cependant, son rôle est différent, puisque la délétion génique de la tankyrase-2 chez la souris ne semble pas affecter les télomères, mais semble plutôt perturber le métabolisme des animaux, qui présentent une taille réduite.

I.3 Les PARP de type CCCH

Les membres de cette famille partagent une structure en doigt de zinc de type cystéine-cystéine-cystéine-histidine (CCCH) capable de se lier à l'ARN, ce qui les différencie des autres PARP. Ils présentent également un motif tryptophane-tryptophane-acide glutamique (WWE), probablement impliqué dans l'interaction protéine-protéine.

La **PARP-7** (79 kDa) est induite par le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), d'où son autre appellation TCDD-inducible PARP (tiPARP). La surexpression de la tiPARP chez le rat par un traitement au TCDD pourrait expliquer certains effets délétères de ce composé sur les fonctions neurologiques, comme le comportement, l'apprentissage et la mémoire.

A l'heure actuelle, la **PARP-12** est très peu connue, mais elle semble structurellement proche de la PARP-13.

La **PARP-13** existe sous 2 isoformes, appelées PARP-13.1 et PARP-13.2. L'isoforme la plus courte, dont le domaine PARP est tronqué, se lie à l'ARN viral *via* son doigt de zinc CCCH, inhibe l'accumulation d'ARN viral et confère donc une résistance à l'infection rétrovirale chez le rat. Cependant, on ignore encore si l'isoforme contenant le domaine PARP possède quant à elle cette fonction.

I.4 Les macroPARP

Les macroPARP ont la particularité de contenir des macrodomaines qui peuvent se lier à des ADP-riboses.

La **PARP-9** (96 kDa) ou BAL1 (B-Agressive Lymphoma protein 1) contient 2 macrodomaines. Jusqu'à présent, elle est la seule PARP à être répertoriée comme inactive.

La **PARP-14** (170 kDa) ou BAL2 ou CoaSt6 [Co-Activator of STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription-6)] contient 3 macrodomaines.

La **PARP-15** (112 kDa) ou BAL3 contient 1 seul macrodomaine.

I.5 Les autres PARP

La **PARP-4** (193 kDa) ou vPARP est un constituant du complexe « vault », une association de ribonucléoprotéines localisée dans le cytoplasme et probablement impliquée dans le transport intracellulaire et dans la résistance aux molécules anti-cancéreuses. La PARP-4 est la seule PARP pour laquelle le domaine catalytique n'est pas situé en Cter.

La **PARP-10** (109 kDa) est un partenaire de la proto-oncoprotéine c-Myc, un régulateur transcriptionnel clé contrôlant la prolifération cellulaire.

A l'exception de la présence d'un motif WWE pour la **PARP-11**, très peu de données existent sur les structures des **PARP-6**, **-8** et **-16**, ce qui rend difficile la détermination de leurs rôles.

En 2010, Hottiger et collaborateurs ont proposé une autre classification des PARP (qu'ils renomment « ADP-ribosyltransférases » ou ART) en fonction de leur activité de mono- ou poly-(ADP-ribosyl)ation ou bien de l'absence d'activité.

La PARP-1 étant l'enzyme responsable de la grande majorité des PARylation, nous parlerons particulièrement de celle-ci lorsque nous évoquerons « la PARP » tout au long de ce chapitre.

II. LA POLY(ADP-RIBOSYL)ATION

La PARylation est une modification post-traductionnelle consistant à greffer, le plus souvent en réponse à des signaux de stress cellulaire qui engendrent des cassures d'ADN, des chaînes de PARs de tailles

variables, de manière covalente, sur des protéines cibles impliquées notamment dans la régulation de la structure de la chromatine, la transcription génique, la réparation de l'ADN et la mort cellulaire.

La PARylation est un processus très dynamique, de demi-vie très courte (1 à 6 minutes) et réversible, qui dépend, d'une part, de la formation des PARs, et d'autre part, de leur dégradation par la poly(ADP-ribose)glycohydrolase ou PARG.

II.1 Synthèse des PARs

L'activité catalytique de la PARP est principalement régulée par son interaction avec les cassures d'ADN. Dès qu'elle perçoit une cassure simple ou double brin de l'ADN, la PARP augmente la vitesse de catalyse de son substrat, le NAD^+ , augmentant ainsi son activité jusqu'à 500 fois. Le NAD^+ est clivé pour donner une unité ADP-ribose, qui se fixe sur la protéine acceptrice, ainsi que du nicotinamide (Figure 33).

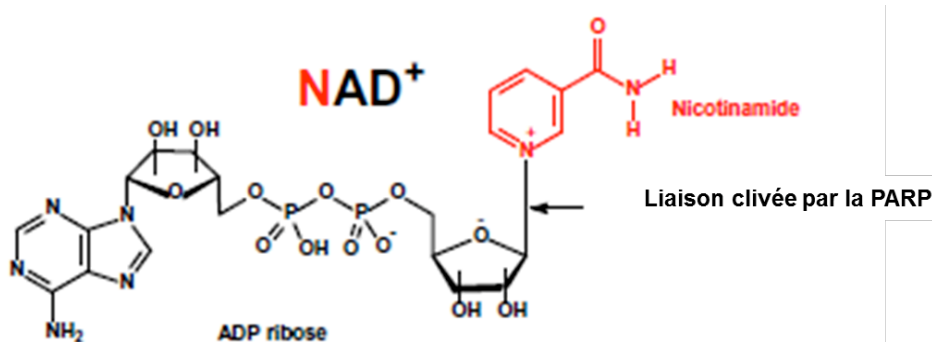


Figure 33. Schéma d'une molécule de NAD^+

D'après Curtin et Szabo, 2013

Ce 1^{er} ADP-ribose est transféré sur un résidu acide glutamique (E), acide aspartique (D) ou lysine (K) *via* une liaison ester (Figure 34). Lors de l'élongation de la chaîne, d'autres unités d'ADP-ribose sont greffées les unes à la suite des autres *via* une liaison O-glycosydique ribose-ribose. Cela conduit à la formation d'une chaîne linéaire qui peut compter jusqu'à 200 unités d'ADP-riboses. Cette chaîne peut également présenter des ramifications ou branches. *In vitro*, on estime que ces ramifications apparaissent tous les 20 à 50 résidus.

Le nicotinamide produit peut être régénéré en NAD^+ grâce à la Nicotinamide MonoNucleotide Adenylyltransferase-1 (NMNAT-1) et entraîne la consommation de 4 molécules d'ATP.

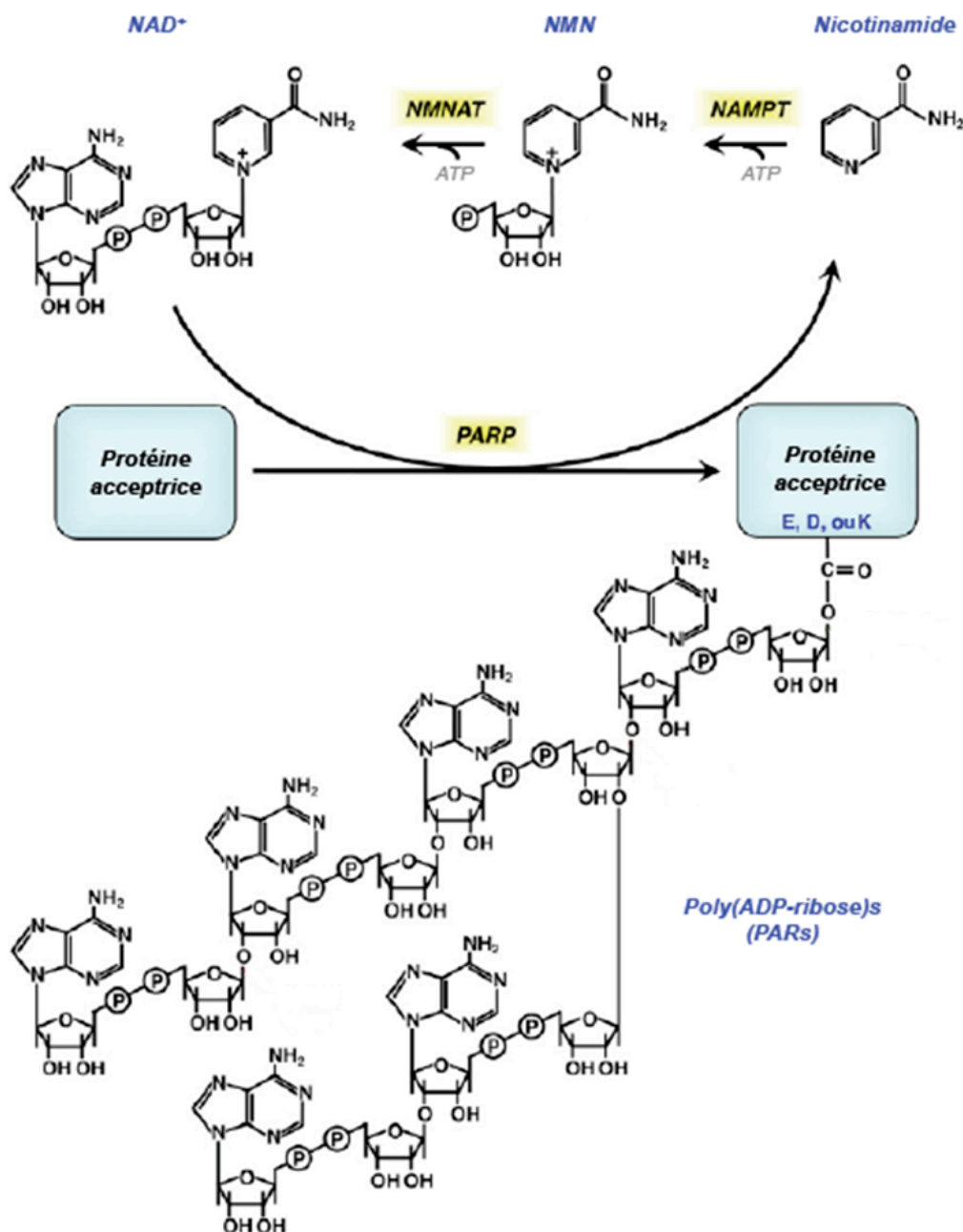


Figure 34. Synthèse des PAR par la PARP et régénération du NAD⁺

D'après Krishnakumar et Kraus, 2010

ATP : Adénosine triphosphate ; D : Acide aspartique ; E : Acide glutamique ; K : Lysine ; NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide ; NAMPT : Nicotinamide phosphoribosyltransférase ; NMN : Nicotinamide mononucléoside ; NMNAT : Nicotinamide mononucléoside adénylyltransférase.

La NMNAT-1, qui catalyse la formation de NAD⁺, est exclusivement nucléaire et est recrutée par la PARP afin de produire le substrat dont elle a besoin localement pour PARyler ses protéines cibles (Kim *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2012).

La principale cible de la PARP est la PARP elle-même, mais elle peut également PARyler de nombreuses protéines, telles que des histones, des facteurs de transcription ou bien encore des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. Ces protéines contiennent toutes un motif de liaison des PARs, nommé PBM, qui chevauche leur domaine fonctionnel, ce qui explique comment les PARs peuvent altérer les propriétés fonctionnelles de leurs cibles. L'accumulation des PARs, chargés négativement, sur leur cible entraîne un phénomène de répulsion électrostatique qui finit par détacher la PARP de sa cible. C'est ainsi qu'est régulée son activité.

II.2 Dégradation des PARs

Les PARs synthétisés par la PARP sont rapidement dégradés par la PARG. Il existe au moins 5 isoformes de PARG chez l'Homme, résultant d'un épissage alternatif. Elles sont localisées dans le cytoplasme, la mitochondrie ou dans le noyau. La seule isoforme nucléaire (110 kDa) n'est présente qu'en faible quantité par rapport à la PARP-1, mais cela est compensé par une importante activité spécifique. En effet, une inhibition minimale de 90% de l'activité PARG est nécessaire pour observer une accumulation de PARs. La PARG possède une activité exo- et endoglycosidase et clive donc les liaisons O-glycosidiques ribose-ribose (Figure 35).

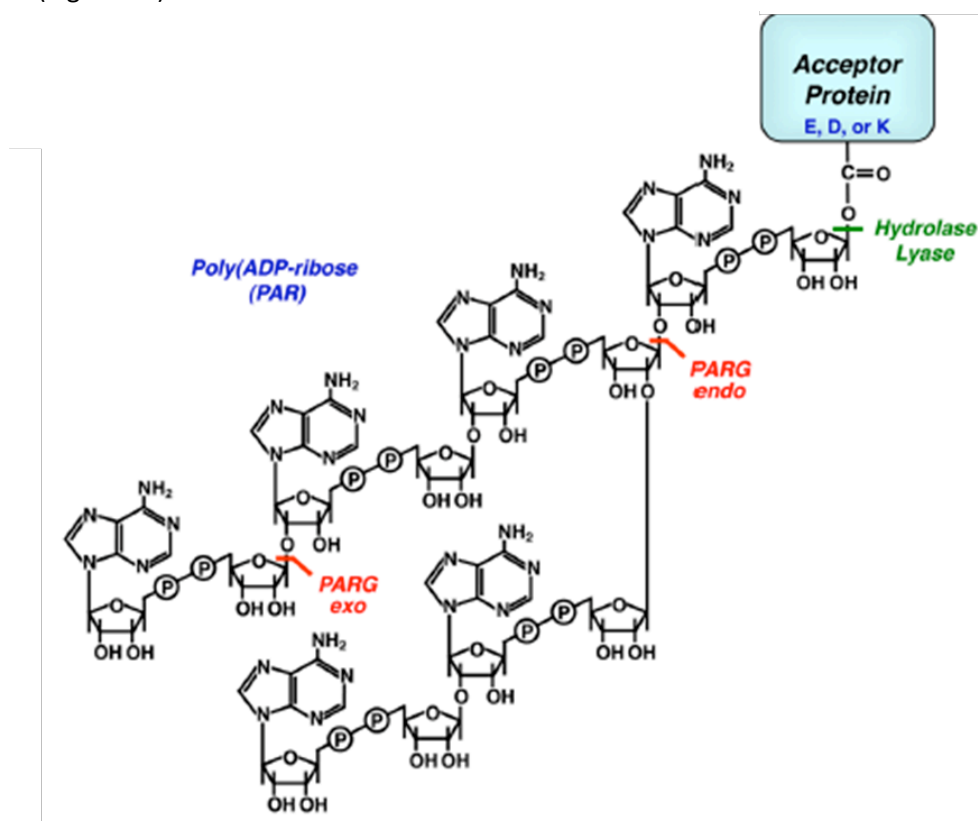


Figure 35. Dégradation des PARs

D'après Krishnakumar et Kraus, 2010

PARG endo : site de clivage endoglycosidase de la PARG ; PARG exo : site de clivage exoglycosidase de la PARG

Les produits de son hydrolyse sont donc des PARs libres et des protéines mono(ADP-ribosyl)ées. D'autres enzymes, comme la mono(ADP-ribosyl)protéine hydrolase ou la mono(ADP-ribosyl)protéine lyase, semblent être impliquées dans le clivage de la liaison du dernier monomère ADP-ribose-protéine (Hassa et Hottiger, 2008).

Le rôle des polymères de PARs clivés reste à confirmer mais ils pourraient transmettre des signaux en se liant à d'autres protéines par leurs motifs de reconnaissance de la PAR.

III. MECANISMES BÉNÉFIQUES DE LA PARP EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES

En conditions physiologiques, où les cassures de l'ADN sont peu nombreuses, l'activité de la PARP reste faible et permet de réguler des processus 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.

III.1 Réparation de l'ADN et stabilité du génome

La PARP est impliquée dans l'organisation spatiale et temporelle de la réparation de l'ADN après des cassures simple ou double brin, et dans la réparation par excision de base. Elle favorise la réparation des cassures, mais ne les répare pas elle-même. En effet, elle peut tout d'abord détecter ces cassures d'ADN grâce à ses motifs en doigt de zinc, puis s'y fixer, ce qui va entraîner son activation (Figure 36). Ainsi, la PARylation des histones, en particulier H1 et H2B, permet la relaxation de la chromatine au niveau du site lésé. Enfin, la PARylation d'autres protéines nucléaires comme XRCC1 (X-ray Repair Cross-Complementing protein 1), l'ADN-polymérase III et l'ADN-ligase III permet leur recrutement au niveau des cassures d'ADN, et finalement, sa réparation.

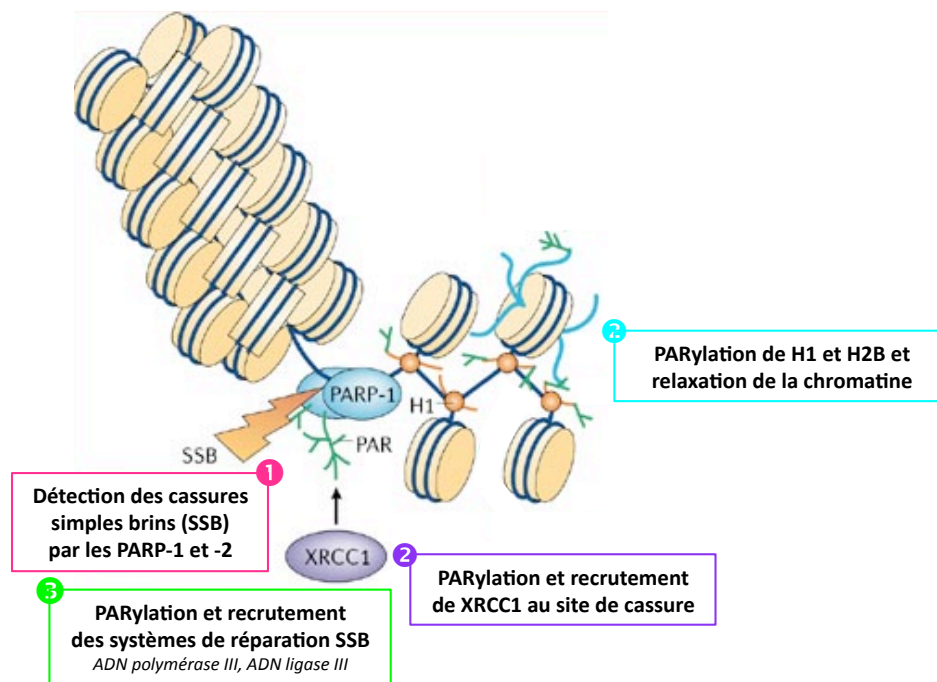


Figure 36. Implication de la PARP dans la réparation de l'ADN

Modifié d'après Schreiber *et al.*, 2006

H1 H2B : Histones 1 et 2B ; SSB : Single Strand Break ; XRCC1 : X-ray Repair Cross-Complementing protein 1

La réparation des anomalies de l'ADN participe au maintien de la stabilité du génome, puisqu'elle limite la conservation des aberrations au cours de la multiplication cellulaire. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et de souris PARP-1 $-/-$ a confirmé l'importance de cette enzyme dans la surveillance et le maintien de l'intégrité du génome.

III.2 Régulation de la transcription génique

La relaxation de la chromatine induite par la PARP rend également les gènes plus accessibles à la machine transcriptionnelle. Par ailleurs, la PARP PARyle également certains facteurs de transcription, comme NF- κ B, ce qui entraîne la répression ou l'activation des gènes sous leur contrôle. Enfin, la PARP peut également modifier l'expression de certains gènes en régulant l'expression et l'activité de l'ADN méthyltransférase-1 (Dnmt1 ; Caiafa *et al.*, 2009) : en inhibant la Dnmt1, la PARP empêche la méthylation du promoteur du gène cible et favorise ainsi sa transcription.

III.3 Régulation du cycle cellulaire

Comme cela a été décrit précédemment, certaines PARP sont présentes au niveau des centrosomes et des télomères, où elles peuvent être associées à des protéines impliquées dans le cycle cellulaire. En réponse à une lésion de l'ADN durant la mitose, la PARP est capable d'interrompre la progression du cycle cellulaire, afin de limiter la réplication des aberrations de l'ADN.

D'autre part, chez des souris PARP-2 ^{-/-} irradiées, on observe un niveau élevé de ségrégation anormale des chromosomes (Amé *et al.*, 2004).

IV. MECANISMES DÉLÉTÈRES DE LA PARP EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES

En conditions pathologiques ou de stress, où les cassures d'ADN sont nombreuses, l'activité de la PARP est considérablement augmentée et entraîne des réponses cellulaires différentes de celles décrites précédemment, conduisant souvent à des effets délétères et non plus bénéfiques (Figure 37).

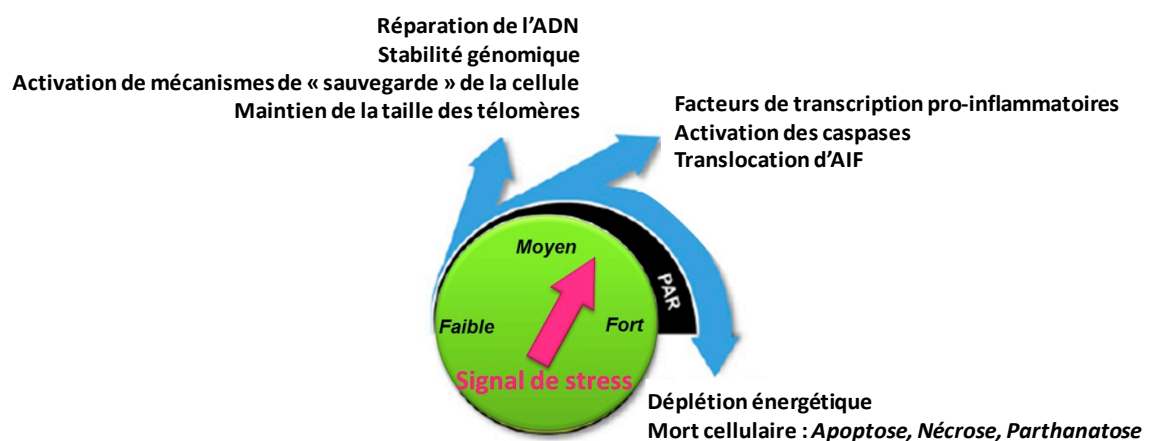


Figure 37. Le « thermostat cellulaire » lié à l'activité de la PARP

Modifié d'après Luo et Kraus, 2012

IV.1 PARP et mort cellulaire

La PARP est impliquée dans différents types de mort cellulaire, selon l'intensité du stress que subit la cellule :

- L'**apoptose** est la mort programmée d'une cellule, en réponse à une situation de stress pathologique. Ce type de mort cellulaire est qualifié de « caspase-dépendante » puisqu'il met en jeu l'activation de caspases suite au dysfonctionnement mitochondrial. En particulier, la caspase 3 reconnaît un motif contenu dans la partie Nter de la PARP-1, ce qui lui permet de la cliver en 2 fragments, l'un de 25 kDa (fragment Nter) et l'autre de 89 kDa (fragment Cter ; Bürkle, 2001 ;

Sodhi *et al.*, 2010). Ce clivage sépare le domaine de liaison à l'ADN de la PARP de son domaine catalytique, ce qui entraîne l'inactivation de l'enzyme. L'objectif de ce clivage est de préserver l'ATP pour engager les étapes de l'apoptose nécessitant des ressources énergétiques.

- La **nécrose** est une mort rapide et incontrôlée, induite par un stress cellulaire très important. Ainsi, lorsque l'ADN est fortement lésé, la PARP est également fortement activée et consomme des quantités importantes de NAD^+ , et par conséquent, beaucoup d'ATP qui est nécessaire à sa régénération. Cette brusque et forte déplétion énergétique entraîne une altération de la membrane plasmique et le relargage du contenu cellulaire dans le milieu extérieur, provoquant une inflammation, des lésions secondaires, et finalement, une réaction en chaîne de mort des cellules environnantes. Ce processus est appelé la « théorie du suicide » (Berger, 1985). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont confirmé cette théorie, puisque l'ajout de NAD^+ ou l'inhibition pharmacologique de la PARP permettent de modérer cette déplétion énergétique, associé à une réduction de la mort cellulaire (Schraufstatter *et al.*, 1986 ; Alano *et al.*, 2004, 2010 ; Ying *et al.*, 2007 ; Ying et Xiong, 2010).
- La PARP est également impliquée dans un 3^{ème} type de mort cellulaire « caspase-indépendante ». En réponse à un stress, les perturbations mitochondriales conduisent à la libération du facteur AIF, qui est ainsi transloqué de la mitochondrie vers le noyau. Cette translocation s'accompagne de la fragmentation de l'ADN, et par conséquent, de la mort de la cellule par **parthanatose** (« par » pour poly-(ADP-ribose) et « thanatos » qui signifie mort en grec ; voir pour revue : Wang *et al.*, 2009b). Cette mort cellulaire est effectivement liée à la PARP, puisque le stress entraîne une hyperactivation de la PARP, une surconsommation de NAD^+ et la synthèse de PARs, entraînant une dépolarisation de la membrane mitochondriale, la formation de pores de perméabilité et par conséquent le relargage d'AIF (Strosznajder *et al.*, 2010).

IV.2 PARP et inflammation

La PARP interagit avec de nombreux partenaires impliqués dans les phénomènes de l'inflammation et elle participe notamment à l'expression de gènes pro-inflammatoires sous la dépendance du facteur de transcription NF- κ B qu'elle régule. Dans un modèle murin de choc endotoxinique (induit par l'injection de lipopolysaccharides ou LPS), la délétion du gène de la PARP modifie l'expression des gènes sous la dépendance de NF- κ B et réduit ainsi l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Hassa et Hottiger, 1999; Oliver *et al.*, 1999). Dans un modèle de septicémie, les souris PARP-/- présentent des taux plasmatiques de TNF α , d'IL-6 et -10 très inférieurs par rapport à ceux des souris sauvages, associés à une diminution « clinique » de l'inflammation et une meilleure survie des animaux (Soriano *et al.*, 2002). Chez des souris apolipoprotéine E -/-, utilisées pour développer de l'athérosclérose, l'inhibition pharmacologique ou génique de la PARP diminue l'expression de gènes codant pour des molécules

d'adhésion, telles que VCAM-1 et les P- et E-sélectines, et limite l'inflammation (von Lukowicz *et al.*, 2008). La réduction de l'expression de ces molécules à la surface des cellules limite l'adhésion et la migration des cellules inflammatoires au niveau du site de lésion et diminue ainsi l'inflammation.

Toutes ces études montrent bien que la régulation de l'expression de gènes *via* la PARP peut moduler les réponses inflammatoires.

V. INHIBITEURS DE LA PARP

In vivo, l'activité de la PARP peut être régulée par des modifications post-traductionnelles (acétylation, phosphorylation, ubiquitinylation), mais elle est surtout inhibée par le nicotinamide, son inhibiteur endogène, à partir duquel ont été synthétisés d'autres inhibiteurs pharmacologiques. Dans ce paragraphe, nous développerons quelques exemples de molécules (voir pour revue Curtin et Szabo, 2013).

Le point commun entre tous les inhibiteurs de PARP est la présence d'un groupement amide au sein de leur structure. Ce groupement, que l'on retrouve aussi dans le nicotinamide (Figure 38), est primordial, car il permet d'établir la liaison avec le site de fixation du NAD^+ sur la PARP. C'est pourquoi ce groupement est également présent sur le NAD^+ (Figure 38). Ainsi, les inhibiteurs de PARP exercent leurs effets en entrant en compétition avec le substrat de l'enzyme pour empêcher son fonctionnement.

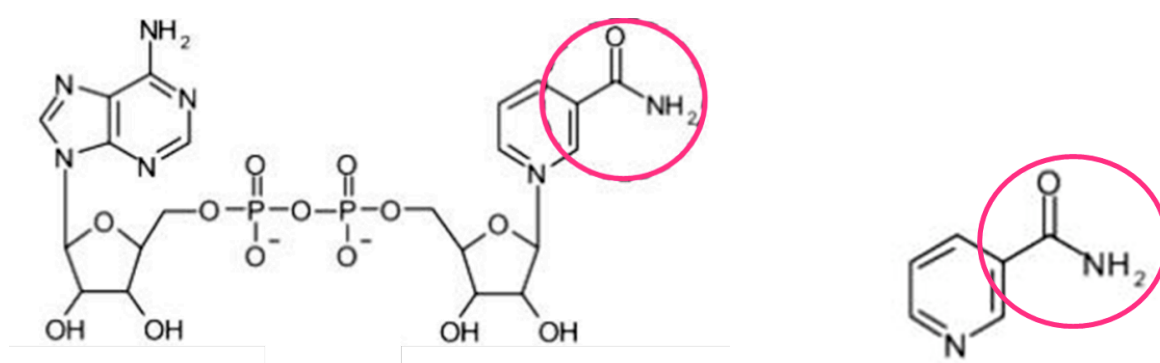


Figure 38. Structures du NAD^+ (à gauche) et du nicotinamide (à droite)

Le groupement amide (entouré en rouge) permet la fixation au site de liaison du NAD^+ sur la PARP

Le **nicotinamide** est un produit de la réaction de PARylation, qui permet de réguler négativement l'activité de la PARP, mais avec une faible puissance, puisque la concentration nécessaire pour inhiber

50% de l'activité PARP (CI50) est de 210 μ M. Les inhibiteurs de PARP ont été développés à partir de sa structure.

La 1^{ère} classe d'inhibiteurs de PARP synthétisée est celle des **benzamides**, dans lesquels l'azote en position 3 du cycle a été substitué par un carbone. Le chef de file de cette classe est le 3-aminobenzamide (3-AB), dans lequel un groupement amine a été greffé sur le carbone en position 3, afin d'augmenter sa solubilité (Figure 39; Durkacz *et al.*, 1980).

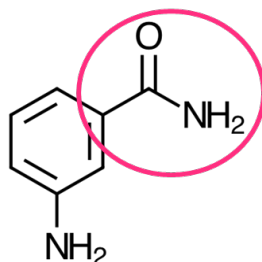


Figure 39. Structure du 3-aminobenzamide

Le 3-AB a été très utilisé en laboratoire pour étudier les fonctions de la PARP. Une étude de 1980 a démontré que le 3-AB inhibait la réparation des cassures d'ADN induites par un agent alkylant, le diméthylsulfate, et augmentait ainsi la cytotoxicité de ce composé (Durkacz *et al.*, 1980). Les benzamides ne sont pas des inhibiteurs puissants de la PARP : la CI50 du 3-AB est de 33 μ M.

Ils ont donc été modifiés pour donner de nouvelles classes d'inhibiteurs plus puissants, avec des CI50 de l'ordre du nanomolaire, et plus spécifiques comme les **isoquinolinones** (ex : 5-aminoisoquinolinone ou 5-AIQ), les **isoquinolines** (ex : le MP-124), les isoindolinones (ex : INO-1001) ou les **phénanthridiones** (ex : PJ-34).

Le chef de file des phénanthridiones est le N-(6-oxo-5,6-dihydrophénanthridin-2-yl)-(N,N-diméthylacétamide) ou PJ34 qui possède une CI50 de 17 nM (Figure 40). Le PJ34, synthétisé par les laboratoires Inotek pour établir la preuve de concept du rôle de la PARP dans différentes situations pathologiques, s'est montré efficace dans de nombreux modèles expérimentaux d'ischémies, notamment cérébrales (voir paragraphe suivant).

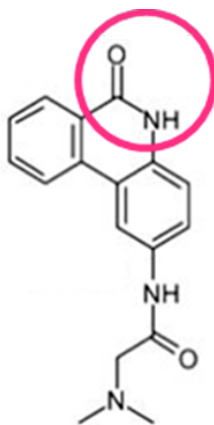


Figure 40. Structure du PJ34

En 2006, Alano et collaborateurs ont montré que la minocycline, une **tétracycline** utilisée depuis les années 1970 pour ses propriétés antibiotiques, était également un puissant inhibiteur de PARP, dont la CI_{50} est de l'ordre du nanomolaire (Figure 41).

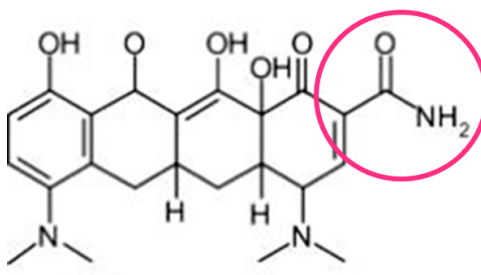


Figure 41. Structure de la minocycline

De nouveaux composés ont été récemment développés comme l'INO-1001, un puissant inhibiteur de PARP ($CI_{50} < 15$ nM) de la famille des **isoindolinones** (Figure 42). Cette molécule est actuellement en essais cliniques dans le traitement de l'ischémie myocardique.

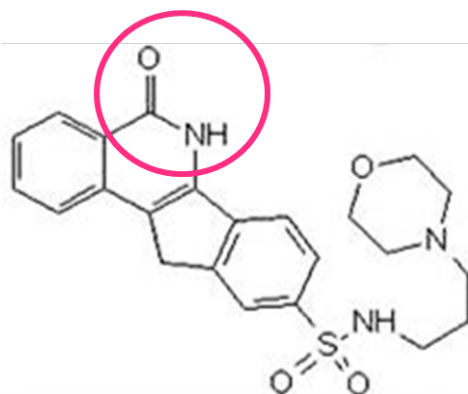


Figure 42 . Structure du INO-1001

Actuellement, une dizaine d'inhibiteurs de PARP, comme par exemple l'Olaparib (Astra Zeneca), le Veliparib (Abbott), ou l'Iniparib (BiPar–Sanofi Aventis) sont en essais cliniques, pour la plupart en cancérologie.

L'utilisation de ces molécules dans l'ischémie cérébrale pourrait être une approche envisageable, puisque les arguments en faveur de l'implication délétère de la PARP dans cette pathologie sont de plus en plus nombreux.

VI. RÔLE DE LA PARP DANS L'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE

Comme nous l'avons vu précédemment (voir le chapitre AVC, paragraphe III), l'ischémie cérébrale provoque une cascade physiopathologique dont la production d'un stress oxydant. Les radicaux libres entraînent des cassures de l'ADN qui vont donc provoquer une hyperactivation de la PARP dans les neurones, mais aussi dans les cellules endothéliales, microgliales et astrocytaires (Moroni et Chiarugi, 2009).

Chez l'Homme, l'activation post-ischémique de la PARP a été mise en évidence par l'augmentation de la formation des PARs sur des coupes de cerveaux de patients décédés d'un arrêt cardiaque (Love *et al.*, 1999). Sairanen et collaborateurs (2009) ont confirmé la formation de PARs et donc l'activation post-ischémique de la PARP post-mortem chez des patients victimes d'AVCi.

Des études expérimentales *in vivo* ont également montré une augmentation de la PARylation dans le cerveau après ischémie/reperfusion (Endres *et al.*, 1998).

Deux études publiées en 1997 ont été les premières à décrire des effets protecteurs chez des souris PARP-1 *-/-* ischémisées (Eliasson *et al.*, 1997 ; Endres *et al.*, 1997). En effet, ces animaux présentaient une réduction de la lésion cérébrale d'au moins 60% par rapport aux souris sauvages. Dans ces études, la formation d'ADP-riboses était augmentée et les quantités de NAD⁺ diminuées dans les tissus issus de souris sauvages alors qu'aucune formation de PARs n'avait été observée chez les animaux PARP-1 *-/-* et que les taux de NAD⁺ étaient préservés. De plus, une étude de Goto et collaborateurs (2002) a montré que les souris PARP-1 *-/-* étaient protégées contre l'ischémie cérébrale, mais que cette protection disparaissait après la transfection virale du gène de la PARP-1.

Il est important de noter que la délétion du gène de la PARP-1 s'est révélée protectrice chez les souris mâles par rapport aux souris sauvages mâles, alors que l'inverse est observé chez les femelles, c'est-à-dire une aggravation de la lésion chez les mutantes (Liu *et al.*, 2011).

Depuis, de nombreuses études ont confirmé que les inhibiteurs de la PARP-1, tels que le 3-AB, le PJ34, la minocycline et l'INO-1001, réduisent la lésion cérébrale et les déficits fonctionnels post-ischémiques dans des modèles d'ischémie cérébrale transitoire (Yrjänheikki *et al.*, 1998 ; Takahashi et Greenberg, 1999 ; Ding *et al.*, 2001 ; Couturier *et al.*, 2003 ; Fox *et al.*, 2005 ; Morimoto *et al.*, 2005 ; Haddad *et al.*, 2006 ; Hayakawa *et al.*, 2008 ; Egi *et al.* 2011) ou permanente (Haddad *et al.*, 2008 ; Egi *et al.*, 2011) chez le rat et la souris.

En 2011, Matsuura et collaborateurs ont montré l'effet protecteur du MP-124 dans des modèles d'ischémie cérébrale permanente et transitoire chez le singe, en mettant en évidence une diminution du volume de l'infarctus et du déficit neurologique (Matsuura *et al.*, 2011). Un autre point important de cette étude est que ces effets ont été observés aussi bien chez les mâles que chez les femelles.

Ainsi, le rôle délétère de la PARP dans l'ischémie cérébrale est aujourd'hui clairement établi. Pour l'expliquer, plusieurs hypothèses sont avancées (voir pour revues : Strosznajder *et al.*, 2010 ; Curtin et Szabo, 2013) :

1) Théorie de la déplétion énergétique

Lors d'une ischémie cérébrale, la privation en oxygène et en glucose, d'une part, et l'hyperactivation post-ischémique de la PARP, qui entraîne une forte consommation de NAD⁺ et donc d'ATP, d'autre part, conduisent à une déplétion massive des stocks énergétiques cellulaires et à la mort cellulaire. Malgré des résultats parfois contradictoires (Endres *et al.*, 1997), il semble que l'inhibition génique ou pharmacologique de la PARP soit bénéfique indépendamment de la restauration des stocks énergétiques (Goto *et al.*, 2002), ce qui suggère que d'autres mécanismes peuvent être à l'origine des effets délétères de la PARP dans l'ischémie cérébrale.

2) PARP et mort cellulaire par parthanatose

Il a été montré que l'INO-1001 diminue la taille de la lésion cérébrale et la translocation d'AIF dans des modèles d'ischémie cérébrale focale transitoire ou permanente (Komjáti *et al.*, 2004). De plus, dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire, la lésion était diminuée chez les souris PARP-1 ^{-/-} par rapport aux animaux sauvages et cet effet s'accompagnait d'une diminution de l'accumulation d'AIF dans le noyau et de l'augmentation post-ischémique de la formation de PARs (Li *et al.*, 2010). Ces données montrent donc que la mort par parthanatose induite par la PARP participe aux effets délétères post-ischémiques.

3) PARP et inflammation

Plusieurs études ont démontré l'implication de la PARP dans l'inflammation post-ischémique. En effet, il a été montré, notamment au sein du laboratoire, que l'inhibition de la PARP par le 3-AB diminue l'infiltration des PMN dans un modèle d'ischémie cérébrale focale chez la souris (Couturier *et al.*, 2003). Par ailleurs, dans un autre modèle d'ischémie cérébrale transitoire, notre laboratoire a mis en évidence que la diminution de 26% de la lésion cérébrale et l'amélioration fonctionnelle chez les animaux traités par le PJ34 (25 mg/kg), s'accompagnaient d'effets anti-inflammatoires, notamment par une diminution de l'expression des ARNm de TNF α , d'IL-6, de la E-sélectine et d'ICAM-1 (Haddad *et al.*, 2006).

D'autres études dans des modèles d'ischémie cérébrale transitoire ont également montré que le 3-AB diminue l'expression post-ischémique de NF- κ B et d'ICAM-1 (Koh *et al.*, 2004 et 2005).

4) PARP et transformations hémorragiques

Des travaux ont également été menés sur l'implication de la PARP dans les TH post-ischémiques, notamment au laboratoire, où, dans un modèle murin d'ischémie cérébrale permanente, le PJ34 (6,25 mg/kg) a réduit les TH, associé à une réduction du volume d'infarctus et du déficit moteur (Haddad *et al.*, 2008). Cet effet pourrait passer par la dégradation de la BHE *via* les MMP, puisque la surexpression de la MMP-9 a été réduite d'environ 60% chez ces mêmes animaux, confirmant ainsi les résultats d'autres études (Koh *et al.*, 2005).

Par ailleurs, Crome et collaborateurs (2007) ont montré que le rt-PA, en potentialisant l'activation des récepteurs NMDA, augmentait l'activation de la PARP au cours de l'ischémie cérébrale.

Au laboratoire, le PJ34 s'est opposé aux effets délétères induit par l'administration post-ischémique de rt-PA, en termes de TH et de déficits fonctionnels, dans un modèle murin d'ischémie cérébrale permanente (Haddad *et al.*, 2013 ; Teng *et al.*, 2013).

A l'heure actuelle, les inhibiteurs de PARP semblent donc constituer une stratégie thérapeutique très intéressante en monothérapie pour le traitement des AVCi, mais aussi en association avec le rt-PA. De plus, les molécules actuellement testées en essais cliniques en cancérologie semblent être bien tolérées par les patients, du moins à court terme.

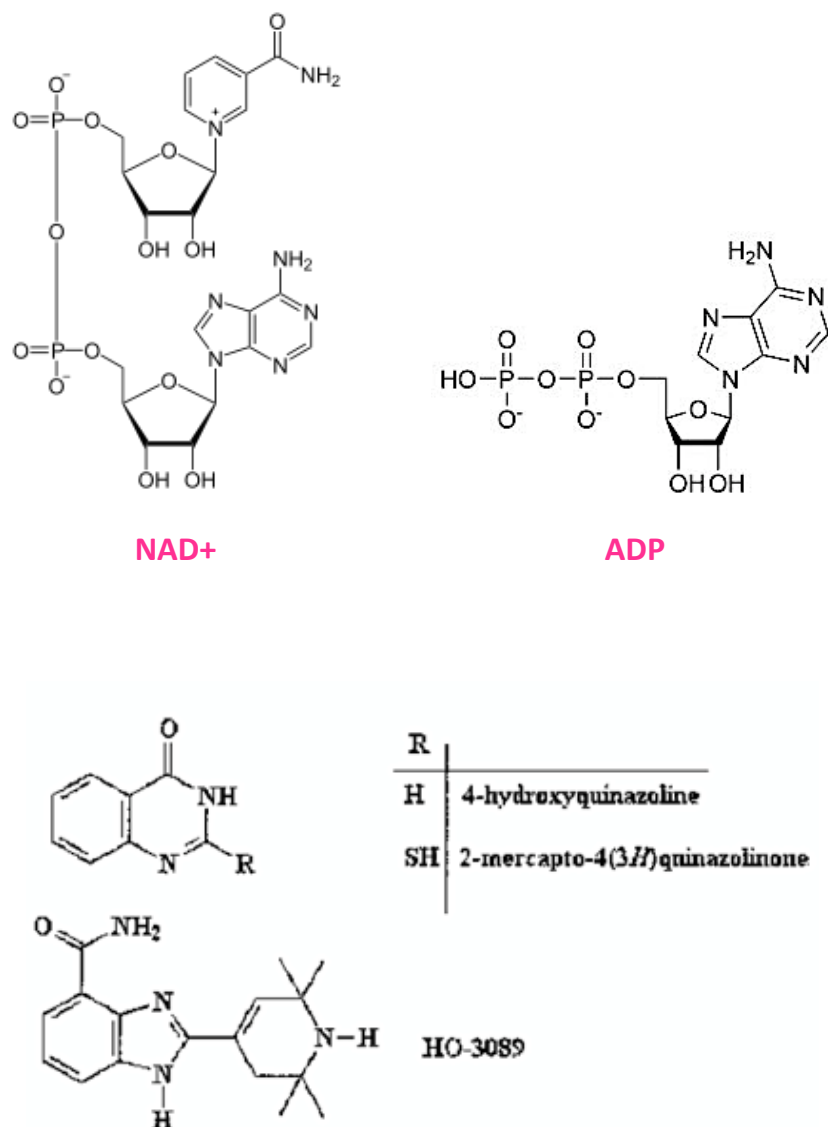
VII. RÔLE DE LA PARP DANS L'ACTIVATION ET L'AGRÉGATION PLAQUETTAIRES

Nous avons vu que la PARP jouait un rôle délétère au cours de l'ischémie cérébrale. Par ailleurs, nous avons montré que les plaquettes *via* leur rôle thrombo-inflammatoire, contribuaient également à la formation de la lésion. Cependant, il existe très peu de données sur le rôle de la PARP dans les phénomènes d'activation et d'agrégation plaquettaires.

Tout d'abord, au cours de la dernière décennie, 2 études *in vitro* ont évalué l'effet d'inhibiteurs de PARP sur l'agrégation plaquettaire (Alexy *et al.*, 2004 ; Tóth *et al.*, 2006). La PARP étant une enzyme essentiellement nucléaire, ces études peuvent paraître surprenantes. Néanmoins, l'étude d'Alexy et collaborateurs est née de l'hypothèse que la ressemblance structurelle de certains inhibiteurs de PARP avec la partie adénine du NAD⁺, pourrait inhiber l'agrégation plaquettaire en se liant aux récepteurs plaquettaires de l'ADP, P2Y1 et/ou P2Y12. Trois inhibiteurs (le 4-hydroxyquinazoline, le 2-mercapto-4(3H)-quinazolinone et le HO-3089) ont ainsi été testés sur des échantillons de sang total de volontaires sains et ont réduit l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP de manière dose-dépendante (à partir de 20 µM pour le HO-3089 et de 500 µM pour les autres inhibiteurs), sans modifier les agrégations induites par le collagène ou l'adrénaline. Par ailleurs, l'augmentation des concentrations d'ADP a conduit à une perte de l'effet inhibiteur, suggérant une éventuelle compétition avec l'ADP pour ses récepteurs. Cette étude a été la 1^{ère} à évoquer un effet antiagrégant plaquettaire des inhibiteurs de PARP, non pas par l'inhibition de la PARP, mais potentiellement par une ressemblance structurelle avec l'ADP (Figure 43).

En 2006, Tóth et collaborateurs ont évalué *in vitro* l'effet de l'INO-1001 sur du PRP issu d'échantillons de sang de volontaires sains, mais contrairement à l'étude précédente, l'INO-1001 s'est révélé sans effet sur l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP ou encore l'adrénaline. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette différence. Tout d'abord, la structure chimique de l'INO-1001 est différente de celle des inhibiteurs de PARP testés par l'équipe d'Alexy. Par ailleurs, la différence majeure entre les 2 études réside dans les concentrations d'inhibiteurs testées. En effet, Alexy et collaborateurs (2004) ont choisi de fortes concentrations comprises entre 10 et 1500 µM, qui correspondent à des doses supra-thérapeutiques, et n'ont observé un effet qu'à partir de 20 ou 500 µM selon l'inhibiteur. En revanche, l'INO-1001 a été testé à des concentrations cohérentes avec une administration *in vivo*, le plus souvent comprises entre 0,1 et 10 µM.

Ainsi, il semblerait que les inhibiteurs de PARP testés dans ces études ne présentent des propriétés anti-agrégantes qu'à très fortes concentrations.



Inhibiteurs de PARP testés par Alexy et al., 2004

4-hydroxyquinazolinone, 2-mercapto-4(3H)quinazolinone, HO-3089

Figure 43. Structures du NAD⁺, de l'ADP et des inhibiteurs de PARP testés par Alexy et collaborateurs (2004)

A côté de cet effet « PARP-indépendant », d'autres études suggèrent également que l'inhibition de l'activité PARP pour inhiber l'activation et l'agrégation plaquettaires.

Comme nous l'avons vu précédemment, la PARP régule l'activation de différents facteurs de transcription impliqués dans l'expression de nombreuses protéines impliquées dans l'inflammation, dont celle des molécules d'adhésion (Jagtap et Szabo, 2005 ; Moroni et Chiarugi, 2009). Or, ces molécules d'adhésion jouent notamment un rôle clé dans l'adhésion des plaquettes aux cellules

endothéliales et dans l'agrégation plaquettaire (Tabuchi et Kuebler, 2008), ce qui pourrait contribuer à la formation de nouveaux thrombi.

Dans un modèle *in vivo* d'ischémie/reperfusion hépatique chez la souris, Khandoga et collaborateurs (2002) ont montré que la délétion du gène de la PARP réduit, d'une part, la translocation de la P-sélectine et l'expression post-ischémiques des ARNm de la E-sélectine, d'ICAM-1 et de VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux hépatiques, et d'autre part, les interactions entre cellules endothéliales, leucocytes et plaquettes. Ces effets s'accompagnent d'une meilleure perfusion tissulaire.

La même équipe a montré qu'un traitement par le 5-AIQ (3 mg/kg) diminue également l'adhésion des plaquettes et des leucocytes sur la paroi des vaisseaux et améliore la perfusion hépatique (Khandoga *et al.*, 2004). Par ailleurs, la lésion post-ischémique, caractérisée par une augmentation des cellules apoptotiques et nécrotiques, est également réduite par le 5-AIQ. Même si le traitement n'a pas diminué la mortalité post-ischémique des animaux, il permet néanmoins de prolonger la survie des animaux traités par rapport au groupe contrôle.

Ces données suggèrent donc que la PARP peut contribuer à la lésion post-ischémique hépatique en augmentant l'expression et la translocation des molécules d'adhésion, qui s'accompagne d'une accumulation des plaquettes et des leucocytes sur les cellules endothéliales.

Enfin, dans un modèle d'inflammation pulmonaire induit par perfusion de LPS, l'inhibition de la PARP par le 3-AB réduit l'augmentation de l'expression des P- et E-sélectines sur les cellules endothéliales et le recrutement des plaquettes (Kieffmann *et al.*, 2004).

BUT DU TRAVAIL

A la suite d'un AVCi, les cliniciens sont confrontés à plusieurs problèmes d'ordre vasculaire, à savoir (1) reperfusion des tissus ischémiés par le rt-PA, (2) éviter les TH, ainsi que (3) les phénomènes de réocclusion précoce ou tardive.

Comme nous venons de le voir, il est clairement établi qu'après une ischémie cérébrale l'hyperactivation de la PARP est, d'une part, neurotoxique, et d'autre part, contribue aux TH spontanées ou induites par le rt-PA, en favorisant la dégradation des composants de la BHE.

Plusieurs données récentes de la littérature suggèrent que l'inhibition de la PARP pourrait également réduire les phénomènes de réocclusion, et ceci *via* l'inhibition de l'activation et/ou de l'agrégation plaquettaires.

Jusqu'à ce jour, les effets de la PARP sur les fonctions plaquettaires ont été très peu étudiés. Toutefois, les seules données dont on dispose suggèrent que les inhibiteurs de PARP pourraient inhiber l'activation et/ou l'agrégation plaquettaires post-ischémiques, et ce, selon 2 mécanismes :

- un mécanisme « PARP-indépendant », qui permettrait à certains inhibiteurs de PARP d'exercer un effet anti-agrégant *via* une analogie structurale avec des agonistes plaquettaires comme l'ADP (Alexy *et al.*, 2004).
- un mécanisme « PARP-dépendant » lié à l'effet anti-inflammatoire des inhibiteurs de PARP. En effet, l'inhibition pharmacologique ou génique de la PARP dans un modèle d'ischémie/reperfusion hépatique a permis de réduire l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales hépatiques, ainsi que l'adhésion des plaquettes et des leucocytes sur la paroi endothéliale, et ces effets se sont accompagnés d'une protection et d'une meilleure perfusion des tissus ischémiés (Khandoga *et al.*, 2002 et 2004). Mais à l'heure actuelle, il n'existe aucune donnée sur les effets plaquettaires des inhibiteurs de PARP dans l'ischémie cérébrale.

Au vu de ces données, nous nous sommes interrogés sur les éventuels effets de l'inhibition de la PARP sur l'agrégation plaquettaire. En effet, il nous est apparu nécessaire de rechercher si la réduction des TH après un traitement par les inhibiteurs de PARP ne serait pas liée, au moins en partie, à une activité pro-agrégante, qui compromettrait leur association avec le rt-PA. A l'inverse, une éventuelle activité anti-agrégante des inhibiteurs de PARP constituerait un élément favorable susceptible d'améliorer la reperfusion et/ou de diminuer les risques de réocclusion.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a consisté à évaluer les effets plaquettaires « PARP-indépendant » et « PARP-dépendant » à l'aide d'un puissant inhibiteur de PARP, le PJ34. Pour cela, mon projet de recherche s'est articulé en 2 parties.

Dans la 1^{ère} partie, nous avons réalisé une étude *in vitro* dont le but était d'évaluer l'effet du PJ34 sur l'agrégation plaquettaire induite par différents agonistes (ADP, collagène et des agonistes des récepteurs à la thrombine), sur du sang humain et murin, en le comparant à celui de 3 autres inhibiteurs de PARP de structures chimiques différentes (3-AB, minocycline et INO-1001).

La 2^{ème} partie de ce travail a comporté plusieurs études *in vivo* :

- Au vu des résultats obtenus dans la 1^{ère} partie, nous avons tout d'abord étudié les effets du PJ34 et de la minocycline sur l'hémostase, en utilisant 3 tests d'exploration des fonctions plaquettaires chez la souris : le temps de saignement, des modèles de thromboembolie pulmonaire et un modèle de thrombose carotidienne induite par le FeCl₃.
- Nous avons ensuite recherché si l'inhibition de la PARP par le PJ34 interagissait avec l'activité thrombolytique du rt-PA dans un modèle de thrombose par occlusion de l'ACM par le FeCl₃ récemment mis au point (Karatas *et al.*, 2011).
- Enfin, afin de pouvoir étudier la contribution de la PARP dans l'activation et l'agrégation plaquettaires à la suite d'une ischémie cérébrale, nous avons évalué, dans un modèle endovasculaire d'ischémie cérébrale transitoire chez la souris, les cinétiques (1) de l'activation plaquettaire (sPsélectine) au niveau sérique, (2) de l'expression des molécules d'adhésion et (3) de l'adhésion des plaquettes sur les cellules endothéliales au niveau cérébral.

L'ensemble de ces travaux doit permettre d'établir un argument supplémentaire en faveur des inhibiteurs de PARP qui pourraient en effet présenter l'avantage, par rapport à toutes les molécules qui se sont révélées inefficaces dans les essais cliniques, de combiner 3 effets bénéfiques : (1) un effet neuroprotecteur, (2) un effet vasculoprotecteur en réduisant les TH post-ischémiques spontanées ou induites par le rt-PA et enfin (3) un effet anti-agrégant susceptible de diminuer le risque de réocclusion post-ischémique, mais également d'améliorer la thrombolyse en permettant (1) d'accroître le taux de recanalisation et (2) de réduire les doses de rt-PA et donc ses effets délétères.

MATERIEL ET METHODES

Toutes les expériences (à l'exception des tests d'agrégation plaquettaire *in vitro* sur sang humain) ont été réalisées chez des souris mâles Swiss (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) en accord avec la directive du Conseil de la Communauté Européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC) et les réglementations françaises (D2001-486) sur la protection des animaux utilisés en expérimentation.

I. EVALUATION DE L'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE *IN VITRO*

Cette partie a été réalisée en collaboration avec le Dr Christilla BACHELOT-LOZA de l'unité INSERM 765 « Thrombose : épidémiologie, physiopathologie, thérapeutiques innovantes » dirigée par le Pr Pascale GAUSSEM, au sein de la Faculté de Pharmacie de l'Université Paris Descartes.

I.1 Prélèvement de sang et préparation du Plasma Riche en Plaquettes (PRP)

Les tests d'agrégation plaquettaires *in vitro* ont été réalisés, d'une part, chez l'Homme, dans une perspective clinique, et chez la souris d'autre part, afin de caractériser les modèles expérimentaux utilisés. Les tubes sont citratés, afin d'empêcher le sang de coaguler pendant et après les prélèvements. L'intérêt du citrate est de chélater les ions calciques de manière réversible, ce qui permet ensuite de réaliser les tests d'agrégation.

En raison des différences entre les plaquettes humaines et murines, le protocole de préparation du PRP est différent selon l'origine de l'échantillon de sang.

I.1.1 Chez l'Homme

- **Prélèvement de sang**

D'après la convention (C CPSL UNT No. 12/EFS/064) entre l'Université Paris Descartes et l'EFS (Établissement Français du Sang) et avec l'accord des donateurs volontaires sains, les prélèvements ont été réalisés lors de dons du sang, au sein de l'EFS Saint-Vincent de Paul et de l'EFS Trinité, à Paris. Les patients traités par l'aspirine sont exclus. Le sang a été recueilli dans des tubes BD Vacutainer® citratés (trisodium citrate 3,8%) de 5 ml, à raison de 1 à 3 tubes par donneur.

- **Préparation du PRP**

Les tubes de sang sont centrifugés à 133 g pendant 20 minutes à 25°C (Centrifugeuse OrtoAlresa Digtor 21 R, Madrid, Espagne). Les surnageants de PRP d'un même donneur sont ensuite prélevés et poolés dans un Falcon de 50 ml.

Les tubes, débarrassés du PRP, sont à nouveau centrifugés à 2630 g pendant 20 minutes à 25°C. De la même façon, les surnageants de Plasma Pauvre en Plaquettes (PPP) d'un même donneur sont prélevés et poolés dans un Falcon de 50 ml.

La concentration plaquettaire du PRP est déterminée à l'aide de l'automate Cell Coulter Z1® (Beckman Coulter, Brea, USA) ou du compteur de cellules MS9-3V (Melet Schloesing Pharmaceuticals, La Chaux-de-Fonds, Suisse), puis ajustée à $2,7 \pm 0,5 \cdot 10^8$ plaquettes/ml avec le PPP autologue afin de normaliser tous les échantillons.

I.1.2 Chez la Souris

- **Prélèvement de sang**

Le sang est prélevé chez des souris de 38 à 45 g, anesthésiées par injection intrapéritonéale (i.p. ; 50 µl/10 g) de pentobarbital disodique dilué au 1/4 dans du NaCl à 0,9% (65 mg/kg ; Ceva Santé Animale, Libourne, France). Les souris sont placées en décubitus dorsal et une incision est réalisée au niveau de la paroi abdominale, puis au niveau de la cage thoracique, afin de dégager le cœur. Le prélèvement est réalisé par ponction intracardiaque dans le ventricule droit avec une aiguille de 23G et une seringue de 2 ml préalablement coatées avec une solution de citrate à 130 mM (citrate trisodique, réf. 27833294, Normapur Prolabo), doucement et en prenant soin de ne pas faire de bulles afin de limiter l'activation des plaquettes. Dans ces conditions, le volume de sang recueilli est d'environ 1 ml par souris. Les prélèvements de plusieurs souris sont poolés dans un tube à hémolyse de 5 ml, contenant 500 µl de citrate à 130 mM, afin de respecter une proportion sang:citrate de 9:1 (concentration finale de citrate : 13 mM).

- **Préparation du PRP**

Les tubes de sang sont centrifugés à 230 g pendant 11 minutes à 25°C (Centrifugeuse OrtoAlresa Digtor 21 R). Le surnageant, correspondant au PRP, est prélevé et mis dans un Falcon de 50 ml. Les tubes, débarrassés du PRP, sont à nouveau centrifugés à 2630 g pendant 20 minutes à 25°C. De la même façon, le surnageant de PPP est recueilli dans un Falcon de 50 ml.

La concentration plaquettaire du PRP est déterminée à l'aide de l'automate Cell Coulter Z1[®] ou du compteur de cellules MS9-3V. En raison d'un nombre de plaquettes beaucoup plus élevé chez la souris par rapport à l'homme et du volume limité de PPP, la concentration plaquettaire murine est ajustée à $3,0 \pm 0,5 \cdot 10^8$ plaquettes/ml avec le PPP autologue.

I.2 Préparation des réactifs

Afin de ne pas induire de lyse cellulaire, les différents réactifs sont préparés de telle sorte que le volume de solutions aqueuses déposé dans les tubes de PRP ne dépasse pas 10% du volume total de l'échantillon.

I.2.1 Agonistes

De nombreux récepteurs sont présents à la surface des plaquettes et leurs agonistes permettent d'induire l'agrégation plaquettaire en explorant différentes voies. Dans nos expériences, nous avons utilisé l'ADP, le collagène et des peptides activateurs des récepteurs à la thrombine PAR1 (PAR1ap ou TRAP6) pour les études chez l'homme et PAR4 (PAR4ap) pour les études chez la souris (Tableau II).

Tableau II. Agonistes utilisés dans les tests d'agrégation plaquettaire

Agoniste	Récepteur cible	Référence et fournisseur	Solvant	Concentration finale
ADP	P2Y1 P2Y12	Réf. 127507, F. Hoffmann La Roche Ltd, Bâle, Suisse	Eau bidistillée	1,5 à 10 μ M
Collagène	GPVI, $\alpha_2\beta_1$ (vWF, GPIb-IX-V)	kit SKF Solution, réf. 1130630 Nycomed, Zurich, Suisse	Solution du kit (glucose isotonique)	Homme : 0,5 à 2 μ g/ml Souris : 6 à 8 μ g/ml
PAR1ap	PAR1	Réf. H-2936, Bachem, Bubendorf, Suisse	Eau bidistillée	1 à 2 μ M
PAR4ap	PAR4	Réf. H-6046, Bachem, Bubendorf, Suisse	Eau bidistillée	80 à 200 μ M

I.2.2 Inhibiteurs de PARP

Nous avons testé 4 inhibiteurs de PARP de classes chimiques différentes : le PJ34, le 3-AB (réf. A0788, Sigma-Aldrich), la minocycline (réf. M9511, Sigma-Aldrich) et l'INO-1001. Notre choix s'est porté sur des molécules bien caractérisées et/ou actuellement en essais cliniques dans le cadre de pathologies cardiovasculaires.

Le PJ34 est dissout dans de l'eau bidistillée, afin d'obtenir des concentrations finales de 0,1 à 1000 μ M.

Le 3-AB, la minocycline et l'INO-100 sont dissouts dans de l'eau bidistillée, afin d'obtenir une concentration finale de 50 μ M.

I.3 Tests d'agrégation

I.3.1 Principe

Affichage des courbes d'agrégation

Le test d'agrégation plaquettaire permet de mesurer la capacité des plaquettes d'un échantillon de PRP à agréger en présence d'un agoniste. Il est réalisé selon une méthode turbidimétrique à l'aide d'un agrégomètre à 8 canaux PAP8E (Bio/Data Corporation, Horsham, USA ; Figure 44).

Canaux pour 8 tubes

Figure 44. Agrégomètre à 8 canaux PAP8E



En pratique, les plaquettes au repos sont en suspension dans le milieu et rendent l'échantillon opaque. Le rayon lumineux émis par l'agrégomètre n'est donc que faiblement transmis. En revanche, après l'ajout de l'agoniste, les plaquettes activées s'agrègent entre elles et le milieu s'éclaircit, ce qui se traduit par une plus forte transmission lumineuse (Figure 45).

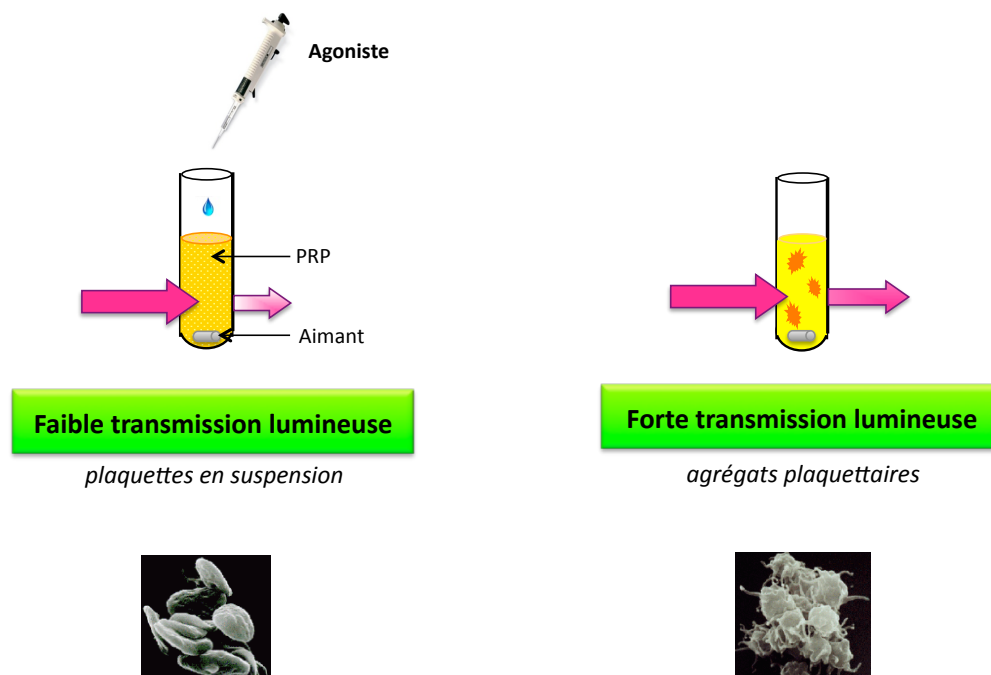


Figure 45. Principe du test d'agrégation plaquettaire

PRP : plasma riche en plaquettes

Le témoin utilisé est du PPP, c'est-à-dire un milieu clair et sans plaquettes, correspondant à un échantillon où les plaquettes seraient totalement agrégées : il représente donc une agrégation de 100% (Figure 46). Chaque donneur ou pool de souris est ainsi son propre témoin.

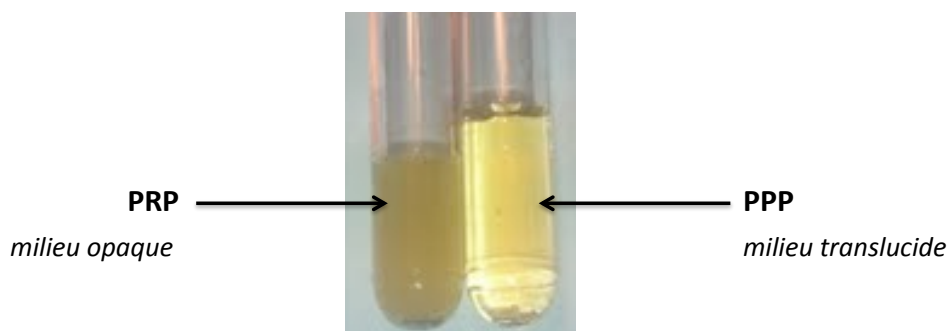


Figure 46. Echantillons de PRP et de PPP

Le résultat est exprimé en pourcentage d'agrégation. Il correspond au rapport de la transmission lumineuse de l'échantillon après ajout de l'agoniste et de celle du témoin.

I.3.2 Protocole

Le témoin est préparé dans une cuve en verre siliconé en déposant 230 μ l de PPP et 20 μ l d'eau bidistillée, afin d'obtenir un volume final de 250 μ l.

Chaque échantillon est également préparé dans une cuve en verre siliconé, en déposant 230 μ l de PRP + 10 μ l d'inhibiteur de PARP ou de solvant (eau bidistillée) et un barreau aimanté qui permet d'homogénéiser le contenu du tube sous agitation. Les échantillons sont agités pendant 2 secondes, puis incubés pendant 10 minutes à 37°C sans agitation, avant la mesure.

Les échantillons sont ensuite placés à 37°C sous agitation (1000 rpm). Le tracé est d'abord enregistré pendant 2 minutes afin de vérifier sa stabilité, puis 10 μ l d'agoniste sont ajoutés afin de déclencher l'agrégation (volume final 250 μ l). Le tracé d'agrégation est suivi pendant 6 minutes.

I.3.3 Expression des résultats

Le logiciel intégré à l'agrégomètre permet de mesurer 4 paramètres pour chaque échantillon :

- le maximum d'agrégation (MA), qui correspond à l'agrégation maximale atteinte pendant la durée de l'enregistrement. Dans le cas de l'ADP, l'agrégomètre est capable de distinguer chez l'Homme un MA pour la 1^{ère} phase (P2Y1-dépendante) et pour la 2^{nde} phase (P2Y12-dépendante) d'agrégation (Figure 47),
- l'agrégation finale (FA), qui correspond à l'agrégation atteinte à la fin de l'enregistrement,

- la désagrégation (DA), correspondant à l'agrégation maximale à laquelle on soustrait l'agrégation finale,
- l'aire sous la courbe (AUC), qui correspond à la surface sous la courbe d'agrégation.

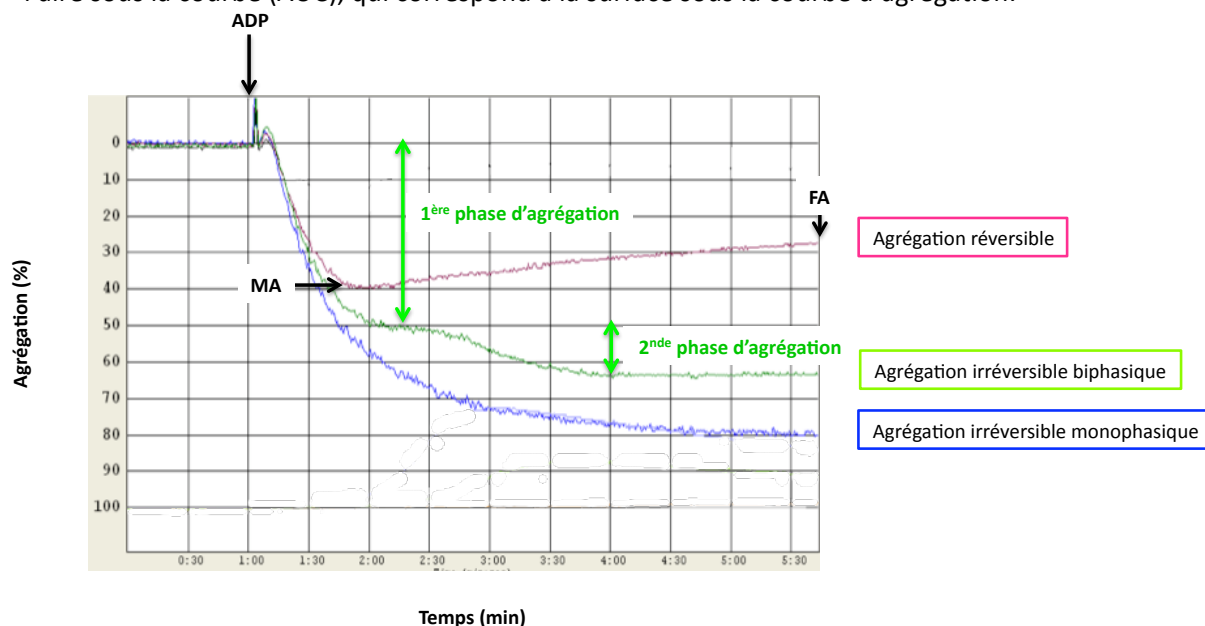


Figure 47. Les différents profils d'agrégation induite par l'ADP observés chez l'Homme

I.4 Evaluation de l'état de phosphorylation de VASP dans les plaquettes

Pour cela, nous avons utilisé le kit PLT VASP/P2Y12 (réf. 7014, Biocytex, Marseille, France), utilisé en clinique pour évaluer la réponse des patients au traitement par le clopidogrel.

I.4.1 Principe

VASP est une protéine intra-plaquettaire dont la phosphorylation est régulée par la voie de l'AMPc. Dans les conditions du test, la PGE1 est utilisée pour activer des protéines kinases dépendantes de l'AMPc et ainsi induire la phosphorylation de VASP (VASP-P) qui est associée à un état d'inactivation des plaquettes (Figure 48 ; voie 1). Au contraire, l'ADP, *via* les récepteurs P2Y12, inhibe cette cascade et conduit au maintien de VASP sous une forme non phosphorylée, qui est liée à l'activation plaquettaire (Figure 48 ; voie 2).

Les inhibiteurs du récepteur P2Y12 inhibent l'effet de l'ADP, ce qui est mis en évidence par la persistance de VASP-P induite par la PGE1 (Figure 48 ; voie 3).

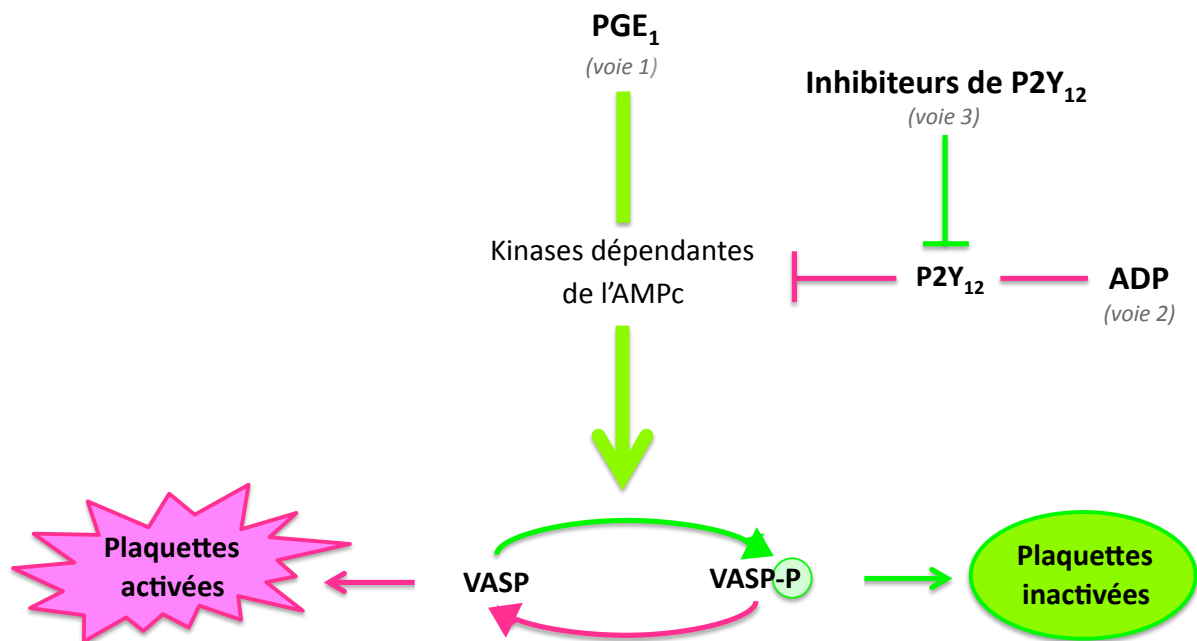


Figure 48. Principe d'évaluation de l'état de phosphorylation de VASP dans les plaquettes

I.4.2 Protocole

Le sang total de donneurs volontaires sains est prélevé sur tubes BD Vacutainer® citratés, au sein de l'EFS Saint-Vincent de Paul et de l'EFS Trinité, comme décrit précédemment (paragraphe I.1.1).

Le sang est pré-incubé pendant 10 minutes avec le PJ34 à différentes concentrations (100, 250, 500 ou 1000 µM) ou son solvant (eau bidistillée).

Les échantillons sont ensuite incubés avec la PGE1 (= **Témoin positif de VASP-P**) ou de la PGE1 + ADP pendant 10 minutes, puis fixés.

Les cellules sanguines sont ensuite perméabilisées et marquées avec un anticorps (Ac) primaire monoclonal spécifique de la protéine VASP-P sur la sérine en position 239 (16C2) ou son contrôle isotopique négatif (= **Témoin négatif**).

Les échantillons sont enfin incubés avec un mélange d'Ac secondaires : un Ac dirigé contre l'Ac primaire anti-VASP-P, couplé au FITC, et un Ac anti-CD61 couplé à la Phycoérythrine, qui permet le contre-marquage des plaquettes (Figure 49).

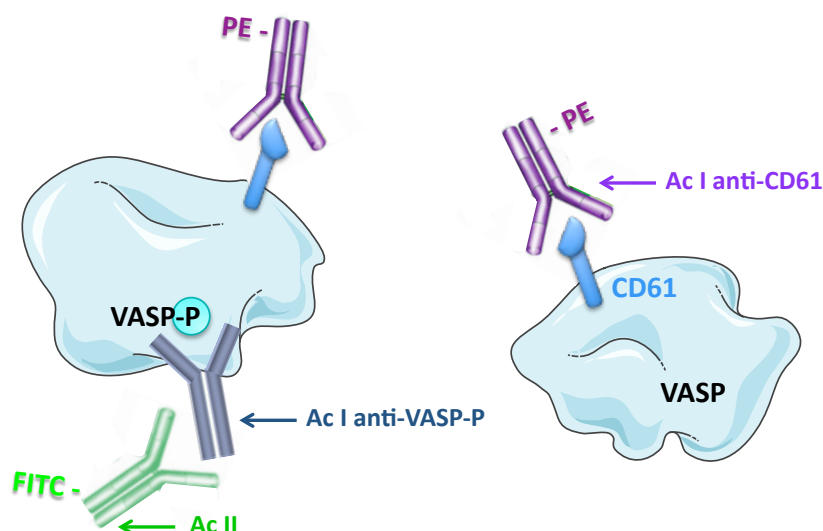


Figure 49. Marquage de VASP-P dans les plaquettes

Ac I, II : anticorps primaire, secondaire ; PE : Phycoérythrine ; VASP : vasodilator stimulated phosphoprotein ; VASP-P : VASP phosphorylée

I.4.3 Expression des résultats

Les mesures sont effectuées à l'aide d'un cytomètre de flux BD FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). A l'aide du logiciel BD CellQuest Pro (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), deux cytogrammes sont tracés (Figure 50):

- FS LOG x SS LOG, qui représente la taille des éléments (Forward Scatter, FS) en fonction de leur granularité (Side Scatter, SS),
- FL1 LOG x FL2 LOG, qui représente la fluorescence émise par le marquage de VASP-P-FITC en fonction de la fluorescence émise par le contre-marquage plaquettaire CD61-PE.

L'analyse du tube Témoin positif (PGE1 seule) permet de définir les réglages nécessaires à la lecture des autres tubes. Ainsi, sur le cytogramme FS LOG x SS LOG, on définit la région R1 correspondant aux plaquettes, afin d'exclure les débris cellulaires et les leucocytes.

Le cytogramme FL1 LOG x FL2 LOG est conditionné à cette région R1. Le comptage dans R1 est ensuite réglé à 10 000 évènements. Sur le cytogramme FL1 LOG x FL2 LOG, on définit la région R2, afin d'isoler les plaquettes FL2+ des débris FL2-. On note alors la valeur de la fluorescence sur l'axe des ordonnées.

Les autres tubes sont analysés en conservant cette fenêtre R2 et les paramètres de FS, SS, FL1 et FL2.

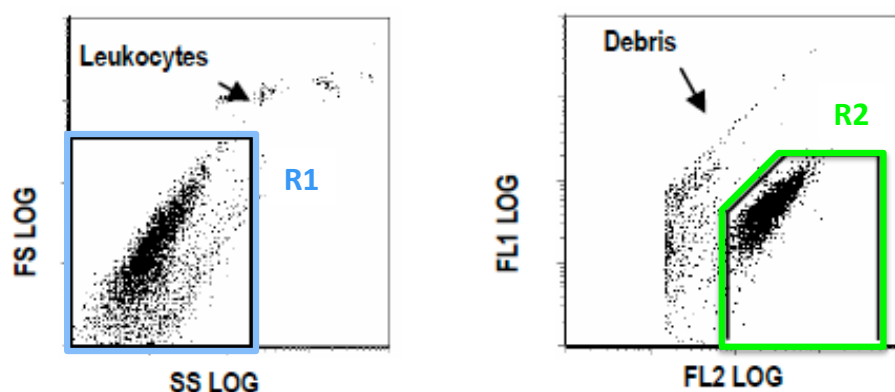


Figure 50. Sélection des régions d'intérêt sur les cytogrammes lors de la cytométrie de flux de VASP-P

Les résultats bruts sont corrigés par soustraction de la valeur du témoin négatif et exprimés en intensité moyenne de fluorescence (MFI). L'index de réactivité plaquettaire (PRI) est calculé en utilisant les MFI en présence de PGE1 seule ou de PGE1 + ADP + PJ34 ou son solvant selon la formule suivante :

$$PRI_{PGE1 + ADP \pm PJ34} = [(MFI_{PGE1} - MFI_{PGE1 + ADP \pm PJ34}) / MFI_{PGE1}] \times 100$$

Ainsi, plus le PRI est faible, plus le taux de VASP-P est élevé, ce qui correspond à un état d'inactivation du récepteur P2Y12, associé à une inactivation plaquettaire.

II. TESTS D'EXPLORATION DES FONCTIONS PLAQUETTAIRES *IN VIVO*

II.1 Modèle de temps de saignement

Le temps de saignement (TS) est mesuré selon la méthode décrite par Grüner et collaborateurs (2004). Les souris sont anesthésiées (ip ; 100 µl/10 g) par un mélange de kétamine (50 mg/kg ; Clorketam 1000, Vetoquinol, Paris, France) et de xylazine (6 mg/kg ; Rompun 2%, Bayer, Leverkusen, Allemagne) et placées dans une couveuse maintenue à 30 ± 0,5°C, le temps qu'elles s'endorment. Environ 7 minutes plus tard, les souris sont placées sur une couverture chauffante reliée à une sonde rectale (Harvard Apparatus Ltd, Edenbridge, Angleterre), afin de les maintenir en normothermie à 37 ± 0,5 °C. La queue est coupée à 3 mm de son extrémité à l'aide d'un scalpel (Figure 51).



Figure 51. Schéma du modèle de TS

Le sang est absorbé avec un papier filtre (cellulose type 11A, Ø 55 mm, Roth, Lauterbourg, France) sans toucher la plaie, toutes les 15 secondes, jusqu'à ce que n'apparaisse plus de sang sur le papier. L'expérience est limitée à 20 minutes.

Trente minutes, 1 heure, 2 heures ou 3 heures avant la réalisation du test, les souris reçoivent une injection i.p. (100 µl/10 g) de PJ34 à 25 mg/kg, de minocycline à 90 mg/kg ou de solvant (NaCl à 0,9%). Nous avons choisi de fortes doses s'étant révélées neuroprotectrices au laboratoire (Haddad *et al.*, 2006 ; Homsy *et al.*, 2009) et dans la littérature (Cho *et al.*, 2007) dans des modèles d'ischémie cérébrale ou de traumatisme crânien.

La durée du temps saignement est exprimée en secondes.

II.2 Modèles de thromboembolie pulmonaire

D'après les résultats obtenus au cours des premiers tests d'agrégation plaquettaire chez l'Homme, nous avons choisi de réaliser le modèle de thromboembolie pulmonaire (TEP) en utilisant les deux agonistes suivants, couramment utilisés dans la littérature : l'ADP (Teng *et al.*, 1997) et le collagène associé à l'adrénaline (Pozgajova *et al.*, 2006).

Les souris sont placées dans une boîte à contention (Figure 52). L'ADP (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) ou le mélange de collagène (réf. 1130630, Nycomed kit SKF Solution) / adrénaline (réf. E4642, Sigma-Aldrich) sont injectés par voie intraveineuse (i.v. 0,05 ml/10 g ; aiguille de 27G) dans la veine latérale de la queue, en environ 10 secondes.

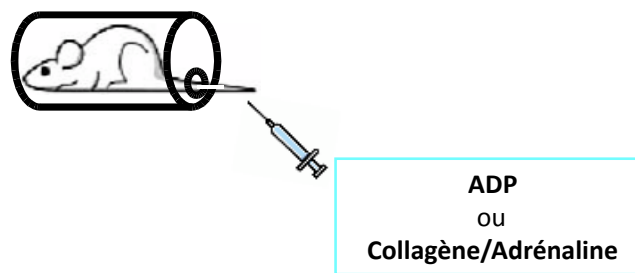


Figure 52. Schéma du modèle de TEP

Trente minutes ou 3 heures avant la réalisation du test, les souris reçoivent une injection i.p. de PJ34 (25 mg/kg), de minocycline (90 mg/kg) ou de solvant (NaCl à 0,9%).

Nous avons noté le temps (en secondes) au bout duquel les souris meurent et déterminé le taux de mortalité au bout de 10 minutes.

II.3 Modèle de thrombose carotidienne induite par le chlorure ferrique

Les souris sont anesthésiées par un mélange de kétamine/xylazine, selon les mêmes modalités que dans le test du temps de saignement, puis placées en décubitus dorsal sur une couverture chauffante reliée à une sonde rectale (Harvard Apparatus Ltd, Edenbridge, Angleterre) afin de les maintenir en normothermie à $37 \pm 0,5$ °C. La peau est incisée au niveau du cou afin de dégager l'artère carotide commune (ACC) gauche, autour de laquelle est placée une sonde à ultrasons (Transonic systems inc., Emka Technologies, Falls Church, USA) sur laquelle a été préalablement déposé du gel Aquasonic 100 (Parker ; Figure 53). Cette sonde permet de suivre l'évolution du débit et donc l'occlusion de l'artère.

Une pastille de papier filtre (Filtre sans cendres n°111, Durieux) de 2 mm de diamètre est découpée à l'aide d'un emporte-pièce (réf. 24214-02, FST) puis plongée dans une solution aqueuse de chlorure ferrique FeCl_3 à 15% (réf. 157740, Sigma-Aldrich) préparée quotidiennement, au moins 20 minutes avant le début de l'expérience. La pastille, saturée en FeCl_3 , est ensuite placée pendant 4 minutes sur l'ACC gauche. Le débit artériel est suivi pendant 20 minutes.

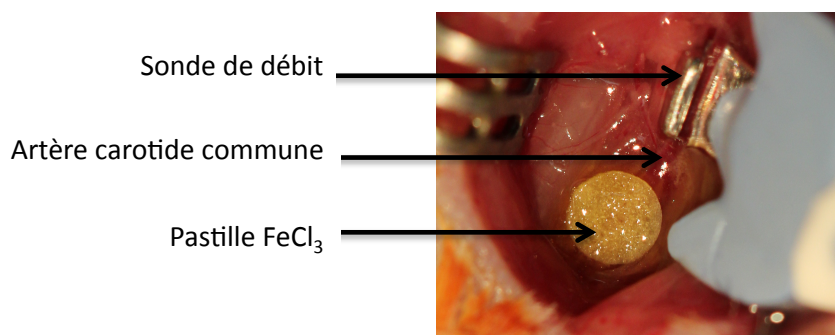


Figure 53. Modèle de thrombose carotidienne par application d'une pastille de FeCl_3

Trente minutes ou 3 heures avant la réalisation du test, les souris reçoivent une injection i.p. de PJ34 (25 mg/kg), de minocycline (90 mg/kg) ou de solvant (NaCl à 0,9%).

Nous avons noté le temps au bout duquel le débit carotidien est nul, ce qui correspond au temps d'occlusion complète.

III. MODÈLE DE THROMBOSE DE L'ACM INDUITE PAR LE FeCl_3

Ce modèle, adapté d'après celui développé par Karatas et collaborateurs en 2011, consiste à appliquer une pastille imprégnée de FeCl_3 sur un segment de l'ACM afin de provoquer son occlusion.

Ce modèle est réalisé chez des souris anesthésiées par un mélange de kétamine/xylazine, selon les mêmes modalités que précédemment. Les souris sont placées sur une couverture chauffante reliée à une sonde rectale (Harvard Apparatus Ltd, Edenbridge, Angleterre) afin de les maintenir en normothermie à $37 \pm 0,5$ °C. L'ensemble de la chirurgie est réalisé sous une loupe binoculaire (Zeiss S1, Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne). La solution de FeCl_3 , préparée quotidiennement, est réalisée par dilution du FeCl_3 (réf. 157740S, Sigma-Aldrich) dans de l'eau bidistillée. La solution est préparée au moins 20 minutes avant son utilisation.

Après avoir incisé la peau entre l'œil et l'oreille gauches, la crête osseuse du crâne est dégagée. Une craniectomie est réalisée au niveau de la bifurcation de l'ACM, en prenant soin de ne pas abîmer la dure-mère. Une pastille de papier filtre (Sans cendres n°111, Durieux, diamètre 1,2 mm) imprégnée de la solution de FeCl_3 est déposée sur la dure-mère au niveau de la bifurcation de l'ACM et laissée en place durant 3 minutes. L'occlusion de l'ACM est suivie pendant 30 minutes après la pose de la pastille en mesurant le débit sanguin cérébral (DSC) à l'aide d'une sonde laser Doppler (MoorLAB, Moor Instruments, Millwey, Angleterre) positionnée en aval de la zone occluse.

Les animaux sont répartis en 4 groupes et reçoivent un prétraitement par le PJ34 (25 mg/kg ; ip ; 10 ml/kg) ou son solvant (NaCl 0,9%) et une administration de rt-PA (10 mg/kg ; 10% bolus i.v. + 90% en perfusion) ou son solvant (NaCl 0,9%) selon le protocole décrit dans la 2^{ème} partie des Résultats (paragraphe II).

Nous avons évalué différents paramètres à partir du suivi du DSC (Figure 54):

- le temps d'occlusion maximale
- le début de la chute du DSC
- la fin de la chute du DSC
- la durée de la chute de DSC

- le délai de $\frac{1}{2}$ chute du DSC
- l'AUC, c'est-à-dire l'aire sous la courbe de DSC

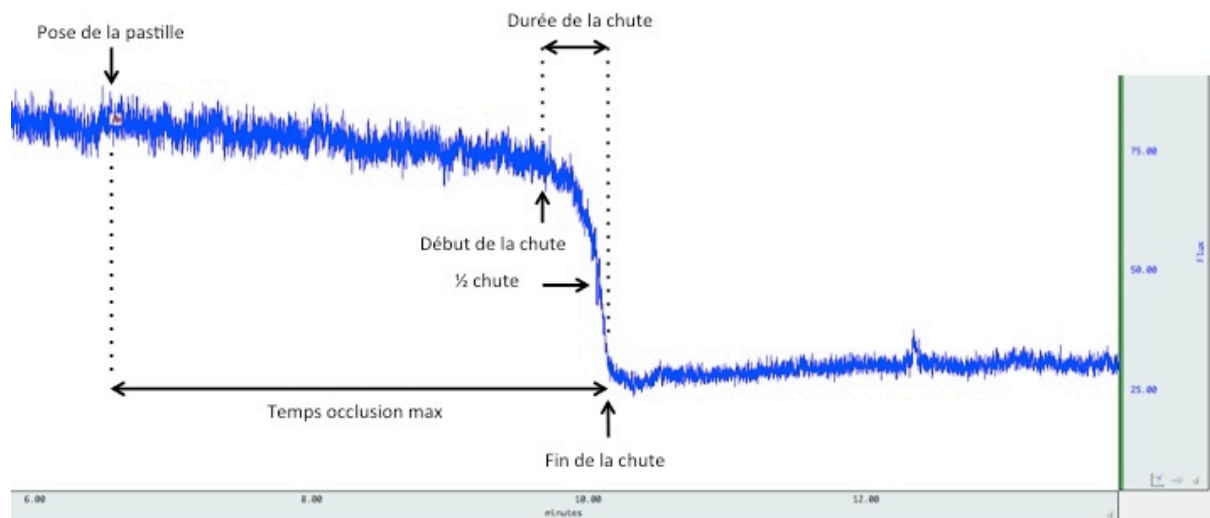


Figure 54. Tracé du DSC et paramètres évalués dans le modèle de thrombose de l'ACM par le FeCl_3

IV. MODELE ENDOVASCULAIRE D'ISCHEMIE CÉRÉBRALE FOCALE TRANSITOIRE

Ce modèle consiste à occlure de façon transitoire (1 heure) l'ACM gauche par voie endovasculaire, selon la technique décrite par Clark et collaborateurs (1997).

Ce modèle est réalisé chez des souris anesthésiées par un mélange de kétamine/xylazine, selon les mêmes modalités que précédemment. L'ensemble de la chirurgie est réalisé sous une loupe binoculaire (Zeiss S1, Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

Après avoir incisé la peau entre l'œil et l'oreille gauches, l'os du crâne est dégagé. À l'aide d'une colle cyanoacrylate (Super Glue 3 Loctite, Henkel, France), une sonde laser Doppler (MoorLAB, Moor Instruments, Millwey, Angleterre) est mise en place, afin de mesurer le DSC dans le territoire de l'ACM.

Les souris sont ensuite placées en décubitus dorsal sur une couverture chauffante reliée à une sonde rectale (Harvard Apparatus Ltd, Edenbridge, Angleterre) afin de les maintenir en normothermie à $37 \pm 0,5$ °C. La peau est incisée au niveau du cou et une goutte de xylocaïne à 1% (AstraZeneca, Rueil Malmaison, France) est déposée sur le plan superficiel. Les glandes salivaires sont dégagées, puis les muscles sterno-cléido-mastoïdiens sont dilacérés afin de dégager les artères carotides commune (ACC) et externe (ACE) gauches. Après avoir soigneusement dégagé le nerf vague, l'ACC est temporairement occluse au niveau proximal par un fil de soie (5-0 Ethicon FK870, Issy les Moulineaux, France). L'artère occipitale est cautérisée à l'aide d'une pince électrique bipolaire afin de dégager l'artère carotide interne (ACI) et la bifurcation de l'ACM. L'ACI est temporairement occluse par un fil de soie. L'ACE est

ligaturée au niveau distal par un fil de soie. Un autre fil de soie est placé au niveau proximal. Une artériotomie est ensuite réalisée entre les 2 fils, afin d'y introduire un filament de nylon (diamètre : 80 µm, Sensas, Feeling Competition, France) dont l'extrémité a été préalablement recouverte d'une colle thermofusible (diamètre final : environ 190 µm pour une souris de 30 g ; Jet Melet, Radiospares, Beauvais, France). Le filament est délicatement poussé jusqu'à ce que son extrémité vienne occlure l'origine de l'ACM gauche (Figure 55).

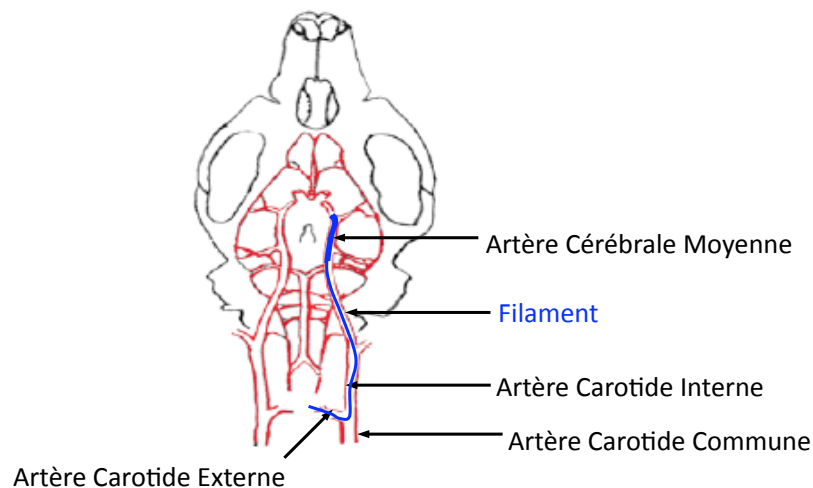


Figure 55. Modèle endovasculaire d'ischémie cérébrale focale transitoire

L'occlusion de l'ACM est contrôlée par la mesure de la chute du DSC. Après avoir vérifié la stabilité du DSC pendant 2 minutes, le filament est maintenu en place par un fil de soie noué autour de l'ACE, afin d'empêcher d'éventuels déplacements.

La chute du DSC est alors calculée selon la formule suivante :

$$[(DSC \text{ initial} - DSC \text{ final}) / DSC \text{ initial}] \times 100.$$

Les souris présentant une chute de DSC inférieure à 50% de la valeur de base sont exclues.

Les souris sont ensuite replacées dans une couveuse thermostatée à $30 \pm 0,5$ °C. Après 50 minutes, les souris sont réanesthésiées par une 1/2 dose du mélange kétamine/xylazine si besoin.

Après 1 heure d'occlusion, le filament est retiré pour permettre la reperfusion. La plaie est suturée à l'aide d'un fil de polyamide (4/0 Ethicon F2416, Issy les Moulineaux, France).

Afin de prévenir la déshydratation des animaux, une administration sous-cutanée de 0,5 ml de NaCl à 0,9% est réalisée en fin de journée. Les animaux sont ensuite placés dans une couveuse thermostatée à $30 \pm 0,5$ °C avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*, jusqu'au moment de leur euthanasie.

Dans nos études, nous avons également inclus des animaux témoins non opérés (naïfs) et des animaux témoins opérés (shams), qui ont subi l'ensemble de la chirurgie à l'exception de l'insertion du filament de nylon.

V. ÉVALUATION DES DÉFICITS FONCTIONNELS

Les souris sont placées dans la pièce de comportement au moins 15 minutes avant le début de la batterie de tests sensorimoteurs. Pour tous ces tests, plus le score est petit, plus le déficit est important. Ils sont réalisés 24 heures après l'ischémie dans l'ordre décrit ci-dessous.

V.1 Test des cercles

Ce test est réalisé en premier, car il mesure l'exploration de la souris et sa motricité spontanée. Ce test a été modifié d'après le test de « sortie de cercle » de Leinhausen et collaborateurs (2006) et adapté dans notre laboratoire par Marianne Haddad (2008).

Le dispositif est constitué d'une feuille, disposée sur un plan de travail bien dégagé, sur laquelle sont dessinés trois cercles concentriques de 15, 30 et 45 cm de diamètre. Chaque espace formé est numéroté de l'extérieur vers le centre de 1 à 5. La souris est posée au centre des cercles (zone 5) et son déplacement est observé pendant 30 secondes (Figure 56).

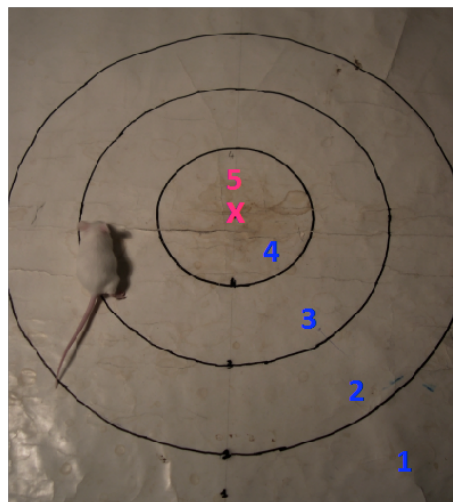


Figure 56. Test des cercles

La cotation de ce test se fait sur 10 points (Tableau III).

Tableau III. Cotation du test des cercles

Description	Score
La souris atteint la zone 1 entre 0 et 10 s	10
entre 11 et 20 s	9
entre 21 et 30 s	8
La souris atteint la zone 2 entre 0 et 10 s	7
entre 11 et 20 s	6
entre 21 et 30 s	5
La souris atteint la zone 3 entre 0 et 10 s	4
entre 11 et 20 s	3
entre 21 et 30 s	2
La souris reste dans la zone 4 pendant les 30 s du test	1
La souris reste au point 5 pendant les 30 s du test	0

V.2 Score neurologique sur 13 points

Ce test est une adaptation chez la souris des différents items du score neurologique réalisé chez le rat au laboratoire (Wahl *et al.*, 1992). Il permet d'évaluer la présence de différents réflexes sensorimoteurs. Une lésion cérébrale à gauche induit un déficit du côté droit.

Chaque item est affecté d'une cotation partielle (de 0 à 3 points selon l'item ; voir Tableaux IV à VIII), dont la somme maximale est de 13 points.

V.2.1 Circling

Ce test est réalisé en même temps que le test des cercles. Le circling est ipsilatéral, c'est-à-dire que la souris se déplace en tournant vers la gauche. Le « rolling » est le fait que la souris roule latéralement sur elle-même et passe donc du ventre sur le dos.

Tableau IV. Cotation du circling

Description	Score
La souris fait du « rolling »	0
La souris fait de petits cercles	1
La souris fait de grands cercles	2
La souris se déplace de façon aléatoire	3

V.2.2 Réflexe d'agrippement

La souris est maintenue en contention par la peau du cou, en laissant les pattes avant suffisamment libres de leurs mouvements. L'agrippement est évalué en plaçant une boucle de fil métallique de 0,4 mm de diamètre au niveau de la face interne de la patte de la souris (Figure 57).

Pour la patte avant, l'agrippement est positif si la souris serre le fil et si elle est capable de le tenir dans sa patte lorsqu'on le lâche.

Pour l'agrippement de la patte arrière, on recherche la capacité de la souris à resserrer ses doigts autour du fil métallique.

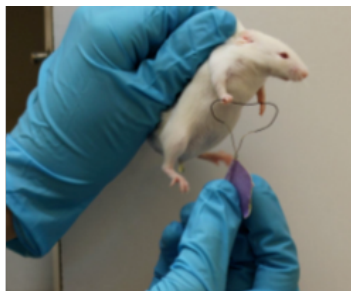


Figure 57. Evaluation du réflexe d'agrippement

Tableau V. Cotation du réflexe d'agrippement

Description		Score
Patte avant droite	agrippe	1
	n'agrippe pas	0
Patte arrière droite	agrippe	1
	n'agrippe pas	0

V.2.3 Perte d'appui

La souris est maintenue en contention de façon à ce que ses pattes droites soient situées au bord d'une table à angle droit. Chaque patte est successivement déplacée dans le vide (Figure 58). Le test évalue la capacité de la souris à reposer sa patte sur la table.

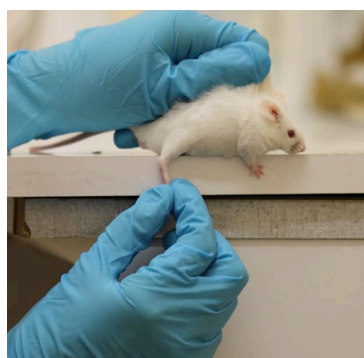


Figure 58. Test de la perte d'appui

Tableau VI. Cotation de la perte d'appui

Description		Score
Patte avant droite	repose la patte	1
	ne repose pas la patte	0
Patte arrière droite	repose la patte	1
	ne repose pas la patte	0

V.2.4 Placement visuel

La souris est suspendue par la queue et approchée doucement du bord d'une table. On note si la souris tend la/les patte(s) et la/les pose sur la table.

Tableau VII. Cotation du placement visuel

Description	Score
Pose les deux pattes en même temps	2
Pose la patte droite en retard	1
Ne pose pas la patte droite	0

V.2.5 Suspension par la queue

La souris est posée sur la table, puis soulevée doucement, plusieurs fois, à quelques centimètres de la surface de la table, afin d'évaluer la présence éventuelle d'une flexion de la patte et/ou d'une torsion du thorax (Figure 59).

La flexion et la torsion s'observent du côté controlatéral à la lésion (à droite).

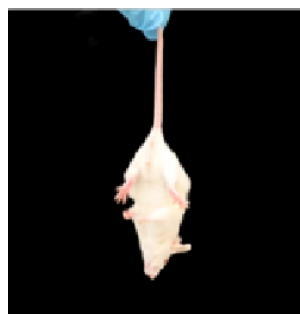
**Figure 59. Evaluation de la suspension par la queue**

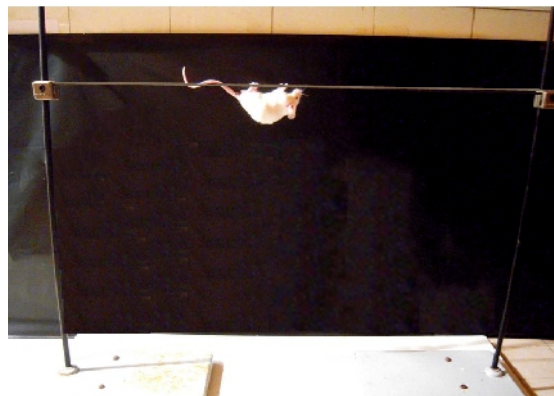
Tableau VIII. Cotation de la suspension par la queue

Description		Score
Flexion de la patte	absence de flexion de la patte droite	2
	flexion partielle de la patte droite	1
	flexion importante de la patte droite	0
Torsion du thorax	absence de torsion du thorax	2
	torsion partielle du thorax	1
	torsion importante du thorax	0

V.3 Tests d'agrippement

Les 2 tests d'agrippement sont réalisés en même temps, sur un dispositif constitué d'une barre horizontale de 3 mm de diamètre, de 60 cm de long et suspendue à 40 cm au-dessus du plan de travail. La souris est positionnée de manière à ce que ses pattes antérieures soient au contact du milieu de la tige (Hall, 1985). Le corps est ensuite placé verticalement, de façon à ce que les pattes postérieures soient sous la barre.

La souris est alors lâchée et le chronomètre est déclenché simultanément (Figure 60).

**Figure 60. Test d'agrippement**

V.3.1 Test du « grip »

Ce test consiste à mesurer le temps pendant lequel la souris reste accrochée, pendant une période d'observation limitée à 30 secondes. Le score du grip est coté sur 3 points (Tableau IX).

Tableau IX. Cotation du test du « grip »

Temps	Score
0 s	0
1 à 10 s	1
11 à 20 s	2
21 à 30 s	3

V.3.2 Test du « string »

Un score de 0 à 5 est attribué selon la façon dont la souris s'agrippe et/ou se déplace sur la tige (Tableau X).

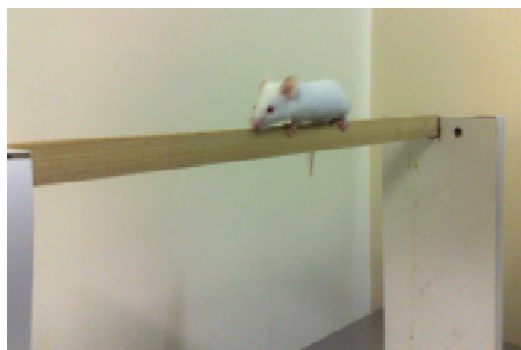
Tableau X. Cotation du test du "string"

Description	Score
La souris chute au cours des 30 s	0
La souris reste accrochée 30 s sans utiliser simultanément ses 4 pattes	1
La souris reste accrochée 30 s par les 4 pattes (5 s au moins)	2
La souris reste accrochée 30 s par les 4 pattes et la queue (5 s au moins)	3
La souris reste accrochée 30 s par les 4 pattes et la queue et se promène sur la tige (5 s au moins)	4
La souris atteint une des barres verticales dans les 30 s	5

V.4 Test de la poutre

Le test de la traversée de la poutre a été modifié d'après Leinase et collaborateurs (2006).

La souris est placée à l'extrémité d'une poutre de 1 cm de large, de 30 cm de long, située à 40 cm de hauteur et doit atteindre l'autre extrémité (Figure 61).

**Figure 61. Test de la poutre**

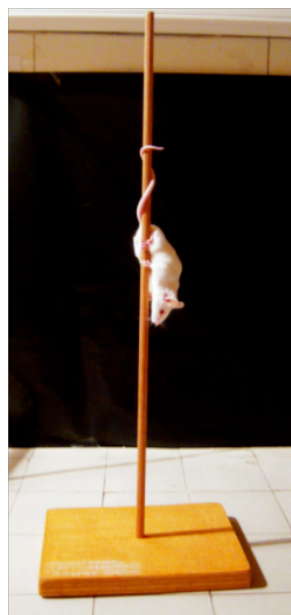
La cotation est faite sur 4 points d'après Millerot-Serruot et collaborateurs (2007 ; Tableau XI).

Tableau XI. Cotation de la traversée de la poutre

Description	Score
La souris ne tient pas ou ne bouge pas sur la poutre	0
La souris traverse la poutre avec une patte pendante	1
La souris traverse la poutre en faisant plus de trois fautes d'appui	2
La souris ne traverse la poutre qu'après un stimulus sonore ou tactile	3
La souris traverse la poutre sans stimulus sonore ou tactile	4

V.5 Test du mât

Ce test a été modifié d'après Ogawa et collaborateurs (1985) et Bouet et collaborateurs (2007). Le dispositif est constitué d'un mât vertical en bois strié de 8 mm de diamètre et de 50 cm de longueur, fixé sur un support horizontal. La souris est placée en haut du mât, tête vers le bas (Figure 62).

**Figure 62. Test du mât**

On note le temps mis par la souris pour descendre correctement le mât, c'est-à-dire dans l'axe du mât en plaçant ses pattes les unes après les autres le long du mât, et atteindre le support. Le temps maximal est fixé à 30 secondes. Le chronomètre est arrêté lorsque la souris pose ses pattes postérieures sur le support horizontal.

Une souris qui ne descend pas correctement (qui s'enroule autour du mât ou se laisse glisser) a un score maximal de 30 secondes.

Le test est réalisé 3 fois et la moyenne des trois temps est calculée, afin de minimiser le facteur "appréhension" des souris. Le temps en secondes est converti en un score sur 3 points (Tableau XII).

Tableau XII. Cotation du mât

Temps	Score
30 s	0
20 à 29 s	1
10 à 19 s	2
0 à 9 s	3

V.6 Score global

Il est possible de calculer un **score global** en additionnant les scores de chaque test (Tableau XIII):

Tableau XIII. Composition du score global

Test	Score
Test des cercles	10
Score neurologique	13
Test du « string »	5
Test du « grip »	3
Test de la poutre	4
Test du mât	3
Total des déficits fonctionnels	38

VI. RÉALISATION D'HÉMORRAGIES INTRACÉRÉBRALES PAR VOIE MÉCANIQUE

Cette procédure permet de produire des témoins de la présence de cellules sanguines, telles que les plaquettes, dans des échantillons de cerveaux de souris. Ces échantillons ont été utilisés au cours de la mise au point des techniques d'immunohistochimie.

La technique est réalisée sur des souris anesthésiées, comme décrit précédemment, par un mélange kétamine/xylazine. La peau du crâne est incisée avec un scalpel, puis le bregma et la suture inter-hémisphérique sont dégagés.

A l'aide d'une aiguille 30G, 2 perforations de 4 à 5 mm de profondeur (afin d'atteindre le striatum) sont réalisées à travers la boîte crânienne, dans une zone située sous le bregma dans l'hémisphère gauche.

La peau est ensuite refermée par 2 agrafes. Les souris sont placées dans une couveuse thermostatée à $30 \pm 0,5$ °C jusqu'à leur réveil. Deux heures après la chirurgie, les souris ont été exsanguinoperfusées selon le protocole suivant.

VII. EXSANGUINOPERFUSION DES ANIMAUX

Cette technique permet d'éliminer le sang circulant des vaisseaux cérébraux des souris. La procédure est réalisée chez la souris anesthésiée par injection i.p. de pentobarbital disodique (60 mg/kg dilué au 1/4 dans du NaCl à 0,9%). La peau de l'abdomen est incisée, le diaphragme puis les côtes sont coupés, en prenant soin de ne pas abimer le cœur et les poumons. Une aiguille, reliée à une bouteille remplie d'une solution de NaCl à 0,9% hépariné (50 UI/ml ; héparine choay, Sanofi Synthelabo, Le Plessis Robinson, France) à température ambiante, est insérée dans le ventricule gauche de l'animal. A l'aide d'un ciseau, l'oreillette gauche est coupée, permettant ainsi au sang de s'évacuer. La perfusion par le NaCl hépariné est maintenue pendant 5 minutes à 90 mmHg, une pression proche de la pression sanguine physiologique de la souris. Le dispositif est ensuite retiré et le cerveau de la souris est prélevé selon les protocoles décrits dans les paragraphes suivants, en fonction de son utilisation pour des techniques de western blot (WB) ou immunohistochimiques.

VIII. EVALUATION DU VOLUME DE LÉSION CÉRÉBRALE

Les souris sont anesthésiées par injection i.p. de pentobarbital disodique dilué au 1/4 (65 mg/kg), puis exsanguinoperfusées, comme décrit précédemment. En fonction du type de prélèvement, nous avons utilisé deux techniques de coloration pour visualiser la lésion cérébrale : le chlorure de triphényltétrazolium (TTC) ou le violet de crésyl.

VIII.1 Coloration au chlorure de triphényltétrazolium

Le TTC est un produit incolore qui devient rouge lorsqu'il est réduit par les déshydrogénases mitochondriales fonctionnelles. La coloration au TTC fait donc apparaître en blanc toutes les zones cérébrales en souffrance alors que les zones saines sont colorées en rouge.

Les cerveaux sont prélevés puis coupés en 7 coupes frontales de 1 mm d'épaisseur à l'aide d'un Chopper (MacIlwain, Mickle Laboratory Engineering, Gomshall, Angleterre). Les coupes 1, 3, 5 et 7 sont utilisées pour réaliser la coloration et les coupes 2, 4 et 6 pour la mise au point du Western Blot de CD41 (Figure 63 ; voir paragraphe X).

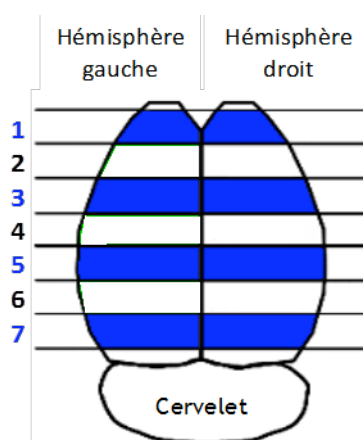


Figure 63. Schéma des 7 niveaux de coupe de cerveaux de 1 mm d'épaisseur

Les coupes sont immergées dans du TTC à 2% (réf. T-8877, Sigma-Aldrich) puis retirées après environ 10 minutes, jusqu'à obtention d'une coloration suffisante (Figure 64).

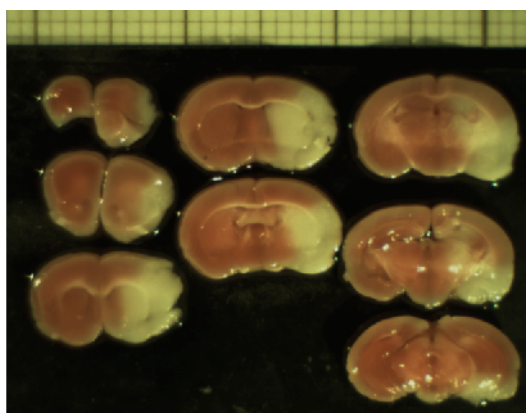
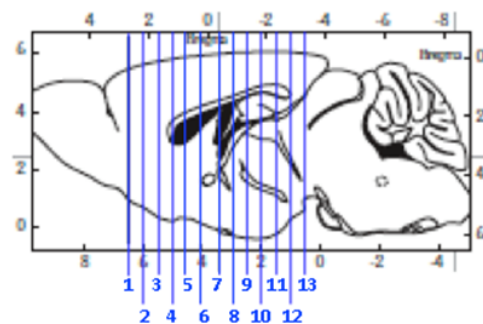


Figure 64. Lésion cérébrale après coloration par le TTC (7 niveaux de coupe)

VIII.2 Coloration au violet de crésyl

Le violet de crésyl est un colorant basique qui possède une forte affinité pour les corps de Nissl, riches en ARN, et présents dans les neurones. Ainsi, les régions saines sont colorées en violet alors que le tissu nécrosé reste blanc.

Les cerveaux sont prélevés et immédiatement plongés dans l'isopentane à -40°C pour permettre une congélation rapide, puis conservés à -40°C jusqu'au jour de la préparation des coupes. Les cerveaux sont coupés à l'aide d'un cryostat (Jung CM3000, Leica Microsystèmes, Nanterre, France) dans une enceinte maintenue à $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Treize coupes frontales de $20\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur sont prélevées tous les $500\text{ }\mu\text{m}$ à partir du niveau d'antériorité $+2,68\text{ mm}$ (niveau 1) jusqu'au niveau $-3,28\text{ mm}$ (niveau 13) par



rapport au bregma (Figure 65).

Figure 65. Schéma des 13 niveaux de coupe de cerveaux de $20\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur
D'après l'atlas de Franklin et Paxinos, 2007

Les lames sont conservées à -20°C jusqu'au jour de leur utilisation, pour la réalisation de la coloration au violet de crésyl ou de l'immunomarquage (voir paragraphe XI).

Pour réaliser la coloration au violet de crésyl, les coupes sont d'abord fixées pendant 5 minutes dans le mélange de Carnoy (chloroforme 30% ; acide acétique 10% ; éthanol absolu 60%), puis plongées successivement dans les bains suivants (Tableau XIV) :

Tableau XIV. Composition de la solution de violet de crésyl

Solution de violet de crésyl	pendant 5 à 10 min
Eau bidistillée	1 passage dans 2 bains successifs
Ethanol à 70°	1 passage
Ethanol à 90°C	1 passage
Ethanol absolu	1 passage

Toluène

jusqu'au montage

Le montage est réalisé en plaçant des lamelles sur les lames avec la solution d'Eukitt (O. Kindler GmbH, Freiburg, Allemagne ; Figure 66).

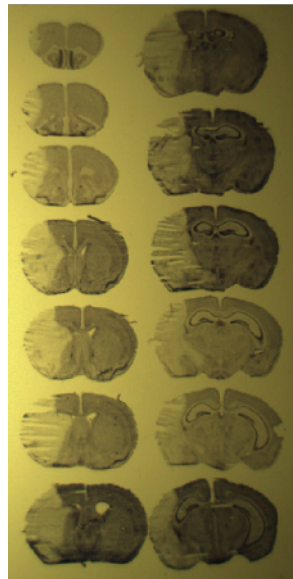


Figure 66. Lésion cérébrale après coloration par la violet de crésyl (13 niveaux de coupe)

VIII.3 Quantification du volume de lésion

Les coupes sont photographiées à l'aide d'une caméra Moticam 2500 (Motic, Xiamen, Chine).

La surface de la lésion, ainsi que les surfaces totales des hémisphères gauche et droit sont mesurées à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, Bethesda, USA). Le volume de la lésion est alors calculé à partir des surfaces mesurées, corrigées par le rapport (Surface Hémisphère Droit / Surface Hémisphère Gauche), afin de tenir compte de l'œdème, et de la distance séparant 2 niveaux de coupes (1 mm ou 500 μm). La lésion cérébrale est exprimée en mm^3 .

IX. DOSAGE DE LA P-SÉLECTINE SOLUBLE DANS LE SERUM

Les plaquettes activées libèrent dans la circulation sanguine de la P-sélectine soluble (sP-sélectine). Le principe du test est donc d'évaluer l'état d'activation des plaquettes de souris en dosant la sP-sélectine sérique.

Les souris sont anesthésiées par injection i.p. de pentobarbital disodique dilué au 1/4 dans du NaCl à

0,9% (65 mg/kg), puis placées en décubitus dorsal. La paroi abdominale est incisée pour permettre de dégager le foie et l'intestin avec une pince. A l'aide d'une seringue et d'une aiguille de 25G préalablement citratées, 400 µl de sang sont prélevés doucement au niveau de la veine cave inférieure, en prenant soin de ne pas faire de bulles afin de limiter l'activation des plaquettes (Jirouskova *et al.*, 2007). Le prélèvement est immédiatement déposé dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et laissé pendant 2 heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

Les animaux sont ensuite exsanguinoperfusés comme décrit précédemment (paragraphe VII), afin de prélever le cerveau pour réaliser le western blot des molécules d'adhésion (paragraphe X).

Les tubes de sang sont centrifugés à 2000 g pendant 20 minutes à 20°C, puis le surnageant (environ 90 µl) est prélevé, aliquoté sous un volume de 30 µl et congelé à -40°C jusqu'au jour du dosage.

Le dosage est réalisé par une technique en « sandwich », à l'aide du kit Quantikine® sPsél murine (réf. MPS00, R&D Systems, Lille, France ; Figure 67).

Les échantillons de sérum sont préalablement dilués au 1/50^{ème} dans une solution tampon. Une gamme standard, comprise entre 0 et 20 ng/ml de sPsél, est également réalisée après dilution dans ce même tampon.

Dans chaque puits de la plaque, précoaté avec un Ac monoclonal anti-sPsélectine murine, 50 µl d'un tampon de dilution, puis 50 µl de standard ou d'échantillon sont déposés en duplicata. La plaque est incubée pendant 2 heures à température ambiante, puis les puits sont lavés 5 fois avec 300 µl de tampon de lavage. L'Ac polyclonal anti-sPsélectine conjugué à la HRP est ensuite ajouté, à raison de 100 µl par puits. La plaque est à nouveau incubée pendant 2 heures à température ambiante et les puits lavés 5 fois. Puis, 100 µl de solution de substrat [H₂O₂ ; tétraméthylbenzidine (TMB ; chromogène) en proportions égales] sont déposés dans chaque puits. La plaque est alors incubée pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. La réaction enzymatique est stoppée par l'ajout de 100 µl d'une solution d'acide chlorhydrique qui colore la solution bleue en jaune.

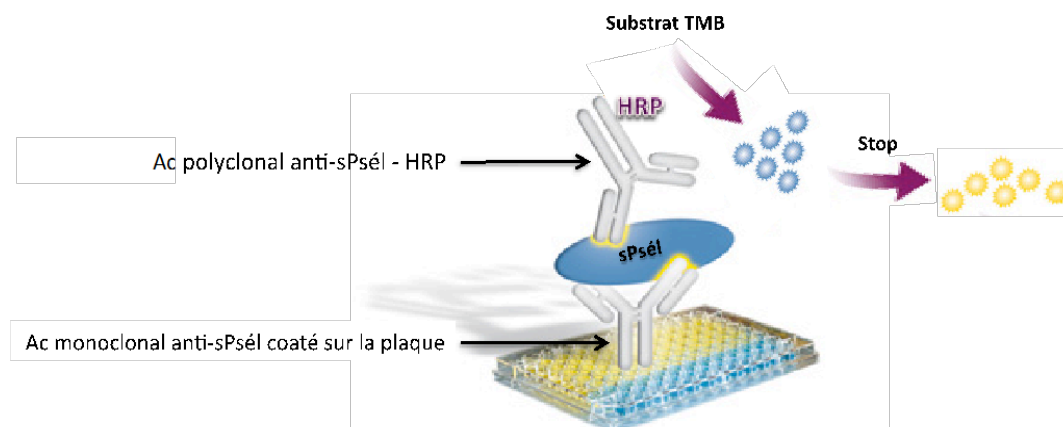


Figure 67. Principe du dosage de la sP-sélectine par ELISA

Ac : anticorps ; HRP : horseradish peroxidase ; sPsél : P-sélectine soluble ; TMB : tétramethylbenzidine
La plaque est analysée dans les 30 minutes, à l'aide du lecteur de microplaques SPECTROstar nano. Afin de corriger les imperfections optiques de la plaque, la densité optique (DO) lue à 540 nm est soustraite à la DO lue à 450 nm pour chaque puits. A l'aide de la gamme étalon, la concentration en sP-sélectine des échantillons est calculée et exprimée en ng/ml.

X. WESTERN BLOT

X.1 Prélèvement et préparation des échantillons

X.1.1 Prélèvement et préparation des échantillons pour le Western Blot de CD41

Afin de pouvoir évaluer l'importance de l'adhésion plaquettaire sur l'endothélium, nous avons utilisé un Ac anti-CD41 qui reconnaît spécifiquement la sous-unité GPIIb (140 kDa) de GPIIb/IIIa, présente à la surface des plaquettes.

Le WB est réalisé sur des échantillons de cerveaux prélevés sur des souris naïves (n = 6 perfusées ; n = 5 non perfusées) et des souris ischémiées (n = 4 perfusées ; n = 6 non perfusées).

Après euthanasie, les cerveaux des souris ont été prélevés et coupés en 7 coupes frontales de 1 mm d'épaisseur à l'aide d'un Chopper (MacIwain, Mickle Laboratory Engineering, Gomshall, Surrey, Angleterre ; Figure 68). Des échantillons de l'hémisphère lésé (= hémisphère gauche) au niveau des coupes 2, 4 et 6 sont prélevés sur une plaque en verre maintenue à 4°C. Les échantillons sont placés dans un eppendorf, pesés et conservés à - 40°C jusqu'au jour du broyage.

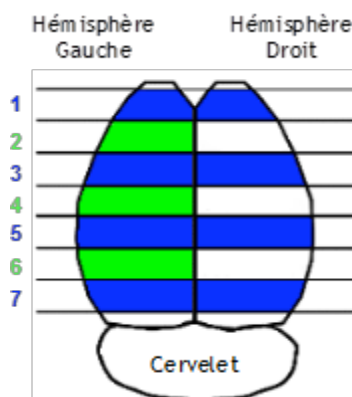


Figure 68. Schéma des coupes prélevées pour l'évaluation du volume de lésion (en bleu) et le western blot de CD41 (en vert)

Les échantillons sont broyés à l'Ultraturrax dans 10 fois leur volume de tampon de broyage dont les compositions testées sont décrites dans le Tableau XV :

Tableau XV . Tampon de broyage des échantillons utilisés pour le Western blot de CD41

Conditions		Composition du tampon de broyage
1	Protocole établi d'après Liu et collaborateurs (2011)	Tris 0,5 M pH 6,8 ; SDS 4% ; Glycérol 20% ; inhibiteurs de protéases (1 pastille/10 ml tampon ; réf. 04 693 124 001, Complete Mini, Roche)
	Fraction protéique cytoplasmique soluble	Tris 50 mM pH 7,4 ; inhibiteurs de protéases (Complete Mini)
2	Fraction protéique cytoplasmique liée au cytosquelette	Tris 50 mM pH 7,4 ; Triton X-100 1% ; inhibiteurs de protéases (Complete Mini)
	Fraction protéique liée à la membrane	Tris 50 mM pH 7,4 ; SDS 4% ; inhibiteurs de protéases (Complete Mini)

Les échantillons sont ensuite soniqués 10 secondes à 6 watts puis centrifugés à 10 000 g à 15°C pendant 15 minutes. Une partie des surnageants (20 µl) est prélevée pour doser les protéines par la méthode BCA (voir paragraphe X.3) et le reste est conservé pour le WB de CD41.

Les homogénats de cerveau prélevés après la centrifugation sont dilués au 1/2 dans du tampon de Laemmli en conditions non réductrices (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 ; glycérol 10% ; SDS 10% ; grains de bleu de bromophénol ; eau bidistillée) puis chauffés à 95°C pendant 5 minutes afin de dénaturer les protéines.

X.1.2 Prélèvement et préparation des échantillons pour le Western Blot des molécules d'adhésion

Pour étudier la cinétique de l'expression de la P-sélectine, d'ICAM-1 et de VCAM-1 à la suite de l'ischémie cérébrale, nous avons utilisé différents groupes d'animaux (n = 3-4/groupe):

- des souris naïves
- des shams, qui ont subi toute la chirurgie, à l'exception de l'insertion du filament
- des souris ischémisées euthanasiées après 6, 24 ou 48 heures de reperfusion.

Les cerveaux de ces animaux sont prélevés et coupés à l'aide d'un double scalpel permettant d'obtenir une tranche de 3 mm d'épaisseur (environ 75 mg de tissu) du côté ischémié, correspondant au cœur de

la lésion, zone du cerveau dans laquelle la lésion est irréversible (Figure 69). Les deux extrémités, qui correspondent à la zone de pénombre, où les cellules sont en souffrance mais ne présentent pas de mort immédiate, sont également prélevées (environ 120 mg de tissu) et conservés à -40 °C jusqu'au jour du broyage.

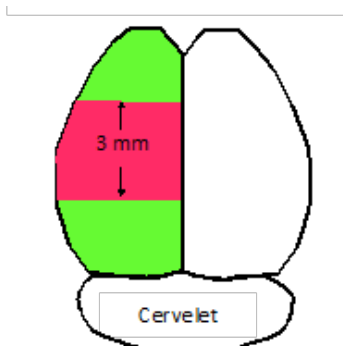


Figure 69. Schéma de prélèvements des zones de cœur (en rose) et de pénombre (en vert) pour le Western blot des molécules d'adhésion

Les échantillons sont broyés à l'ultraturax dans 10 fois leur volume de tampon de broyage (Tris HCl 50 mM ; NaCl 150 mM ; Triton X-100 1% ; pH 7,4 ; inhibiteurs de protéases Complete Mini). Les homogénats sont ensuite centrifugés à 12 000 g à 4°C pendant 20 minutes.

Une partie du surnageant est prélevée (20 µl) pour doser les protéines par la méthode BCA. Le reste est utilisé pour le WB des molécules d'adhésion (400 µl).

Les homogénats de cerveau prélevés après la centrifugation sont dilués 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 10% ; grains de bleu de bromophénol ; eau bidistillée) puis chauffés à 95°C pendant 10 minutes afin de dénaturer les protéines.

X.2 Préparation des témoins positifs

X.2.1 Préparation des témoins positifs pour le Western Blot de CD41

Du sang est prélevé dans des tubes citratés après ponction intracardiaque chez des souris naïves préalablement anesthésiées, selon les conditions décrites précédemment. Les échantillons de sang sont ensuite préparés pour servir de témoins positifs lors des WB de CD41, selon les conditions décrites dans le Tableau suivant :

Tableau XVI. Conditions de préparation des témoins positifs selon les essais de Western blot de CD41

Essai	Préparation du témoin positif
1	Centrifugation : 450 g ; 10 min Prélèvement du surnageant = PRP
2	Centrifugation : 1240 g ; 12 min Elimination du surnageant Remise en suspension du culot plaquettaire dans PBS 10 mM = plaquettes non lavées (T1)
	Centrifugation de T1 : 1240 g ; 12 min Elimination du surnageant Remise en suspension du culot plaquettaire dans PBS 10 mM = plaquettes lavées (T2)

X.2.2 Préparation des témoins positifs pour le Western Blot des molécules d'adhésion

Nous avons utilisé deux témoins positifs des molécules d'adhésion pour mettre au point les WB de la P-sélectine et d'ICAM-1.

- **Modèle de stimulation des molécules d'adhésion par le LPS** (Gotsch *et al.*, 1994 ; Kukiélka *et al.*, 1993)

Une solution de lipopolysaccharide (LPS) à la dose de 40 mg/kg (i.p) a été injectée chez des souris. Après 3 ou 6 heures, les souris ont été anesthésiées avec du pentobarbital (75 mg/kg ; 0,15 ml/souris ; i.p) dilué au 1/4 dans du NaCl à 0,9%, puis exsanguinoperfusées par voie intracardiaque avec du NaCl à 0,9% hépariné (paragraphe VII). Les cerveaux ont ensuite été prélevés et congelés à -40°C jusqu'au jour du broyage.

Des cerveaux ont été également prélevés chez des animaux traités par le LPS mais non perfusés, afin de mettre en évidence la présence de la sP-sélectine libérée dans la circulation sanguine par les plaquettes activées.

Des souris témoins ne recevant que le solvant du LPS (NaCl à 0,9%) ont également été incluses.

- **Cellules Raw 264.7** (Tsutsumi *et al.*, 2010)

Des cellules Raw 264.7 ont également été utilisées. Ces cellules sont issues de lignées murines de macrophages et couramment utilisées comme témoin positif des marqueurs de l'inflammation.

X.3 Dosage des protéines par l'acide bicinchoninique (BCA)

Le principe de dosage des protéines par BCA repose sur la formation d'un complexe protéine-Cu²⁺ dans des conditions alcalines, suivie d'une réduction de Cu²⁺ en Cu⁺. L'ion Cu⁺ forme un complexe violet avec

le BCA, qui est détecté par colorimétrie. Le produit de la réaction est proportionnel à la quantité de protéines présente dans l'échantillon.

Une gamme étalon, comprise entre 0,1 et 1,5 mg/ml d'albumine sérique bovine (BSA, réf. A3059, Sigma-Aldrich) a été réalisée. Le tampon de travail a été préparé en mélangeant une solution de BCA à pH 11,25 (réf. B9643, Sigma-Aldrich) et une solution de sulfate de cuivre(II) (réf. C2284, Sigma-Aldrich) dans un rapport 50:1.

Chaque échantillon et point de gamme a été déposé en duplicata sur une plaque 96 puits, à raison de 25 µl par puits, puis 200 µl de tampon de travail y ont été ajoutés. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, la DO a été mesurée à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (SPECTROstar nano, BMG Labtech, Champigny sur Marne, France). Ce dosage a permis de mesurer les volumes exacts à déposer dans les puits de WB pour travailler à quantité de protéines constante.

X.4 Réalisation du Western blot

La technique du WB consiste à séparer les protéines de l'échantillon par électrophorèse, puis à révéler la protéine d'intérêt par un Ac spécifique.

X.4.1 Electrophorèse

Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire dans un gel de migration de polyacrylamide à 7,45% ou 6% (Tableau XVII) coulé entre deux plaques de verre. Puis, un gel de concentration à 4,15% est coulé sur le gel de migration et permet de concentrer les protéines afin qu'elles pénètrent simultanément dans le gel de migration.

Tableau XVII. Composition des différents gels utilisés lors des WB

Pour 2 gels	Gels de migration		Gel de concentration
	7,45%	6%	4,15%
Acrylamide 30%	5 ml	4 ml	1,4 ml
Tris HCl 1,5 M ; pH=8,8	5 ml	5 ml	-
Tris HCl 0,5 M ; pH=6,8	-	-	2,5 ml
Eau bidistillée	9,7 ml	10,7 ml	6 ml
SDS 10%	0,2 ml	0,2 ml	0,1 ml
Persulfate d'ammonium (APS) 10%	0,2 ml	0,2 ml	0,1 ml
Tétraméthyléthylènediamine (TEMED)	0,02 ml	0,02 ml	0,01 ml

Après polymérisation, les gels sont placés dans une cuve contenant du tampon d'électrophorèse (Tris 25 mM, glycine 195 mM, sodium dodécyl sulfate ou SDS 0,1%). Les échantillons sont déposés à

quantité fixe de protéines (40 ou 50 µg), ainsi que les marqueurs de PM (5 µl ; réf. RPN800E, Amersham Full-Range rainbow, GE Healthcare ; réf. 161-0374, Precision Plus Protein Standards Dual Color, Bio-Rad ; réf. LC5925, See Blue, Invitrogen). La migration est faite à courant constant sous 20 mA par gel pendant environ 2 heures, jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel.

X.4.2 Electrotransfert

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène ou PVDF (porosité : 0,45 µm ; Amersham) dans la glace pendant une heure à 100 V. Avant le transfert, les membranes de PVDF sont préalablement activées à l'éthanol pendant 5 minutes, puis équilibrées dans du tampon de transfert (Tris 125 mM ; Glycine 192 mM ; éthanol 20% ; SDS 0,01%).

À la fin du transfert, les membranes sont rincées dans un bain de TTBS 0,1% (TBS 10X ; Tween 20 ; eau bidistillée) pendant 5 minutes.

X.4.3 Immunomarquage

Dans un premier temps, les sites non spécifiques sont saturés par une solution bloquante (lait ou mélange bloquant Amersham) pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Les membranes sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C avec l'Ac primaire dilué dans la solution de bloquage.

Après un lavage de 15 minutes, puis 2 lavages de 5 minutes dans des bains de TTBS sous agitation à température ambiante, les membranes sont incubées avec l'Ac secondaire dilué dans la solution de bloquage pendant 1 heure à l'obscurité sous agitation à température ambiante. Puis les membranes sont à nouveau lavées (Conditions expérimentales décrites dans le Tableau XVIII).

Tableau XVIII. Conditions expérimentales des Western Blot en fonction des protéines d'intérêts

Protéine	Gel de migration	Blocage	Ac primaire	Ac secondaire
CD41	7,45% 6%	Lait 5%	Ac rat anti-CD41, 553847, BD Pharmingen Dilution : 1/500 ^{ème}	Ac chèvre anti-rat – HRP Dilutions : 1/10000 ^{ème} ; 1/25000 ^{ème}
P-sélectine	7,45%	Lait 5% Mélange bloquant 2%	Ac chèvre anti-P-sélectine, AF737, R&D Dilutions : 1/1000 ^{ème} ; 1/600 ^{ème}	Ac lapin anti-chèvre FITC, 31533, Pierce Dilutions : 1/200 ^{ème} ; 1/500 ^{ème}
		Lait 5%	Ac lapin anti-P-sélectine, ab59738, abcam Dilution : 1/500 ^{ème}	Ac âne anti-lapin FITC, N1034, Amersham Dilution : 1/1000 ^{ème}
ICAM-1	7,45%	Lait 5% Mélange bloquant 2%	Ac lapin anti-ICAM-1, sc1511-R, Santa Cruz Dilution : 1/500 ^{ème}	Ac âne anti-lapin FITC, N1034, Amersham Dilution : 1/1000 ^{ème}
		Lait 5%	Ac lapin anti-ICAM-1, ab124759, abcam Dilutions : 1/100 ^{ème} ; 1/300 ^{ème}	
		Lait 5%	Ac chèvre anti-ICAM-1, AF796, R&D Dilution : 1/2000 ^{ème}	Ac lapin anti-chèvre FITC, 31533, Pierce Dilution : 1/200 ^{ème}
VCAM-1	7,45%	Lait 5%	Ac lapin anti-VCAM-1, ab134047, abcam Dilution : 1/1000 ^{ème}	Ac âne anti-lapin FITC, N1034, Amersham Dilution : 1/1000 ^{ème}

X.4.4 Révélation par chimioluminescence ou ECL

La révélation est effectuée à l'aide d'un système de révélation Enhanced Chimio Luminescence (ECL) Advance, permettant la quantification sur film. Un ml de substrat pour la HRP est ajouté sur chaque membrane qui est incubée pendant 5 minutes. Les membranes sont ensuite exposées à un film photographique et révélées dans une chambre noire.

X.4.5 Révélation par chimiofluorescence ou ECF

Cette technique étant moins sensible que l'ECL Advance, elle nécessite l'amplification du signal par un Ac tertiaire anti-fluorescéine couplé à la phosphatase alcaline (kit ECF RPN5781, Amersham) dilué au 1/2000^{ème} dans la solution de blocage.

La révélation est effectuée par l'ajout de 1 ml de substrat Enhanced Chimio Fluorescence (réf. RPN5780, ECF, Kit GE Healthcare) sur chaque membrane pendant 20 minutes à l'abri de la lumière. Les membranes sont ensuite scannées à l'aide du Storm 860 (Amersham-Pharmacia Biotech, Orsay, France). Une semi-quantification est réalisée avec le logiciel ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics, Foster City, California, USA). Pour tenir compte des différences induites par l'électrotransfert entre les membranes, au moins deux points communs sont déposés sur chaque membrane permettant de calculer un facteur de correction. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires après soustraction du bruit de fond correspondant à une partie de la membrane sans dépôt.

X.4.6 Protocole de déshybridation des membranes

Cette technique permet de réutiliser une membrane et de l'hybrider avec différents Ac primaires.

La membrane est réactivée dans un bain d'éthanol pendant 5 minutes. Après rinçage à l'eau bidistillée, elle est incubée dans du tampon de déshybridation (Tris-HCl 0,5 mM, pH 6,8 ; SDS 2% ; β -mercaptoéthanol 200 mM) pendant 30 minutes à 60 °C sous hotte et sous agitation. La membrane est rincée à l'eau bidistillée jusqu'à disparition de l'odeur de β -mercaptoéthanol puis lavée au TTBS (2 x 5 minutes). La membrane est ensuite bloquée au TTBS-lait (environ 50 ml), puis incubée avec un nouvel Ac primaire.

XI. IMMUNOHISTOCHIMIE

Les échantillons sont prélevés et préparés selon les mêmes conditions que lors de la coloration par le violet de crésyl, à l'exception des lames qui sont gélatinées.

XI.1 Immunofluorescence de CD41

Les coupes sont post-fixées dans un bain d'acétone froid pendant 10 minutes. Après séchage, les lames sont placées dans une chambre humide et les coupes sont réhydratées par une solution de PBS (tampon phosphate 10 mM, pH 7,4) pendant 10 minutes.

Afin de bloquer les sites non spécifiques, les coupes sont incubées en chambre humide avec le sérum de chèvre à 2% pendant 30 minutes. Les coupes sont ensuite incubées en chambre humide avec l'Ac primaire (Ac monoclonal de rat anti-CD41 murin, réf. MCA2245, AbD Serotec) dilué au 1/200^{ème} dans une solution de PBS – sérum de chèvre 2% pendant 1 heure sous agitation. Les lames sont lavées 3 x 10 minutes dans des bains de PBS sous agitation. Les coupes sont ensuite incubées en chambre humide avec l'Ac secondaire (Ac de chèvre anti-rat DyLight 488, réf. 112-486-003, Jackson ImmunoResearch) dilué au 1/400^{ème} dans une solution de PBS – sérum de chèvre 2% pendant 2 heures sous agitation, puis lavées comme précédemment.

Le montage des lames est réalisé avec le mowiol (réf. 4-88, Sigma). Après séchage toute la nuit à l'abri de la lumière, les lames sont observées au microscope à fluorescence.

XI.2 Immunofluorescence de CD41/collagène IV

L'essai de co-marquage de CD41 et du collagène IV est réalisé selon les conditions décrites précédemment, à l'exception des références des Ac primaires et secondaires utilisés (Tableau XIX) :

Tableau XIX. Ac utilisés lors de l'essai de co-marquage CD41/Collagène IV par immunofluorescence

Protéine	Ac primaire		Ac secondaire	
	Référence	Dilution	Référence	Dilution
CD41	Ac monoclonal de rat anti-CD41 murin, réf. MCA2245, AbD Serotec	1/200 ^{ème}	Ac de chèvre anti-rat réf. A11007, Alexa Fluor 594 (rouge)	1/400 ^{ème}
Collagène IV	Ac polyclonal de lapin anti-collagène IV, réf. ab6586, abcam	1/400 ^{ème}	Ac de chèvre anti-lapin réf. A11008, Alexa Fluor 488 (vert)	1/400 ^{ème}

Afin de vérifier que les Ac, déposés simultanément, n'interfèrent pas entre eux, les contrôles spécifiques nécessaires ont été réalisés :

- Aucun Ac
- Aucun Ac primaire + solution contenant les 2 Ac secondaires
- Ac primaire anti-CD41 + solution contenant les 2 Ac secondaires
- Ac primaire anti-Collagène IV + solution contenant les 2 Ac secondaires
- Solution contenant les 2 Ac primaires + solution contenant les 2 Ac secondaires

XII. ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD (déviation standard), sauf pour la durée de survie dans le modèle de thrombo-embolie pulmonaire qui est représentée par la médiane.

L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad prism (GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Une différence est considérée significative pour une valeur de $P < 0,05$.

Le Tableau XX résume les différents tests statistiques utilisés en fonction de l'expérience :

Tableau XX. Tests statistiques utilisés en fonction des expériences

Expérience	Test statistique
Tests d'agrégation plaquettaire	ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de Dunnett
Temps de Saignement	Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Mann-Whitney
Thromboembolie pulmonaire Taux de mortalité Durée de survie	Test exact de Fischer Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Mann-Whitney
Thrombose carotidienne	Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Mann-Whitney
Thrombose de l'ACM par FeCl ₃ AUC Autres paramètres	ANOVA à 2 facteurs croisés (PJ34 et rt-PA) Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Mann-Whitney
Déficits fonctionnels	Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Mann-Whitney
Dosage sP-sélectine	Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Mann-Whitney
Western blot des molécules d'adhésion	Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Mann-Whitney

RESULTATS ET DISCUSSION

PREMIERE PARTIE : ÉVALUATION DU ROLE DES INHIBITEURS DE PARP DANS L'AGREGATION PLAQUETTAIRE *IN VITRO*

La 1^{ère} partie de ce travail a consisté à étudier les effets d'inhibiteurs de PARP sur l'agrégation plaquettaire *in vitro*.

En effet, en 2004, l'étude d'Alexy et collaborateurs a montré que certains inhibiteurs de PARP (4-hydroxyquinazoline, 2-mercapto-4(3H)-quinazolinone et HO-3089) pouvaient être anti-agrégants plaquettaires, indépendamment de leur activité sur la PARP, probablement en raison d'une analogie structurale avec l'ADP. Comme les inhibiteurs de PARP exercent leurs effets en entrant en compétition avec le substrat de l'enzyme (NAD^+) pour empêcher son fonctionnement, et du fait de la ressemblance entre le NAD^+ et l'ADP, les auteurs ont proposé que des inhibiteurs de PARP, possédant une structure moléculaire ressemblant à la partie adénine commune au NAD^+ et à l'ADP, pouvaient également entrer en compétition avec l'ADP pour ses récepteurs plaquettaires, P2Y1 et/ou P2Y12, empêchant ainsi leur activation, et donc l'agrégation plaquettaire.

L'ischémie cérébrale étant une pathologie dans laquelle l'activation et l'agrégation plaquettaires sont impliquées (Stoll *et al.*, 2008; Franks *et al.*, 2010), nous avons souhaité évaluer les conséquences d'un traitement par un inhibiteur de PARP dans cette composante. A cet effet, nous avons évalué si le PJ34 (chef de file de la famille des phénanthridiones), un puissant inhibiteur de PARP utilisé comme stratégie anti-PARP depuis plusieurs années notamment au laboratoire dans des modèles murins d'ischémie cérébrale, présentait un effet anti-agrégant, en plus de ses effets neuroprotecteurs et vasculoprotecteurs. Nous avons également comparé les effets du PJ34 à ceux de 3 autres inhibiteurs de PARP de structures chimiques différentes : un benzamide (3-AB), une tétracycline (minocycline) et un dérivé isoindolinone (INO-1001).

Les études ont été réalisées sur des échantillons de sang de donneurs volontaires sains, dans une perspective clinique, et de souris afin de caractériser nos modèles expérimentaux.

Ce travail a été mené en collaboration avec le Dr Christilla Bachelot-Loza de l'unité INSERM 765 « Thrombose : épidémiologie, physiopathologie, thérapeutiques innovantes ».

I. CHEZ L'HOMME

I.1 Mise au point des conditions expérimentales

La 1^{ère} étape de ce travail a été de valider nos conditions expérimentales pour réaliser le test d'agrégation plaquettaire, en utilisant un des inhibiteurs de PARP de l'étude d'Alexy et collaborateurs (2004), le 4-hydroxyquinazoline (4-HOQ).

En effet, afin de nous affranchir de l'interaction des inhibiteurs de PARP avec d'autres cellules sanguines que les plaquettes, nous avons décidé de travailler en PRP, contrairement à Alexy et collaborateurs, qui ont pré-incubés les échantillons de sang total avec le 4-HOQ (100, 500, 1000 et 1500 μ M) avant de les centrifuger pour recueillir le PRP et réaliser les tests d'agrégation.

Dans cette mise au point, nous avons testé 3 concentrations de 4-HOQ :

- 10 μ M : cette faible concentration a été choisie, puisque dans notre étude l'inhibiteur de PARP a directement été pré-incubé dans le PRP, ce qui évite son interaction avec les autres cellules sanguines,
- 100 μ M, qui est la plus faible concentration de 4-HOQ testée dans l'étude d'Alexy, mais qui n'a pas entraîné d'effet anti-agrégant,
- 1000 μ M, qui a réduit d'environ 30% l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP dans l'étude d'Alexy.

Nos résultats ont mis en évidence un effet anti-agrégant du 4-HOQ, puisque celui-ci a diminué l'agrégation maximale (MA) induite par l'ADP à 5 ou 10 μ M sur 3 échantillons de PRP humain. En effet, le 4-HOQ a réduit le MA de $50,9 \pm 3,96\%$ à 10 μ M, de $50,2 \pm 3,32\%$ à 100 μ M et de $55,4 \pm 2,05\%$ à 1000 μ M.

Dans nos conditions de travail, nous avons donc retrouvé l'effet anti-agrégant du 4-HOQ décrit par Alexy et collaborateurs, ce qui nous a permis de valider notre technique.

Les taux d'inhibition supérieurs observés dans notre étude par rapport à ceux de l'étude d'Alexy peuvent s'expliquer par les différentes conditions expérimentales. En effet, il est probable que dans leur étude, le fait de pré-incuber l'inhibiteur de PARP dans du sang total, puis de centrifuger les

échantillons pour recueillir le PRP, ait entraîné la perte d'une quantité importante de 4-HOQ avec la fraction globulaire, rendant la concentration de 4-HOQ réellement présente dans le PRP plus faible.

I.2 Etude de l'effet du PJ34 sur l'agrégation plaquettaire *in vitro* sur du sang humain et comparaison avec ceux du 3-AB, de la minocycline et de l'INO-1001

L'objectif de cette étude a été, d'une part, d'évaluer les effets du PJ34 sur l'agrégation plaquettaire, et d'autre part, de vérifier l'hypothèse d'Alexy et collaborateurs selon laquelle ces effets seraient liés à une analogie structurale de certains inhibiteurs de PARP avec l'ADP et de préciser le mécanisme mis en jeu.

I.2.1 Résultats : Article

Lechaftois M, Bachelot-Loza C, Margaill I, Marchand-Leroux C, Lerouet D.

PJ34 : a potent PARP inhibitor with antiplatelet effect through P2Y₁₂ antagonism?

Soumis à British Journal of Pharmacology (voir pages 219-231).

I.2.2 Principaux résultats et discussion

En ce qui concerne le PJ34 (CI50 = 17 nM), nous avons testé des concentrations comprises entre 0,1 et 100 μ M pour les études effet-dose, et jusqu'à 500 μ M pour les études avec des concentrations croissantes d'ADP, afin de couvrir un large intervalle correspondant à des concentrations compatibles avec les doses administrées *in vivo* jusqu'à de très fortes concentrations, correspondant à des doses supra-thérapeutiques.

Tout d'abord, notre étude montre que le PJ34 inhibe l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP. En revanche, il est sans effet sur l'agrégation induite par le collagène ou un agoniste du récepteur de la thrombine, le PAR1ap. Ces résultats sont en accord avec ceux d'Alexy et collaborateurs (2004) qui ont montré que leurs inhibiteurs de PARP inhibaient l'agrégation induite par l'ADP, sans modifier celle induite par l'adrénaline ou le collagène. Ces auteurs ont supposé que cet effet anti-agrégant était lié à une compétition avec l'ADP pour se lier à ses récepteurs. Afin d'approfondir cette hypothèse, à la différence d'Alexy et collaborateurs qui ont étudié l'effet de leurs inhibiteurs de PARP sur l'agrégation maximale, nous avons utilisé des concentrations d'ADP induisant une agrégation biphasique ; la 1^{ère} phase étant plutôt liée à l'activation de P2Y1 et la 2^{nde} à celle de P2Y12. Dans ces conditions, le PJ34 n'a inhibé que la 2^{nde} phase d'agrégation, suggérant ainsi que cet effet anti-agrégant est plus spécifique de P2Y12.

Ensuite, nous avons étudié l'effet de concentrations croissantes d'ADP sur l'inhibition induite par le PJ34 (50, 100 ou 500 μ M). Nos résultats montrent que l'augmentation des concentrations d'ADP diminue l'effet inhibiteur du PJ34. Avec une concentration d'ADP de 10 μ M, l'effet anti-agrégant du PJ34 à 100 μ M disparaît même totalement. Ce résultat suggère que cet effet anti-agrégant serait lié à une compétition entre l'ADP et le PJ34 pour le récepteur P2Y12.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons évalué l'implication du récepteur P2Y12 à l'aide d'un test spécifique des inhibiteurs de ce récepteur, utilisé en clinique pour mettre en évidence la résistance des patients à un traitement par le clopidogrel (Aleil *et al.*, 2005), et basé sur l'état de phosphorylation de la protéine intra-plaquettaire VASP. Dans les conditions du test, la protéine VASP sous forme phosphorylée traduit l'état inhibé du récepteur P2Y12 alors que sa forme non phosphorylée est liée à la disponibilité du récepteur. Ainsi, en se fixant sur P2Y12, le clopidogrel empêche la déphosphorylation de VASP et donc l'activation des plaquettes. Cet effet se traduit par un faible index de réactivité plaquettaire (PRI). Pour réaliser cette étude, nous avons dû travailler avec des concentrations de PJ34 beaucoup plus fortes (100, 250, 500 et 1000 μ M) que dans les tests d'agrégation. D'une part, ceci pourrait être lié au fait que nous avons dû travailler en sang total, puisque le kit VASP/P2Y12 ne fonctionne pas sur du PRP. Il faut savoir que dans le sang l'ADP est dégradé en adénosine, un inhibiteur

de l'agrégation plaquettaire facilement capturé par les globules rouges, qui l'empêchent ainsi d'exercer son effet inhibiteur. Par conséquent, l'adénosine peut davantage inhiber l'agrégation plaquettaire dans le PRP, où les globules sont absents, que dans le sang total (Lyú *et al.*, 2011). Ceci pourrait donc expliquer que de plus faibles concentrations de PJ34 soient suffisantes pour inhiber l'agrégation plaquettaire dans le PRP. D'autre part, la concentration d'ADP fourni dans le kit n'étant pas précisée, il est possible qu'elle soit plus forte que celles utilisées dans nos tests d'agrégation. Dans ces conditions expérimentales, le PJ34 a diminué de manière concentration-dépendante le PRI, suggérant qu'il pourrait agir comme un antagoniste de P2Y₁₂.

Ces résultats *in vitro* constituent donc un faisceau de preuves en faveur d'un effet anti-agrégant du PJ34 *via* l'antagonisme compétitif de P2Y₁₂.

Afin de confirmer cet antagonisme, il serait intéressant de faire une étude de « binding ».

Nous avons ensuite comparé les effets du PJ34 avec ceux d'autres inhibiteurs de PARP de structure chimique différente. Notre choix s'est porté sur le 3-AB, l'INO-1001 et la minocycline qui se sont révélés neuroprotecteurs dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale (Yrjänheikki *et al.*, 1999 ; Couturier *et al.*, 2003 ; Komjáti *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2004 ; Koh *et al.*, 2004, 2005 ; Strosznajder *et al.*, 2005 ; Hayakawa *et al.*, 2008). Il est important de noter que l'INO-1001 est actuellement en essai clinique de phase II dans l'ischémie myocardique (Morrow *et al.*, 2009) et que la minocycline, dont l'activité inhibitrice de PARP a été découverte par Alano et collaborateurs (2006), est quant à elle testée dans plusieurs essais cliniques dans le cadre des AVCi (Lampl *et al.*, 2007 ; Fagan *et al.*, 2010).

Notre hypothèse de départ reposant sur un mécanisme « PARP-indépendant », nous ne nous sommes donc pas basés sur les valeurs de CI₅₀ inhibant la PARP (PJ34 : 17 nM ; 3-AB : 33 µM ; minocycline : de l'ordre du nM ; INO-1001 < 15 nM) pour choisir leur concentration d'utilisation. Afin de détecter un éventuel effet, nous avons ainsi choisi la concentration de 50 µM à laquelle le PJ34 avait fortement (80%) inhibé l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP.

Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons mis en évidence aucun effet du 3-AB ou de l'INO-1001 quel que soit le type d'agrégation. Ce dernier résultat est en accord avec l'étude *in vitro* de Toth et collaborateurs (2006) qui n'a montré aucun effet de l'INO-1001 à 10 ou 100 µM sur l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP et l'adrénaline. Par ailleurs, même si les auteurs suggèrent que la structure chimique de l'INO-1001 pourrait tout simplement expliquer l'absence d'effet anti-agrégant par rapport aux inhibiteurs de PARP testés dans l'étude d'Alexy et collaborateurs (2004), ils s'interrogent sur la pertinence des résultats de ces derniers en raison des fortes concentrations d'inhibiteurs utilisées. En effet, dans cette étude, les auteurs ont montré que leurs inhibiteurs de PARP inhibaient l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP à des concentrations 5 à 20 fois plus importantes

que les concentrations nécessaires pour inhiber la PARP dans des cultures de cardiomyocytes soumises à un stress oxydant. Par contre, les concentrations d'INO-1001 utilisées par Toth et collaborateurs (2006) sont cohérentes avec les concentrations utilisées *in vitro* pour inhiber la PARP dans ces mêmes cultures ou bien encore avec les concentrations plasmatiques retrouvées dans des modèles *in vivo* (0,27 et 1,4 $\mu\text{M/l}$).

On peut également s'interroger sur la pertinence de nos résultats avec le PJ34, dont un effet anti-agrégant significatif a été observé à partir de 10 μM (60% d'inhibition), même si l'agrégation tend à être inhibée dès 1 μM (environ 25%). En effet, bien que cette concentration de 10 μM soit supérieure à celle de la CI50 pour inhiber la PARP (17 nM), elle est identique à la concentration d'INO-1001 utilisée dans l'étude de Toth et dont la CI50 est du même ordre de grandeur (<15 nM). De plus, les concentrations de PJ34 utilisées dans notre étude sont cohérentes avec celles habituellement utilisées *in vitro*. Ainsi, dans un modèle d'OGD, le PJ34 (30 nM à 1 μM) inhibe de manière concentration-dépendante la mort neuronale (Abdelkarim *et al.*, 2001). Le PJ34 à 10 ou 100 μM réduit la mort cellulaire de cardiomyoblastes induite par un stress oxydant (Szepes *et al.*, 2013). Au laboratoire, la concentration de 10 μM a permis de diminuer de 70% la mort cellulaire induite par le NMDA dans des cultures de cellules endothéliales bEnd3 (données du laboratoire non publiées). Dans des cultures d'HUVEC, Mathews et Berk (2008) ont montré que le PJ34 à 10 μM réduit la mort cellulaire induite par l' H_2O_2 .

De manière intéressante, la minocycline a également montré des propriétés anti-agrégantes plaquettaires en inhibant d'environ 50-60% tous les types d'agrégation. Ainsi, contrairement au PJ34 dont l'effet anti-agrégant semble spécifique de la voie de P2Y₁₂, la minocycline semble agir *via* des mécanismes plus généraux. En effet, la minocycline a la capacité de chélater les ions bivalents, dont les ions Ca^{2+} (Glette *et al.*, 1984), indispensables au phénomène d'agrégation plaquettaire (Varga-Szabo *et al.*, 2009). Ainsi, leur chélation pourrait expliquer l'effet anti-plaquettaire de la minocycline.

Enfin, pour expliquer l'effet anti-agrégant de leurs inhibiteurs de PARP, Alexy et collaborateurs (2004) évoquent une ressemblance structurelle avec l'ADP. Il est toutefois difficile d'établir un lien entre l'effet du PJ34 et une potentielle analogie structurale avec l'ADP. En effet, mis à part la présence de 2 cycles accolés, dont l'un possède un atome d'azote, le PJ34 ne présente pas de similitude évidente avec l'ADP. Par ailleurs, l'INO-1001 présente lui aussi ce motif, mais sa taille et l'encombrement stérique qui en résulte pourrait peut-être expliquer son manque d'activité par rapport au PJ34.

En conclusion, dans cette étude *in vitro*, nous avons donc montré sur du sang humain que certains inhibiteurs de PARP sont anti-agrégants et que cet effet est « PARP-indépendant », puisque tous les inhibiteurs testés ne se sont pas révélés anti-agrégants. Cette étude est la 1^{ère} à mettre en évidence un

effet anti-agrégant du PJ34, probablement *via* une compétition avec l'ADP pour son récepteur plaquettaire P2Y₁₂. La minocycline agirait quant à elle *via* un mécanisme plus général puisqu'elle inhibe de manière identique tous les types d'agrégation.

II. CHEZ LA SOURIS

II.1 Mise au point des conditions expérimentales

Cette étude préliminaire a été réalisée pour déterminer les concentrations d'agonistes plaquettaires à utiliser pour réaliser les tests d'agrégation en PRP chez la souris. En effet, contrairement à l'Homme, l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP est réversible chez la souris (Nunn, 1981 ; Rosenblum *et al.*, 1983 ; Sudo *et al.*, 2003). Ainsi, les concentrations d'ADP ne pouvant être choisies en fonction de la présence d'une agrégation biphasique comme chez l'Homme, nous avons choisi la concentration (5 μ M) qui induisait le moins de variabilité inter-échantillons. De plus, cette concentration de 5 μ M est conforme avec les concentrations couramment utilisées dans la littérature (Angelillo-Scherrer *et al.*, 2001).

Ainsi, dans nos conditions expérimentales, l'ADP à 5 μ M provoque une agrégation maximale de 40%. Il est important de noter que des concentrations d'ADP supérieures n'ont pas induit d'agrégation au-delà de 40%.

Comme pour les études réalisées chez l'Homme, nous avons utilisé 2 autres agonistes plaquettaires, afin d'explorer différentes voies d'agrégation : le collagène et un peptide activateur du récepteur à la thrombine PAR4 ou PAR4ap. En effet, si le PAR1 est le récepteur à la thrombine prépondérant chez l'Homme, il n'est pas présent chez la souris (voir pour revue Coughlin, 2000). C'est donc son équivalent murin, le PAR4, qui est stimulé pour induire l'agrégation par la voie de la thrombine chez la souris. Nous avons utilisé le PAR4ap à 200 μ M, une concentration qui induit une agrégation de 70% reproductible entre les échantillons. Le collagène a été utilisé aux concentrations de 6 ou 8 μ g/ml, qui provoquent des agrégations de 70 à 80%. L'utilisation de ces fortes concentrations de collagène est liée à des contraintes pratiques. En effet, la réponse à l'agrégation induite par le collagène se dégrade très rapidement et impose de traiter les échantillons dans les plus brefs délais. Cependant, il existe un délai incompressible lié au prélèvement du sang des 5 souris nécessaires à la constitution du pool d'échantillon de sang de 5 ml, volume minimal nécessaire pour recueillir suffisamment de PRP pour réaliser le test.

Ne disposant pas des valeurs de 1^{ère} et 2^{nde} phases d'agrégation chez la souris avec l'ADP, nous avons regardé si d'autres paramètres que le MA pouvaient être modifiés par les inhibiteurs de PARP. Nous avons ainsi comparé le MA et l'AUC après les agrégations induites par l'ADP, le collagène et le PAR4ap. Nos résultats ayant montré que les inhibiteurs de PARP modifiaient de la même manière ces 2 paramètres (Figure 70), nous avons comparé les effets sur l'agrégation uniquement en utilisant le paramètre MA dans la suite de ce travail.

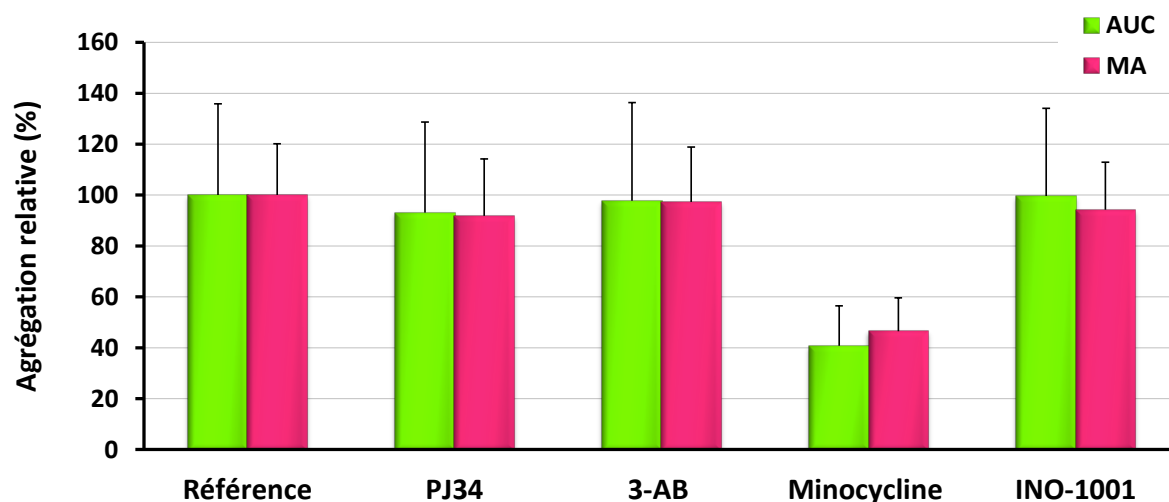


Figure 70. Exemple de comparaison entre l'agrégation maximale (MA) et l'AUC après agrégation induite par l'ADP 5 μ M

Les valeurs sont exprimées comparativement à la référence correspondante normalisée à 100% en moyenne $\pm$ SD ; n = 4-6.

II.2 Etude de l'effet du PJ34 sur l'agrégation plaquettaire *in vitro* sur du sang de souris et comparaison avec ceux du 3-AB, de la minocycline et de l'INO-1001

Après avoir déterminé les conditions expérimentales du test d'agrégation chez la souris, nous avons évalué l'effet du PJ34 sur l'agrégation plaquettaire que nous avons ensuite comparé avec ceux du 3-AB, de la minocycline et de l'INO-1001.

Compte tenu des résultats obtenus lors des tests d'agrégation chez l'Homme, nous avons choisi d'étudier le PJ34 aux concentrations de 0,1 ; 1 ; 10 et 50 μ M chez la souris.

II.2.1 Résultats

L'étude effet-concentration du PJ34 ne montre aucun effet sur l'agrégation plaquettaire qu'elle soit induite par l'ADP, le PAR4ap ou le collagène (Figure 71).

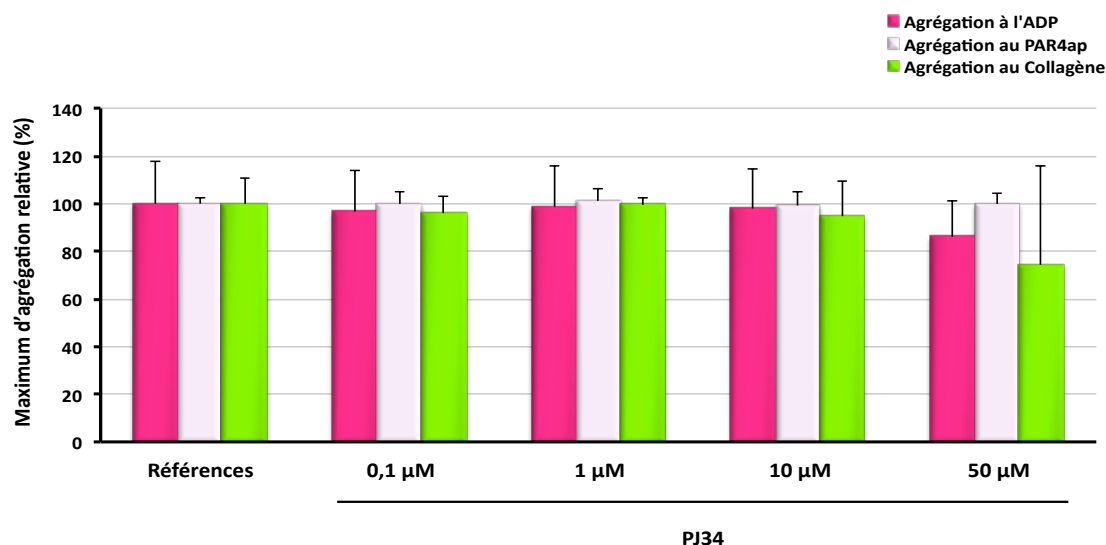


Figure 71. Effet-concentration du PJ34 sur l'agrégation plaquettaire

Les valeurs sont exprimées comparativement à la référence correspondante normalisée à 100% en moy $\pm$ SD ; n = 4-5 expériences/agoniste (ADP, PAR4ap ou collagène).

Ensuite, comme chez l'Homme, nous avons comparé les effets du PJ34 à ceux de 3 autres inhibiteurs de PARP utilisés à la concentration de 50 μ M. La figure 72 montre que la minocycline réduit l'agrégation plaquettaire par rapport à la référence, qu'elle soit induite par l'ADP ($46,5 \pm 9,61$ % *versus* $100,0 \pm 10,06$ % ; $P < 0,01$), le PAR4ap ($47,1 \pm 1,26$ % *versus* $100,0 \pm 1,20$ % ; $P < 0,001$) ou bien le collagène ($27,6 \pm 6,60$ % *versus* $100,0 \pm 6,60$ % ; $P < 0,001$). Par contre, le 3-AB ou l'INO-1001 ne modifient aucune de ces agrégations (Figure 72).

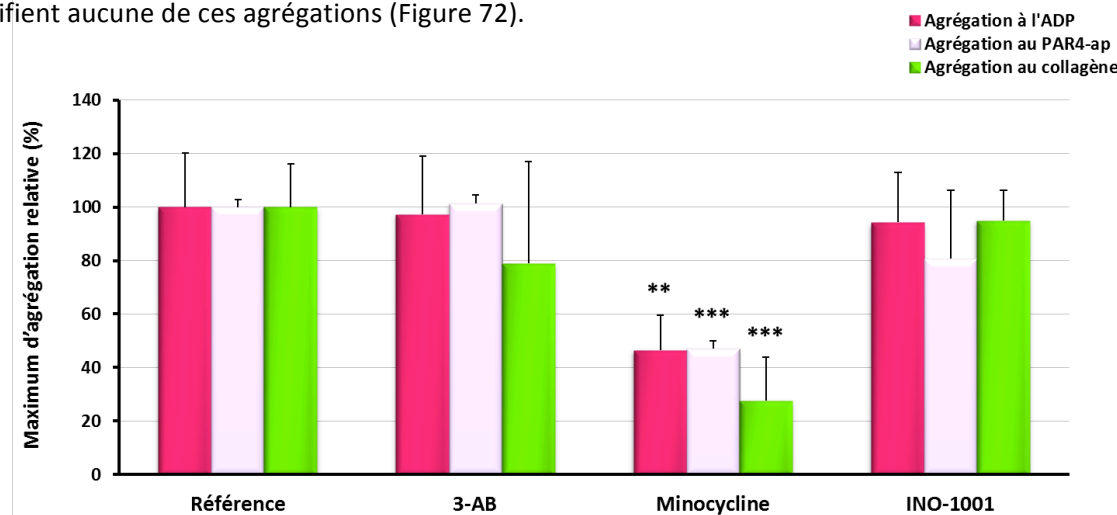


Figure 72. Effets de différents inhibiteurs de PARP sur l'agrégation plaquettaire

Les valeurs sont exprimées comparativement à la référence correspondante normalisée à 100% en moy $\pm$ SD ; n = 5-6 expériences/agoniste ; ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$ *versus* référence correspondante.

II.2.2 Discussion

Dans cette étude d'agrégation plaquettaire chez la souris, nous avons montré que comme chez l'Homme, le 3-AB et l'INO-1001 n'ont aucun effet sur l'agrégation plaquettaire, et ce, quel que soit l'agoniste utilisé. De plus, la minocycline exerce un effet anti-agrégant de 55 à 70% sur tous les types

d'agrégation, ce qui semble conforter l'hypothèse selon laquelle la minocycline exercerait son activité anti-agrégante *via* un mécanisme plus général, peut être en chélatant le Ca^{2+} .

En ce qui concerne le PJ34, nos résultats ne montrent pas de modification de l'agrégation plaquettaire induite par le PAR4ap ou le collagène comme chez l'Homme, et il est également sans effet sur l'agrégation induite par l'ADP.

Ce dernier résultat soulève des questions quant au rôle de P2Y₁₂ chez la souris, même si son implication dans l'activation et l'agrégation plaquettaires n'est plus à démontrer (voir pour revue Gachet, 2008 ; Kim et Kunapuli, 2011). En effet, de nombreuses études ont évalué son rôle chez la souris, que ce soit par inhibition pharmacologique ou délétion génique de ce récepteur. Il a ainsi été montré que l'inhibition de P2Y₁₂ par un pré-traitement oral de clopidogrel (dès 10 mg/kg) ou de prasugrel (dès 1,1 mg/kg) diminue significativement l'agrégation plaquettaire induite *ex vivo* par l'ADP (3 μM) ou le collagène (1 $\mu\text{g/ml}$) sur des échantillons de PRP (Hashimoto *et al.*, 2007). De même, la délétion génique de P2Y₁₂ inhibe fortement l'agrégation plaquettaire induite *ex vivo* par l'ADP (0,5 et 10 μM), le collagène (1 $\mu\text{g/ml}$) et le PAR4ap (1 mM) sur des échantillons de PRP (André *et al.*, 2003). De plus, chez ces souris P2Y₁₂^{-/-}, le temps de saignement est 3 fois plus important que celui mesuré chez les souris sauvages, et dans un modèle de thrombose de l'artère mésentérique induite par le FeCl_3 , l'apparition d'un thrombus est retardée et ce thrombus est non occlusif en raison de sa petite taille.

Par ailleurs, il est clairement établi qu'il existe des différences physiologiques entre les espèces, et notamment en terme d'agrégation plaquettaire. Bien que très semblables aux plaquettes humaines, les plaquettes de souris sont toutefois plus petites, 4 à 5 fois plus nombreuses, et elles possèdent également une plus grande hétérogénéité au niveau des granules, surtout les granules α (Tsakiris *et al.*, 1999 ; Schmitt *et al.*, 2001 ; Jirouskova *et al.*, 2007). De plus, des études ont montré que les plaquettes murines ne répondent pas aussi bien que les plaquettes humaines à certains agonistes, et ceci vraisemblablement en raison de différences au niveau des récepteurs et/ou des voies de signalisation.

En comparant la réponse à l'ADP sur du PRP de sang humain ou murin, Sudo et collaborateurs (2003) ont ainsi montré que chez l'Homme une faible concentration d'ADP induit une agrégation réversible, alors que de fortes concentrations sont responsables d'une seconde agrégation irréversible. Par contre, chez la souris, l'agrégation n'est jamais irréversible, même avec de fortes concentrations d'ADP pour lesquelles la désagrégation est seulement retardée. Par ailleurs, en 1981, Nunn a comparé la réponse des plaquettes murines à une stimulation par le collagène ou l'ADP. Bien que ces 2 agonistes aient provoqué une agrégation, l'auteur a constaté, en mesurant la sérotonine libérée des granules denses, que seul le collagène était responsable de cette sécrétion. Ces résultats ont été confirmés 2 ans plus

tard par Rosenblum et collaborateurs (1983) qui ont montré que contrairement à l'AA et au collagène, l'ADP ne provoquait pas de sécrétion d'ATP des granules denses, même après stimulation par des concentrations induisant des agrégations maximales. Ces résultats sont donc cohérents avec le caractère réversible de l'agrégation induite par l'ADP chez la souris. En effet, chez l'Homme, lors d'une forte stimulation, les plaquettes activées libèrent le contenu de leurs granules, notamment de l'ADP qui va stimuler le récepteur P2Y₁₂, et ainsi déclencher la 2nde phase d'agrégation, provoquant une agrégation irréversible. Il semble donc exister des différences entre les plaquettes humaines et murines dans la transduction du signal conduisant à la sécrétion. Cependant, les données actuelles de la littérature ne permettent pas de l'affirmer.

Si on regarde plus précisément la structure de P2Y₁₂, il existe 83% d'acides aminés identiques chez l'Homme et la souris (Pausch *et al.*, 2004 ; von Kügelgen, 2006). Par ailleurs, l'étude de Van Giezen et collaborateurs (2009) suggèrent qu'il n'y aurait pas qu'un seul site de fixation pour les agonistes et les antagonistes sur P2Y₁₂. On pourrait donc imaginer que l'absence d'effet anti-agrégant du PJ34 chez la souris pourrait être liée au fait que son site de fixation sur le récepteur P2Y₁₂ humain est absent sur le récepteur murin.

Par ailleurs, afin confirmer les résultats obtenus *in vitro*, nous pourrions réaliser une étude d'agrégation plaquettaire *ex vivo*, après un traitement par ces inhibiteurs de PARP administré directement chez la souris, et comparer les résultats avec un antagoniste de P2Y₁₂.

En résumé de cette 1^{ère} partie, nous avons montré que certains inhibiteurs de PARP inhibaient l'agrégation plaquettaire *in vitro*, et que cet effet anti-agrégant était « PARP-indépendant ».

Ces résultats sont les premiers à mettre en évidence un effet anti-agrégant du PJ34, probablement *via* une compétition avec l'ADP pour son récepteur plaquettaire P2Y₁₂, qui semble spécifique à l'Homme puisqu'il n'a pas été retrouvé chez la souris. Quant à la minocycline, elle semble exercer son effet anti-agrégant *via* des mécanismes plus généraux, communs aux 2 espèces et qui touchent tous les types d'agrégation.

Au vu des résultats *in vitro* obtenus dans cette 1^{ère} partie, nous avons ensuite cherché à évaluer les effets plaquettaires de l'inhibition de la PARP dans des modèles *in vivo*, en utilisant le PJ34 et la minocycline.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE DES EFFETS D'INHIBITEURS DE PARP DANS DES MODELES EXPERIMENTAUX *IN VIVO*

I. ETUDE DES EFFETS DU PJ34 ET DE LA MINOCYCLINE SUR L'HÉMOSTASE

Dans la 1^{ère} partie de ce travail, nous avons montré dans des tests d'agrégation plaquettaires *in vitro* que le PJ34 et la minocycline présentent des effets anti-agrégants plaquettaires « PARP-indépendants ». Si cet effet s'observe aussi bien sur du sang humain que murin pour la minocycline, il semble spécifique à l'Homme pour le PJ34. Un tel effet anti-agrégant de ces inhibiteurs de PARP pourrait constituer un élément favorable susceptible d'améliorer la reperfusion et/ou de diminuer les risques de réocclusion à la suite d'une ischémie cérébrale, mais aussi d'augmenter le risque hémorragique. La suite logique de ce travail a donc été d'évaluer les effets *in vivo* de ces deux inhibiteurs sur l'hémostase.

Dans ce contexte, nous avons évalué les effets du PJ34 et de la minocycline sur 3 tests d'exploration des fonctions plaquettaires chez la souris : le temps de saignement, des modèles de thromboembolie pulmonaire et un modèle de thrombose carotidienne induite par le FeCl₃.

Protocole expérimental :

Le traitement a consisté à administrer chez la souris le PJ34 (25 mg/kg) ou la minocycline (90 mg/kg) par voie i.p. (100 µl/10 g). Le choix des doses a été établi d'après les données du laboratoire et de la littérature. Nous avons ainsi choisi une dose de PJ34 de 25 mg/kg que le laboratoire a précédemment montrée neuroprotectrice dans notre modèle d'ischémie cérébrale transitoire chez la souris (Haddad *et al.*, 2006). Pour la minocycline, nous avons choisi une dose de 90 mg/kg utilisée dans des modèles d'ischémie cérébrale (Cho *et al.*, 2007) ou de traumatisme crânien (Homsy *et al.*, 2009).

I.1. Étude des effets du PJ34 et de la minocycline sur le temps de saignement

Le temps de saignement correspond au temps qui s'écoule entre la réalisation d'une plaie cutanée et le moment où le saignement provoqué s'arrête. Ce test est couramment utilisé pour apprécier le risque hémorragique de stratégies antiplaquettaires et il permet une exploration globale de l'hémostase primaire (Grüner *et al.*, 2004 ; Jandrot-Perrus *et al.*, 2010). Il évalue ainsi le rôle des mécanismes d'adhésion et d'agrégation des plaquettes au niveau de la lésion, conduisant à la formation du clou plaquettaire qui va limiter les pertes de sang.

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé le modèle décrit par Grüner et collaborateurs (2004), qui consiste à couper un segment à l'extrémité de la queue d'une souris et à absorber le sang à l'aide d'un papier filtre jusqu'à l'arrêt du saignement.

Temps de saignement (s)

I.1.1 Validation du modèle

Afin de valider nos conditions expérimentales, nous avons utilisé l'aspirine (ASA) comme stratégie antiplaquettaire de référence connue pour allonger le temps de saignement, à la dose de 100 mg/kg (Grüner *et al.*, 2004).

Les protocoles de traitement étant très variables d'une étude à l'autre (Grüner *et al.*, 2004 ; Teng *et al.*, 1997 ; Hayashi *et al.*, 2012), les souris ont été traitées par l'ASA ou son solvant (PBS 10 mM) par voie i.p. 30 minutes ou 1 heure avant le début du test.

Nos résultats ne montrent aucune différence significative entre les groupes ASA et solvant, et ce, quel que soit le temps de traitement (30 minutes : 227 ± 94,2 s *versus* 266 ± 135,8 s ; 1 heure : 498 ± 212,9 s *versus* 429 ± 337,8 s ; Figure 73 et Tableau XXI).

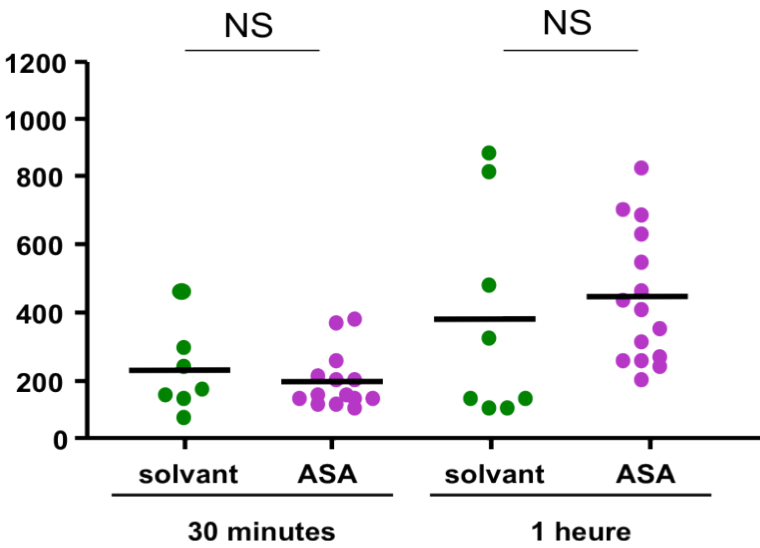


Figure 73 et Tableau XXI. Effet de l'ASA sur le temps de saignement

Durée de traitement	Temps de saignement (s) Solvant (moy ± SD)	Temps de saignement (s) ASA (moy ± SD)
30 minutes	266 ± 135,6	227 ± 94,2
1 heure	229 ± 337,8	498 ± 212,9

L'ASA (100 mg/kg) ou son solvant (PBS 10 mM) sont administrés par voie intrapéritonéale 30 minutes ou 1 heure avant la réalisation du test.

Au vu de ces résultats, nous avons réalisé une nouvelle expérience en administrant l'ASA ou son solvant 3 heures avant le début du test, afin de reproduire les conditions expérimentales de l'étude de Grüner et collaborateurs (2004).

La Figure 74 et le Tableau XXII montrent que l'ASA augmente de façon significative ($\times 2,5$) le temps de saignement par rapport au solvant ($551 \pm 297,4$ s *versus* $201 \pm 94,7$ s ; $P < 0,001$).

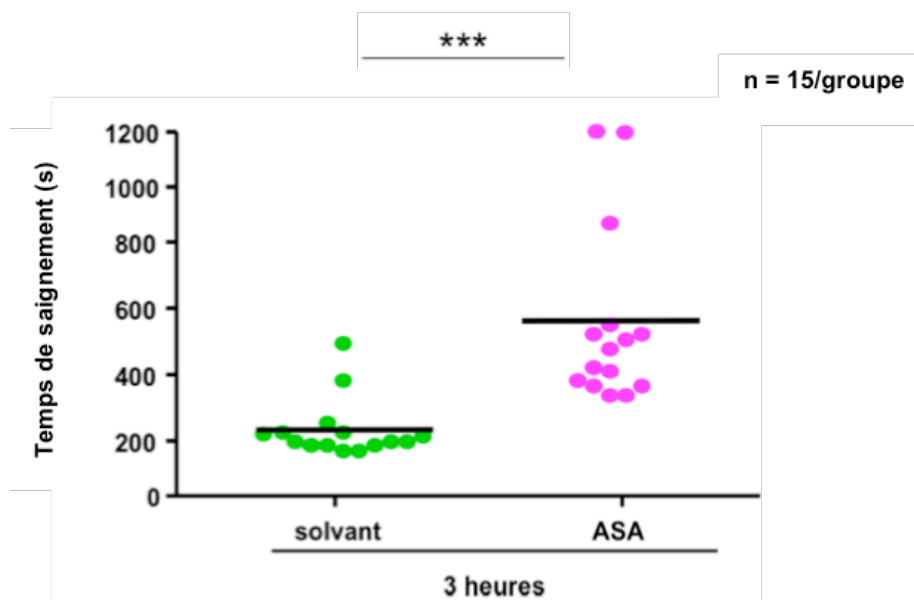


Figure 74 et Tableau XXII. Effet de l'ASA sur le temps de saignement

Durée de traitement	Temps de saignement (s) Solvant (moy $\pm$ SD)	Temps de saignement (s) ASA (moy $\pm$ SD)
3 heures	201 $\pm$ 94,7	551 $\pm$ 297,4

L'ASA (100 mg/kg) ou son solvant (PBS 10 mM) sont administrés par voie intrapéritonéale 3 heures avant la réalisation du test. *** : $P < 0,001$ *versus* solvant.

Le modèle étant validé, nous avons ensuite étudié les effets des inhibiteurs de PARP.

I.1.2 Effets du PJ34 et de la minocycline sur le temps de saignement

Etant donné la variabilité du temps de saignement observée avec l'ASA en fonction du délai entre le traitement et la réalisation du test (30 minutes, 1 heure ou 3 heures), nous avons ensuite étudié les effets d'une administration de PJ34, de minocycline ou de leur solvant (NaCl à 0,9%) à différents temps : 30 minutes, 1 heure, 2 heures ou 3 heures avant la réalisation du test.

Quel que soit le temps d'administration, nous n'observons aucune différence significative entre les groupes traités par le PJ34 et les groupes solvant correspondants (Figure 75 et Tableau XXIII).

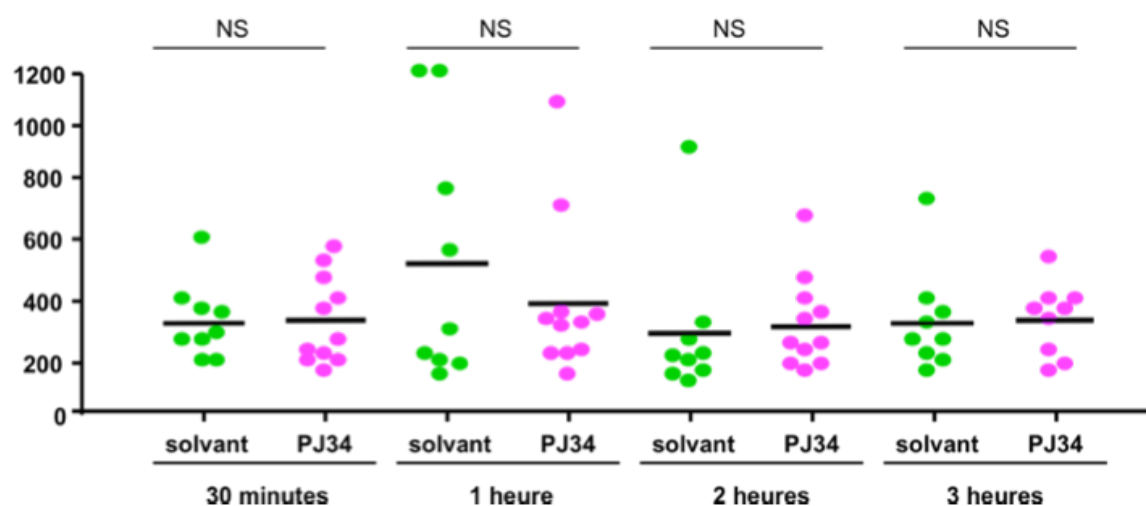


Figure 75 et Tableau XXIII. Effet du PJ34 sur le temps de saignement

Durée de traitement	Temps de saignement (s) Solvant (moy ± SD)	Temps de saignement (s) PJ34 (moy ± SD)
30 minutes	293 ± 132,9	300 ± 165,5
1 heure	508 ± 447,6	360 ± 285,1
2 heures	257 ± 260,3	287 ± 166,1
3 heures	293 ± 186,6	307 ± 129,1

Le PJ34 (25 mg/kg) ou son solvant (NaCl à 0,9%) sont administrés par voie intrapéritonéale 30 minutes, 1 heure, 2 heures ou 3 heures avant la réalisation du test.

La Figure 76 et le Tableau XXIV montrent que le traitement par la minocycline 30 minutes, 1 heure, 2 heures ou 3 heures avant le test ne modifie pas le temps de saignement par rapport aux animaux traités par le solvant correspondants.

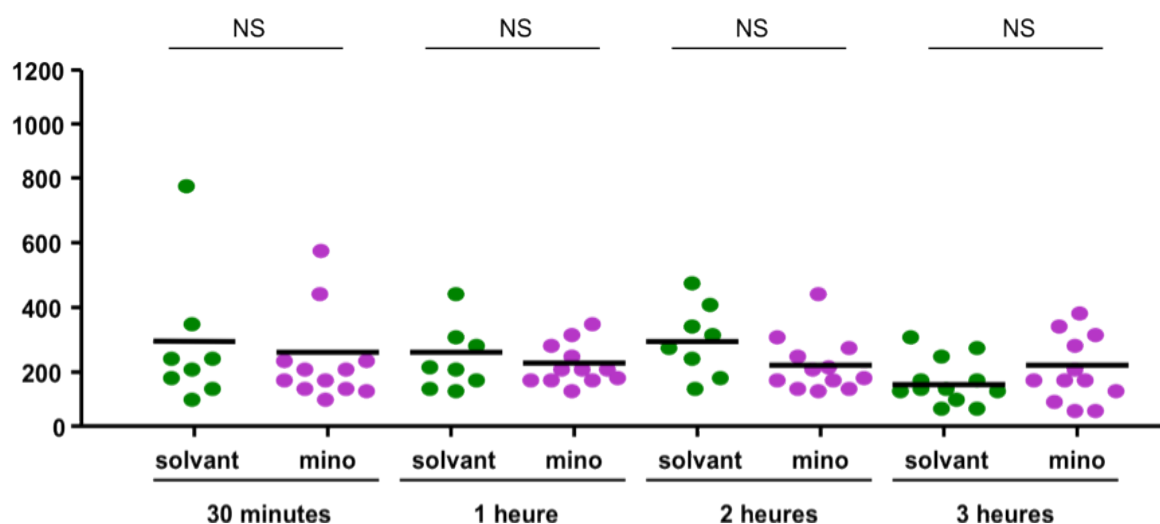


Figure 76 et Tableau XXIV. Effet de la minocycline (mino) sur le temps de saignement

Durée de traitement	Temps de saignement (s) Solvant (moy ± SD)	Temps de saignement (s) Minocycline (moy ± SD)
30 minutes	244 ± 217,9	177 ± 122,0
1 heure	176 ± 87,0	151 ± 51,4
2 heures	204 ± 79,8	164 ± 57,4
3 heures	127 ± 45,0	155 ± 77,4

La minocycline (90 mg/kg) ou le solvant (NaCl à 0,9%) sont administrés par voie intrapéritonéale 30 minutes, 1 heure, 2 heures ou 3 heures avant la réalisation du test.

N'ayant pas constaté de modification du temps de saignement avec les inhibiteurs de PARP, nous avons décidé pour la suite des études sur l'hémostase de ne garder que 2 temps de traitement, 30 minutes et 3 heures avant la réalisation du test, afin d'évaluer les effets à un temps précoce et à un temps tardif.

I.2. Étude des effets du PJ34 et de la minocycline dans des modèles de thromboembolie pulmonaire

Les modèles de thromboembolie pulmonaire mesurent la résistance d'une souris à un processus thromboembolique aigu induit sans lésion de l'endothélium, par l'injection intraveineuse (dans la veine latérale de la queue ; 50 µl/10 g) d'agonistes plaquettaires. Des agrégats plaquettaires se forment dans la circulation et conduisent à l'obstruction de la microcirculation pulmonaire, à la paralysie des membres inférieurs, puis à la mort rapide de l'animal (Jandrot-Perrus *et al.*, 2010). On compare ainsi le taux de survie ou de mortalité sur une période d'observation maximale donnée (10 minutes dans notre étude) entre un groupe contrôle et un groupe traité.

Au vu des résultats obtenus dans les tests d'agrégation plaquettaire *in vitro*, nous avons choisi d'induire la thromboembolie pulmonaire par l'injection intraveineuse d'ADP ou d'un mélange de collagène/adrénaline, afin de distinguer l'implication des deux voies d'activation plaquettaire.

I.2.1 Modèle de thromboembolie pulmonaire induite par l'ADP

- **Mise au point du modèle : choix de la dose d'ADP**

Pour déterminer la dose d'ADP à administrer, nous nous sommes référés à l'article de Teng et collaborateurs (1997), qui a montré une mortalité de 95% avec une dose de 300 mg/kg d'ADP injectée par voie intraveineuse (50 µl/10 g).

En utilisant ce protocole, nous avons observé une mortalité de 1 souris sur 11 (9%) seulement. Nous avons donc augmenté la dose d'ADP à 400 mg/kg, ce qui nous a permis d'observer une mortalité de 6 souris sur 8, soit un taux de mortalité de 75%. Nous avons donc gardé la dose d'ADP de 400 mg/kg pour la suite de l'étude.

L'injection d'ADP dans la veine de la queue induit une agitation importante de l'animal qui s'arrête brutalement, suivie d'une respiration forcée et de la mort de l'animal. Ces effets sont observés quasiment instantanément au moment de l'injection de l'agoniste plaquettaire. La mort de l'animal survient très rapidement, environ 30 à 45 secondes après l'injection d'ADP.

- **Effets du PJ34 et de la minocycline sur la thromboembolie pulmonaire induite par l'ADP**

Nos résultats montrent que ni le PJ34, ni la minocycline ne modifient significativement la mortalité des animaux traités par rapport aux groupes solvant correspondants (Tableaux XXV et XXVI).

Tableaux XXV et XXVI. Effets d'un prétraitement de 30 minutes ou 3 heures du PJ34 et de la minocycline sur la mortalité dans le modèle de thromboembolie pulmonaire induite par l'ADP

Traitement 30 minutes	Nombre souris mortes/total	Mortalité (%)
Solvant	9 / 10	90
PJ34	9 / 10	90
Minocycline	10 / 10	100

Traitement 3 heures	Nombre souris mortes/total	Mortalité (%)
Solvant	8 / 10	80
PJ34	8 / 10	80
Minocycline	7 / 10	70

Le PJ34 (25 mg/kg), la minocycline (90 mg/kg) ou le solvant (NaCl à 0,9%) sont administrés par voie intrapéritonéale 30 minutes ou 3 heures avant l'injection intraveineuse d'ADP (400 mg/kg). La durée maximale d'observation est de 10 minutes.

Par ailleurs, ces 2 traitements ne modifient pas non plus la durée de survie des animaux traités par rapport aux groupes solvant correspondants (Figures 77 et 78).

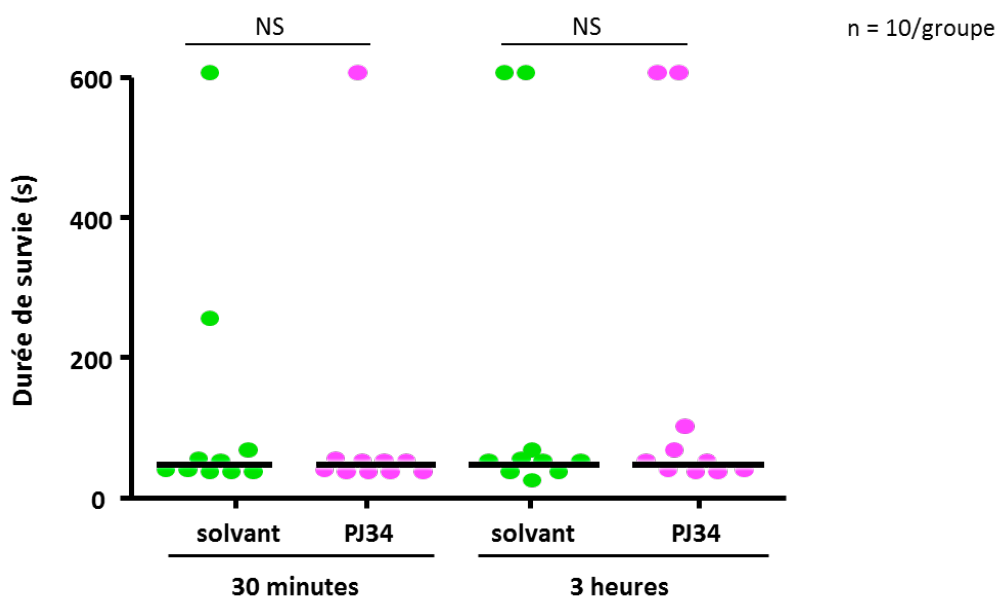


Figure 77. Effet du PJ34 sur la durée de survie dans le modèle de thromboembolie pulmonaire induite par l'ADP

Le PJ34 (25 mg/kg) ou le solvant (NaCl à 0,9%) sont administrés par voie intrapéritonéale 30 minutes ou 3 heures avant l'injection intraveineuse d'ADP (400 mg/kg). La durée maximale d'observation est de 10 minutes.

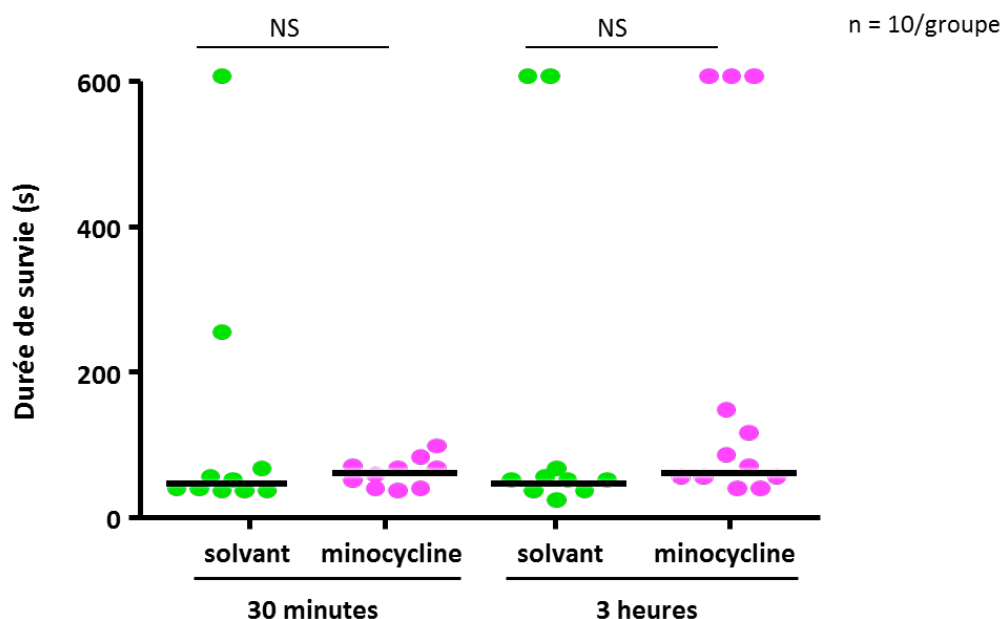


Figure 78. Effet de la minocycline sur la durée de survie dans le modèle de thromboembolie pulmonaire induite par l'ADP

La minocycline (90 mg/kg) ou le solvant (NaCl à 0,9%) sont administrés par voie intrapéritonéale 30 minutes ou 3 heures avant l'injection intraveineuse d'ADP (400 mg/kg). La durée maximale d'observation est de 10 minutes.

1.2.2 Modèle de thromboembolie pulmonaire induite par un mélange collagène/adrénaline

- **Mise au point du modèle : choix des doses de collagène et d'adrénaline**

Nous nous sommes basés sur l'article de Pozgajova et collaborateurs (2006) où le mélange collagène/adrénaline administré par voie intraveineuse (50 µl/10 g), respectivement aux doses de 0,8 mg/kg et 60 µg/kg, entraîne une mortalité de 100%.

En utilisant ce protocole, nous n'avons observé qu'une mortalité de 4 souris sur 10 (40%).

Nous avons donc augmenté les doses à 1 mg/kg et 120 µg/kg, mais, à nouveau, nous n'avons observé la mortalité que d'1 seule souris sur 4 (25%). Enfin, nous avons injecté les doses de 1,2 mg/kg et 120 µg/kg qui nous ont permis d'obtenir une mortalité de 3 souris sur 4 (75%).

L'injection du mélange collagène/adrénaline induit les mêmes effets que ceux observés lors de l'administration d'ADP, mais plus tardivement. La mort ne survient qu'au bout de 2 ou 3 minutes après l'injection.

- **Effets du PJ34 et de la minocycline sur la thromboembolie pulmonaire induite par un mélange collagène/adrénaline**

Comme dans le modèle précédent, nos résultats ne mettent en évidence aucun effet du PJ34 ou de la minocycline sur le taux de mortalité (Tableaux XXVII et XXVIII) ou sur la durée de survie des animaux (Figures 79 et 80) par rapport aux groupes solvant correspondants.

Tableaux XXVII et XXVIII. Effets d'un prétraitement de 30 minutes ou 3 heures du PJ34 et de la minocycline sur la mortalité dans le modèle de thromboembolie pulmonaire induite par l'ADP

Traitement 30 minutes	Nombre souris mortes/total	Mortalité (%)
Solvant	7 / 8	88
PJ34	6 / 8	75
Minocycline	6 / 8	75

Traitement 3 heures	Nombre souris mortes/total	Mortalité (%)
Solvant	6 / 8	75
PJ34	6 / 8	75
Minocycline	8 / 8	100

Le PJ34 (25 mg/kg), la minocycline (90 mg/kg) ou le solvant (NaCl à 0,9%) sont administrés par voie intrapéritonéale 30 minutes ou 3 heures avant l'injection intraveineuse d'un mélange de collagène/adrénaline (1,2 mg/kg / 120 µg/kg). La durée maximale d'observation est de 10 minutes.

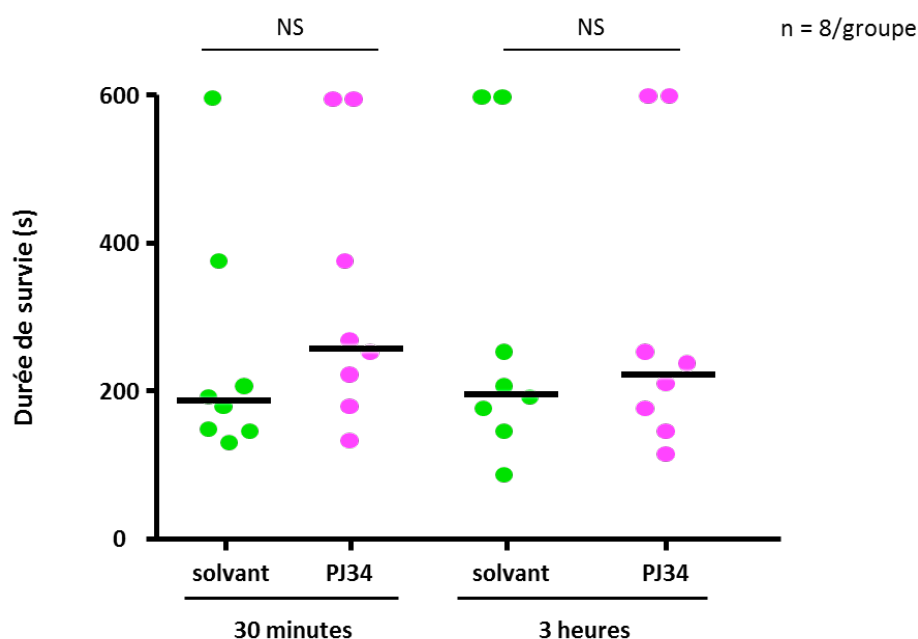


Figure 79. Effet du PJ34 sur la durée de survie dans le modèle de thromboembolie pulmonaire induite par collagène/adrénaline

Le PJ34 (25 mg/kg) ou le solvant (NaCl à 0,9%) sont administrés par voie intrapéritonéale 30 minutes ou 3 heures avant l'injection intraveineuse d'un mélange de collagène/adrénaline (1,2 mg/kg / 120 µg/kg). La durée maximale d'observation est de 10 minutes.

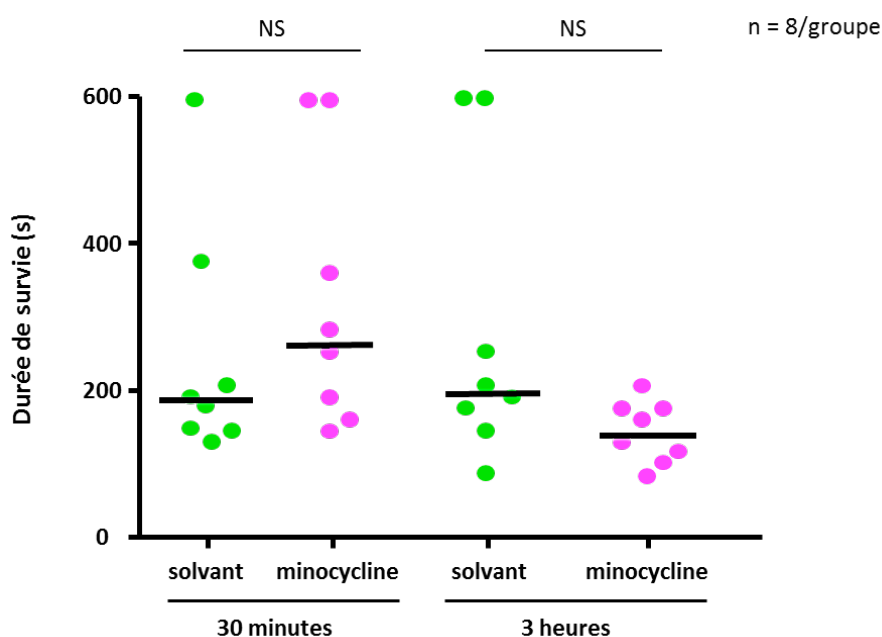


Figure 80. Effet de la minocycline sur la durée de survie dans le modèle de thromboembolie pulmonaire induite par collagène/adrénaline

La minocycline (90 mg/kg) ou le solvant (NaCl à 0,9%) sont administrés par voie intrapéritonéale 30 minutes ou 3 heures avant l'injection intraveineuse d'un mélange de collagène/adrénaline (1,2 mg/kg / 120 µg/kg). La durée maximale d'observation est de 10 minutes.

I.3 Etude des effets du PJ34 et de la minocycline dans un modèle de thrombose artérielle induite par le FeCl₃

À l'inverse des modèles de thromboembolie pulmonaire précédents, le modèle de thrombose artérielle induite par le FeCl₃ provoque une lésion de l'endothélium, qui va favoriser la formation d'un thrombus plaquettaire (Day *et al.*, 2004 ; Kurz *et al.*, 1990).

I.3.1 Mise au point du modèle

Les protocoles décrits dans la littérature pour réaliser le modèle de thrombose artérielle par application de FeCl₃ étant multiples, en termes de taille et de papier filtre, de concentration de FeCl₃, de durée d'application du papier filtre ou même d'artère occluse (voir pour revue Denis *et al.*, 2011), nous avons choisi de réaliser l'occlusion de l'ACC en posant pendant 4 minutes une pastille de papier filtre de 2 mm de diamètre imbibée d'une solution de FeCl₃.

Dans un 1^{er} temps, il nous a fallu déterminer la concentration de FeCl₃ permettant d'obtenir un modèle reproductible, et ceci, en prenant comme critère, le temps d'occlusion complète de l'ACC, c'est-à-dire le temps entre la pose de la pastille et l'obtention d'un flux sanguin nul. Nous avons donc testé 3 concentrations de FeCl₃ : 10, 15 et 20%.

Nos résultats ne montrent pas de différences significatives entre les 3 concentrations : $14,0 \pm 4,6$ s avec la concentration de 10% ; $9,7 \pm 1,2$ s avec la concentration de 15% et $10,2 \pm 1,9$ s avec la concentration de 20% (Figure 81), mais on constate toutefois que le temps d'occlusion complète de l'ACC est plus variable avec la concentration de FeCl₃ de 10% (33,1% *versus* 12,5% et 18,3% avec les concentrations respectives de 15% et 20%).

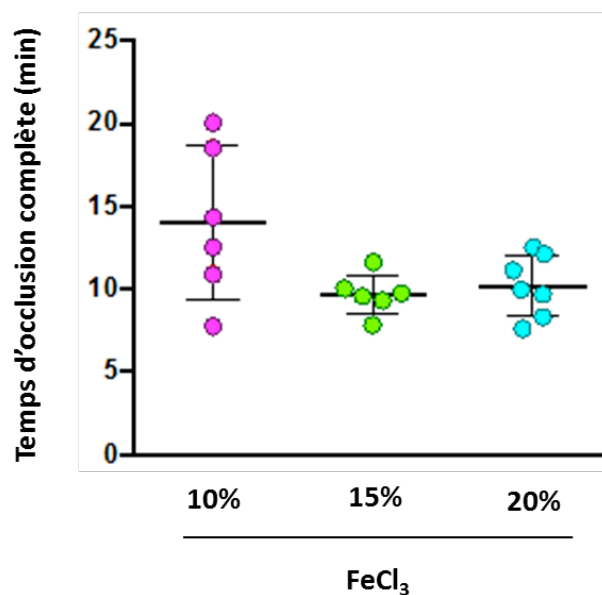
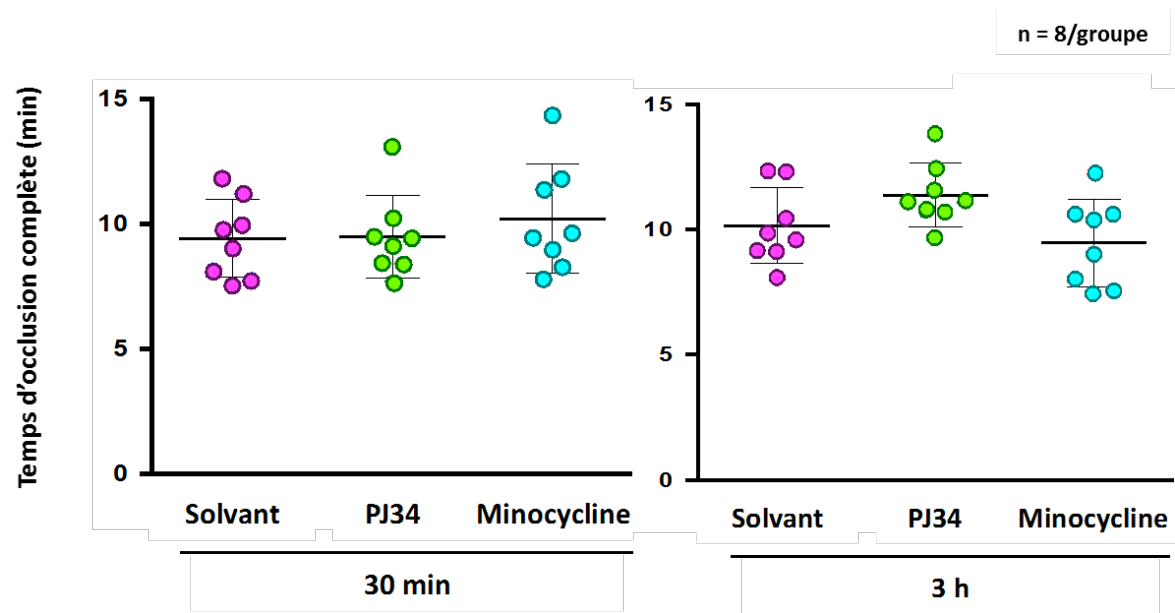


Figure 81. Effet de la concentration du FeCl₃ sur le temps d'occlusion complète

Compte tenu de la variabilité avec la concentration de 10%, nous avons donc poursuivi avec la plus faible des deux concentrations éligibles, c'est-à-dire 15%.

I.3.2 Effets du PJ34 et de la minocycline dans un modèle de thrombose artérielle par le FeCl₃ à 15%

Les Figures 82 et 83 et les Tableaux XXIX et XXX ne mettent en évidence aucune différence significative entre les groupes traités par le PJ34 ou la minocycline 30 minutes ou 3 heures avant l'induction de la thrombose et le groupe solvant correspondant.



Figures 82 et 83 et Tableaux XXIX et XXX. Effet du PJ34 et de la minocycline dans un modèle de thrombose artérielle induite par le FeCl₃ à 15%

Traitement 30 minutes	Temps d’occlusion complète en min (moy ± SD)	Début de la chute en min (moy ± SD)	Durée de la chute en min (moy ± SD)
Solvant	9,4 ± 1,56	6,9 ± 0,82	2,5 ± 1,46
PJ34	9,5 ± 1,65	6,4 ± 1,28	3,0 ± 1,00
Minocycline	10,2 ± 2,20	7,0 ± 1,27	3,2 ± 1,44

Traitement 3 heures	Temps d’occlusion complète en min (moy ± SD)	Début de la chute en min (moy ± SD)	Durée de la chute en min (moy ± SD)
Solvant	10,1 ± 1,54	7,2 ± 1,18	2,9 ± 0,96
PJ34	11,4 ± 1,27	8,3 ± 1,26	3,1 ± 0,89
Minocycline	9,5 ± 1,74	7,0 ± 1,66	2,4 ± 0,96

Le PJ34 (25 mg/kg), la minocycline (90 mg/kg) ou le solvant (NaCl à 0,9%) sont administrés par voie intrapéritonéale 30 minutes ou 3 heures avant l’induction de la thrombose artérielle.

I.4 Discussion

Dans un 1^{er} temps, nous avons étudié les effets du PJ34 et de la minocycline, deux inhibiteurs de PARP, sur le temps de saignement, test qui permet d’explorer l’hémostase primaire. Pour cela, nous avons reproduit la technique décrite par Grüner et collaborateurs (2004). Tout d’abord, nous avons validé ce modèle chez la souris en utilisant l’ASA (100 mg/kg), comme stratégie anti-plaquettaire de référence. Dans notre étude, l’ASA, administrée 3 heures avant la réalisation du test, a permis d’allonger (x2,5) le temps de saignement, conformément aux données de la littérature (Grüner *et al.*, 2004 ; Hayashi *et al.*,

2012). Par contre, nous n'avons pas observé de modification du temps de saignement chez les souris traitées par le PJ34 (25 mg/kg) ou la minocycline (90 mg/kg), que ce soit 30 minutes, 1 heure, 2 heures ou 3 heures avant la réalisation du test.

Nos résultats suggèrent donc que, dans nos conditions expérimentales, les deux inhibiteurs de PARP n'ont pas d'effet sur l'hémostase primaire. Ils ne semblent donc présenter ni d'effet pro-agrégant pouvant expliquer la réduction des TH spontanées ou induites par le rt-PA que nous avons précédemment observées (Haddad *et al.*, 2008, 2013 ; Teng *et al.*, 2013 ; Murata *et al.*, 2008), ni d'effet anti-agrégant pouvant exposer à un risque hémorragique, qui est la principale complication des stratégies anti-plaquettaires.

Ensuite, nous avons cherché à déterminer si ces deux inhibiteurs de PARP étaient susceptibles de modifier directement la formation d'un thrombus, en utilisant deux modèles de thrombose. Il existe en effet de nombreux modèles *in vivo* de thrombose permettant d'étudier l'effet pro- ou anti-thrombotique d'une molécule. Ces modèles permettent d'explorer différents mécanismes intervenant dans la formation du thrombus (Day *et al.*, 2004). Nous avons choisi d'utiliser le modèle de thromboembolie pulmonaire et le modèle de thrombose artérielle induite par le FeCl₃.

Le modèle de thromboembolie pulmonaire est un modèle de thrombose veineuse dans lequel la paroi vasculaire reste intacte et il permet d'étudier l'interaction entre les plaquettes (Teng *et al.*, 1997). L'embolie pulmonaire a été induite par deux agonistes plaquettaires qui explorent deux voies d'activation plaquettaires différentes :

- l'ADP, qui a permis de montrer un effet anti-agrégant du PJ34 dans l'étude *in vitro* d'agrégation plaquettaire chez l'Homme,
- le collagène (associé à de l'adrénaline).

Nos résultats montrent qu'un traitement par le PJ34 ou la minocycline, 30 minutes ou 3 heures, avant l'injection de ces agonistes plaquettaires ne modifie ni le taux de mortalité, ni la durée de survie des animaux. Ces résultats sont en accord avec les données précédentes montrant l'absence d'effet de ces molécules sur la fonction plaquettaire.

Contrairement au modèle de thromboembolie pulmonaire, le modèle de thrombose artérielle induite par le FeCl₃ est un modèle dans lequel ce composé induit une lésion de la paroi vasculaire, qui va conduire à la formation d'un thrombus. Toutefois, le mécanisme mis en jeu est encore mal connu.

Dans la littérature, on trouve de nombreux protocoles, en terme de concentration de FeCl_3 (2,5 à 50%) et de durée d'exposition au FeCl_3 (Denis *et al.*, 2011). Notre modèle a été validé en appliquant une pastille de papier filtre imbibée avec du FeCl_3 à une concentration de 15% pendant 4 minutes.

Dans ce modèle, un pré-traitement (30 minutes ou 3 heures) avec le PJ34 ou la minocycline n'a pas modifié le temps au bout duquel se forme le thrombus, suggérant comme dans le modèle de thromboembolie pulmonaire que ces deux molécules n'ont pas d'effet pro- ou anti-thrombotique.

Ainsi l'ensemble des résultats obtenus dans nos différents modèles montre que le PJ34 et la minocycline n'ont pas d'effet pro- ou anti-thrombotique quel que soit le terrain vasculaire au niveau de l'occlusion, lésé ou non.

Il est important de souligner le manque de standardisation de ces modèles qui rend difficile les comparaisons de résultats entre différents laboratoires. En effet, comme nous l'avons mentionné à plusieurs reprises, de nombreux protocoles de modèles de temps de saignement, de thromboembolie pulmonaire et de thrombose artérielle sont décrits dans la littérature (Denis *et al.*, 2011) et prêtent donc fréquemment à discussion.

Toutefois, dans nos conditions expérimentales, nous avons montré que les deux inhibiteurs de PARP testés, le PJ34 et la minocycline, n'ont pas d'effet sur des tests d'exploration de l'hémostase. Un tel résultat ne soutend donc pas la réduction par le PJ34 des TH observées dans un modèle d'ischémie cérébrale permanente au laboratoire (Haddad *et al.*, 2008, 2013 ; Teng *et al.*, 2013), d'une part, et d'autre part, il est donc peu probable que les inhibiteurs de PARP exposent à des risques de saignement.

Au cours de ces études *in vivo* chez la souris, nous n'avons pas retrouvé l'effet anti-agrégant de la minocycline que nous avons observé dans notre étude d'agrégation plaquettaire *in vitro*. Il est possible que la dose de 90 mg/kg administrée *in vivo* ne permette pas d'atteindre des concentrations plasmatiques aussi fortes que celle utilisée *in vitro* (50 μM), et ne permette donc pas d'exercer d'effet anti-agrégant. Un dosage plasmatique pourrait permettre de le vérifier.

Par ailleurs, comme dans les tests d'agrégation *in vitro*, nous n'avons pas observé d'effet du PJ34 *in vivo*, suggérant l'innocuité de la molécule chez l'animal. En revanche, nous ne pouvons pas extrapoler ce résultat chez l'Homme, où le PJ34 s'était révélé anti-agrégant *in vitro*.

Après avoir mis en évidence l'innocuité du PJ34 et de la minocycline, nous avons ensuite recherché si l'inhibition de la PARP par le PJ34 interagissait avec l'activité thrombolytique du rt-PA dans un modèle de thrombose de l'ACM induite par le FeCl_3 . En effet, une éventuelle diminution de la thrombolyse par

le PJ34 compromettrait l'association des deux molécules. Au contraire, si le PJ34 améliorerait la thrombolyse par le rt-PA, cela permettrait de favoriser la recanalisation et/ou de réduire les doses de rt-PA, et donc ses effets délétères.

II. ETUDE DE L'INTERACTION DU PJ34 ET DU RT-PA DANS UN MODELE DE THROMBOSE DE L'ACM PAR LE FeCl₃

Nous venons de voir que le PJ34 ne modifiait pas l'hémostase dans nos modèles de temps de saignement, de thromboembolie pulmonaire et de thrombose carotidienne, démontrant son innocuité dans nos conditions expérimentales. Il est toutefois important de vérifier son effet sur la thrombolyse induite par le rt-PA. En effet, si le PJ34 s'avère entraver la thrombolyse, cela constituerait un frein indéniable à son utilisation en clinique. En revanche, si le PJ34 améliore la thrombolyse, cela établirait un argument supplémentaire en faveur de son administration dans le cadre du traitement des AVCi.

Le modèle de thrombose cérébrale que nous avons utilisé a été récemment développé par Karatas et collaborateurs (2011) et consiste à occlure l'ACM par application locale d'une pastille de papier filtre imprégnée de solution de FeCl₃. L'intérêt de ce modèle est de pouvoir suivre l'effet d'un traitement sur le DSC après occlusion et donc de répondre aux objectifs de notre étude qui sont d'évaluer (1) si le PJ34 modifie le délai d'occlusion de l'ACM et (2) si le PJ34 modifie la thrombolyse induite par le rt-PA.

Ce modèle a été introduit au laboratoire par le Pr Michel Plotkine et cette étude a été réalisée en collaboration avec M. Bérard Coqueran, technicien au laboratoire.

II.1 Mise au point

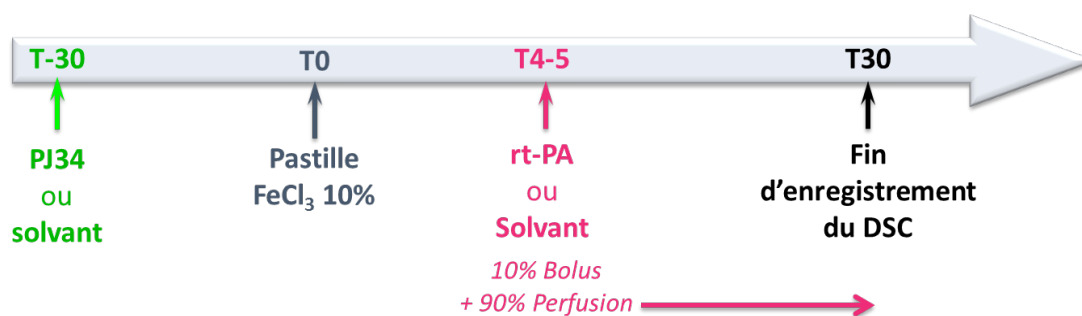
Lors d'essais préliminaires, nous nous sommes inspirés des conditions expérimentales décrites par Karatas et collaborateurs (2011) pour mettre au point notre modèle. Dans leur étude, un papier filtre de forme rectangulaire (0,3 x 1 mm²) imprégné d'une solution de FeCl₃ à 10% est placé pendant 3 minutes, après craniectomie, sur la dure-mère au niveau du tronc de l'ACM distale. Ce dispositif provoque une chute du DSC dans les 10 minutes et l'occlusion complète du segment de l'ACM sous le papier filtre en 17 ± 2 minutes. Après avoir déterminé les conditions provoquant une occlusion reproductible, cette équipe a recherché si le caillot formé pouvait être lysé par le rt-PA. Pour cela, le rt-PA (10 mg/kg) a été administré par voie intraveineuse de manière précoce, 10 minutes après l'application du FeCl₃, et se décompose en une administration de 10% de la dose en bolus, puis le reste

en perfusion continue pendant 30 minutes. Dans ces conditions, le taux de reperfusion était d'environ 50% (12 souris/23).

Nous avons observé que l'application d'une pastille de papier filtre de 1,5 mm de diamètre imprégnée de FeCl_3 de 10% à 30% pendant 3 minutes sur la dure-mère n'induisait pas d'occlusion, quelle que soit la durée de la pose. Nous avons donc modifié le protocole en incisant la dure-mère avant la pose de la pastille. Dans ces nouvelles conditions, cette modification nous a conduit à nous interroger sur la concentration de FeCl_3 à utiliser. Ainsi, nous avons comparé les concentrations de 5 et 10%. La concentration de 5% n'a pas provoqué d'occlusion reproductible puisque certains animaux présentaient une occlusion complète alors que d'autres reperfusaient spontanément ou bien encore ne présentaient pas d'occlusion de l'ACM. En raison de ce manque de reproductibilité, nous avons choisi de garder la concentration de 10% dans notre étude. Un autre facteur déterminant est la taille du papier filtre. Lors de nos premiers essais, la pastille était de 1,5 mm de diamètre. Cependant, nous avons observé que celle-ci endommageait le tissu péri-artériel en raison de sa taille trop importante. Nous avons donc utilisé des pastilles plus petites de 1,2 mm de diamètre. Le temps de pose de la pastille a été maintenu à 3 minutes, comme dans l'étude de Karatas et collaborateurs (2011). Nous avons conservé la dose (10 mg/kg) et le protocole d'administration du rt-PA, à savoir 10% de la dose en bolus, puis les 90% restants en perfusion. En revanche, nous avons choisi de l'administrer entre 4 et 5 minutes à partir de la pose de la pastille de FeCl_3 au lieu de 10 minutes, comme dans l'étude de Karatas et collaborateurs (2011). Nous avons en effet choisi d'administrer le rt-PA avant l'occlusion complète de l'ACM, qui a lieu au bout d'environ 6 à 8 minutes.

Protocole d'administration du PJ34 et du rt-PA :

Afin d'étudier l'effet propre du PJ34 et de l'association PJ34 et rt-PA sur la thrombolyse, les animaux ont reçu un prétraitement (30 minutes avant la pose de la pastille) par voie i.p (10 ml/kg) de PJ34 (25 mg/kg) ou de son solvant (NaCl à 0,9%). Il ont été anesthésiés puis ont reçu l'administration par voie i.v de rt-PA (10 mg/kg) ou de son solvant (NaCl à 0,9%) selon le protocole décrit ci-après.



L'administration du rt-PA a été réalisée en bolus (10% de la dose) à un débit de 40,9 $\mu\text{l}/\text{minute}$ pendant 22 secondes, puis en perfusion (90% de la dose) à un débit de 3,97 $\mu\text{l}/\text{minute}$. La durée de la perfusion est adaptée selon le poids de la souris.

Le DSC a été suivi pendant les 30 minutes suivant la pose de la pastille de FeCl_3 à l'aide d'une sonde laser Doppler placée en aval de la pastille.

Quatre groupes d'animaux ischémiés ($n=9-10/\text{groupe}$) ont ainsi été définis :

- solvant du PJ34 + solvant du rt-PA,
- solvant du PJ34 + rt-PA,
- PJ34 + solvant du rt-PA,
- PJ34 + rt-PA.

II.2 Résultats

Au cours de notre étude, nous avons tout d'abord recherché si le PJ34 modifiait l'occlusion de l'ACM.

Pour répondre à cette question, nous avons évalué différents paramètres après la pose d'une pastille de FeCl_3 à 10%. Les résultats, détaillés dans le Tableau XXXI, montrent qu'il n'y a pas de différence entre les 4 groupes d'animaux, à l'exception du temps de début de la chute du DSC (Figure 84), puisqu'elle est retardée chez les animaux recevant le PJ34, le rt-PA ou l'association par rapport aux animaux ne recevant que leurs solvants (respectivement $6,5 \pm 2,46$ min, $P<0,05$; $6,7 \pm 1,28$ min, $P<0,01$; $7,4 \pm 2,52$ min, $P<0,05$ versus $5,0 \pm 0,44$ min).

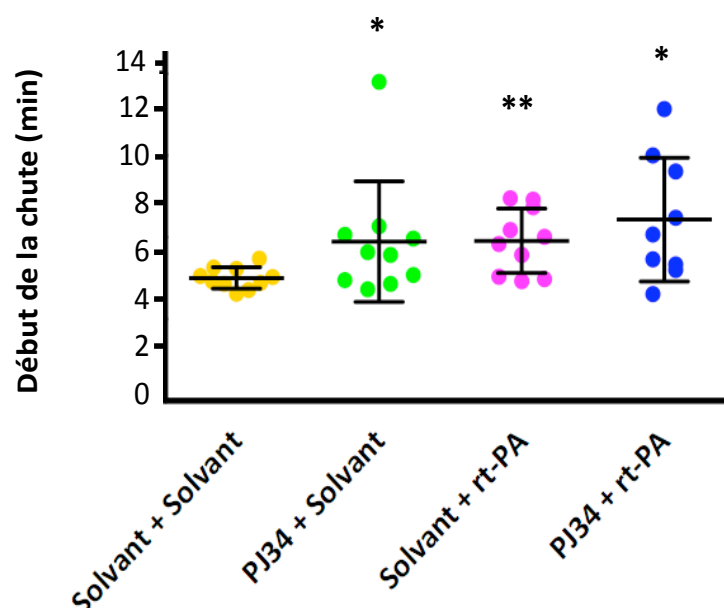


Figure 84. Début de chute de DSC dans la région de l'ACM après application de FeCl₃

* : P < 0,05 versus "Solvant + Solvant" ; ** : P < 0,01 versus "Solvant + Solvant"

Tableau XXXI. Paramètres évalués lors de l'occlusion de l'ACM induite par le FeCl₃ à 10%

Moy ± SD (en min) n = 9-10/groupe	Solvant + solvant	PJ34 + solvant	Solvant + rt-PA	PJ34+ rt-PA
Temps d'occlusion maximale	6,3 ± 0,61	7,8 ± 3,13	7,5 ± 1,62	8,4 ± 2,71
Début de la chute	5,0 ± 0,44	6,5 ± 2,46 *	6,7 ± 1,28 **	7,4 ± 2,52 *
Fin de la chute	6,3 ± 0,61	7,7 ± 3,13	7,7 ± 1,55	8,4 ± 2,71
Durée de la chute	1,3 ± 0,69	1,3 ± 0,79	1,1 ± 0,67	1,0 ± 0,41
Délai de 1/2 chute	5,8 ± 0,60	6,9 ± 3,36	7,5 ± 1,61	7,9 ± 2,69

Ainsi, dans nos conditions expérimentales, le PJ34 ne modifie pas l'occlusion de l'ACM par le FeCl₃ mais ne fait que la retarder dans le temps.

La seconde étape de notre étude a consisté à déterminer si le PJ34 modifie ou non la thrombolyse induite par le rt-PA.

Les résultats présentés ci-dessous montrent l'effet des différents traitements sur l'évolution du DSC par rapport au DSC de base, mesuré avant l'occlusion de l'ACM par le FeCl₃ (Figure 85 et Tableau XXXII).

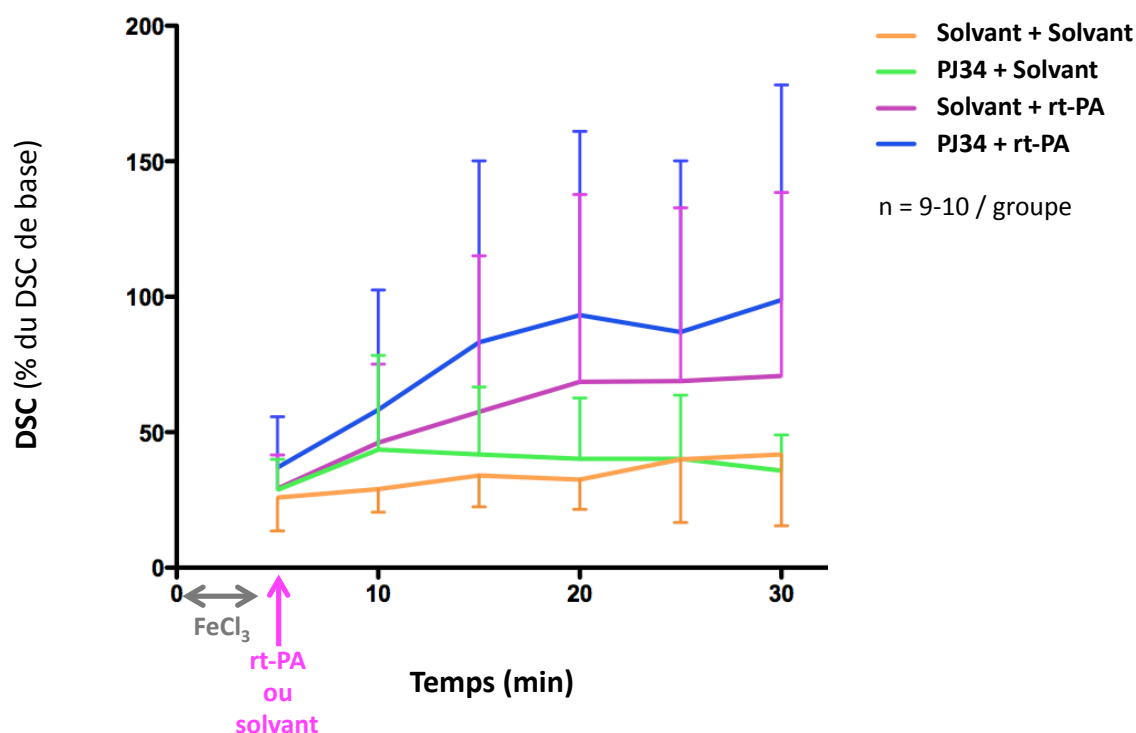


Figure 85 et Tableau XXXII. Evolution du DSC en fonction du temps après occlusion de l'ACM

Les données sont représentées en moyenne $\pm$ SD ; DSC : débit sanguin cérébral

Le début de la pose de la pastille de FeCl_3 imprégnée de solution à 10% a déterminé le T0.

Le tracé est représenté à partir du début de l'injection du rt-PA ou de son solvant (entre 4 et 5 min).

DSC (% du DSC de base) Moy $\pm$ SD n = 9-10	Temps après le début de la pose de la pastille de FeCl_3					
	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
Solvant + Solvant	26 $\pm$ 12,3	29 $\pm$ 8,5	34 $\pm$ 11,6	32 $\pm$ 10,9	40 $\pm$ 23,4	42 $\pm$ 26,3
PJ34 + Solvant	29 $\pm$ 11,3	44 $\pm$ 34,7	42 $\pm$ 24,9	40 $\pm$ 22,4	40 $\pm$ 23,5	36 $\pm$ 13,2
Solvant + rt-PA	29 $\pm$ 12,4	46 $\pm$ 28,9	58 $\pm$ 57,6	69 $\pm$ 69,2	69 $\pm$ 63,9	71 $\pm$ 67,7
PJ34 + rt-PA	37 $\pm$ 18,8	58 $\pm$ 44,2	83 $\pm$ 66,9	93 $\pm$ 67,8	87 $\pm$ 63,2	99 $\pm$ 79,4

La Figure 85 montre que le DSC des animaux ayant reçu le solvant du rt-PA et le solvant du PJ34 (tracé orange) est stable au cours du temps et reste inférieur à 45% du DSC de base, montrant ainsi la stabilité du caillot.

Nous avons également représentés les AUC, calculées à partir des courbes de DSC de chaque animal (Figure 86 et Tableau XXXIII).

La réalisation d'une ANOVA à 2 facteurs croisés (PJ34 et rt-PA) sur les AUC montre qu'il n'y a pas d'effet PJ34 ($P = 0,289$), un effet rt-PA ($P = 0,012$), mais pas d'interaction PJ34 x rt-PA ($P = 0,558$). Ces résultats témoignent d'une reperfusion accrue chez les animaux traités par le rt-PA, mais non significativement

modifiée par le PJ34. Toutefois, on notera une tendance à l'amélioration de la reperfusion lors de l'association au PJ34.

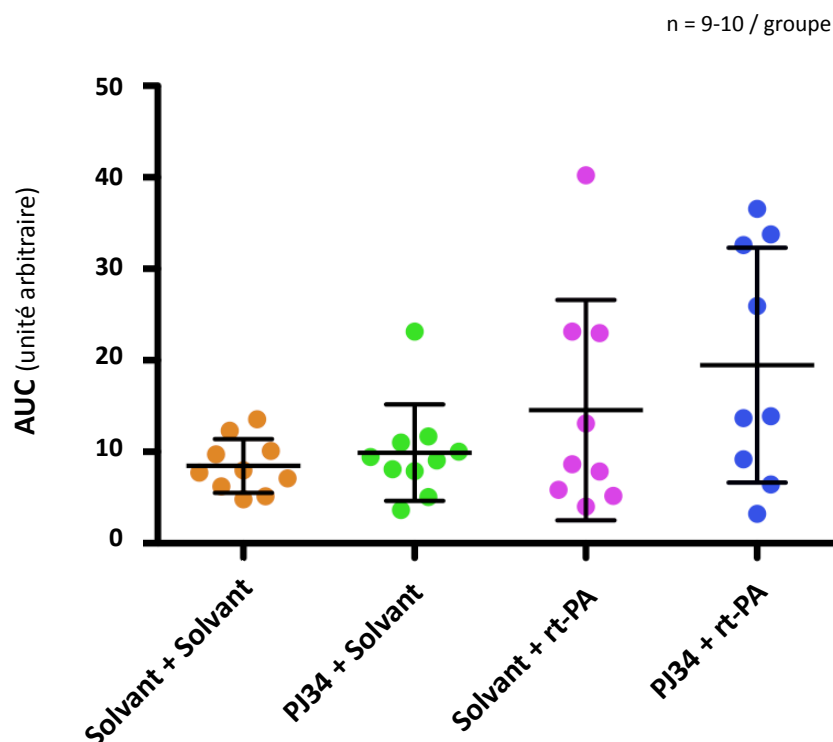


Figure 86 et Tableau XXXIII. AUC de reperfusion après occlusion de l'ACM

Les données sont représentées en moyenne $\pm$ SD

AUC (en UA) n = 9-10/groupe	Solvant + solvant	PJ34 + solvant	Solvant + rt-PA	PJ34+ rt-PA
moy $\pm$ SD	847 $\pm$ 293,4	991 $\pm$ 527,6	1456 $\pm$ 1203,7	1948 $\pm$ 1281,9

II.3 Discussion

Nos résultats montrent que le PJ34 et le rt-PA seuls ou en association retardent le début de l'occlusion de l'ACM, mais ne s'y opposent pas. Cet effet du PJ34 pourrait s'expliquer par le fait qu'il exerce un effet protecteur sur la paroi vasculaire, ce qui retarderait la lésion de l'endothélium par le FeCl_3 et donc l'occlusion de l'ACM. Quant au rt-PA, son activité thrombolytique retarderait l'occlusion de l'artère.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence que l'administration du rt-PA, associé ou non au PJ34, favorisait la reperfusion. Ce résultat était évidemment attendu puisqu'il ne fait que confirmer l'effet thrombolytique du rt-PA. Nous remarquons une variabilité supérieure chez les animaux recevant le rt-PA par rapport à ceux recevant son solvant. Cette observation est cohérente avec les données de Karatas et collaborateurs (2011) qui, dans ce modèle, observent une reperfusion chez 50% des animaux recevant le rt-PA, mais aussi avec les données cliniques, puisque lors de l'administration du

thrombolytique, les taux de reperfusion peuvent varier de manière importante : certains patients présenteront une thrombolyse complète, alors que d'autres présenteront une thrombolyse partielle voire une absence totale d'efficacité (Christou *et al.*, 2000 ; Alexandrov *et al.*, 2001 ; Rha et Saver, 2007).

Il est intéressant de noter que l'association du PJ34 au rt-PA semble améliorer la reperfusion par rapport au rt-PA seul, même si, en raison de la grande variabilité observée dans nos échantillons, ce résultat n'est pas significatif. Il serait donc nécessaire de compléter cette étude.

En 2006, Toth et collaborateurs ont montré que l'INO-1001, un autre puissant inhibiteur de PARP, ne modifiait pas les fonctions plaquettaires et hémostatiques *in vitro* chez la souris, comme dans notre travail. Par ailleurs, cette équipe a montré que l'INO-1001 ne modifiait pas l'effet thrombolytique du rt-PA évalué *in vitro* par le temps de lyse des euglobulines. Au vu de ces résultats, il serait également intéressant d'évaluer l'effet du PJ34 en utilisant ce test.

Finalement, notre étude montre que le PJ34 n'entrave pas la thrombolyse par le rt-PA. Au contraire, cette thrombolyse semble même potentialisée par le PJ34. Ces résultats restent cependant à compléter.

III. CARACTÉRISATION DU MODÈLE D'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE FOCALE TRANSITOIRE EN TERMES D'ACTIVATION ET D'ADHÉSION DES PLAQUETTES

En parallèle de ce travail, nous avons cherché à préciser les mécanismes d'activation et d'adhésion des plaquettes dans un modèle d'ischémie cérébrale focale transitoire.

Comme nous l'avons vu précédemment, nos études sur le rôle « PARP-indépendant » des inhibiteurs de PARP dans l'agrégation plaquettaire *in vitro*, associés à ceux sur leur implication dans l'hémostase *in vivo*, ne sont pas en faveur d'un effet pro-agrégant des inhibiteurs de PARP pouvant contribuer à la réduction des TH spontanées ou induites par le rt-PA dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale. Cet effet bénéfique pourrait donc être essentiellement lié à un effet protecteur au niveau de la microcirculation cérébrale (Haddad *et al.*, 2008, 2013 ; Teng *et al.*, 2013).

Si les inhibiteurs de PARP protègent effectivement la paroi vasculaire, en la rendant moins thrombogène, ceci pourrait réduire également le risque de formation de nouveaux thrombi, et par conséquent, de réocclusion. Dans un modèle d'ischémie/reperfusion hépatique, Khandoga et

collaborateurs (2002 et 2004) ont ainsi montré que l'inhibition pharmacologique ou génique de la PARP réduit l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales hépatiques, ainsi que l'adhésion des plaquettes et des leucocytes sur la paroi endothéliale, et que ces effets sont associés à la protection et une meilleure perfusion des tissus ischémiés.

Afin de pouvoir, à terme, évaluer si les inhibiteurs de PARP induisent des effets semblables dans l'ischémie cérébrale, la dernière partie de mon travail a été de caractériser un modèle murin d'ischémie cérébrale focale, en termes d'activation plaquettaire, d'expression des molécules d'adhésion et d'adhésion des plaquettes sur les cellules endothéliales au niveau cérébral.

Notre choix s'est porté sur un modèle consistant à occlure par voie endovasculaire l'ACM gauche de façon transitoire et ceci, pour plusieurs raisons :

- Au laboratoire, il a été montré que ce modèle est à l'origine d'une augmentation des ARNm de deux molécules d'adhésion, ICAM-1 et E-sélectine, 6 heures après l'ischémie (Haddad *et al.*, 2006).
- Par rapport à des modèles plus sévères d'ischémie cérébrale permanente (Haddad *et al.*, 2008) ou bien des modèles où la reperfusion nécessitent la thrombolyse par le rt-PA (Orset *et al.*, 2007 ; El Amki *et al.*, 2012), ce modèle induit plus rarement l'apparition de TH spontanées, dont la présence pourrait rendre difficile la mise en évidence de l'adhésion des plaquettes sur la paroi des vaisseaux cérébraux.
- Enfin, le laboratoire disposait déjà de données sur le rôle de la PARP dans ce modèle. En effet, un traitement par le PJ34 (25 mg/kg ; ip) entraîne une diminution de la lésion cérébrale et du déficit neurologique, des effets anti-inflammatoires, notamment par une réduction de l'expression des ARNm de TNF α , d'IL-6, de la E-sélectine et d'ICAM-1 (Haddad *et al.*, 2006).

III.1 Prise en main du modèle d'ischémie cérébrale focale transitoire par voie endovasculaire

La 1^{ère} étape de cette partie a consisté à apprendre le modèle d'ischémie cérébrale. Pour cela, il m'a fallu maîtriser la technique de préparation des filaments et les gestes de microchirurgie sous loupe binoculaire afin de réaliser des lésions reproductibles, en accord avec les données du laboratoire. Cette période de prise en main a duré 3 mois, au cours desquels j'ai réalisé plusieurs séries d'animaux.

Les animaux ont été euthanasiés après 24 heures de reperfusion, puis leurs cerveaux ont été prélevés, afin de mesurer le volume de lésion cérébrale post-ischémique par coloration au TTC.

III.1.1 Résultats

Lors de la prise en main du modèle, j'ai réalisé 4 séries d'animaux, dont les principaux paramètres sont présentés dans le Tableau XXXIV et la Figure 87.

Au cours de la 1^{ère} série, la durée du temps opératoire était d'environ 1 heure par souris en raison de la difficulté de l'acte chirurgical. La maîtrise des gestes chirurgicaux a permis de réduire de moitié cette durée au bout de la 4^e série.

Le taux de réussite a été évalué après élimination des animaux morts au cours de la chirurgie, des animaux pour lesquels la chute de DSC était inférieure à 50% ou pour lesquels était survenu un accident chirurgical. Le taux de réussite est passé de 46% à la 1^{ère} série d'animaux à 88% lors de la 4^e série. Le taux de mortalité est passé quant à lui de 54% à la 1^{ère} série à 6% lors de la 4^e série, ce qui est en accord avec les données sur ce modèle dans le laboratoire (mortalité < 10%).

Par ailleurs, la variabilité de la dernière série est inférieure à 30%, ce qui reste cohérent avec celle habituellement observée, et les volumes de lésion sont de l'ordre de 75 mm³, ce qui correspond au volume obtenu par Marianne Haddad au laboratoire (Haddad *et al.*, 2006).

Tableau XXXIV. Principaux paramètres évalués lors de la prise en main du modèle

N° de série	Taux de réussite (nb animaux/total)	Mortalité post-chirurgie	Durée chirurgie	Volume ± SD (mm ³)	Variabilité
1	46% (13/28)	54%	60 min	63 ± 27,6	44%
2	50% (13/26)	42%	46 min	80 ± 33,0	41%
3	57% (12/21)	19%	39 min	69 ± 28,9	42%
4	88% (14/16)	6%	34 min	74 ± 20,6	28%

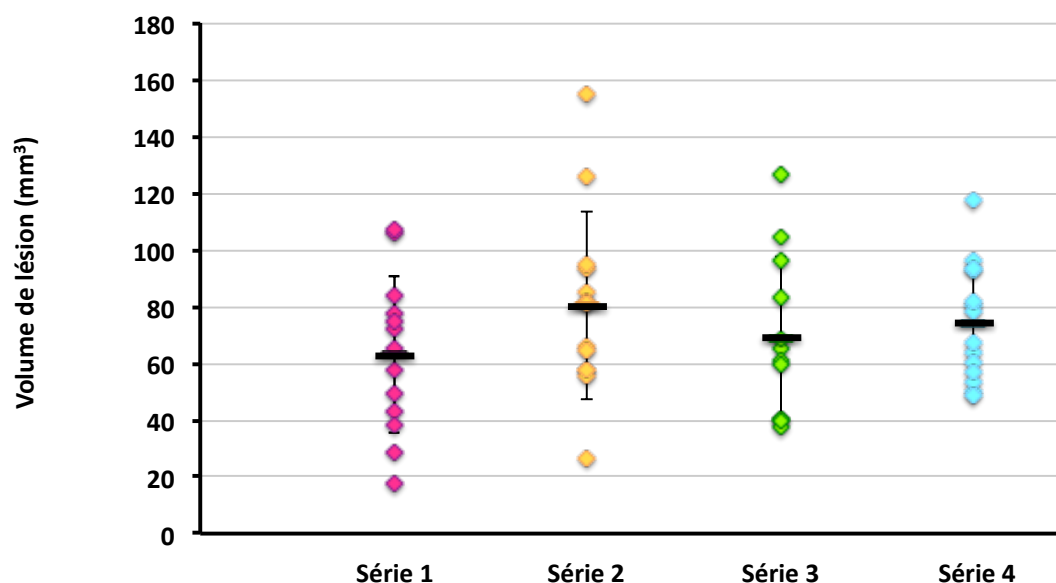


Figure 87. Volumes de lésion cérébrale au cours des 4 séries après 24 heures de reperfusion

Les tirets représentent les moyennes $\pm$ SD

III.1.2 Discussion

Les principales difficultés rencontrées au cours de cette phase d'apprentissage du modèle sont :

- La précision des gestes chirurgicaux, qui impacte sur le taux d'animaux éliminés par accident chirurgical (par exemple, par rupture de l'artère occipitale), mais qui peut aussi contribuer à la variabilité des volumes de lésion cérébrale
- Le temps opératoire, très élevé en début d'apprentissage, du fait du manque de maîtrise de la procédure chirurgicale, a nécessité la ré-administration d'anesthésique, ce qui peut expliquer la mortalité per-opératoire. Par ailleurs, cette anesthésie prolongée a pu favoriser une hypothermie chez la souris, d'autant plus que les souris régulent mal leur température corporelle. Or il est clairement établi que l'hypothermie protège le cerveau de l'ischémie (Connolly *et al.*, 1996), ce qui peut aussi contribuer à la variabilité de la taille des lésions et expliquer les plus faibles volumes mesurés dans la 1^{ère} série.
- La préparation des filaments constitue également un facteur critique nécessitant un travail minutieux et de la pratique, afin de recouvrir le fil de nylon de colle de manière homogène et reproductible. La température de la colle, la vitesse de passage du filament dans la colle, la forme et la taille du filament sont autant de paramètres qui conditionnent la qualité du filament. De plus, il est important d'adapter les filaments au poids de l'animal (diamètre : 190 μ m pour une souris de 30 g), afin (1) d'induire une chute de DSC suffisante pour provoquer

l'ischémie cérébrale et (2) de ne pas léser la paroi vasculaire lors du passage du filament, ce qui pourrait produire une hémorragie (Connolly *et al.*, 1996).

Lors de ma 4^{ème} série, les volumes de lésion cérébrale ($74 \pm 20,6 \text{ mm}^3$), leur variabilité (28%), ainsi que la mortalité (6%) et le temps opératoire (environ 35 min) étant satisfaisants et en accord avec les données du laboratoire, j'ai ensuite réalisé une 5^{ème} série d'animaux pour évaluer les déficits fonctionnels 24 heures après l'occlusion de l'ACM.

III.2 Evaluation du déficit neurologique 24 heures après l'ischémie cérébrale

Ainsi, afin d'évaluer le déficit fonctionnel post-ischémique à 24 heures, j'ai réalisé une batterie de tests comportementaux sur 3 groupes de souris (n=12-13/groupe) : naïfs, Shams et ischémiés.

III.2.1 Résultats

Les résultats des différents tests sont présentés dans la figure 88 (A à F) et le Tableau XXXV :

Le test des cercles ne met pas en évidence de différence entre les Shams et les naïfs ($9,3 \pm 1,50$ *versus* $9,8 \pm 0,55$), mais il montre une réduction du score chez les souris ischémiées par rapport aux Shams ($7,7 \pm 2,99$ *versus* $9,3 \pm 1,50$; $P < 0,05$).

Le score neurologique sur 13 points, consistant à évaluer différents réflexes sensorimoteurs, est presque maximal chez les animaux naïfs et Shams (respectivement $12,5 \pm 0,78$ et $12,5 \pm 0,52$). Il montre un déficit des animaux ischémiés par rapport aux Shams ($8,2 \pm 2,76$ *versus* $12,5 \pm 0,52$; $P < 0,001$).

Le score du « grip » n'est pas statistiquement différent chez les Shams par rapport aux naïfs ($3,0 \pm 0,00$ *versus* $2,7 \pm 0,75$). Par contre, le score des animaux ischémiés est réduit par rapport à celui des Shams ($2,2 \pm 1,11$ *versus* $3,0 \pm 0,00$; $P < 0,05$).

Le test du « string » ne met en évidence aucune différence statistique que ce soit entre les animaux Shams et naïfs ($4,3 \pm 1,06$ *versus* $4,1 \pm 1,85$) ou entre les animaux ischémiés et Shams ($2,3 \pm 2,27$ *versus* $4,3 \pm 1,06$; $P = 0,06$).

Le test de la poutre ne montre aucune différence significative entre les Shams et les naïfs ($2,8 \pm 1,48$ *versus* $3,3 \pm 0,85$), ni entre les animaux ischémiés et les Shams ($1,8 \pm 1,60$ *versus* $2,8 \pm 1,48$).

Le test du mât montre une différence significative entre les Shams et les naïfs ($1,6 \pm 0,79$ *versus* $2,2 \pm 0,44$; $P < 0,05$), mais pas entre les animaux ischémiés et les Shams ($1,1 \pm 0,90$ *versus* $1,6 \pm 0,79$).

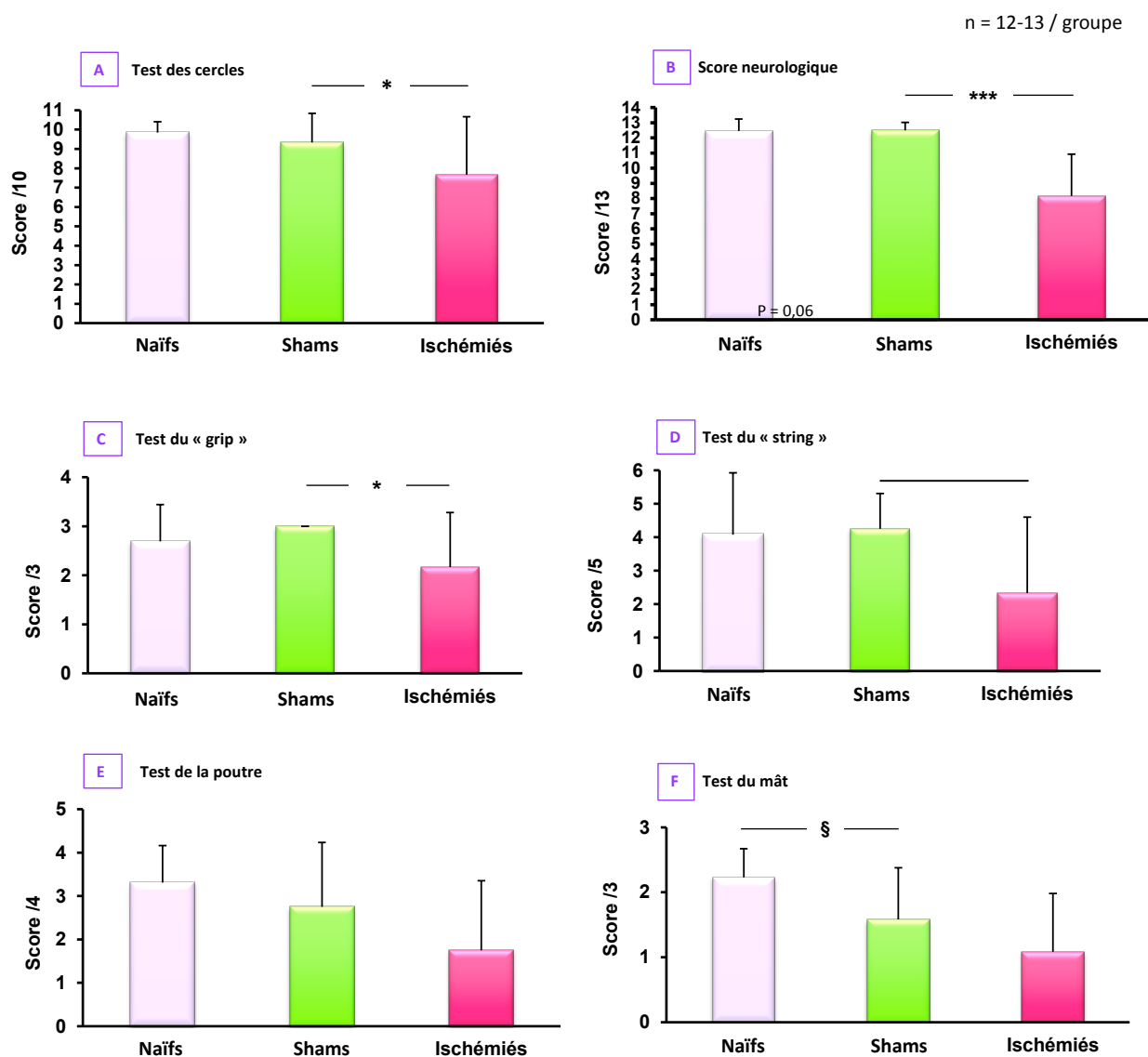


Figure 88 et Tableau XXXV. Evaluation du déficit fonctionnel 24 heures après l'ischémie cérébrale

Test	Naïfs (moy ± SD) ; n = 13	Shams (moy ± SD) ; n = 12	Ischémisés (moy ± SD) ; n = 12
Test des cercles	9,8 ± 0,55	9,3 ± 1,50	7,7 ± 2,99 *
Score neurologique	12,5 ± 0,78	12,5 ± 0,52	8,2 ± 2,76 ***
Test du « grip »	2,7 ± 0,75	3,0 ± 0,00	2,2 ± 1,11 *
Test du « string »	4,1 ± 1,85	4,3 ± 1,06	2,3 ± 2,27
Test de la poutre	3,3 ± 0,85	2,8 ± 1,48	1,8 ± 1,60
Test du mât	2,2 ± 0,44	1,6 ± 0,79 §	1,1 ± 0,90

§ : P<0,05 Shams *versus* naïfs ; * P<0,05 et *** P<0,001 ischémisés *versus* Shams.

La somme de ces différents scores permet d'établir un score global sur 38 points qui met en évidence une atteinte fonctionnelle significative chez les animaux ischémiés par rapport aux animaux Shams ($23,2 \pm 9,81$ versus $33,4 \pm 2,53$; $P < 0,01$; Figure 89). Notons qu'il n'y a pas de différence entre les Shams et les animaux naïfs ($33,4 \pm 2,53$ versus $34,6 \pm 2,79$).

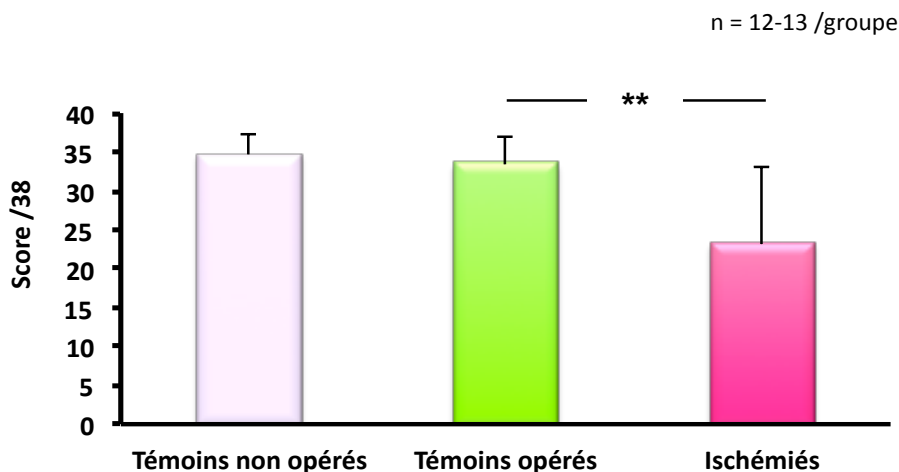


Figure 89. Evaluation du score global 24 heures après l'ischémie cérébrale

** $P < 0,01$ ischémiés versus Shams

III.2.2 Discussion

Le modèle d'ischémie par voie endovasculaire induisant des lésions au niveau du cortex et du striatum, nous avons choisi, parmi les tests dont nous disposons au laboratoire, ceux qui explorent des fonctions liées à ces structures, à savoir des fonctions sensorielles, motrices et de coordination.

Le test des cercles, le score neurologique et le test du « grip » ont permis de mettre en évidence un déficit significatif chez les animaux ischémiés par rapport aux Shams, ce qui est en accord avec les données du laboratoire (Haddad *et al.*, 2006). Par contre, nous n'avons pas retrouvé le déficit post-ischémique qui avait été observé avec le test du « string » (données du laboratoire non publiées), probablement en raison de la variabilité observée dans les différents groupes.

Les autres tests (tests de la poutre et du mât) n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les différents groupes d'animaux, en raison notamment d'une grande variabilité au sein de chaque groupe.

Par ailleurs, le test du mât a montré un effet de la chirurgie, puisque le score des Shams est significativement réduit par rapport à celui des animaux naïfs et ce déficit n'est pas aggravé par l'ischémie après 24 heures de reperfusion. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature et du laboratoire qui suggèrent que le test du mât semble plus pertinent pour montrer un

déficit à 48 heures dans les modèles d'ischémie cérébrale transitoire (Bouet *et al.*, 2007 ; El Amki *et al.*, 2012 ; données du laboratoire non publiées) en raison d'une éventuelle récupération des Shams.

Le score global a mis en évidence un déficit chez les animaux ischémiés par rapport aux Shams. Il est toutefois difficile de comparer ce score à d'autres études, car chaque laboratoire l'adapte en fonction de ses modèles et de ses problématiques.

Après avoir pris en main le modèle d'ischémie cérébrale transitoire par voie endovasculaire et montré qu'il induisait des déficits neurologiques, j'ai réalisé la 2^{nde} étape de cette partie, qui a consisté à caractériser ce modèle en termes d'activation plaquettaire et d'adhésion des plaquettes sur la paroi des vaisseaux.

III.3 Evaluation de la cinétique d'adhésion des plaquettes et de l'expression des molécules d'adhésion P-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1 à la suite d'une ischémie cérébrale transitoire

Le but de cette étude a été de caractériser dans notre modèle d'ischémie l'adhésion des plaquettes sur la paroi des vaisseaux cérébraux, ainsi que l'expression des molécules d'adhésion au niveau cérébral (P-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1) ou au niveau plasmatique, en dosant la sP-sélectine, utilisée comme marqueur d'activation plaquettaire.

Pour cela, nous avons étudié les cinétiques de ces différentes molécules après 6, 24 ou 48 heures de reperfusion. Ces différents temps ont été choisis, afin de détecter l'expression de molécules impliquées dans les étapes précoces de l'adhésion plaquettaire, comme la P-sélectine ou plus tardives, comme ICAM-1 et VCAM-1.

Ne disposant pas de toutes les techniques nécessaires pour réaliser cette caractérisation du modèle, de nombreuses mises au point ont dû être réalisées.

III.3.1 Evaluation de l'adhésion des plaquettes sur les cellules endothéliales cérébrales

Nous avons utilisé comme marqueur des plaquettes la protéine CD41 également connue sous le nom de GPIIb, couramment utilisée comme marqueur plaquettaire (Khandoga *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2011). Afin de pouvoir quantifier et visualiser l'accumulation des plaquettes dans les vaisseaux cérébraux, nous avons utilisé les techniques de WB et d'immunofluorescence.

a. Western Blot de CD41

Dans une 1^{ère} expérience, nous avons évalué la spécificité de l'Ac primaire anti-CD41.

Pour cela, les mêmes échantillons de cerveaux ou de témoins positifs (PRP) ont été déposés sur 2 gels différents. Ces échantillons correspondent à des homogénats de cerveaux d'animaux naïfs et d'animaux ischémiés, exsanguinoperfusés ou non, et homogénéisés dans un tampon de broyage élaboré d'après l'étude de Liu et collaborateurs (2011).

Après transfert sur deux membranes de PDVF, la membrane A a été incubée avec l'Ac primaire et l'Ac secondaire, alors que la membrane B n'a été incubée qu'avec l'Ac secondaire. Après révélation, on constate l'apparition de nombreuses bandes non spécifiques sur la membrane B et ceci uniquement chez les témoins positifs (Figure 90). Toutefois, sur la membrane A, l'Ac primaire permet de détecter une bande supplémentaire vers 140 kDa, qui pourrait correspondre à CD41, et ceci toujours chez les témoins positifs.

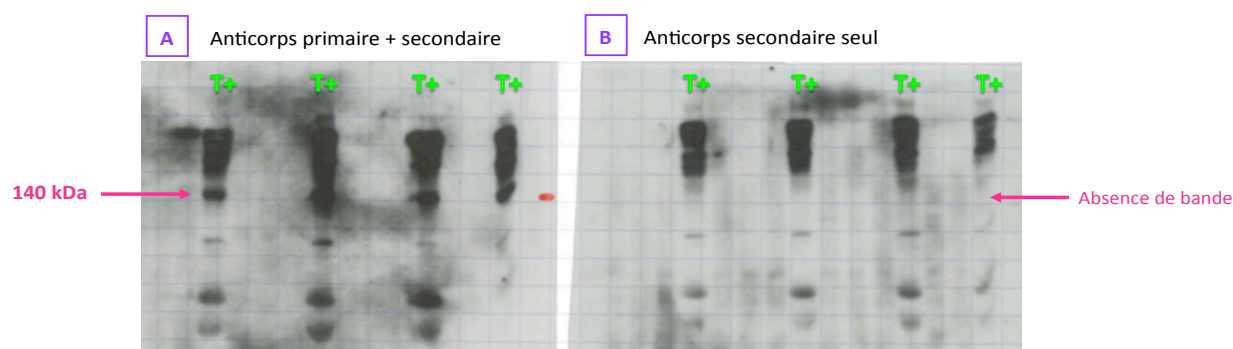


Figure 90. Mise au point du Western Blot de CD41 : conditions 1

Révélation ECL Advance Exposition 5 min ; Ac I de rat anti-CD41 murin BD Pharmingen dilué au 1/500^e ± Ac II de chèvre anti-IgG de rat couplé HRP dilué au 1/10 000^e ; T+ : PRP ; échantillons de cerveaux de souris naïves et ischémiées ± exsanguinoperfusées

N'ayant pas détecté la présence de la protéine CD41 dans les échantillons de cerveaux de souris qu'ils soient exsanguinoperfusés ou non, nous nous sommes interrogés sur la qualité de l'extraction de la protéine CD41. En effet, un rapport CD41/protéines totales trop faible pourrait masquer le signal de la protéine d'intérêt.

Dans une 2^{nde} expérience, nous avons donc cherché à optimiser les conditions du WB, ainsi que le protocole d'extraction des protéines dans les échantillons de cerveaux, en apportant plusieurs modifications :

- 1) utilisation d'un gel de migration concentré à 6% d'acrylamide au lieu de 7,5%, afin de mieux séparer les bandes présentes autour de 125-150 kDa,

- 2) le PRP a été remplacé par des plaquettes lavées (T2) ou non lavées (T1) comme témoin positif de CD41, afin d'éliminer les bandes parasites observées entre 150-200 kDa qui, dans nos conditions non réductrices, pourraient correspondre à des IgG,
- 3) différentes conditions d'extraction ont été testées, afin de déterminer dans quelle fraction protéique se trouvait la protéine CD41, et ainsi pouvoir la concentrer. Pour cela, nous avons gardé :
 - la fraction protéique cytoplasmique soluble (extraite par un tampon Tris-HCl) = **fraction A**,
 - la fraction protéique cytoplasmique liée au cytosquelette (extraite par un tampon Tris Triton 1%) = **fraction B**,
 - la fraction protéique liée à la membrane (extraite par un tampon Tris SDS 4%) = **fraction C**,
- 4) l'Ac secondaire a été dilué au 1/25 000^{ème}, afin de réduire le fort signal non spécifique observé avec la dilution au 1/10 000^{ème}.

Sur les deux gels, nous avons déposé les mêmes échantillons de cerveaux de souris naïves homogénéisés selon les mêmes conditions que dans la 1^{ère} expérience (échantillon 1) ou selon les nouvelles conditions de fractionnement (échantillons 2 et 3).

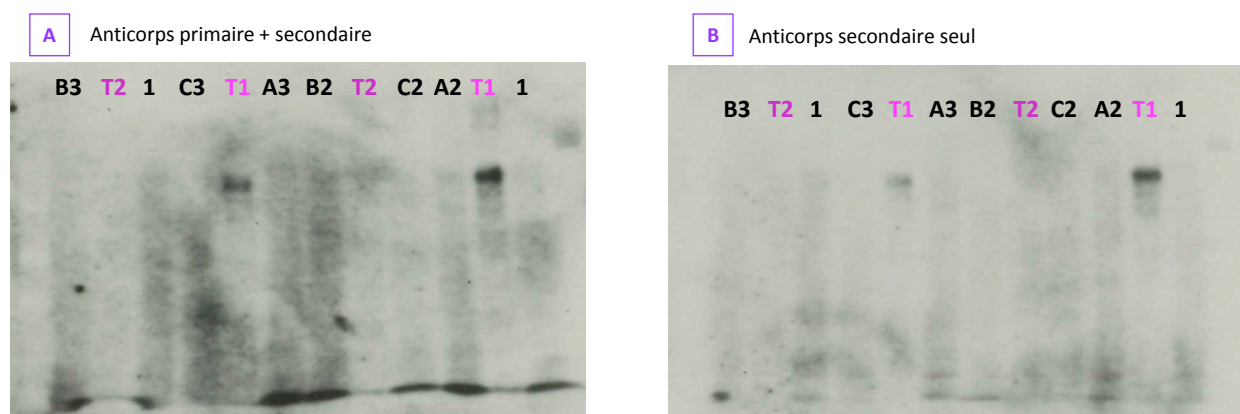


Figure 91. Mise au point du Western Blot de CD41 : conditions 2

Révélation ECL Advance Exposition 25 min ; Ac I de rat anti-CD41 murin BD Pharmingen dilué 1/500^e ± Ac II de chèvre anti-IgG de rat couplé HRP dilué 1/25 000^e ; T1 : témoin positif plaquettes non lavées ; T2 : témoin positif plaquettes lavées ; A2 et A3 : fraction soluble des échantillons 2 et 3 ; B2 et B3 : fraction liée au cytosquelette des échantillons 2 et 3 ; C2 et C3 : fraction liée à la membrane des échantillons 2 et 3 ; 1 : échantillon 1 directement extrait par le SDS 4%

De manière surprenante, sur la membrane A, nous n'avons observé aucune bande dans nos échantillons, quelle que soit la fraction protéique considérée (Figure 91). De même, nous n'avons pas mis en évidence la protéine CD41 dans les témoins positifs de plaquettes lavées (T2), puisqu'aucune bande n'est présente. Une seule bande est présente dans les témoins positifs de plaquettes non lavées

(T1), mais elle se retrouve également sur la membrane B, qui a seulement été incubée avec l'Ac secondaire, et semble donc non spécifique.

Ainsi, se pose la question (1) de la spécificité de l'Ac primaire anti-CD41 utilisé et (2) du seuil de sensibilité de la technique de WB pour détecter CD41 au niveau cérébral.

Au vu des ces résultats, nous avons donc décidé d'étudier l'expression de la protéine par une autre approche, l'immunohistochimie.

b. Immunofluorescence de CD41

Une autre série d'animaux a été utilisée pour réaliser les techniques d'immunohistochimie.

- **Mise au point et validation de la technique**

La technique de l'immunohistochimie présente l'avantage de localiser le marquage dans le cerveau, contrairement au WB qui peut « noyer » le signal dans l'homogénat de cerveau, ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus précédemment.

Dans un essai préliminaire destiné à valider notre Ac primaire, nous avons réalisé l'immunofluorescence de CD41. Pour cela, nous avons utilisé comme témoin positif des coupes de cerveaux de souris ayant subi une hémorragie intracrânienne par voie mécanique (voir Partie Matériel et Méthode, paragraphe VI) dont le marquage est présenté Figure 92.

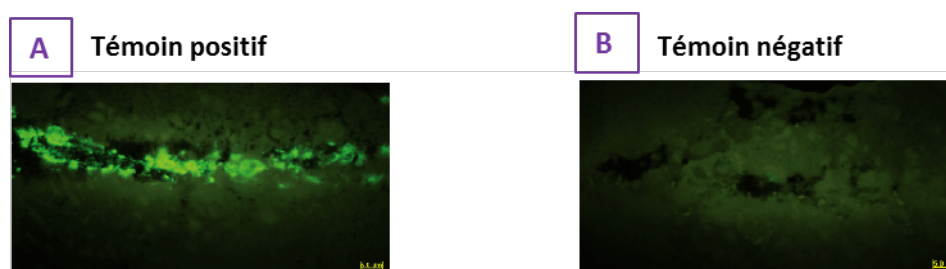


Figure 92. Validation de l'Ac I anti-CD41 en immunofluorescence sur des coupes témoins d'hémorragie

Nos résultats montrent que la zone hémorragique, qui contient des plaquettes, est marquée par l'Ac anti-CD41 (marquage vert). Cet essai préliminaire permet de valider l'utilisation de l'Ac primaire anti-CD41 sur nos coupes de cerveau par immunohistochimie.

Après avoir validé la spécificité de notre Ac primaire, nous avons testé différentes concentrations de sérum de chèvre (pas de blocage, 1%, 2% ou 5%), afin de mettre au point les conditions du protocole d'immunofluorescence de CD41 (marqué par un Ac secondaire couplé au FITC) sur des coupes de cerveaux de souris naïves, shams et ischémisées sacrifiées 24 heures après la reperfusion (n=3/groupe).

Nous avons constaté que le blocage par le sérum de chèvre à 2% offre le meilleur rapport signal/bruit de fond (Figure 92).



Figure 92. Essai préliminaire d'immunofluorescence de CD41 (marquage en vert) avec un blocage par le sérum de chèvre à 2%

Les photos montrent une absence de marquage sur les coupes d'animal naïf (Figure A), un faible marquage sur les coupes de sham (Figure B) et un marquage dense 24 heures après la reperfusion chez les animaux ischémisés (Figure C).

- **Résultats**

Après avoir validé la technique d'immunofluorescence de CD41, nous avons évalué l'accumulation des plaquettes sur les coupes de cerveaux de souris shams et ischémisées après 6, 24 ou 48 heures de reperfusion.

Pour cela, nous avons tout d'abord observé toutes les coupes de cerveaux, afin de sélectionner les champs d'intérêt où le marquage était particulièrement présent. Ces champs d'observation sont situés sur les coupes 7 et 8, dans la zone infarctée, au niveau du tiers supérieur du cortex et délimités par le carré rouge sur la Figure 94.

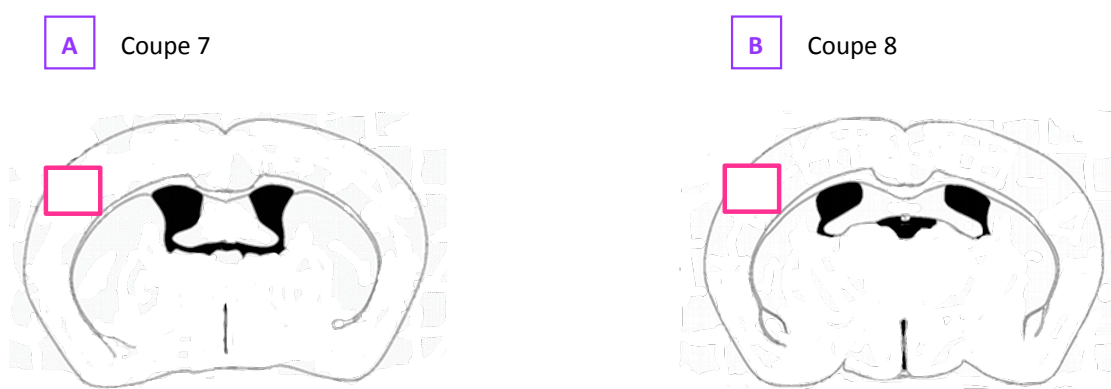


Figure 94. Champ d'observation sur les coupes de cerveau 7 et 8 situé dans la zone de lésion

Nos résultats montrent un marquage plus important chez les animaux ischémiés par rapport aux shams correspondants (Figure 95). Par ailleurs, visuellement, il semble que le marquage chez les animaux ischémiés augmente avec le temps de reperfusion. Cependant, seule une quantification des champs sélectionnés permettrait de l'affirmer.

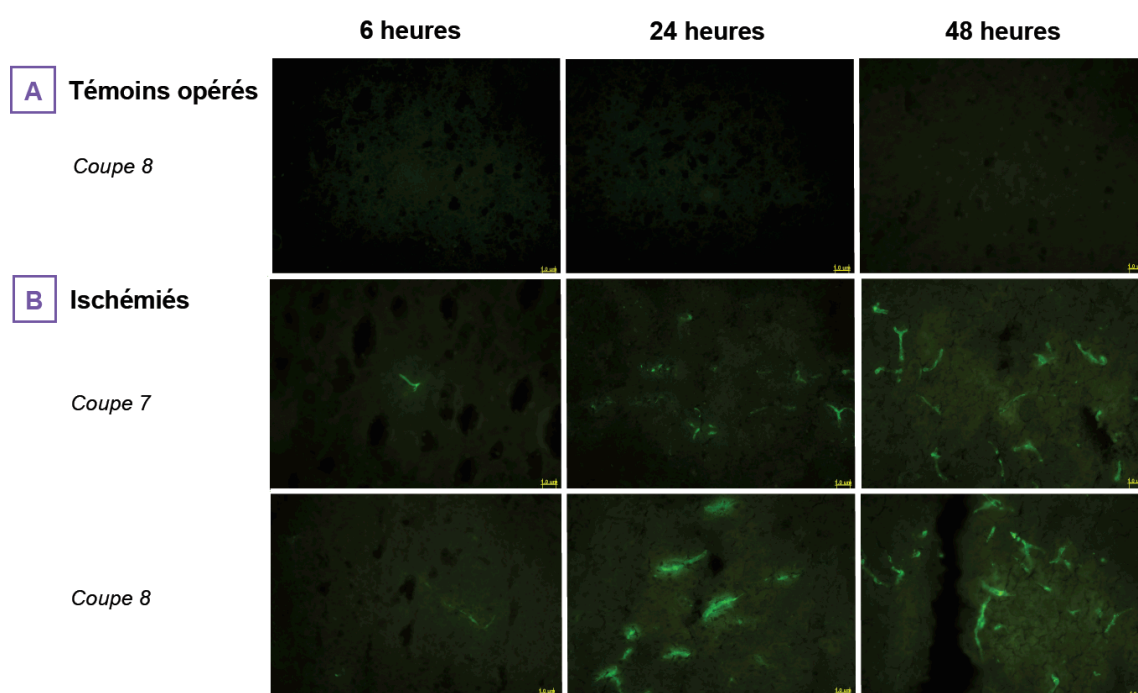


Figure 95. Photos représentatives de l'accumulation des plaquettes mise en évidence par le marquage de CD41 (FITC, en vert) sur des coupes de cerveaux de shams ou ischémiés après 6, 24 ou 48 heures de reperfusion

Afin de déterminer si les plaquettes marquées sont bien adhérentes à l'endothélium, comme le suggère le marquage en forme de tubules, nous avons voulu réaliser un co-marquage avec un marqueur de la paroi vasculaire, le collagène IV (Gidday *et al.*, 2005 ; Mitsuhashi *et al.*, 2013). Pour cela, nous avons utilisé des Ac secondaires couplés (1) au FITC pour marquer le collagène IV, qui apparaît donc en vert, et (2) au TRITC pour marquer CD41, qui apparaît en rouge. Afin de s'assurer que les Ac primaires et

secondaires des deux protéines n'interféraient pas, nous avons réalisé les contrôles nécessaires figurant ci-dessous (Figure 96).

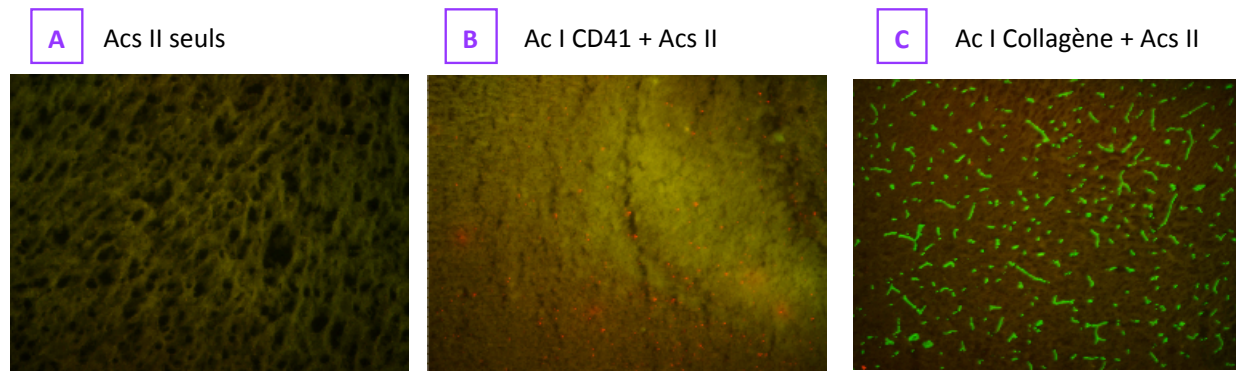


Figure 96. Contrôles de l'immunofluorescence CD41 (en rouge) et collagène IV (en vert)

La présence d'un marquage uniquement rouge (CD41) sur la figure B et uniquement vert (collagène IV) sur la figure C montre que les différents Ac n'interfèrent pas. Nous avons donc réalisé les marquages sur nos échantillons. Cependant, comme l'illustre la figure 97, l'Ac secondaire couplé au TRITC (rouge) semble se fixer sur l'ensemble du tissu ischémié et provoquer un bruit de fond très important qui empêche de mettre en évidence un marquage de CD41.

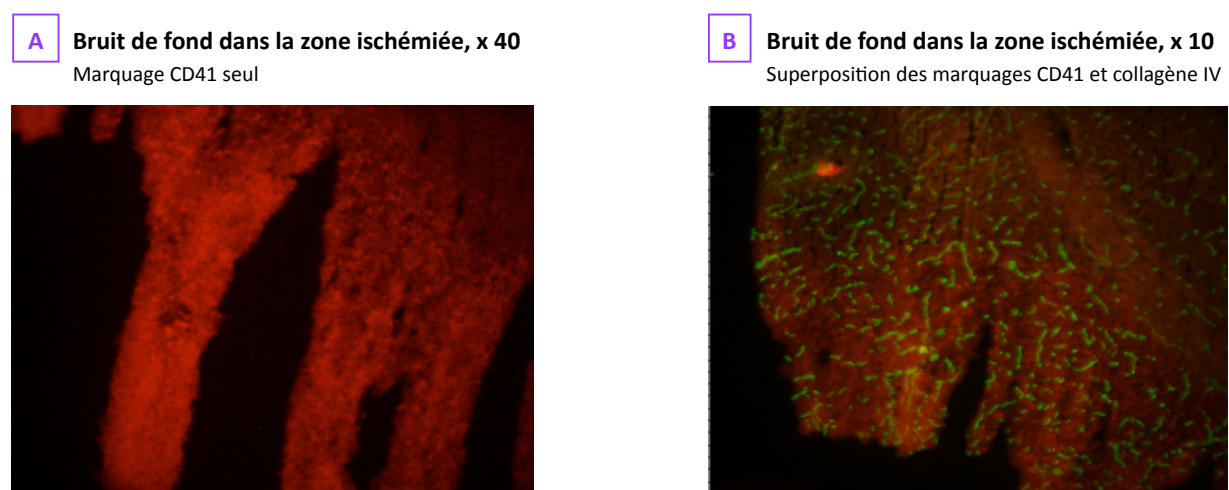


Figure 97. Co-marquage CD41 (TRITC, rouge) et collagène IV (FITC, vert) sur des coupes de cerveaux ischémiés

c. Discussion

L'objectif de la quantification de CD41 par WB était d'évaluer l'accumulation post-ischémique des plaquettes au niveau cérébral, correspondant à la formation de thrombi après la reperfusion.

Dans le 1^{er} essai, nous n'avons observé aucune bande dans les échantillons de cerveaux exsanguinoperfusés ou non. Nous nous sommes donc interrogés sur la qualité de l'extraction de la protéine CD41.

Dans un 2nde essai, nous avons donc préparé d'autres échantillons en distinguant les différentes fractions protéiques (solubles, liées au cytosquelette ou à la membrane). Cependant, aucun signal n'a été détecté dans les échantillons, quelle que soit la fraction considérée, ni dans les témoins positifs. Un manque de sensibilité de la technique pourrait expliquer ces résultats. En effet, un rapport de la protéine CD41/protéines totales cérébrales pourrait être insuffisant, et par conséquent, masquer le signal de CD41. L'ajout de concentrations croissantes connues de plaquettes à des homogénats de cerveaux permettrait de déterminer le seuil de sensibilité de détection de CD41 par WB au niveau cérébral. Par ailleurs, de nombreuses conditions restent encore à tester, notamment un nouvel Ac primaire anti-CD41.

La technique de WB n'ayant pas permis de quantifier la présence de plaquettes dans nos échantillons cérébraux, nous avons voulu la visualiser par immunofluorescence. Nos résultats montrent, d'une part, un marquage de CD41 plus dense chez les animaux ischémiés par rapport aux animaux témoins correspondants, et d'autre part, visuellement, ce marquage, et donc l'adhésion des plaquettes dans le cerveau, augmente avec la durée de reperfusion post-ischémique. Cependant, il reste à quantifier ce marquage.

Par ailleurs, nous avons voulu vérifier si ces plaquettes étaient adhérentes à la paroi vasculaire. L'aspect du marquage en forme de tubule semble dessiner les contours de vaisseaux et est donc en faveur de l'adhésion des plaquettes sur l'endothélium vasculaire. Afin de confirmer ce résultat, nous avons réalisé un essai de co-marquage de CD41 et du collagène IV, un constituant de la paroi vasculaire. Cet essai n'a pas permis de mettre en évidence de marquage plaquettaire. Une des hypothèses pouvant expliquer ce résultat est que le marquage du collagène IV, une protéine abondamment présente dans le cerveau, par le FITC, un fluorophore très lumineux et donc très voyant, atténue peut être le marquage rouge (TRITC) des plaquettes, d'autant plus que contrairement au collagène, les plaquettes ne sont présentes que de manière très localisée.

Ainsi, deux « pistes » d'optimisation de la technique pourraient être testées :

- 1) une dilution plus importante de l'Ac secondaire du collagène IV, afin d'atténuer le marquage. L'augmentation de la concentration de l'Ac secondaire de CD41 ne serait quant à elle pas judicieuse, car elle augmenterait davantage le bruit de fond déjà très important au niveau de la zone ischémisée,
- 2) l'inversion des sondes fluorescentes des deux protéines, c'est-à-dire coupler l'Ac secondaire de CD41 au FITC et l'Ac secondaire du collagène IV au TRITC.

Pour conclure, dans notre modèle d'ischémie cérébrale transitoire, cette étude montre une accumulation de plaquettes au niveau cérébral dès 6 heures de reperfusion, dont la densité semble augmenter dans la zone ischémisée après 24 heures, et plus encore après 48 heures. La forme tubulaire du marquage suggère que ces plaquettes adhèrent à la paroi vasculaire. Il existe peu de données concernant la cinétique d'accumulation des plaquettes dans le cerveau après une ischémie transitoire et celles-ci sont assez disparates. Dans un modèle d'ischémie transitoire par occlusion de l'ACM chez le chat, Jafar et collaborateurs (1989) ont montré une augmentation des plaquettes dans différentes structures cérébrales ipsilatérales à l'occlusion cérébrale après 45 minutes de reperfusion. La limite de cette étude est qu'elle n'évalue la présence de plaquettes qu'à ce temps et n'établit pas de cinétique. Par contre, dans un modèle d'ischémie cérébrale par occlusion transitoire de l'ACC chez la souris, les plaquettes n'adhèrent pas à la paroi vasculaire après 40 minutes de reperfusion, mais après 4 heures (Ishikawa *et al.*, 2003).

L'étape suivante de mon travail a été d'étudier si l'expression des molécules impliquées dans l'adhésion des plaquettes sur l'endothélium vasculaire (P-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1) était modulée dans ce modèle d'ischémie, que ce soit au niveau sérique ou cérébral.

III.3.2 Evaluation de l'activation plaquettaire par le dosage de la sP-sélectine sérique

Nous avons mesuré les concentrations de sP-sélectine au niveau sérique chez les animaux utilisés pour les western blot de CD41. La sP-sélectine, qui est notamment libérée lors de la sécrétion du contenu des granules α des plaquettes activées, constitue un marqueur de leur activation (Kisucka *et al.*, 2009). Elle est également connue pour être un marqueur d'une augmentation de l'activité pro-coagulante (André *et al.*, 2000).

• Résultats

La sP-sélectine a été dosée par ELISA après prélèvement de sang au niveau de la veine cave inférieure d'animaux naïfs, shams et ischémiés après 6, 24 ou 48 heures de reperfusion (n = 3-5/groupe). Les résultats sont présentés dans la Figure 98 et le Tableau XXXVI.

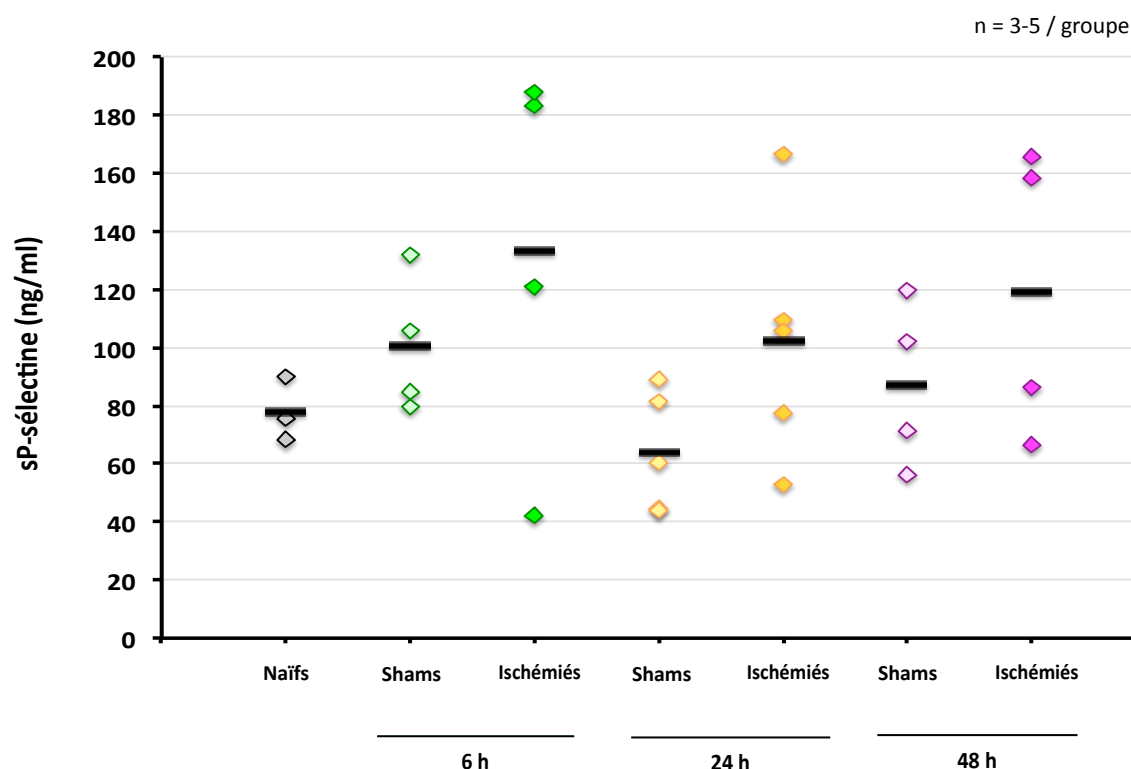


Figure 98 et Tableau XXXVI. Concentrations plasmatiques de la sP-sélectine après 6, 24 ou 48 heures de reperfusion

sP-sélectine (en ng/ml) n = 3-5 /groupe		6 h		24 h		48 h	
	Naïfs	Shams	Ischémiés	Shams	Ischémiés	Shams	Ischémiés
Moy ± SD	78 ± 11,1	101 ± 23,8	134 ± 68,2	64 ± 20,7	103 ± 42,6	87 ± 28,8	119 ± 50,2

L'analyse statistique ne montre aucune différence entre les groupes, mais il est à noter le faible nombre d'échantillons par groupe. Toutefois, on remarque une tendance à l'augmentation de la sP-sélectine chez les animaux ischémiés par rapport aux shams correspondants quel que soit le temps de reperfusion.

• Discussion

Le faible nombre d'échantillons par groupe représente évidemment une limite à l'interprétation de cette étude qu'il sera donc nécessaire de compléter. On remarque toutefois une tendance à l'augmentation des concentrations de sP-sélectine chez les animaux ischémiés par rapport aux shams correspondants. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature où une augmentation de la sP-sélectine a été observée chez l'Homme après un AVC ou un AIT (Cha *et al.*, 2003). Cependant, les cinétiques d'expression sont discordantes. En effet, il a été montré une augmentation des taux de

sP-sélectine 1 jour, 3 jours et 7 jours après la survenue de l'AVC (Kozuka *et al.*, 2002), alors que Wang et collaborateurs (2013) évoquent un pic d'expression de la sP-sélectine après 24 heures.

Il existe peu de données concernant la cinétique d'expression de la sP-sélectine après une ischémie cérébrale chez la souris. D'autres marqueurs peuvent toutefois être étudiés pour mettre en évidence l'activation plaquettaire, tels que le PF4, contenu dans les granules α et denses, dont la libération semble augmenter 24 heures après une ischémie cérébrale transitoire induite par occlusion de l'ACM (Laufs *et al.*, 2000).

En parallèle de cette étude systémique, nous avons cherché à mettre en évidence au niveau cérébral, par WB, l'expression des molécules d'adhésion : la P-sélectine, un médiateur précoce de l'adhésion des plaquettes et des leucocytes sur les cellules endothéliales, et ICAM-1 et VCAM-1 impliqués dans les phénomènes plus tardifs d'adhésion des leucocytes sur l'endothélium. L'ensemble de ces événements contribue notamment à la formation d'amas leuco-plaquettaires pouvant occlure les vaisseaux.

III.3.3 Evaluation de l'expression des molécules d'adhésion au niveau cérébral par Western blot

Les WB des molécules d'adhésion au niveau cérébral ont été réalisés sur une autre série d'animaux.

a. Evaluation de l'expression de la P-sélectine

La 1^{ère} étape de cette mise au point a été d'évaluer la spécificité de l'Ac primaire anti-P-sélectine que nous avons choisi d'utiliser (R&D Systems). Pour cela, nous avons réalisé une expérience dans laquelle les mêmes échantillons des zones de cœur (c) ou pénombre (p) d'homogénats de cerveaux de souris naïves, shams et ischémiées 6 heures ont été déposés sur deux gels. Après transfert sur deux membranes de PVDF, la 1^{ère} membrane a été incubée avec l'Ac primaire (dilué au 1/1000^{ème}) et l'Ac secondaire, alors que la 2nde membrane n'a été incubée qu'avec l'Ac secondaire.

Nous avons également déposé sur les gels :

- comme témoin positif de la P-sélectine, des homogénats de cerveaux de souris traitées par le LPS pendant 3 ou 6 heures, perfusés ou non. En effet, les données de la littérature indiquent que le LPS induit une surexpression de la P-sélectine endothéliale dans le cerveau (Gotsch *et al.*, 1994)
- des homogénats de cerveaux de souris traitées par le solvant du LPS, perfusés ou non.

Après révélation, deux bandes à 112 kDa et 131 kDa ont été détectées sur la membrane incubée avec l'Ac primaire (Figure 99 A), pouvant correspondre respectivement à la forme soluble (100-105 kDa) et à la forme transmembranaire de la P-sélectine (140 kDa ; Ishiwata *et al.*, 1994).

En l'absence d'Ac primaire, ces deux bandes disparaissent dans tous les échantillons (Figure 99 B).

Par ailleurs, l'expression de la P-sélectine n'est pas augmentée dans nos témoins positifs LPS par rapport aux témoins solvant correspondants.

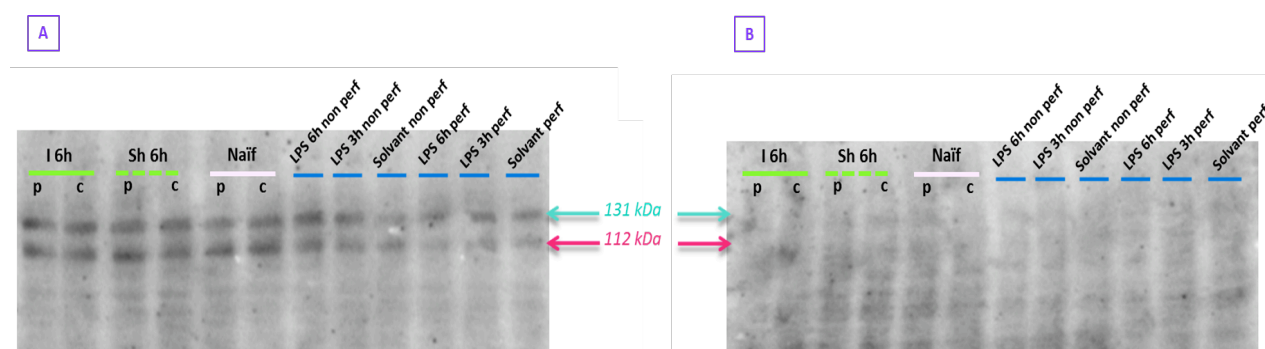


Figure 99. Mise au point du western blot de P-sélectine avec l'Ac primaire R&D Systems

Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats:

- 1) l'Ac primaire anti-P-sélectine utilisé n'est pas spécifique,
- 2) l'administration du LPS par voie intrapéritonéale n'a pas suffi à induire une expression de P-sélectine au niveau central et ne serait donc pas un bon témoin positif dans nos conditions.

En répétant le WB dans les mêmes conditions, nous avons remarqué, de manière surprenante, que les bandes que nous avons détectées dans les précédents échantillons « disparaissaient » en raison d'un rapport signal/bruit de fond insuffisant, rendant la lecture impossible (Figure 100).

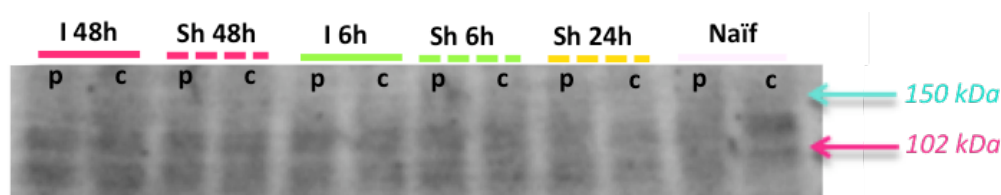


Figure 100. Western blot représentatif avec l'Ac primaire R&D Systems.

Nous avons donc cherché à optimiser la technique en testant différentes conditions de blocage et de dilution des Ac (Tableau XXXVII).

Tableau XXXVII. Conditions testées pour le Western Blot de la P-Sélectine (membranes A, B, C et D)

	A	B	C	D
Conditions de blocage	TTBS 0,1% contenant 2% de mélange bloquant	TTBS 0,1% contenant 5% de lait	TTBS 0,1% contenant 5% de lait	TTBS 0,1% contenant 5% de lait
Dilution Ac I de chèvre anti-P-Sélectine (R&D Systems)	1/600 ^e	1/600 ^e	1/600 ^e	1/1000 ^e
Dilution Ac II anti-IgG de chèvre	1/200 ^e	1/200 ^e	1/500 ^e	1/200 ^e

Les mêmes échantillons d'homogénats des zones de cœur (c) et de pénombre (p) de cerveaux de souris Sham 48 heures et ischémisées 24 heures ont été déposés sur 4 gels différents.

Les résultats sont présentés dans la Figure 101.

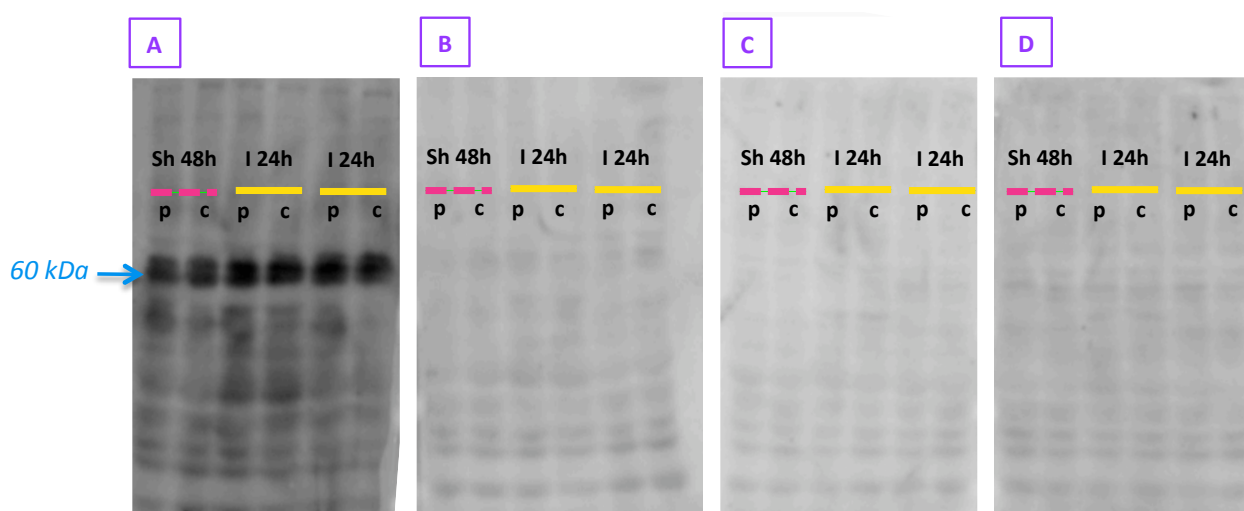


Figure 101. Western Blot de la P-Sélectine avec différentes conditions de blocage et dilutions des Ac (Ac primaire R&D Systems)

Western blot (membranes A, B, C et D) obtenus après le dépôt d'homogénats des zones de cœur (c) et de pénombre (p) de cerveaux de souris Shams (48h) et ischémisées (24h) avec les différentes conditions de blocage et dilutions des Ac décrites dans le Tableau XXXVII.

Après révélation, seule la membrane A présente une bande à environ 60 kDa. Cependant, cette bande ne correspond pas au poids moléculaire de la P-Sélectine, qui est de 140 kDa. Aucune bande n'apparaît sur les autres membranes.

Au vu de ces résultats, nous avons testé un 2nd Ac primaire (Abcam), en évaluant tout d'abord sa spécificité.

La membrane A (avec Ac primaire et secondaire ; Figure 102 A) montre une multitude de bandes entre 25 et 130 kDa qui ne sont plus présentes sur la membrane B (avec Ac secondaire seulement ; Figure 102 B), mais aucune de ces bandes ne correspond au poids moléculaire de notre protéine d'intérêt.

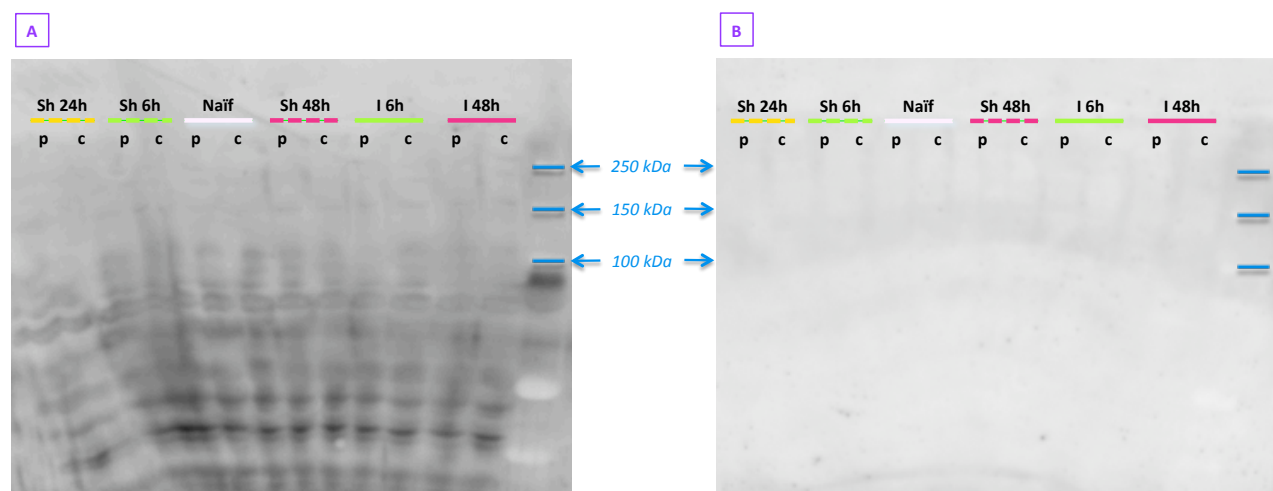


Figure 102. Western blot après incubation (A) ou non (B) avec l'Ac primaire anti-P-Sélectine (Abcam) dilué au 1/500^{ème}

Western blots obtenus après le dépôt d'homogénats des zones de cœur (c) et de pénombre (p) de cerveaux de souris naïves, shams (Sh ; 6, 24 ou 48h) et ischémiées (I ; 6 ou 48h).

Après avoir testé plusieurs Ac à différentes dilutions, différentes conditions de blocage ou de systèmes de révélation, nous n'avons pas pu retrouver le profil observé lors de nos toutes premières expériences, et ce, sans pouvoir véritablement trouver d'explication.

b. Evaluation de l'expression d'ICAM-1

En raison de ces différents niveaux de glycosylation, la protéine ICAM-1 est détectée entre environ 90 et 115 kDa par WB.

• Mise au point et validation de la technique

Nous avons tout d'abord testé deux Ac primaires anti-ICAM-1 (Santa Cruz et Abcam), qui ont respectivement montré une multitude ou l'absence de bandes aux poids moléculaires attendus d'ICAM-1 (Figure 103). Comme témoin positif, nous avons déposé un lysat de cellules Raw 264.7, une lignée macrophagique murine connue pour surexprimer ICAM-1. Ce témoin positif révéla avec l'Ac primaire Santa Cruz montre un signal très important aux alentours de 100 kDa, mais qui ne s'aligne avec aucune des bandes présentes dans les échantillons (Figure 103 A). En revanche, avec l'Ac primaire Abcam, aucune bande n'apparaît au niveau du témoin positif (Figure 103 B).

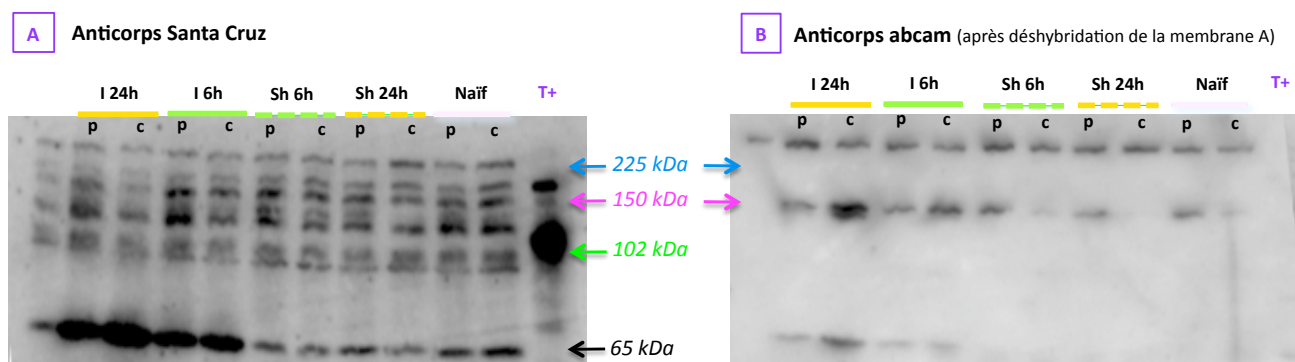


Figure 103. Western blot après incubation avec les Ac primaires anti-ICAM-1 Santa Cruz (A) ou abcam (B)

Nous avons finalement testé un 3^{ème} Ac primaire (R&D Systems), en déposant sur deux gels les mêmes échantillons de cerveaux de souris naïves, shams (6 et 24 heures) et ischémiées (6 et 24 heures).

Nos résultats montrent une large bande aux alentours de 100 kDa, aussi bien au niveau du témoin positif que des échantillons (Figure 104 A), qui semble correspondre à ICAM-1. Ces bandes n'ont pas été observées en l'absence de l'Ac primaire, révélant ainsi sa spécificité (Figure 104 B). Nous avons donc retenu ce 3^{ème} Ac pour quantifier notre protéine d'intérêt dans nos différents échantillons.

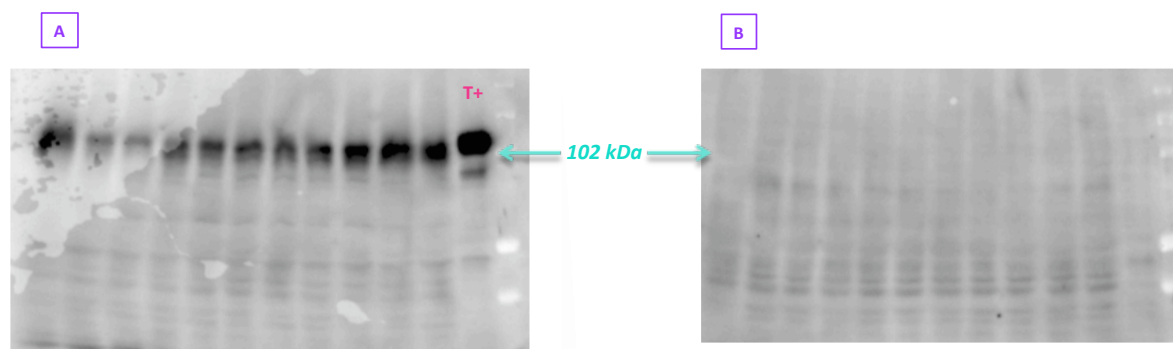


Figure 104. Western blot après incubation (A) ou non (B) avec l'Ac I anti-ICAM-1 (R&D Systems)

• Résultats

Après avoir vérifié la spécificité de l'Ac primaire, nous avons déposé des échantillons d'homogénats des zones de cœur (c) et de pénombre (p) de cerveaux de souris naïves, shams (6, 24 et 48 heures) et ischémiées (6, 24 et 48 heures). Deux échantillons communs (sham 6 heures et ischémié 48 heures) ont été déposés sur chaque gel, afin de pouvoir comparer l'expression d'ICAM-1 entre tous les échantillons et de la quantifier. La Figure 105 présente deux exemples de membranes obtenues.

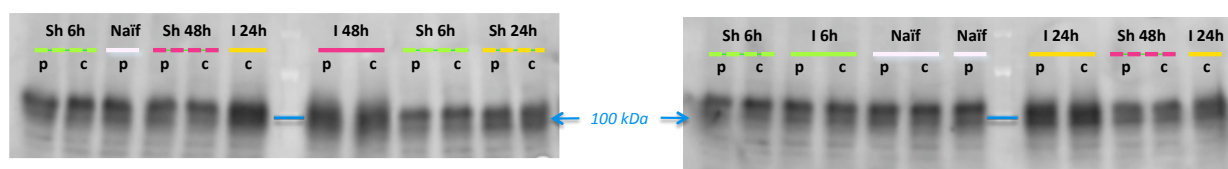


Figure 105. Western Blots représentatifs après incubation avec l'Ac anti-ICAM-1 R&D Systems

WB obtenus après le dépôt d'homogénats des zones de cœur (c) et de pénombre (p) de cerveaux de souris naïves, shams (Sh ; 6, 24 et 48h) et ischémiées (I ; 6, 24 et 48h).

La Figure 106 et le Tableau XXXVIII présentent les résultats de cette quantification dans les zones de cœur et de pénombre. On observe le même profil d'expression d'ICAM-1 dans ces 2 zones. Dans le cœur de la lésion et la zone de pénombre, son expression n'est pas différente entre les souris naïves et les shams après 6, 24 ou 48 heures de reperfusion. L'ischémie n'entraîne pas de modification de l'expression d'ICAM-1 à 6 heures, qui augmente à partir de 24 heures. Après 48 heures de reperfusion, l'expression d'ICAM-1 est fortement augmentée chez les animaux ischémiés par rapport aux shams, que ce soit dans la zone de cœur ($203,8 \pm 55,33$ UA *versus* $70,9 \pm 20,26$ UA ; $P < 0,01$) ou de pénombre ($209,7 \pm 49,31$ UA *versus* $83,3 \pm 16,65$ UA ; $P < 0,01$).

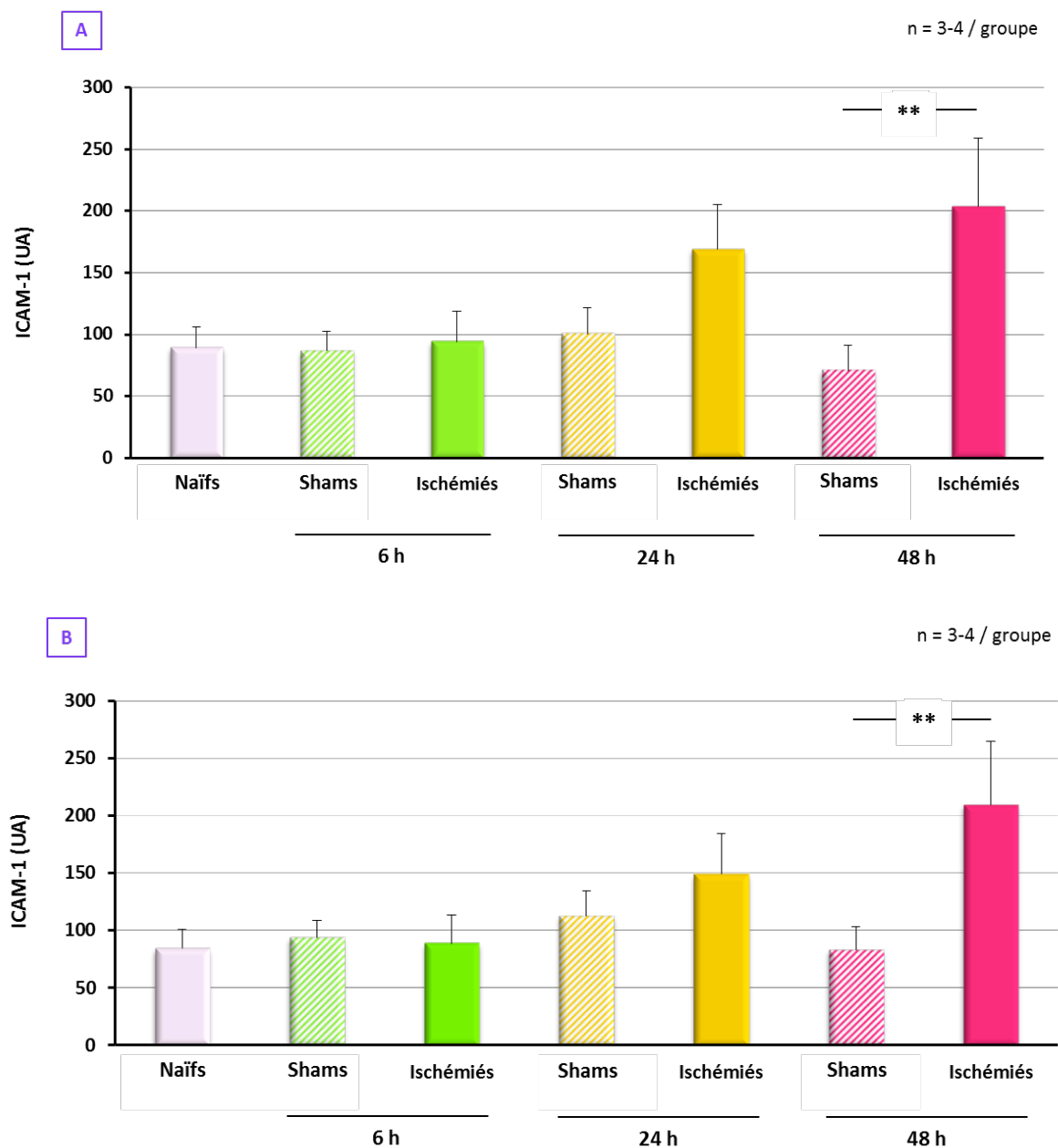


Figure 106 et Tableau XXXVIII. Cinétique de l’expression d’ICAM-1 après l’ischémie dans les zones de cœur (A) et de pénombre (B)

ICAM-1 (en UA) n = 3-4 /groupe		6 h		24 h		48 h	
Moy ± SD	Naïfs	Shams	Ischémiés	Shams	Ischémiés	Shams	Ischémiés
Coeur	89,3 ± 16,70	86,9 ± 15,28	94,1 ± 24,50	100,5 ± 21,44	169,0 ± 35,77	70,9 ± 20,26	203,8 ± 55,33 **
Pénombre	84,4 ± 20,44	93,6 ± 17,40	88,9 ± 9,03	113,0 ± 26,84	149,0 ± 25,97	83,3 ± 16,65	209,7 ± 49,31 **

** P < 0,01 ischémiés versus shams

c. Evaluation de l'expression de VCAM-1

La mise au point de ce WB ayant déjà été établie au sein du laboratoire dans un autre modèle d'ischémie cérébrale, les échantillons précédents ont été analysés par WB et quantifiés.

La Figure 107 présente deux exemples (A et B) de membranes montrant la présence d'une seule bande vers 100 kDa, qui correspond au poids moléculaire de la protéine VCAM-1.

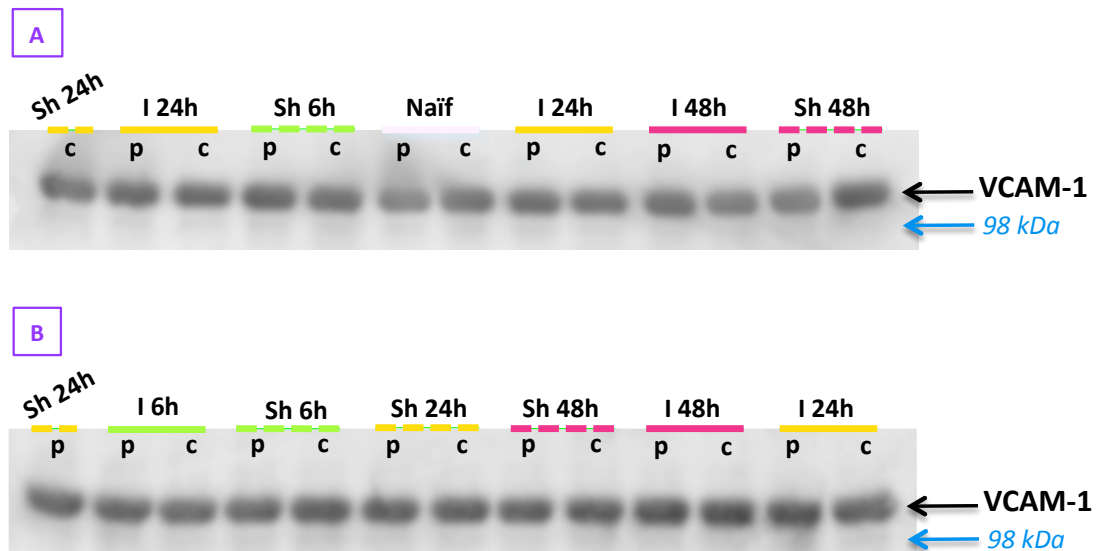


Figure 107. Western Blots représentatifs après incubation avec l'Ac primaire anti-VCAM-1

WB obtenus après le dépôt d'homogénats des zones de cœur (c) et de pénombre (p) de cerveaux de souris naïves, shams (Sh ; 6, 24 et 48h) et ischémisées (I ; 6, 24 et 48h).

Les résultats de la quantification, présentés dans la Figure 108 et le Tableau XXXIX, ne montrent aucune modulation de l'expression de VCAM-1 que ce soit par la chirurgie (Shams *versus* naïfs) ou l'ischémie dans les zones de cœur et de pénombre.

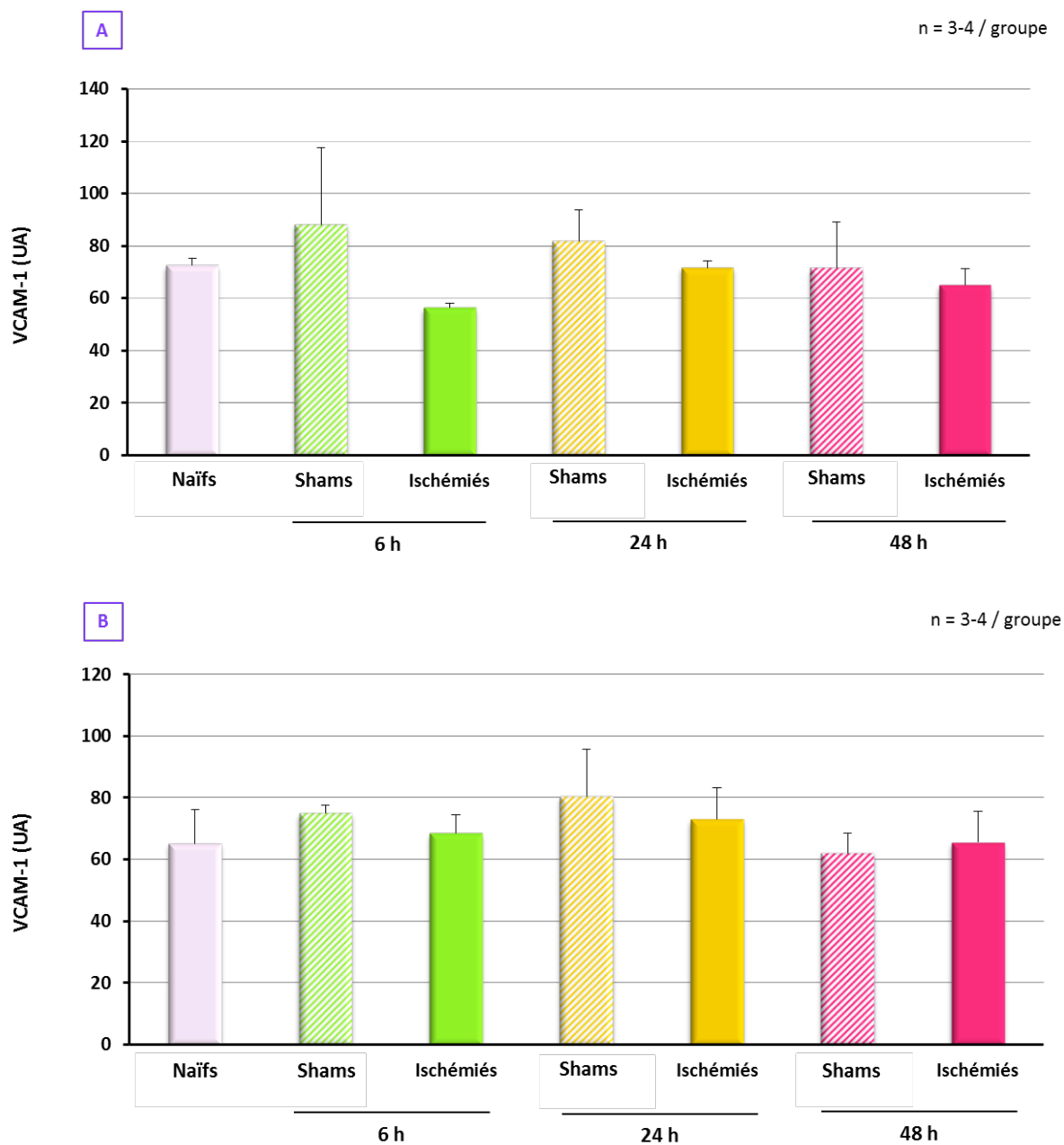


Figure 108 et Tableau XXXIX. Cinétique de l’expression de VCAM-1 après l’ischémie dans les zones de cœur (A) et de pénombre (B)

VCAM-1 (en UA) n = 3-4 /groupe		6 h		24 h		48 h	
Moy ± SD	Naïfs	Shams	Ischémiés	Shams	Ischémiés	Shams	Ischémiés
Coeur	72,6 ± 2,83	88,2 ± 29,36	56,4 ± 1,77	81,8 ± 11,81	71,7 ± 2,62	71,5 ± 17,55	65,0 ± 6,47
Pénombre	65,2 ± 10,97	75,0 ± 2,37	68,5 ± 5,85	80,3 ± 15,22	73,0 ± 10,13	62,1 ± 6,36	65,5 ± 9,99

d. Discussion

L'objectif de ce travail était d'établir, dans notre modèle d'ischémie cérébrale transitoire, les cinétiques d'expression de trois molécules d'adhésion, la P-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1, dans le parenchyme cérébral. Pour cela, nous avons essayé de mettre au point leur détection par WB en distinguant les zones de cœur et de pénombre de la lésion cérébrale. En effet, on pourrait supposer que la modulation de l'expression des protéines touche particulièrement le cœur de la lésion, mais en raison d'une nécrose importante, on sait aussi que la synthèse protéique y est très altérée (voir pour revue Moustafa et Baron, 2008). Ainsi, il était indispensable de vérifier l'expression des protéines en périphérie de la lésion, où les cellules sont moins sévèrement touchées.

La P-sélectine est impliquée dans les phénomènes de ralentissement et d'initiation de l'adhésion entre les plaquettes, les leucocytes et les cellules endothéliales. En raison de cette fonction précoce et de la mobilisation potentiellement rapide des stocks de P-sélectine des granules α et des corps de Weibel-Palade, nous nous attendions à une augmentation de cette molécule d'adhésion à des temps précoces. Cependant, les deux Ac primaires anti-P-sélectine testés n'ont pas apporté de résultat concluant, car aucun ne semble spécifique de notre protéine d'intérêt. En effet, l'Ac primaire de R&D Systems n'a détecté qu'une bande à environ 60 kDa, correspondant probablement à des Ig G au vu du poids moléculaire, alors que l'Ac primaire d'Abcam a quant à lui détecté de nombreuses bandes entre 25 et 130 kDa.

Afin d'évaluer la cinétique de la P-Sélectine, il faudrait donc tester un nouvel Ac, en utilisant la protéine purifiée comme contrôle, afin localiser avec certitude la bande d'intérêt.

Par ailleurs, nous avons cherché à détecter la P-sélectine par immunofluorescence sur des coupes de cerveaux de souris mais la technique nécessite encore des mises au point.

Les données de la littérature évoquent bien une expression post-ischémique de la P-sélectine, aussi bien chez l'Homme que chez le rongeur, mais sa cinétique d'expression est variable selon les modèles. Dans un modèle d'ischémie transitoire cérébrale chez le babouin, la P-sélectine est augmentée dès la 1^{ère} heure de reperfusion et jusqu'à 24 heures (Okada *et al.*, 1994). Dans 3 modèles d'ischémie cérébrale transitoire (thrombotique, embolique et par suture de l'ACM), Zhang et collaborateurs (1998) ont mis en évidence une expression biphasique de la P-sélectine puisqu'elle a été détectée dès 15 minutes de reperfusion avant de retrouver un niveau basal après 1 heure, puis une nouvelle augmentation après 2 heures de reperfusion pour atteindre un pic à 6 heures. Ces 2 phases pourraient correspondre respectivement à la mobilisation rapide de la P-sélectine stockée dans les plaquettes et les cellules endothéliales, puis à l'augmentation de son expression *via* une transcription génique. Toutefois, Kasahara et collaborateurs (2010) ont montré, dans un modèle d'ischémie cérébrale focale

transitoire chez la souris, une expression de la P-sélectine 24, 48 et 72 heures après l'ischémie (Kasahara *et al.*, 2010).

Par ailleurs, nous avons cherché à caractériser la cinétique d'expression de molécules d'adhésion de la famille des immunoglobulines, ICAM-1 et VCAM-1. Ces protéines sont impliquées dans l'adhésion ferme des leucocytes et des plaquettes, *via* le fibrinogène, sur la paroi endothéliale des vaisseaux, un phénomène plus tardif que ceux impliquant la P-sélectine.

Nos résultats ont montré lors du WB d'ICAM-1 avec le 3^{ème} Ac primaire (R&D Systems), une large bande vers 100 kDa, correspondant au poids moléculaire attendu. Chez la souris, ICAM-1 comporte 10 sites de glycosylation (base de données UniProt KB). Ainsi, en fonction des niveaux de glycosylation de la protéine, son poids moléculaire peut varier, ce qui expliquerait la largeur de la bande observée. Nous avons mis en évidence une augmentation significative d'ICAM-1 post-ischémique, ce qui est en accord avec plusieurs études réalisées dans différents modèles transitoires et permanents qui ont révélé une augmentation de l'expression post-ischémique dans le cerveau (Okada *et al.*, 1994 ; Jander *et al.*, 1995 ; voir pour revue Yilmaz et Granger, 2008). Chez l'Homme, des études montrent également une augmentation de l'expression d'ICAM-1 dans le cortex ipsilatéral après un AVCi (Bitsch *et al.*, 1998 ; voir pour revue Yilmaz et Granger, 2008).

Dans notre modèle, nous avons observé que cette augmentation était significative après 48 heures de reperfusion. Ces données sont cohérentes avec le fait que, contrairement à la P-sélectine, ICAM-1 n'existe pas sous forme stockée et nécessite une transcription *de novo* et donc un certain délai correspondant à sa synthèse. Nos résultats vont également dans le sens de ceux obtenus précédemment au laboratoire et montrant, dans le même modèle d'ischémie, une augmentation de l'ARNm d'ICAM-1 après 6 heures de reperfusion (Haddad *et al.*, 2006). Chez le rat et la souris, ICAM-1 a été détectée dans le cortex de rat et de souris à 24 et 48 heures (Jander *et al.*, 1995) et à 24, 48 et 72 heures (Kasahara *et al.*, 2010) après ischémie. Chez l'Homme, il a été mis en évidence une augmentation post-ischémique d'ICAM-1 qui présente un pic d'expression à 24 heures (Bitsch *et al.*, 1998).

Il est clairement établi que l'expression d'ICAM-1 est une étape essentielle dans l'adhésion ferme des plaquettes dans les micro-vaisseaux cérébraux après une ischémie cérébrale (voir pour revue Yilmaz et Granger, 2008). Nos résultats sont en accord avec ces données puisque nous avons montré que l'augmentation de l'expression d'ICAM-1 à 48 heures s'accompagne d'une forte adhésion des plaquettes à ce temps.

Enfin, concernant VCAM-1, nos résultats ne montrent aucune différence entre les souris naïves, shams et ischémiées. L'ischémie ne semble donc pas moduler l'expression de VCAM-1 dans notre modèle, ce qui serait en accord avec l'étude de Zhou et collaborateurs (2013) qui a montré une augmentation de l'ARNm de VCAM-1 dans un modèle permanent d'ischémie cérébrale, mais pas transitoire. Toutefois, d'autres études mettent en évidence l'augmentation post-ischémique de VCAM-1 aussi bien chez le rat, après 4 et 24 heures (Justicia *et al.*, 2006), que chez l'Homme (Frijns et Kappelle, 2002).

Au vu de nos résultats, il sera donc pertinent dans la suite de notre travail d'évaluer les effets du PJ34 après 48 heures de reperfusion, temps auquel nous avons mis en évidence une forte augmentation d'ICAM-1 associée à une importante adhésion des plaquettes au niveau cérébral. Cette étude nous permettra de déterminer si l'inhibition de la PARP est capable de s'opposer à ces phénomènes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le but de ce travail était d'étudier les effets de la PARP sur les fonctions plaquettaires et dans ce contexte nous avons évalué les effets plaquettaires « PARP-indépendant » et « PARP-dépendant » de différents inhibiteurs de PARP. Cette étude a associé des travaux *in vitro* d'agrégation plaquettaire et des travaux *in vivo* dans différents modèles. Ce travail s'inscrit dans une thématique plus globale du laboratoire qui recherche à identifier les effets de la PARP sur l'hémostase. En effet, la réduction des TH induites par le rt-PA, mise en évidence avec des inhibiteurs de la PARP, pourrait être liée à une activité pro-agrégante, ce qui compromettrait leur association avec le rt-PA. *A contrario*, un effet anti-agrégant pourrait constituer un atout pour les inhibiteurs de PARP, car ils pourraient ainsi contribuer à une meilleure reperfusion, voire à une réduction des risques de réocclusion.

L'objectif de la 1^{ère} partie était d'évaluer le rôle des inhibiteurs de PARP dans l'agrégation plaquettaire in vitro sur du sang humain et murin.

Le point de départ de cette étude était basé sur les résultats d'Alexy et collaborateurs (2004) qui avaient montré que des inhibiteurs de PARP exerçaient des effets anti-agrégants, indépendamment de leur activité inhibitrice de la PARP, qu'ils ont supposés être liés à une analogie structurale avec l'ADP.

Nos résultats montrent que certains inhibiteurs de PARP sont anti-agrégants plaquettaires *in vitro* et que cet effet est « PARP-indépendant ». Un tel effet anti-agrégant de ces inhibiteurs de PARP pourrait constituer un élément favorable susceptible d'améliorer la reperfusion et/ou de diminuer les risques de réocclusion à la suite d'une ischémie cérébrale.

Ces résultats sont les premiers à mettre en évidence *in vitro* un effet anti-agrégant du PJ34 sur du sang humain, qui pourrait être lié à un antagonisme du récepteur à l'ADP, P2Y₁₂. Toutefois, une étude de « binding » permettrait de conclure rigoureusement sur ce point. Ainsi, l'utilisation d'agonistes et/ou d'antagonistes radio-marqués, tels que l'[3H]ADP ou le [33P]2MeS-ADP, permettrait de caractériser précisément le type de liaison du PJ34 sur P2Y₁₂ (Van Giezen *et al.*, 2009). Par ailleurs cet effet anti-agrégant du PJ34 semble spécifique à l'Homme puisqu'il n'a pas été retrouvé chez la souris, et ceci peut-être en raison notamment de la différence structurale du récepteur P2Y₁₂ entre les 2 espèces (Pausch *et al.*, 2004 ; von Kügelgen, 2006).

Il serait également intéressant d'évaluer l'effet du PJ34 sur les phénomènes de sécrétion du contenu des granules plaquettaires, par exemple *via* la détection de l'ATP. Si le PJ34 inhibait cette sécrétion, il

présenterait l'avantage de ne pas supprimer totalement l'agrégation plaquettaire pouvant exposer à des risques hémorragiques, mais de bloquer uniquement la phase d'amplification de l'agrégation. En ce qui concerne la structure du PJ34, il n'existe pas d'analogie structurale évidente avec l'ADP qui pourrait expliquer son effet anti-agrégant. Toutefois, il est aujourd'hui clairement établi que différents types d'interaction sont mis en jeu entre le récepteur P2Y₁₂ et ses différents ligands. En effet, une étude de la relation structure/activité entre l'ADP et P2Y₁₂ a permis de mettre en évidence le rôle crucial de la lysine en position 280 dans cette interaction (Ignatovica *et al.*, 2012). Les résidus arginine en position 256 et/ou 265 jouent également un rôle important dans la reconnaissance des antagonistes du récepteur (Mao *et al.*, 2010). Par ailleurs, le métabolite actif du clopidogrel se lie à P2Y₁₂ en formant 2 ponts disulfures, grâce à son groupement thiol (Ding *et al.*, 2003). Ainsi, il serait intéressant de déterminer comment et sur quels sites s'établit la liaison P2Y₁₂-PJ34.

Quant à la minocycline, elle a inhibé de manière identique tous les types d'agrégation, suggérant qu'elle exercerait son activité anti-agrégante *via* un mécanisme plus général et commun aux deux espèces, peut être en chélatant les ions calciques. Cette hypothèse reste bien sûr à démontrer.

Dans la 2^{ème} partie, nous avons évalué les effets du PJ34 et de la minocycline, les deux seuls inhibiteurs de PARP ayant montré un effet sur l'agrégation plaquettaire in vitro, dans des modèles in vivo chez la souris.

- La 1^{ère} étape a consisté à étudier leurs effets sur l'hémostase, en utilisant 3 tests d'exploration des fonctions plaquettaires : le temps de saignement, des modèles de thromboembolie pulmonaire et un modèle de thrombose carotidienne induite par le FeCl₃, qu'il nous a, tout d'abord, fallu mettre au point. Nous n'avons mis en évidence aucun effet de ces inhibiteurs de PARP dans nos conditions expérimentales.

D'une part, ces résultats suggèrent que le PJ34 et la minocycline n'ont aucun effet sur l'hémostase primaire, évaluée par le temps de saignement. En conclusion, *in vivo*, le PJ34 (1) n'exerce pas d'effet anti-agrégant et (2) ne semble pas présenter non plus d'effet pro-agrégant pouvant expliquer la réduction des TH spontanées ou induites par le rt-PA, observées précédemment dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale (Murata *et al.*, 2008 ; Machado *et al.*, 2009 ; Haddad *et al.*, 2008, 2013 ; Teng *et al.*, 2013). Cet effet bénéfique pourrait donc être essentiellement lié à la préservation de l'intégrité vasculaire, notamment *via* l'inhibition de la dégradation de constituants de la BHE (claudine-5, ZO-1 et VE-cadhérine) et/ou de l'expression de certaines MMP.

D'autre part, le PJ34 et la minocycline n'ont révélé aucun effet pro- ou anti-thrombotique quel que soit le terrain vasculaire au niveau de l'occlusion, lésé ou non (modèles de thromboembolie pulmonaire et de thrombose carotidienne induite par le FeCl₃).

L'ensemble de ces résultats montre donc l'absence d'effet du PJ34 et de la minocycline sur les fonctions plaquettaires *in vivo* chez la souris.

- La 2nde étape de ces études *in vivo* a été d'évaluer les effets du PJ34 sur l'activité thrombolytique du rt-PA. En effet, les objectifs actuels en terme de thrombolyse sont (1) d'augmenter son efficacité, afin d'augmenter les taux de recanalisation, et (2) de diminuer les effets indésirables (TH), notamment en diminuant les doses administrées. Pour répondre à ces deux problématiques, il est nécessaire de trouver une molécule qui puisse agir en synergie avec le rt-PA. En effet, une éventuelle diminution de la thrombolyse par le PJ34 compromettrait l'association des deux molécules.

Dans un modèle de thrombose de l'ACM induite par le FeCl₃, nous avons observé que le PJ34 et le rt-PA seuls ou en association retardent le début de l'occlusion de l'ACM, mais ne s'y opposent pas. Concernant le rt-PA, ce résultat serait lié à l'effet thrombolytique de la molécule, qui s'opposerait à la formation précoce du thrombus. L'effet observé avec le PJ34, bien que faible, pourrait quant à lui s'expliquer par son action protectrice de la paroi vasculaire que nous avons mentionnée précédemment. Ainsi le PJ34 pourrait retarder le début de l'occlusion de l'ACM et donc la chute du DSC, en s'opposant à la lésion de l'endothélium par le FeCl₃.

En terme de reperfusion, **notre étude montre que le PJ34 n'entrave pas la thrombolyse par le rt-PA, mais au contraire, une tendance à l'améliorer a été observée.** Ce résultat n'est toutefois pas significatif, notamment en raison d'une grande variabilité dans les groupes d'animaux, ne permettant pas une puissance statistique suffisante avec les effectifs utilisés. Cette étude mérite donc d'être poursuivie. Par ailleurs, elle pourrait être complétée par l'évaluation *in vitro*, sur des échantillons de sang humain et murin, de l'effet thrombolytique de l'association rt-PA - PJ34 à l'aide du test des euglobulines. Ce test a notamment été utilisé pour évaluer l'effet du rt-PA associé à l'INO-1001 et a montré que cet inhibiteur de PARP n'affectait pas l'activité du rt-PA (Toth *et al.*, 2006).

- Comme nous venons de le voir, nos études ne sont pas en faveur d'un effet pro-agrégant des inhibiteurs de PARP pouvant contribuer à la réduction des TH dans l'ischémie cérébrale, qui pourrait donc être essentiellement liée à un effet protecteur au niveau vasculaire. Par ailleurs, en rendant moins thrombogène la paroi vasculaire, l'inhibition de la PARP pourrait également réduire le risque de formation de nouveaux thrombi et donc de réocclusion, comme cela a été suggéré dans un modèle

d'ischémie/reperfusion hépatique (Khandoga *et al.*, 2002, 2004). En effet, les auteurs ont mis en évidence une diminution de l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales hépatiques, ainsi que l'adhésion des plaquettes et des leucocytes sur la paroi endothéliale, associé à une meilleure perfusion des tissus.

Ainsi, afin de pouvoir déterminer à terme si de tels effets surviennent au cours de l'ischémie cérébrale, nous avons parallèlement évalué dans notre modèle endovasculaire d'ischémie cérébrale transitoire chez la souris, les cinétiques d'expression de molécules d'adhésion au niveau cérébral et plasmatique et de l'adhésion des plaquettes.

Nos résultats montrent une adhésion des plaquettes, évaluée par l'immunofluorescence de CD41, après 6 heures de reperfusion chez les animaux ischémiés, qui augmente à 24 heures et devient très importante à 48 heures. Parallèlement, la sP-sélectine plasmatique tend à augmenter de manière non significative à ces 3 temps, témoignant ainsi d'une légère activation plaquettaire. Ce résultat reste toutefois à confirmer étant donné la faible taille des échantillons. Par ailleurs, l'expression d'ICAM-1 tend à augmenter à 24 heures, et est significative à 48 heures, ce qui est en accord avec la cinétique d'adhésion des plaquettes.

Ainsi, l'augmentation de l'adhésion des plaquettes au niveau cérébral, associée à l'augmentation de l'expression d'ICAM-1 à 48 heures, justifient dans l'avenir d'évaluer l'implication de la PARP dans ces phénomènes.

Pour cela, une des stratégies envisagées sera d'évaluer l'effet d'un traitement par le PJ34 administré à la dose de 25 mg/kg, dose à laquelle il a été montré une réduction de l'augmentation de l'ARNm d'ICAM-1 dans ce modèle (Haddad *et al.*, 2006).

Par ailleurs, l'injection d'une solution de dextran couplé à du FITC (Hase *et al.*, 2012), une technique qui sera très prochainement mise en place au laboratoire, permettra d'évaluer les zones de perfusion dans le tissu cérébral directement sur des coupes de cerveaux ou d'observer les défauts de perfusion en temps réel, à travers une fenêtre crânienne, par microscopie intravitale (Karatas *et al.*, 2011).

Cette technique microscopique permet également de visualiser directement l'adhésion de plaquettes marquées, par exemple par la rhodamine 6G *ex vivo*, sur la paroi endothéliale, et leur contribution à la formation de thrombi (Khandoga *et al.*, 2004).

Afin de renforcer l'intérêt des inhibiteurs de PARP dans le traitement des AVC, il serait également pertinent de confirmer les résultats obtenus dans l'ensemble de ces modèles *in vivo* en utilisant d'autres inhibiteurs de PARP ou des souris PARP-/-.

En conclusion, à terme, l'ensemble de ces travaux pourrait contribuer à mettre en évidence un nouvel aspect bénéfique des inhibiteurs de PARP. En effet, au-delà de leurs effets neuroprotecteurs et vasculoprotecteurs, l'ensemble de ces données suggère qu'ils (1) ne perturbent pas l'hémostase et (2) n'entravent pas la thrombolyse par le rt-PA, et qu'ils pourraient peut-être même la favoriser. De plus, s'il s'avère que l'inhibition de la PARP réduit l'adhésion plaquettaire et donc le risque de formation de nouveaux thrombi associés aux phénomènes de réocclusion, ceci renforcerait l'intérêt des inhibiteurs de PARP dans le traitement des AVC ischémiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelkarim GE, Gertz K, Harms C, Katchanov J, Dirnagl U, Szabó C, Endres M. Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in *in vitro* and *in vivo* models of stroke. *Int J Mol Med* 2001; 7: 255–260.
- Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE. 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* 1993; 24: 35-41.
- Alano CC, Ying W, Swanson RA. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD⁺ depletion and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 2004; 279: 18895–18902.
- Alano CC, Kauppinen TM, Valls AV, Swanson RA. Minocycline inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 9685-9690.
- Alano CC, Garnier P, Ying W, Higashi Y, Kauppinen TM, Swanson RA. NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death. *J Neurosci* 2010; 30: 2967–2978.
- Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 85-92.
- Alexandrov AV, Burgin WS, Demchuk AM, El-Mitwalli A, Grotta JC. Speed of intracranial clot lysis with intravenous tissue plasminogen activator therapy: sonographic classification and short-term improvement. *Circulation* 2001; 103: 2897-2902.
- Alexy T, Toth A, Marton Z, Horvath B, Koltai K, Feher G, Kesmarky G, Kalai T, Hideg K, Sumegi B, Toth K. Inhibition of ADP-evoked platelet aggregation by selected poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43: 423-431.
- Algra A, van Gijn J. Aspirin at any dose above 30 mg offers only modest protection after cerebral ischaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 60: 197-199.
- Alshekhlee A, Pandya DJ, English J, Zaidat OO, Mueller N, Gupta R, Nogueira RG. Merci mechanical thrombectomy retriever for acute ischemic stroke therapy: literature review. *Neurology* 2012; 79: S126-S134.
- Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays* 2004; 26: 882-893.
- André P, Hartwell D, Hrachovinová I, Saffaripour S, Wagner DD. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 13835-13840.
- Andre P, Delaney SM, LaRocca T, Vincent D, DeGuzman F, Jurek M, Koller B, Phillips DR, Conley PB. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest* 2003; 112: 398-406.

- Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, Arnout J, Dewerchin M, Hoylaerts M, Herbert J, Collen D, Dahlbäck B, Carmeliet P. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med* 2001; 7: 215-221.
- Ansari S, Rahman M, McConnell DJ, Waters MF, Hoh BL, Mocco J. Recanalization therapy for acute ischemic stroke, part 2: mechanical intra-arterial technologies. *Neurosurg Rev* 2011; 34: 11-20.
- Barkauskaite E, Jankevicius G, Ladurner AG, Ahel I, Timinszky G. The recognition and removal of cellular poly(ADP-ribose) signals. *FEBS J* 2013; 280: 3491-3507.
- Beglova N, Blacklow SC, Takagi J, Springer TA. Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat Struct Biol* 2002; 9: 282-287.
- Béjot Y, Touzé E, Jacquin A, Giroud M, Mas JL. [Epidemiology of stroke]. *Med Sci (Paris)* 2009; 25: 727-732.
- Bella J, Kolatkar PR, Marlor CW, Greve JM, Rossmann MG. The structure of the two amino-terminal domains of human intercellular adhesion molecule-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor. *Virus Res* 1999; 62: 107-117.
- Berger NA. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res* 1985; 101: 4-15.
- Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, Gardiner EE, Andrews RK. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost* 2001; 86: 178-188.
- Bitsch A, Klene W, Murtada L, Prange H, Rieckmann P. A longitudinal prospective study of soluble adhesion molecules in acute stroke. *Stroke* 1998; 29: 2129-2135.
- Blum A, Sheiman J, Hasin Y. Leukocytes and acute myocardial infarction. *Isr Med Assoc J* 2002; 4: 1060-1065.
- Bouet V, Freret T, Toutain J, Divoux D, Boulouard M, Schumann-Bard P. Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Exp Neurol* 2007; 203: 555-567.
- Bousser MG. Stroke prevention: an update. *Front Med* 2012; 6: 22-34.
- Broderick JP, Palesch YY, Demchuk AM, Yeatts SD, Khatri P, Hill MD, Jauch EC, Jovin TG, Yan B, Silver FL, von Kummer R, Molina CA, Demaerschalk BM, Budzik R, Clark WM, Zaidat OO, Malisch TW, Goyal M, Schonewille WJ, Mazighi M, Engelter ST, Anderson C, Spilker J, Carrozzella J, Ryckborst KJ, Janis LS, Martin RH, Foster LD, Tomsick TA; Interventional Management of Stroke (IMS) III Investigators. Endovascular therapy after intravenous t-PA versus t-PA alone for stroke. *N Engl J Med* 2013; 368: 893-903.
- Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev* 2011; 25: 155-167.
- Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 2009; 40: e331-e339.
- Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 2009; 111: 483-495.
- Bürkle A. Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays* 2001; 23: 795-806.

- Caiafa P, Guastafierro T, Zampieri M. Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *FASEB J* 2009; 23: 672-678.
- Campbell DJ, Woodward M, Chalmers JP, Colman SA, Jenkins AJ, Kemp BE, Neal BC, Patel A, MacMahon SW. Soluble vascular cell adhesion molecule 1 and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in predicting ischemic stroke in patients with cerebrovascular disease. *Arch Neurol* 2006; 63: 60-65.
- Cauwenberghs N, Vanhoorelbeke K, Vauterin S, Deckmyn H. Structural determinants within platelet glycoprotein Ibalph involved in its binding to von Willebrand factor. *Platelets* 2000; 11: 373-378.
- Cha JK, Jeong MH, Jang JY, Bae HR, Lim YJ, Kim JS, Kim SH, Kim JW. Serial measurement of surface expressions of CD63, P-selectin and CD40 ligand on platelets in atherosclerotic ischemic stroke. A possible role of CD40 ligand on platelets in atherosclerotic ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2003; 16: 376-382.
- Chambon P, Weill JD, Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1963; 11: 39-43.
- Chauhan AK, Motto DG, Lamb CB, Bergmeier W, Dockal M, Plaimauer B, Scheiflinger F, Ginsburg D, Wagner DD. Systemic antithrombotic effects of ADAMTS13. *J Exp Med* 2006; 203: 767-776.
- Chiarugi A. Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 122-129.
- Cho MJ, Liu J, Pestina TI, Steward SA, Thomas DW, Coffman TM, Wang D, Jackson CW, Gartner TK. The roles of alpha IIb beta 3-mediated outside-in signal transduction, thromboxane A2, and adenosine diphosphate in collagen-induced platelet aggregation. *Blood* 2003; 101: 2646-2651.
- Cho KO, Kim SK, Cho YJ, Sung KW, Kim SY. Regional differences in the neuroprotective effect of minocycline in a mouse model of global forebrain ischemia. *Life Sci* 2007; 80: 2030-2035.
- Choi J, Kermode JC. New therapeutic approaches to combat arterial thrombosis: better drugs for old targets, novel targets, and future prospects. *Mol Interv* 2011; 11: 111-123.
- Choudhri TF, Hoh BL, Zerwes HG, Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES Jr, Kottirsch G, Pinsky DJ. Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation. *J Clin Invest* 1998; 102: 1301-1310.
- Christou I, Alexandrov AV, Burgin WS, Wojner AW, Felberg RA, Malkoff M, Grotta JC. Timing of recanalization after tissue plasminogen activator therapy determined by transcranial doppler correlates with clinical recovery from ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31: 1812-1816.
- Ciccone A, Valvassori L, Nichelatti M, Sgoifo A, Ponzio M, Sterzi R, Boccardi E; SYNTHESIS Expansion Investigators. Endovascular treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2013; 368: 904-913.
- Clark WM, Lessov NS, Dixon MP, Eckenstein F. Monofilament intraluminal middle artery occlusion in the mouse. *Neurol Res* 1997; 19: 641-648.
- Connolly ES Jr, Winfree CJ, Stern DM, Solomon RA, Pinsky DJ. Procedural and strain-related variables significantly affect outcome in a murine model of focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* 1996; 38: 523-531.

- Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000; 407: 258-264.
- Couturier JY, Ding-Zhou L, Croci N, Plotkine M, Margail I. 3-Aminobenzamide reduces brain infarction and neutrophil infiltration after transient focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol* 2003; 184: 973-980.
- Crome O, Doeppner TR, Schwarting S, Müller B, Bähr M, Weise J. Enhanced poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation contributes to recombinant tissue plasminogen activator-induced aggravation of ischemic brain injury *in vivo*. *J Neurosci Res* 2007; 85: 1734-1743.
- Curtin NJ, Szabo C. Therapeutic applications of PARP inhibitors: Anticancer therapy and beyond. *Mol Aspects Med* 2013 [*In Press*].
- Day SM, Reeve JL, Myers DD, Fay WP. Murine thrombosis models. *Thromb Haemost* 2004; 92: 486-494.
- de Vos M, Schreiber V, Dantzer F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem Pharmacol* 2012; 84: 137-146.
- Denis C, Methia N, Frenette PS, Rayburn H, Ullman-Culleré M, Hynes RO, Wagner DD. A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 9524-9529.
- Denis CV, Dubois C, Brass LF, Heemskerk JW, Lenting PJ; Biorheology Subcommittee of the SSC of the ISTH. Towards standardization of *in vivo* thrombosis studies in mice. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 1641-1644.
- Dietrich WD, Nakayama H, Watson BD, Kanemitsu H. Morphological consequences of early reperfusion following thrombotic or mechanical occlusion of the rat middle cerebral artery. *Acta Neuropathol* 1989; 78: 605-614.
- Ding Y, Zhou Y, Lai Q, Li J, Gordon V, Diaz FG. Long-term neuroprotective effect of inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase in rats with middle cerebral artery occlusion using a behavioral assessment. *Brain Res* 2001; 915: 210-217.
- Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. Inactivation of the human P2Y₁₂ receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* 2003; 101: 3908-3914.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22: 391-397.
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008; 55: 310-318.
- Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; 87: 179-197.
- Durkacz BW, Omidiji O, Gray DA, Shall S. (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. *Nature* 1980; 283: 593-596.
- Egi Y, Matsuura S, Maruyama T, Fujio M, Yuki S, Akira T. 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* 2011; 1389: 169-176.

- El Amki M, Lerouet D, Coqueran B, Curis E, Orset C, Vivien D, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Margail I. Experimental modeling of recombinant tissue plasminogen activator effects after ischemic stroke. *Exp Neurol* 2012; 238: 138-144.
- Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J, Pieper A, Wang ZQ, Dawson TM, Snyder SH, Dawson VL. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med* 1997; 3: 1089-1095.
- Endres M, Wang ZQ, Namura S, Waeber C, Moskowitz MA. Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 1143-1151.
- Endres M, Scott G, Namura S, Salzman AL, Huang PL, Moskowitz MA, Szabó C. Role of peroxynitrite and neuronal nitric oxide synthase in the activation of poly(ADP-ribose) synthetase in a murine model of cerebral ischemia-reperfusion. *Neurosci Lett* 1998; 248: 41-44.
- Enzmann G, Mysiorek C, Gorina R, Cheng YJ, Ghavampour S, Hannocks MJ, Prinz V, Dirnagl U, Endres M, Prinz M, Beschorner R, Harter PN, Mittelbronn M, Engelhardt B, Sorokin L. The neurovascular unit as a selective barrier to polymorphonuclear granulocyte (PMN) infiltration into the brain after ischemic injury. *Acta Neuropathol* 2013; 125: 395-412.
- Fagan SC, Waller JL, Nichols FT, Edwards DJ, Pettigrew LC, Clark WM, Hall CE, Switzer JA, Ergul A, Hess DC. Minocycline to improve neurologic outcome in stroke (MINOS): a dose-finding study. *Stroke* 2010; 41: 2283-2287.
- Fox C, Dingman A, Derugin N, Wendland MF, Manabat C, Ji S, Ferriero DM, Vexler ZS. Minocycline confers early but transient protection in the immature brain following focal cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 1138-1149.
- Franklin KBJ, Paxinos G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Third Edition, Academic Press, San Diego, 2007: pp 351.
- Franks ZG, Campbell RA, Weyrich AS, Rondina MT. Platelet-leukocyte interactions link inflammatory and thromboembolic events in ischemic stroke. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1207: 11-17.
- Frijns CJ, Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 2002; 33: 2115-2122.
- Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, Pessin M, Ahuja A, Callahan F, Clark WM, Silver F, Rivera F. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled trial. *Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism*. *JAMA* 1999; 282: 2003-2011.
- Gachet C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006; 46: 277-300.
- Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost* 2008; 99: 466-472.
- Gasche Y, Copin JC. [Blood-brain barrier pathophysiology and ischaemic brain oedema]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2003; 22: 312-319.
- Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, Chan PH, Park TS. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H558-H568.

- Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 2008; 55: 363-389.
- Glette J, Sandberg S, Hopen G, Solberg CO. Influence of tetracyclines on human polymorphonuclear leukocyte function. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25: 354-357.
- Goldstein LB, Bushnell CD, Adams RJ, Appel LJ, Braun LT, Chaturvedi S, Creager MA, Culebras A, Eckel RH, Hart RG, Hinchey JA, Howard VJ, Jauch EC, Levine SR, Meschia JF, Moore WS, Nixon JV, Pearson TA; 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. Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2011; 42: 517-584.
- Golias C, Batistatou A, Bablekos G, Charalabopoulos A, Peschos D, Mitsopoulos P, Charalabopoulos K. Physiology and pathophysiology of selectins, integrins, and IgSF cell adhesion molecules focusing on inflammation. A paradigm model on infectious endocarditis. *Cell Commun Adhes* 2011; 18: 19-32.
- Goto S, Xue R, Sugo N, Sawada M, Blizzard KK, Poitras MF, Johns DC, Dawson TM, Dawson VL, Crain BJ, Traystman RJ, Mori S, Hurn PD. Poly(ADP-ribose) polymerase impairs early and long-term experimental stroke recovery. *Stroke* 2002; 33: 1101-1106.
- Gotsch U, Jäger U, Dominis M, Vestweber D. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha *in vivo*. *Cell Adhes Commun* 1994; 2: 7-14.
- Grau AJ, Ruf A, Vogt A, Lichy C, Buggle F, Patscheke H, Hacke W. Increased fraction of circulating activated platelets in acute and previous cerebrovascular ischemia. *Thromb Haemost* 1998; 80: 298-301.
- Gray H. *Anatomy of the Human Body*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1918; Bartleby.com, 2000. www.bartleby.com/107/. [September 2013]. <http://www.bartleby.com/107/146.html>
- Gravanis I, Tsirka SE. Tissue-type plasminogen activator as a therapeutic target in stroke. *Expert Opin Ther Targets* 2008; 12: 159-170.
- Grüner S, Prostredna M, Aktas B, Moers A, Schulte V, Krieg T, Offermanns S, Eckes B, Nieswandt B. Anti-glycoprotein VI treatment severely compromises hemostasis in mice with reduced alpha2beta1 levels or concomitant aspirin therapy. *Circulation* 2004; 110: 2946-2951.
- Hacke W, Donnan G, Fieschi C, Kaste M, von Kummer R, Broderick JP, Brott T, Frankel M, Grotta JC, Haley EC Jr, Kwiatkowski T, Levine SR, Lewandowski C, Lu M, Lyden P, Marler JR, Patel S, Tilley BC, Albers G, Bluhmki E, Wilhelm M, Hamilton S; ATLANTIS Trials Investigators; ECASS Trials Investigators; NINDS rt-PA Study Group Investigators. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet* 2004; 363: 768-774.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D; ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2008; 359: 1317-1329.

- Haddad M, Rhinn H, Bloquel C, Coqueran B, Szabó C, Plotkine M, Scherman D, Margail I. Anti-inflammatory effects of PJ34, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, in transient focal cerebral ischemia in mice. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 23-30.
- Haddad M, Beray-Berthat V, Coqueran B, Palmier B, Szabo C, Plotkine M, Margail I. Reduction of hemorrhagic transformation by PJ34, a poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor, after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Eur J Pharmacol* 2008; 588: 52-57.
- Haddad M, Beray-Berthat V, Coqueran B, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Margail I. Combined therapy with PJ34, a poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor, reduces tissue plasminogen activator-induced hemorrhagic transformations in cerebral ischemia in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 2013; 27: 393-401.
- Hall ED. High-dose glucocorticoid treatment improves neurological recovery in head-injured mice. *J Neurosurg* 1985; 62: 882-887.
- Hamilton JR, Cornelissen I, Coughlin SR. Impaired hemostasis and protection against thrombosis in protease-activated receptor 4-deficient mice is due to lack of thrombin signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1429-1435.
- Hase Y, Okamoto Y, Fujita Y, Kitamura A, Nakabayashi H, Ito H, Maki T, Washida K, Takahashi R, Ihara M. Cilostazol, a phosphodiesterase inhibitor, prevents no-reflow and hemorrhage in mice with focal cerebral ischemia. *Exp Neurol* 2012; 233: 523-533.
- Hashimoto M, Sugidachi A, Isobe T, Niitsu Y, Ogawa T, Jakubowski JA, Asai F. The influence of P2Y12 receptor deficiency on the platelet inhibitory activities of prasugrel in a mouse model: evidence for specific inhibition of P2Y12 receptors by prasugrel. *Biochem Pharmacol* 2007; 74: 1003-1009.
- Hassa PO, Hottiger MO. A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation. *Biol Chem* 1999; 380: 953-959.
- Hassa PO, Hottiger MO. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front Biosci* 2008; 13: 3046-3082.
- Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, Hazekawa M, Mishima S, Fujioka M, Orito K, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M. Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Stroke* 2008; 39: 951-958.
- Hayashi H, Kyushiki H, Nagano K, Sudo T, Matsuoka H, Yoshida S. Anopheline anti-platelet protein from a malaria vector mosquito has anti-thrombotic effects *in vivo* without compromising hemostasis. *Thromb Res* 2012; 129: 169-175.
- Hechler B, Nonne C, Roh EJ, Cattaneo M, Cazenave JP, Lanza F, Jacobson KA, Gachet C. MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 556-563.
- Heiss WD. The ischemic penumbra: correlates in imaging and implications for treatment of ischemic stroke. The Johann Jacob Wepfer award 2011. *Cerebrovasc Dis* 2011; 32: 307-320.

- Homsí S, Federico F, Croci N, Palmier B, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Minocycline effects on cerebral edema: relations with inflammatory and oxidative stress markers following traumatic brain injury in mice. *Brain Res* 2009; 1291: 122-132.
- Hornig CR, Bauer T, Simon C, Trittmacher S, Dorndorf W. Hemorrhagic transformation in cardioembolic cerebral infarction. *Stroke* 1993; 24: 465-468.
- Hottiger MO, Hassa PO, Lüscher B, Schüler H, Koch-Nolte F. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci* 2010; 35: 208-219.
- Ignatovica V, Megnis K, Lapins M, Schiöth HB, Klovins J. Identification and analysis of functionally important amino acids in human purinergic 12 receptor using a *Saccharomyces cerevisiae* expression system. *FEBS J* 2012; 279: 180-191.
- Ishikawa M, Cooper D, Russell J, Salter JW, Zhang JH, Nanda A, Granger DN. Molecular determinants of the prothrombogenic and inflammatory phenotype assumed by the postischemic cerebral microcirculation. *Stroke* 2003; 34: 1777-1782.
- Ishiwata N, Takio K, Katayama M, Watanabe K, Titani K, Ikeda Y, Handa M. Alternatively spliced isoform of P-selectin is present in vivo as a soluble molecule. *J Biol Chem* 1994; 269: 23708-23715.
- Ishrat T, Soliman S, Guan W, Saler M, Fagan SC. Vascular protection to increase the safety of tissue plasminogen activator for stroke. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 3677-3684.
- Italiano JE Jr, Battinelli EM. Selective sorting of alpha-granule proteins. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 173-176.
- Iyú D, Glenn JR, White AE, Fox SC, Heptinstall S. Adenosine derived from ADP can contribute to inhibition of platelet aggregation in the presence of a P2Y12 antagonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 416-422.
- Jackson SP. Arterial thrombosis - insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med* 2011; 17: 1423-1436.
- Jafar JJ, Menoni R, Feinberg H, LeBreton G, Crowell RM. Selective platelet deposition during focal cerebral ischemia in cats. *Stroke* 1989; 20: 664-667.
- Jagtap P, Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 421-440.
- Jander S, Kraemer M, Schroeter M, Witte OW, Stoll G. Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15: 42-51.
- Jandrot-Perrus M, Nurden P. [From platelet functions to therapy]. *Rev Med Interne* 2010; 313: S319-S323.
- Jarvis GE, Atkinson BT, Snell DC, Watson SP. Distinct roles of GPVI and integrin alpha(2)beta(1) in platelet shape change and aggregation induced by different collagens. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 107-117.
- Jirouskova M, Shet AS, Johnson GJ. A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 661-669.

- Justicia C, Martín A, Rojas S, Gironella M, Cervera A, Panés J, Chamorro A, Planas AM. Anti-VCAM-1 antibodies did not protect against ischemic damage either in rats or in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 421-432.
- Kaplan B, Brint S, Tanabe J, Jacewicz M, Wang XJ, Pulsinelli W. Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia. *Stroke* 1991; 22: 1032-1039.
- Kaplan ZS, Jackson SP. The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011: 51-61.
- Karatas H, Erdener SE, Gursay-Ozdemir Y, Gurer G, Soylemezoglu F, Dunn AK, Dalkara T. Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl(3) application: a novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31: 1452-1460.
- Kasahara Y, Taguchi A, Uno H, Nakano A, Nakagomi T, Hirose H, Stern DM, Matsuyama T. Telmisartan suppresses cerebral injury in a murine model of transient focal ischemia. *Brain Res* 2010; 1340: 70-80.
- Kasirer-Friede A, Cozzi MR, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM, Shattil SJ. Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors. *Blood* 2004; 103: 3403-3411.
- Khandoga A, Enders G, Biberthaler P, Krombach F. Poly(ADP-ribose) polymerase triggers the microvascular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G553-G560.
- Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Krombach F. 5-Aminoisoquinolinone, a novel inhibitor of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase, reduces microvascular liver injury but not mortality rate after hepatic ischemia-reperfusion. *Crit Care Med* 2004; 32: 472-477.
- Kidwell CS, Jahan R, Gornbein J, Alger JR, Nenov V, Ajani Z, Feng L, Meyer BC, Olson S, Schwamm LH, Yoo AJ, Marshall RS, Meyers PM, Yavagal DR, Wintermark M, Guzy J, Starkman S, Saver JL; MR RESCUE Investigators. A trial of imaging selection and endovascular treatment for ischemic stroke. *N Engl J Med* 2013; 368: 914-923.
- Kieffmann R, Heckel K, Doerger M, Schenkat S, Kupatt C, Stoeckelhuber M, Wesierska-Gadek J, Goetz AE. Role of PARP on iNOS pathway during endotoxin-induced acute lung injury. *Intensive Care Med* 2004; 30: 1421-1431.
- Kilic E, Kilic U, Matter CM, Lüscher TF, Bassetti CL, Hermann DM. Aggravation of focal cerebral ischemia by tissue plasminogen activator is reversed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor but does not depend on endothelial NO synthase. *Stroke* 2005; 36: 332-336.
- Kim MY, Zhang T, Kraus WL. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev* 2005; 19: 1951-1967.
- Kim S, Kunapuli SP. P2Y12 receptor in platelet activation. *Platelets* 2011; 22: 56-60.
- Kisucka J, Chauhan AK, Zhao BQ, Patten IS, Yesilaltay A, Krieger M, Wagner DD. Elevated levels of soluble P-selectin in mice alter blood-brain barrier function, exacerbate stroke, and promote atherosclerosis. *Blood* 2009; 113: 6015-6022.

- Koh SH, Park Y, Song CW, Kim JG, Kim K, Kim J, Kim MH, Lee SR, Kim DW, Yu HJ, Chang DI, Hwang SJ, Kim SH. The effect of PARP inhibitor on ischaemic cell death, its related inflammation and survival signals. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 1461-1472.
- Koh SH, Chang DI, Kim HT, Kim J, Kim MH, Kim KS, Bae I, Kim H, Kim DW, Kim SH. Effect of 3-aminobenzamide, PARP inhibitor, on matrix metalloproteinase-9 level in plasma and brain of ischemic stroke model. *Toxicology* 2005; 214: 131-139.
- Kohler E, Prentice DA, Bates TR, Hankey GJ, Claxton A, van Heerden J, Blacker D. Intravenous Minocycline in Acute Stroke: A Randomized, Controlled Pilot Study and Meta-analysis. *Stroke* 2013; 44: 2493-2499.
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 1986; 8: 1-8.
- Komjáti K, Mabley JG, Virág L, Southan GJ, Salzman AL, Szabó C. 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* 2004; 13: 373-382.
- Kondziella D, Cortsen M, Eskesen V, Hansen K, Holtmannspötter M, Højgaard J, Stavngaard T, Søndergaard H, Wagner A, Welling KL. Update on acute endovascular and surgical stroke treatment. *Acta Neurol Scand* 2013; 127: 1-9.
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 333-343.
- Kozuka K, Kohriyama T, Nomura E, Ikeda J, Kajikawa H, Nakamura S. Endothelial markers and adhesion molecules in acute ischemic stroke--sequential change and differences in stroke subtype. *Atherosclerosis* 2002; 161: 161-168.
- Krishnakumar R, Kraus WL. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol Cell* 2010; 39: 8-24.
- Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, Fukunaga N. An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke* 1982; 13: 505-508.
- Kukielka GL, Hawkins HK, Michael L, Manning AM, Youker K, Lane C, Entman ML, Smith CW, Anderson DC. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium. *J Clin Invest* 1993; 92: 1504-1516.
- Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res* 1990; 60: 269-280.
- Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2010; 24: 495-509.
- Lampl Y, Boaz M, Gilad R, Lorberboym M, Dabby R, Rapoport A, Anca-Hershkowitz M, Sadeh M. Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study. *Neurology* 2007; 69: 1404-1410.
- Lancé MD, Sloep M, Henskens YM, Marcus MA. Mean platelet volume as a diagnostic marker for cardiovascular disease: drawbacks of preanalytical conditions and measuring techniques. *Clin Appl Thromb Hemost* 2012; 18: 561-568.

- Langelier MF, Pascal JM. PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. *Curr Opin Struct Biol* 2013; 23: 134-143.
- Lanza F, Gachet C, David T, Mangin P. Signalling through the platelet GPIb-V-IX complexe. *Hématologie* 2008; 14:273-284
- Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Pharmacological effects of the spin trap agents N-t-butyl-phenylnitron (PBN) and 2,2,6, 6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) in a rabbit thromboembolic stroke model: combination studies with the thrombolytic tissue plasminogen activator. *Stroke* 2001; 32: 147-153.
- Lapchak PA, Zivin JA. The lipophilic multifunctional antioxidant edaravone (radicut) improves behavior following embolic strokes in rabbits: a combination therapy study with tissue plasminogen activator. *Exp Neurol* 2009; 215: 95-100.
- Lapchak PA. A critical assessment of edaravone acute ischemic stroke efficacy trials: is edaravone an effective neuroprotective therapy? *Expert Opin Pharmacother* 2010; 11: 1753-1763.
- Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Böhm M, Dirnagl U, Endres M. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 2000; 31: 2442-2449.
- Lee JH, Park SY, Shin HK, Kim CD, Lee WS, Hong KW. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition by cilostazol is implicated in the neuroprotective effect against focal cerebral ischemic infarct in rat. *Brain Res* 2007; 1152: 182-190.
- Lee H, Hamilton JR. Physiology, pharmacology, and therapeutic potential of protease-activated receptors in vascular disease. *Pharmacol Ther* 2012; 134: 246-259.
- Leinhase I, Schmidt OI, Thurman JM, Hossini AM, Rozanski M, Taha ME, Scheffler A, John T, Smith WR, Holers VM, Stahel PF. Pharmacological complement inhibition at the C3 convertase level promotes neuronal survival, neuroprotective intracerebral gene expression, and neurological outcome after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2006; 199: 454-464.
- Lenain N, Freund M, Léon C, Cazenave JP, Gachet C. Inhibition of localized thrombosis in P2Y1-deficient mice and rodents treated with MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1144-1149.
- Li X, Klaus JA, Zhang J, Xu Z, Kibler KK, Andrabi SA, Rao K, Yang ZJ, Dawson TM, Dawson VL, Koehler RC. Contributions of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and -2 to nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and injury from focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 2010; 113: 1012-1022.
- Liu F, Lang J, Li J, Benashski SE, Siegel M, Xu Y, McCullough LD. Sex differences in the response to poly(ADP-ribose) polymerase-1 deletion and caspase inhibition after stroke. *Stroke* 2011; 42: 1090-1096.
- Love S, Barber R, Wilcock GK. Neuronal accumulation of poly(ADP-ribose) after brain ischaemia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999; 25: 98-103.
- Lukic-Panin V, Deguchi K, Yamashita T, Shang J, Zhang X, Tian F, Liu N, Kawai H, Matsuura T, Abe K. Free radical scavenger edaravone administration protects against tissue plasminogen activator induced oxidative stress and blood brain barrier damage. *Curr Neurovasc Res* 2010; 7: 319-329.

- Luo X, Kraus WL. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev* 2012; 26: 417-432.
- Machado LS, Sazonova IY, Kozak A, Wiley DC, El-Remessy AB, Ergul A, Hess DC, Waller JL, Fagan SC. Minocycline and tissue-type plasminogen activator for stroke: assessment of interaction potential. *Stroke* 2009; 40: 3028-3033.
- Macrae IM, Robinson MJ, Graham DI, Reid JL, McCulloch J. Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; 13: 276-284.
- Mangin P, Yuan Y, Goncalves I, Eckly A, Freund M, Cazenave JP, Gachet C, Jackson SP, Lanza F. Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway distinct from FcR gamma chain and Fc gamma RIIA. *J Biol Chem* 2003; 278: 32880-32891.
- Mao Y, Zhang L, Jin J, Ashby B, Kunapuli SP. Mutational analysis of residues important for ligand interaction with the human P2Y(12) receptor. *Eur J Pharmacol* 2010; 644: 10-16.
- Martínez-Sánchez P, Díez-Tejedor E, Fuentes B, Ortega-Casarrubios MA, Hacke W. Systemic reperfusion therapy in acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2007; 24: 143-152.
- Mathews MT, Berk BC. PARP-1 inhibition prevents oxidative and nitrosative stress-induced endothelial cell death via transactivation of the VEGF receptor 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 711-717.
- Matsuura S, Egi Y, Yuki S, Horikawa T, Satoh H, Akira T. MP-124, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitor, ameliorates ischemic brain damage in a non-human primate model. *Brain Res* 2011; 1410: 122-131.
- McBean DE, Kelly PA. Rodent models of global cerebral ischemia: a comparison of two-vessel occlusion and four-vessel occlusion. *Gen Pharmacol* 1998; 30: 431-434.
- Merten M, Thiagarajan P. P-selectin in arterial thrombosis. *Z Kardiol* 2004; 93: 855-863.
- Michelson AD, Furman MI. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol* 1999; 6: 342-348.
- Millerot-Serruot E, Chausset A, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Bertrand N, Garnier P, Beley A, Marie C. Effect of early decrease in the lesion size on late brain tissue loss, synaptophysin expression and functionality after a focal brain lesion in rats. *Neurochem Int* 2007; 50: 328-335.
- Mitsuhashi J, Morikawa S, Shimizu K, Ezaki T, Yasuda Y, Hori S. Intravitreal injection of erythropoietin protects against retinal vascular regression at the early stage of diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Eye Res* 2013; 106: 64-73.
- Mohan KM, Wolfe CD, Rudd AG, Heuschmann PU, Kolominsky-Rabas PL, Grieve AP. Risk and cumulative risk of stroke recurrence: a systematic review and meta-analysis. *Stroke* 2011; 42: 1489-1494.
- Molina CA, Barreto AD, Tsivgoulis G, Sierzenski P, Malkoff MD, Rubiera M, Gonzales N, Mikulik R, Pate G, Ostrem J, Singleton W, Manvelian G, Unger EC, Grotta JC, Schellinger PD, Alexandrov AV. Transcranial ultrasound in clinical sonothrombolysis (TUCSON) trial. *Ann Neurol* 2009; 66: 28-38.

- Morimoto N, Shimazawa M, Yamashima T, Nagai H, Hara H. Minocycline inhibits oxidative stress and decreases *in vitro* and *in vivo* ischemic neuronal damage. *Brain Res* 2005; 1044: 8-15.
- Moroni F. Poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP-1) and postischemic brain damage. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 96-103.
- Moroni F, Chiarugi A. Post-ischemic brain damage: targeting PARP-1 within the ischemic neurovascular units as a realistic avenue to stroke treatment. *FEBS J* 2009; 276: 36-45.
- Morrow DA, Brickman CM, Murphy SA, Baran K, Krakover R, Dauerman H, Kumar S, Slomowitz N, Grip L, McCabe CH, Salzman AL. A randomized, placebo-controlled trial to evaluate the tolerability, safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (INO-1001) in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: results of the TIMI 37 trial. *J Thromb Thrombolysis* 2009; 27: 359-364.
- Moulin T, Decavel P. [Circumstances of the diagnosis of carotid or vertebrobasilar arteriopathy]. *Rev Prat* 2004; 54: 1062-1072.
- Moustafa RR, Baron JC. Pathophysiology of ischaemic stroke: insights from imaging, and implications for therapy and drug discovery. *Br J Pharmacol* 2008; 153: S44-S54.
- Murata Y, Rosell A, Scannevin RH, Rhodes KJ, Wang X, Lo EH. Extension of the thrombolytic time window with minocycline in experimental stroke. *Stroke* 2008; 39: 3372-3377.
- Nieswandt B, Bergmeier W, Eckly A, Schulte V, Ohlmann P, Cazenave JP, Zirngibl H, Offermanns S, Gachet C. Evidence for cross-talk between glycoprotein VI and Gi-coupled receptors during collagen-induced platelet aggregation. *Blood* 2001; 97: 3829-3835.
- Nieswandt B, Schulte V, Zywiets A, Gratacap MP, Offermanns S. Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin alpha IIb beta 3 activation in platelets. *J Biol Chem* 2002; 277: 39493-39498.
- Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003; 102: 449-461.
- Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 92-104.
- Nunn B. Some characteristics of mouse platelet aggregation and a comparison of the activity of a range of compounds in mouse and human platelet-rich plasma *in vitro*. *Thromb Haemost* 1981; 45: 1-5.
- Nurden AT. Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1773-1782.
- O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp BH, Howells DW. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 2006; 59: 467-477.
- O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 1997; 20: 252-258.

- Ogawa N, Hirose Y, Ohara S, Ono T, Watanabe Y. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1985; 50: 435-441.
- Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM, Thomas WS, del Zoppo GJ. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke* 1994; 25: 202-211.
- Oliver FJ, Ménissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J* 1999; 18: 4446-4454.
- Orset C, Macrez R, Young AR, Panthou D, Angles-Cano E, Maubert E, Agin V, Vivien D. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 2007; 38: 2771-2778.
- Paciaroni M, Caso V, Agnelli G. The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities. *Eur Neurol* 2009; 61: 321-330.
- Pausch MH, Lai M, Tseng E, Paulsen J, Bates B, Kwak S. Functional expression of human and mouse P2Y12 receptors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 171-177.
- Peralta-Leal A, Rodríguez-Vargas JM, Aguilar-Quesada R, Rodríguez MI, Linares JL, de Almodóvar MR, Oliver FJ. PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 13-26.
- Picker SM. *In-vitro* assesement of platelet function. *Transf Apheres Sci* 2011; 44: 305-319.
- Pinard E, Engrand N. [Physiopathology of cerebral ischemia]. *Ann Fr Anesth Reanim* 1999; 18: 574-582.
- Pinoit JM, Bejot Y, Rouaud O, Benatru I, Osseby GV, Bonin B, Gisselmann A, Giroud M. [Post-stroke depression, another handicap]. *Presse Med* 2006; 35: 1789-1793.
- Polgar J, Matuskova J, Wagner DD. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1590-1596.
- Porter TR, Xie F. Can transcranial ultrasound and microbubble therapy ever enter the mainstream in acute stroke therapy? *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2012; 10: 549-551.
- Pozgajová M, Sachs UJ, Hein L, Nieswandt B. Reduced thrombus stability in mice lacking the alpha2A-adrenergic receptor. *Blood* 2006; 108: 510-514.
- Pradeep H, Diya JB, Shashikumar S, Rajanikant GK. Oxidative stress - assassin behind the ischemic stroke. *Folia Neuropathol* 2012; 50: 219-230.
- Rahman A, Fazal F. Hug tightly and say goodbye: role of endothelial ICAM-1 in leukocyte transmigration. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 823-839.
- Rami A, Bechmann I, Stehle JH. Exploiting endogenous anti-apoptotic proteins for novel therapeutic strategies in cerebral ischemia. *Prog Neurobiol* 2008; 85: 273-296.
- Rha JH, Saver JL. The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke* 2007; 38: 967-973.
- Rivera S, Jourquin J, Ogier C, Bernard A, Charton G, Tremblay E, Khrestchatisky M. [The MMP/TIMP system in the nervous system]. *Med Sci (Paris)* 2004; 20: 55-60.

- Rodríguez-González R, Agulla J, Pérez-Mato M, Sobrino T, Castillo J. Neuroprotective effect of neuroserpin in rat primary cortical cultures after oxygen and glucose deprivation and tPA. *Neurochem Int* 2011; 58: 337-343.
- Romanos E, Planas AM, Amaro S, Chamorro A. Uric acid reduces brain damage and improves the benefits of rt-PA in a rat model of thromboembolic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 14-20.
- Rosenblum WI, Nelson GH, Cockrell CS, Ellis EF. Some properties of mouse platelets. *Thromb Res* 1983; 30: 347-355.
- Sairanen T, Szepesi R, Karjalainen-Lindsberg ML, Saksi J, Paetau A, Lindsberg PJ. Neuronal caspase-3 and PARP-1 correlate differentially with apoptosis and necrosis in ischemic human stroke. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 541-552.
- Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 2001; 413: 74-78.
- Schmitt A, Guichard J, Massé JM, Debili N, Cramer EM. Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. *Exp Hematol* 2001; 29: 1295-1302.
- Schraufstatter IU, Hyslop PA, Hinshaw DB, Spragg RG, Sklar LA, Cochrane CG. Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 4908-4912.
- Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 517-528.
- Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 2004; 104: 1606-1615.
- Shenkman B, Einav Y, Salomon O, Varon D, Savion N. Testing agonist-induced platelet aggregation by the Impact-R [Cone and plate(let) analyzer (CPA)]. *Platelets* 2008; 19: 440-446.
- Shigeno T, Teasdale GM, McCulloch J, Graham DI. Recirculation model following MCA occlusion in rats. Cerebral blood flow, cerebrovascular permeability, and brain edema. *J Neurosurg* 1985; 63: 272-277.
- Shimazawa M, Hara H. Novel situations of endothelial injury in stroke--mechanisms of stroke and strategy of drug development: protective effects of antiplatelet agents against stroke. *J Pharmacol Sci* 2011; 116: 30-35.
- Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Ashwood T, Wasiewski WW, Emeribe U; SAINT II Trial Investigators. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2007; 357: 562-571.
- Smith WS, Sung G, Starkman S, Saver JL, Kidwell CS, Gobin YP, Lutsep HL, Nesbit GM, Grobelny T, Rymer MM, Silverman IE, Higashida RT, Budzik RF, Marks MP; MERCI Trial Investigators. Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: results of the MERCI trial. *Stroke* 2005; 36: 1432-1438.
- Smith WS. Safety of mechanical thrombectomy and intravenous tissue plasminogen activator in acute ischemic stroke. Results of the multi Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischemia (MERCI) trial, part I. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27: 1177-1182.

- Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, French PA, Dauerman HL, Becker RC; 2009 Platelet Colloquium Participants. Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1759-1766.
- Sodhi RK, Singh N, Jaggi AS. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications. *Vascul Pharmacol* 2010; 53: 77-87.
- Soriano FG, Liaudet L, Szabó E, Virág L, Mabley JG, Pacher P, Szabó C. Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock* 2002; 17: 286-292.
- Srivastava P. Optimization of antiplatelet/antithrombotic therapy for secondary stroke prevention. *Ann Indian Acad Neurol* 2010; 13: 6-13.
- Steiner T, Hacke W. Combination therapy with neuroprotectants and thrombolytics in acute ischaemic stroke. *Eur Neurol* 1998; 40: 1-8.
- Stevens A., Lowe J. [Histologie humaine]. Deuxième édition traduite par Validire P. Bruxelles ; Paris : De Boeck université, 1997, pp 408.
- Stoll G, Kleinschnitz C, Nieswandt B. Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. *Blood* 2008; 112: 3555-3562.
- STAIR (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 1999; 30: 2752-2758.
- Strosznajder R, Gadamski R, Walski M. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity protects hippocampal cells against morphological and ultrastructural alteration evoked by ischemia-reperfusion injury. *Folia Neuropathol* 2005; 43: 156-165.
- Strosznajder RP, Czubowicz K, Jesko H, Strosznajder JB. Poly(ADP-ribose) metabolism in brain and its role in ischemia pathology. *Mol Neurobiol* 2010; 41: 187-196.
- Sudo T, Ito H, Kimura Y. Characterization of platelet aggregation in whole blood of laboratory animals by a screen filtration pressure method. *Platelets* 2003; 14: 239-246.
- Supanc V, Biloglav Z, Kes VB, Demarin V. Role of cell adhesion molecules in acute ischemic stroke. *Ann Saudi Med* 2011; 31: 365-370.
- Sutherland BA, Minnerup J, Balami JS, Arba F, Buchan AM, Kleinschnitz C. Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside. *Int J Stroke* 2012; 7: 407-418.
- Suzuki H, Abe K, Tojo S, Kimura K, Mizugaki M, Itoyama Y. A change of P-selectin immunoreactivity in rat brain after transient and permanent middle cerebral artery occlusion. *Neurol Res* 1998; 20: 463-469.
- Szepes M, Janicsek Z, Benkő Z, Cselenyák A, Kiss L. Pretreatment of therapeutic cells with poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor enhances their efficacy in an in vitro model of cell-based therapy in myocardial infarct. *Int J Mol Med* 2013; 31: 26-32.
- Tabuchi A, Kuebler WM. Endothelium-platelet interactions in inflammatory lung disease. *Vascul Pharmacol* 2008; 49: 141-150.
- Takahashi K, Greenberg JH. The effect of reperfusion on neuroprotection using an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase. *Neuroreport* 1999; 10: 2017-2022.

- Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1981; 1: 53-60.
- Teng CM, Wu CC, Ko FN, Lee FY, Kuo SC. YC-1, a nitric oxide-independent activator of soluble guanylate cyclase, inhibits platelet-rich thrombosis in mice. *Eur J Pharmacol* 1997; 320: 161-166.
- Teng F. Implication de la poly(ADP-ribose)polymérase dans les effets délétères de l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant sur la barrière hémato-encéphalique après une ischémie cérébrale. Thèse d'Université Paris Descartes, 2013: pp 221.
- Teng F, Beray-Berthet V, Coqueran B, Lesbats C, Kuntz M, Palmier B, Garraud M, Bedfert C, Slane N, Bérézowski V, Szeremeta F, Hachani J, Scherman D, Plotkine M, Doan BT, Marchand-Leroux C, Margail I. Prevention of rt-PA induced blood-brain barrier component degradation by the poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor PJ34 after ischemic stroke in mice. *Exp Neurol* 2013; 248: 416-428.
- Théorêt JF, Yacoub D, Hachem A, Gillis MA, Merhi Y. P-selectin ligation induces platelet activation and enhances microaggregate and thrombus formation. *Thromb Res* 2011; 128: 243-250.
- Thon JN, Italiano JE. Platelet formation. *Semin Hematol* 2010; 47: 220-226.
- Tilton RG, Berens KL. Functional Role for Selectins in the Pathogenesis of Cerebral Ischemia. *Drug News Perspect* 2002; 15: 351-357.
- Tóth O, Szabó C, Kecskés M, Pótó L, Nagy A, Losonczy H. In vitro effect of the potent poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor INO-1001 alone and in combination with aspirin, eptifibatide, tirofiban, enoxaparin or alteplase on haemostatic parameters. *Life Sci* 2006; 79: 317-323.
- Tsakiris DA, Scudder L, Hodivala-Dilke K, Hynes RO, Collier BS. Hemostasis in the mouse (*Mus musculus*): a review. *Thromb Haemost* 1999; 81: 177-188.
- Tsutsumi T, Nakashima K, Isoda T, Yokota M, Nishihara T. Involvement of adhesion molecule in in vitro plaque-like formation of macrophages stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. *J Periodontol Res* 2010; 45: 550-556.
- Van Giezen JJ, Nilsson L, Berntsson P, Wissing BM, Giordanetto F, Tomlinson W, Greasley PJ. Ticagrelor binds to human P2Y₁₂ independently from ADP but antagonizes ADP-induced receptor signaling and platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1556-1565.
- Vandendries ER, Hamilton JR, Coughlin SR, Furie B, Furie BC. Par4 is required for platelet thrombus propagation but not fibrin generation in a mouse model of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 288-292.
- Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1057-1066.
- Verro P, Gorelick PB, Nguyen D. Aspirin plus dipyridamole versus aspirin for prevention of vascular events after stroke or TIA: a meta-analysis. *Stroke* 2008; 39: 1358-1363.
- Virág L, Robaszkiewicz A, Vargas JM, Javier Oliver F. Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. *Mol Aspects Med* 2013. [In Press]
- von Kügelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 2006; 110: 415-432.

- von Kummer R, Albers GW, Mori E; DIAS Steering Committees. The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke (DIAS) clinical trial program. *Int J Stroke* 2012; 7: 589-596.
- von Lukowicz T, Hassa PO, Lohmann C, Borén J, Braunersreuther V, Mach F, Odermatt B, Gersbach M, Camici GG, Stähli BE, Tanner FC, Hottiger MO, Lüscher TF, Matter CM. PARP1 is required for adhesion molecule expression in atherogenesis. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 158-166.
- Wahl F, Allix M, Plotkine M, Boulu RG. Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1992; 23: 267-272.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 2007; 184: 53-68.
- Wang CX, Ding X, Noor R, Pegg C, He C, Shuaib A. Rosiglitazone alone or in combination with tissue plasminogen activator improves ischemic brain injury in an embolic model in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009a; 29: 1683-1694.
- Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol* 2009b; 218: 193-202.
- Wang Y, Andrews M, Yang Y, Lang S, Jin JW, Cameron-Vendrig A, Zhu G, Reheman A, Ni H. Platelets in thrombosis and hemostasis: old topic with new mechanisms. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2012; 12: 126-132.
- Wang Q, Zhao W, Bai S. Association between plasma soluble P-selectin elements and progressive ischemic stroke. *Exp Ther Med* 2013; 5: 1427-1433.
- Warlow C, Sudlow C, Dennis M, Wardlaw J, Sandercock P. Stroke. *Lancet* 2003; 362: 1211-1224.
- Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 1985; 17: 497-504.
- Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1788: 842-857.
- White H, Boden-Albala B, Wang C, Elkind MS, Rundek T, Wright CB, Sacco RL. Ischemic stroke subtype incidence among whites, blacks, and Hispanics: the Northern Manhattan Study. *Circulation* 2005; 111: 1327-1331.
- Wiviott SD, Antman EM, Winters KJ, Weerakkody G, Murphy SA, Behounek BD, Carney RJ, Lazzam C, McKay RG, McCabe CH, Braunwald E; JUMBO-TIMI 26 Investigators. Randomized comparison of prasugrel (CS-747, LY640315), a novel thienopyridine P2Y₁₂ antagonist, with clopidogrel in percutaneous coronary intervention: results of the Joint Utilization of Medications to Block Platelets Optimally (JUMBO)-TIMI 26 trial. *Circulation* 2005; 111: 3366-3373.
- Wiviott SD, Antman EM, Gibson CM, Montalescot G, Riesmeyer J, Weerakkody G, Winters KJ, Warmke JW, McCabe CH, Braunwald E; TRITON-TIMI 38 Investigators. Evaluation of prasugrel compared with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes: design and rationale for the TRIal to assess Improvement in Therapeutic Outcomes by optimizing platelet Inhibition with prasugrel Thrombolysis In Myocardial Infarction 38 (TRITON-TIMI 38). *Am Heart J* 2006; 152: 627-635.
- Wolberg AS, Aleman MM, Leiderman K, Machlus KR. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth Analg* 2012; 114: 275-285.

- Wong CH, Crack PJ. Modulation of neuro-inflammation and vascular response by oxidative stress following cerebral ischemia-reperfusion injury. *Curr Med Chem* 2008; 15: 1-14.
- World Health Organization. Cerebrovascular disorders: a clinical and research classification. WHO Offset Publication No. 43, Geneva 1978: pp 82. Disponible sur : http://whqlibdoc.who.int/offset/WHO_OFFSET_43.pdf (Dernière consultation le 29/09/2013).
- Xu L, Fagan SC, Waller JL, Edwards D, Borlongan CV, Zheng J, Hill WD, Feuerstein G, Hess DC. Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. *BMC Neurol* 2004; 4: 7.
- Yagi K, Kitazato KT, Uno M, Tada Y, Kinouchi T, Shimada K, Nagahiro S. Edaravone, a free radical scavenger, inhibits MMP-9-related brain hemorrhage in rats treated with tissue plasminogen activator. *Stroke* 2009; 40: 626-631.
- Yamashita T, Kamiya T, Deguchi K, Inaba T, Zhang H, Shang J, Miyazaki K, Ohtsuka A, Katayama Y, Abe K. Dissociation and protection of the neurovascular unit after thrombolysis and reperfusion in ischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 715-725.
- Yilmaz G, Granger DN. Cell adhesion molecules and ischemic stroke. *Neurol Res* 2008; 30: 783-793.
- Ying W, Wei G, Wang D, Wang Q, Tang X, Shi J, Zhang P, Lu H. Intranasal administration with NAD⁺ profoundly decreases brain injury in a rat model of transient focal ischemia. *Front Biosci* 2007; 12: 2728-2734.
- Ying W, Xiong ZG. Oxidative stress and NAD⁺ in ischemic brain injury: current advances and future perspectives. *Curr Med Chem* 2010; 17: 2152-2158.
- Yip HK, Liou CW, Chang HW, Lan MY, Liu JS, Chen MC. Link between platelet activity and outcomes after an ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20: 120-128.
- Yip S, Benavente O. Antiplatelet agents for stroke prevention. *Neurotherapeutics* 2011; 8: 475-487.
- Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 15769-15774.
- Yrjänheikki J, Tikka T, Keinänen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 13496-13500.
- Yuan W, Leisner TM, McFadden AW, Wang Z, Larson MK, Clark S, Boudignon-Proudmon C, Lam SC, Parise LV. CIB1 is an endogenous inhibitor of agonist-induced integrin α IIb β 3 activation. *J Cell Biol* 2006; 172: 169-175.
- Zhang RL, Chopp M, Zhang ZG, Jiang Q, Ewing JR. A rat model of focal embolic cerebral ischemia. *Brain Res* 1997; 766: 83-92.
- Zhang R, Chopp M, Zhang Z, Jiang N, Powers C. The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 1998; 785: 207-214.
- Zhang L, Zhang ZG, Liu X, Hozeska A, Stagliano N, Riordan W, Lu M, Chopp M. Treatment of embolic stroke in rats with bortezomib and recombinant human tissue plasminogen activator. *Thromb Haemost* 2006; 95: 166-173.

- Zhang L, Chopp M, Jia L, Cui Y, Lu M, Zhang ZG. Atorvastatin extends the therapeutic window for tPA to 6 h after the onset of embolic stroke in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 1816-1824.
- Zhang L, Zhang ZG, Buller B, Jiang J, Jiang Y, Zhao D, Liu X, Morris D, Chopp M. Combination treatment with VELCADE and low-dose tissue plasminogen activator provides potent neuroprotection in aged rats after embolic focal ischemia. *Stroke* 2010; 41: 1001-1007.
- Zhang T, Kraus WL. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD⁽⁺⁾ metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804: 1666-1675.
- Zhang T, Berrocal JG, Yao J, DuMond ME, Krishnakumar R, Ruhl DD, Ryu KW, Gamble MJ, Kraus WL. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent gene expression through promoter-directed recruitment of a nuclear NAD⁺ synthase. *J Biol Chem* 2012; 287: 12405-12416.
- Zhou W, Liesz A, Bauer H, Sommer C, Lahrmann B, Valous N, Grabe N, Veltkamp R. Postischemic brain infiltration of leukocyte subpopulations differs among murine permanent and transient focal cerebral ischemia models. *Brain Pathol* 2013; 23: 34-44.

PJ34: a potent poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor with antiplatelet effect through P2Y₁₂ antagonism ?

M LECHAFTOIS¹, C BACHELOT-LOZA², I MARGAILL¹, C MARCHAND-LEROUX¹,
D LEROUET¹

¹EA4475 – “ Pharmacologie de la Circulation Cérébrale ”, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

²Inserm UMR S 765 - Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Correspondence :

Dominique LEROUET

EA4475 - “Pharmacologie de la Circulation Cérébrale”, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

E-mail: dominique.lerouet@parisdescartes.fr

Summary

Background and purpose

After ischaemic stroke, clinicians are faced with incomplete tissue reperfusion and reocclusion, in which platelet activation/aggregation plays a key role. Data suggest that certain poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) inhibitors of a particular chemical structure could be antiaggregant. Beneficial role of PARP inhibition has been largely demonstrated in experimental models of cerebral ischaemia, particularly using the potent PARP inhibitor PJ34. In this in vitro study, we investigated in human blood the potential antiplatelet effect of PJ34 and three other PARP inhibitors

(3-aminobenzamide, INO-1001, minocycline).

Experimental approach

The effect of PARP inhibitors on platelet aggregation induced by ADP, collagen or PAR1ap was evaluated on platelet-rich plasma by optical aggregometry. We chose ADP concentrations inducing a biphasic aggregation curve resulting from the successive activation of ADP receptors, P2Y₁ and P2Y₁₂. P2Y₁₂ inhibition was assessed on whole blood using a flow cytometry method evaluating vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation.

Key results

PJ34 inhibited the second phase of ADP-induced platelet aggregation, an effect reduced by incremental ADP concentrations. PJ34 increased VASP phosphorylation in a concentration-dependent manner. Minocycline reduced all agonist-induced platelet aggregation whereas 3-aminobenzamide and INO-1001 had no effect.

Conclusions and implications

We showed that two PARP inhibitors exert antiplatelet effect. While minocycline seems to act through a more general mechanism that remains to investigate, this is the first study to report that PJ34, a potent PARP inhibitor, could act via a competitive P2Y₁₂ antagonism. The antiaggregant effect of PJ34 strengthens the interest of this molecule in stroke treatment.

Abbreviations

3-AB, 3-aminobenzamide; PAR, proteinase-activated receptor; PAR1ap, activating peptide of PAR1; PARP, poly(ADP-ribose)polymerase; PJ34, N-(6-oxo-5,6-dihydro-phenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide; PRI, platelet reactivity index; PRP, platelet-rich plasma; rt-PA, recombinant tissue plasminogen activator; VASP, vasodilator stimulated phosphoprotein

Keywords

Platelet aggregation, poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor, PJ34, P2Y₁₂ receptor

Introduction

Platelet adhesion, activation and aggregation is a crucial mechanism in arterial thrombosis, and therefore, in the pathophysiology of ischemic stroke (Del Zoppo, 1998; Yip et al., 2005; Stoll et al., 2008; Franks et al., 2010), a leading cause of death worldwide. Today, the only approved treatment for stroke is thrombolysis with the recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) that improves outcomes in acute ischemic stroke patients by restoring cerebral blood flow. Nevertheless, its use remains limited to less than 5% patients due to its narrow therapeutic window of 4.5 hours (Hacke et al., 2008) and the related risk of haemorrhagic transformation (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Moreover, rt-PA induces recanalization in only half of treated patients (Rha and Saver, 2007) and early arterial reocclusion also occurs after successful thrombolysis in about 20 to 30% of recanalized patients (Alexandrov and Grotta, 2002; Rubiera et al., 2005; Saqqur et al., 2007; Balami et al., 2013). Another major health concern in survival patients is the high risk of recurrent strokes within the following few weeks after the first event (Mohan et al., 2011). In addition to lifestyle changes and to the control of risk factors (hypertension, diabetes, dyslipidemia...), current guidelines recommend antiplatelet agents (aspirin, clopidogrel and dipyridamole) as the fundamental strategy of secondary stroke prevention in patients with noncardioembolic disease (Kischner, 2012). However the modest benefit of these agents and the potential risk of bleedings point out the need for novel strategies (Fabre and Gurney, 2010; Di Minno et al., 2011; Weber et al., 2012).

Almost 10 years ago, an in vitro study demonstrated that three poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) inhibitors (4-hydroxyquinazoline ; 2-mercapto-4(3H)-quinazolinone ; HO-3089) were able to reduce ADP-

induced aggregation (Alexy et al., 2004). The authors attributed this effect to a potential competition between these inhibitors and ADP to bind to the receptors of this latter. This competition may be due to a molecular structure resembling that of the adenine moiety of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) molecule and common to ADP. Such an inhibition of ADP-induced aggregation was not observed by Toth and collaborators (2006) with INO-1001, another potent PARP inhibitor with a different structure. Consequently, these data suggest that certain PARP inhibitors might exert antiplatelet effect and then be useful to improve thrombolysis in ischemic stroke patients and also in secondary stroke prevention.

PARP is an ubiquitous nuclear enzyme physiologically involved in DNA repair, by catalysing the synthesis of poly(ADP-ribose) from NAD. As platelets are small anucleate cells, they theoretically cannot contain this enzyme. Accordingly, to our knowledge, there is no data reporting PARP presence in platelets. Consequently, the potential antiaggregant effect of PARP inhibitors would be PARP-independent as suggested in Alexy's study (2004). In pathophysiological conditions, such as stroke, the overactivation of PARP exerts deleterious effects, as demonstrated in several experimental models of cerebral ischaemia (see for review Komjáti et al., 2005; Curtin and Szabo, 2013). In rodent models of cerebral ischaemia, we and others have shown that PJ34 (N-(6-oxo-5,6-dihydro-phenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide), a potent PARP inhibitor (IC₅₀ = 17 nM), reduces infarct volume, blood brain barrier permeability, brain oedema, spontaneous and rt-PA-induced haemorrhagic transformations, inflammatory response, motor deficit, and enhances long-term neuronal survival and neurogenesis (Abdelkarim et al., 2001; Park et al., 2004; Haddad et al., 2006, 2008 and 2013; Lenzsér et al., 2007; Kauppinen et al., 2009; Teng et al., 2013).

In that context, the aim of this *in vitro* study was to evaluate on human blood whether, in addition to its already demonstrated protective effects in ischaemic stroke, PJ34 exerts antiplatelet effect and the potential mechanism involved. The effect of three other PARP inhibitors, that have demonstrated beneficial effects in experimental models of cerebral ischaemia (Couturier et al., 2003; Koh et al., 2004; Komjáti et al., 2004; Xu et al., 2004; Hayakawa et al., 2008), but with different chemical structures, was also studied (Figure 1): a benzamide (3-aminobenzamide or 3-AB; IC₅₀ = 33 µM), an isoindolinone derivative (INO-1001; IC₅₀ < 15 nM) and a tetracycline analogue (minocycline; IC₅₀ ~ nM; Alano et al., 2006). To our knowledge, this is the first report that PJ34 inhibits ADP-induced platelet aggregation in human platelet-rich plasma (PRP) and that this effect could result from P2Y₁₂ antagonism.

Figure 1

Methods

Chemicals and reagents

ADP was obtained from Roche (Boulogne-Billancourt, France) and PAR1ap (activating peptide of protease-activated receptor 1), use as a thrombin receptor activator, from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Collagen was purchased from Nycomed (kit SKF Solution, Nycomed, Austria Takeda Pharmaceuticals International, Zurich, Switzerland). Minocycline and 3-aminobenzamide were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and INO-1001 from Selleck Chemicals (Euromedex, Souffelweyersheim, France). All reagents were dissolved and diluted in distilled water.

Human platelet aggregation studies

Venous blood from informed healthy donors was obtained from the French blood bank institute (EFS), according to the agreement between Paris Descartes

University and EFS (C CPSL UNT No. 12/EFS/064).

Whole blood samples were collected into Vacutainer® tubes containing 3.8% trisodium citrate (BD Vacutainer®, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) and platelet-rich plasma (PRP) was separated by centrifugation at 133 g for 20 minutes at 25°C (OrtoAlresa Digitor 21 R, Madrid, Spain) to obtain (PRP). After carefully removing PRP, the pellet was centrifuged at 2630 g for 20 minutes at 25°C to obtain platelet-poor plasma (PPP). The final platelet count in PRP samples was adjusted to 2.5×10^8 platelets ml⁻¹ with autologous PPP.

Platelet aggregation was quantified in PRP by optical aggregometry using a PAP- 8E Aggregometer (Bio/Data Corporation, Horsham, PA, USA) with a constant stirring rate of 1000 rpm at 37 °C.

Ten microliters of PARP inhibitors (PJ34, 3-AB, minocycline or INO-1001) or vehicle (reference) were added to 230 µl of PRP in glass cuvettes. Samples were pre-incubated at 37°C for 10 minutes. After baseline adjustment, 10 µl of platelet agonist (ADP, collagen or PAR1ap) were added and aggregation was recorded for 8 minutes. A glass cuvette containing 20 µl of vehicle (distilled water) and 230 µl of PPP served as a control of "100% light transmission".

Agonist concentrations were adjusted for each donor to induce a maximum aggregation of about 70%: collagen (1 - 1.5 or 2 µg ml⁻¹) and PAR1ap (1 - 1.5 or 2 µM). Moreover, ADP concentration has to be determined to produce a biphasic aggregation curve (1.5 - 2 - 2.5 - 4 or 5 µM). PJ34 was used at 1, 10, 25, 50 or 100 µM and the other PARP inhibitors (3-AB, minocycline and INO-1001) at 50 µM.

References were normalized to 100% and the maximal aggregation (%) measured in the presence of PARP inhibitor was compared to that of the corresponding reference, except for ADP-induced aggregation where

maximal aggregation was distinguished for each phase.

To evaluate the antiaggregant effect of PJ34 on platelets stimulated with increasing ADP concentrations (1.5 to 10 μ M), PRP was pre-incubated with fixed concentrations of PJ34 (50, 100 or 500 μ M). In this experiment, since the ADP concentration used did not always induce a biphasic aggregation curve, the maximum aggregation (%) in the presence of PJ34 was compared to the corresponding reference. The concentrations of PARP inhibitors or platelet agonist mentioned above correspond to the final concentration in 250 μ l.

VASP phosphorylation

VASP (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein) phosphorylation was measured using a modified commercial kit (PLT VASP/ P2Y₁₂ assay, Biocytex, Marseille, France) on a FACS Calibur flow cytometer. VASP is an intracellular platelet protein which phosphorylation is regulated by cAMP and activation of a protein kinase pathway. PGE1 activates this pathway resulting in VASP phosphorylation (P-VASP), whereas ADP inhibits this cascade through P2Y₁₂ receptors and thus reduces P-VASP.

Briefly, citrated whole blood was pre-incubated for 10 minutes with PJ34 (final concentrations: 100, 250, 500 or 1000 μ M) or its vehicle. The results were expressed as the platelet reactivity index (PRI).

PRI is calculated using corrected mean fluorescence intensities (MFI) in the presence of PGE1 alone (MFI_{PGE1}), PGE1, ADP and PJ34 or its vehicle (MFI_(PGE1+ADP±PJ34)), as follows:

$$PRI = [(MFI_{PGE1} - MFI_{(PGE1+ADP\pm PJ34)}) / MFI_{PGE1}] \times 100$$

One has to know that a low PRI is associated with a high VASP phosphorylation state.

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SD. Samples were compared with the reference value using a one-way

ANOVA followed by Dunnett's test. Statistical significance was assigned at $P < 0.05$. Tests were performed with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA).

Results

Effect of PJ34 on ADP-induced platelet aggregation

The antiplatelet effect of PJ34 was first tested on ADP-induced PRP aggregation. ADP concentration has to be determined for each donor in order to induce, in our experimental conditions, a biphasic aggregation curve resulting from the activation of ADP receptors, P2Y₁ and P2Y₁₂, successively (Figure 2A).

In the absence of PJ34, basal aggregation was about $40 \pm 10.6\%$ for the first phase and $24 \pm 11.9\%$ for the second one.

PJ34 had no effect on the first phase of ADP-induced platelet aggregation, but inhibited the second one by 60% at 10 μ M ($P < 0.01$), by 80% at 25 μ M and 50 μ M ($P < 0.001$), and totally at 100 μ M ($P < 0.001$; Figure 2B).

Figure 2

Considering the dose-dependent effect of PJ34 on the second phase of ADP-induced aggregation, we then evaluated the potential competition between ADP and PJ34 using incremental concentrations of ADP. Figure 3 shows that the more ADP concentrations increased (up to 10 μ M) the less PJ34 had an inhibitory effect. For instance, 100 μ M of PJ34 reduced by 60% the platelet aggregation induced by 1.5 μ M of ADP ($P < 0.05$), by 40% the 2.5 μ M ADP-induced aggregation ($P < 0.05$), by 25% the aggregation induced by 5 μ M and by 15% the 10 μ M ADP-induced aggregation.

Figure 3

Effect of PJ34 on VASP phosphorylation

Because the second aggregation phase induced by ADP is mainly dependent on the engagement of P2Y₁₂ receptor, leading to the inhibition of VASP phosphorylation, we used flow cytometry quantification of P-VASP to investigate the interaction of PJ34 with P2Y₁₂ signalling. This method is one of the most valuable to evaluate the efficacy of P2Y₁₂ antagonists, such as clopidogrel (Aleil et al., 2005). In the condition test, a high VASP phosphorylation state is associated with a low PRI. The PRI of ADP reference was 70 ± 4.6%. PJ34 reduced the PRI in a concentration-dependent manner by 30% at 250 µM (P<0.01), 60% at 500 µM (P<0.001) and totally at 1000 µM (P<0.001; Figure 4).

Figure 4

Effect of PJ34 on collagen- and PAR1ap-induced platelet aggregation

In order to determine the specificity of PJ34 towards ADP-induced aggregation, we next investigated the inhibitory effect of PJ34 on two other platelet agonists (collagen and PAR1ap). Since it is well known that secreted ADP constitutes a second feedback amplification signal in the setting of platelet aggregation, we used agonist concentrations inducing a strong activation less dependent or independent on secreted ADP. Whatever the PJ34 concentration, no inhibitory effect was observed on either collagen- or PAR1ap-induced platelet aggregation (Figure 5).

Figure 5

Effect of other PARP inhibitors with various chemical structures on ADP-, collagen- and PAR1ap-induced platelet aggregation

To precise whether the inhibitory effect on ADP-induced platelet aggregation was specific to PJ34, we evaluated the effect of 3 structural different PARP inhibitors, 3-AB, minocycline and INO-1001, at 50 µM.

While no inhibitory effect of 3-AB and INO-1001 could be observed, minocycline reduced both phases

of ADP-induced platelet aggregation by 50% (P<0.001) and 65% (P<0.01), respectively, and also collagen- and PAR1ap-induced platelet aggregation by 60% (P<0.001; Figure 6).

Figure 6

Discussion and conclusions

Beside their principal function at maintaining homeostasis, platelets are also involved in the formation of pathogenic thrombi. Platelet activation is triggered by a variety of agonists, such as sub-endothelial collagen, thromboxane A2 and ADP released from activated platelets or thrombin generated by the coagulation cascade (Broos et al., 2011). These agonists act on different platelet receptors, but they all trigger signalling pathways leading to intracellular calcium concentration increase (Varga-Szabo et al., 2009). ADP, which is a weak agonist compared to collagen or thrombin, is however considered as the main amplifier of initial aggregation. In this study, we showed that PJ34 inhibits ADP-induced platelet aggregation. This antiplatelet effect seems specific to ADP receptors since PJ34 does not inhibit collagen or PAR1ap-induced platelet aggregation. Our results are in accordance with those of Alexy and collaborators (2004) who investigated the effects of three other PARP inhibitors (4-hydroxyquinazoline ; 2-mercapto-4(3H)-quinazolinone ; HO-3089) and found that they reduced ADP-, but not epinephrine- or collagen-induced platelet aggregation, presumably due to a competition between these PARP inhibitors and ADP for binding to its receptors.

To go further in this hypothetical mechanism, we examined which ADP receptor(s), i.e. P2Y₁ and P2Y₁₂, may be implicated. Indeed, the mechanism of ADP-induced platelet aggregation is complex, since the co-activation of both G-protein-coupled receptors P2Y₁ and P2Y₁₂ is necessary to produce a complete aggregation response (Dorsam and Kunapuli, 2004;

Gachet, 2008). The Gq coupled-P2Y₁ receptor is essential in the initiation of ADP induced-platelet activation; it mediates calcium mobilization from internal stores, which results in platelet shape change, and weak and transient aggregation. The Gi coupled-P2Y₁₂ receptor activation, via lowering cAMP levels induces the amplification of platelet aggregation and secretion; this receptor plays a pivotal role in sustaining platelet aggregation. For that purpose, ADP concentrations were chosen to produce a biphasic aggregation curve. In these conditions, PJ34 (10 to 100 μ M) only inhibited the second phase of ADP-induced platelet aggregation without modifying the first one, suggesting that its antiaggregant effect is specifically linked to the P2Y₁₂ receptor.

Moreover, we observed that incremental ADP concentrations (1.5 to 10 μ M) reduced the inhibitory effect of PJ34 (50, 100 and 500 μ M), and that the antiaggregant effect of 100 μ M PJ34 even disappears when applying ADP at 10 μ M, suggesting a competitive effect of PJ34 with ADP for P2Y₁₂. In order to test this hypothesis, we assessed by flow cytometry the phosphorylation state of the intracellular platelet protein VASP. This assay is commonly used in clinical practice to evaluate the efficiency of P2Y₁₂ antagonism in patients treated with clopidogrel (Aleil et al., 2005). Therefore, any specific P2Y₁₂ antagonist impedes VASP dephosphorylation, and consequently, promotes the phosphorylated form. This assay had to be performed with higher concentrations of PJ34 (100 to 1000 μ M) than in aggregation studies. On one hand, these experimental conditions were partly attributed to the fact that we had to use whole blood for the PLT VASP/P2Y₁₂ kit that does not work on PRP. It is important to note that, in both blood and plasma, ADP can be broken down to adenosine, an inhibitor of platelet aggregation. However, adenosine is readily removed from blood through uptake into red blood cells, which makes it unavailable to inhibit platelet aggregation. Therefore, adenosine can exert more

efficiently its inhibitor effect on platelet aggregation in PRP where red blood cells are absent (Iyú et al., 2011). This could explain that lower PJ34 concentrations are necessary to inhibit ADP-induced platelet aggregation in PRP. On the other hand, as the concentration of ADP provided in the kit is not specified, one can imagine that this concentration may be higher than those we used before. Whatever the reason, our results show that PJ34 increased the amount of P-VASP in a dose-dependent manner, suggesting that PJ34 may act like a P2Y₁₂ antagonist.

Since our original hypothesis relied on a “PARP-independent” mechanism, we then examined whether three other PARP inhibitors with different chemical structure exert similar antiplatelet effect. We opted for 3-AB, INO-1001 and minocycline that also demonstrated beneficial effects in experimental models of cerebral ischaemia (Couturier et al., 2003; Koh et al., 2004; Komjáti et al., 2004; Xu et al., 2004; Hayakawa et al., 2008). The concentration of these PARP inhibitors (50 μ M) was chosen based on the PJ34 concentration inducing an important antiaggregant effect, without referring to their IC50 for PARP accordingly to our hypothesis.

First, neither 3-AB nor INO-1001 modified platelet aggregation whatever the agonist used, which is consistent with previous results showing no effect of INO-1001 at 10 or 100 μ M (Toth et al., 2006). The authors suggested that this lack of antiplatelet effect might simply be explained by its structure, but they also suspected the concentrations used. Indeed, in Toth’s study, INO-1001 concentrations are consistent with those preventing PARP activation in a cardiomyocyte oxidative challenge model or even with plasma concentrations measured in *in vivo* models, whereas Alexy and collaborators (2004) showed that inhibition of ADP-induced platelet aggregation with their PARP inhibitors occurred at higher concentrations than those inhibiting PARP activity in similar cell culture.

In our study, PJ34 significantly inhibited the second phase of ADP-induced platelet aggregation by 60% at 10 μ M, with a tendency at 1 μ M (25%). Although these concentrations are higher than the IC50 for PARP inhibition (17 nM), they are similar to those used by Toth and collaborators with the equipotent PARP inhibitor, INO-1001 (IC50 < 15 nM). Moreover, PJ34 concentrations are consistent with those commonly used in in vitro studies. So, for example, pre-treatment with 30-1000 nM PJ34 significantly protected neurons from OGD-induced cell death in a dose-dependent manner (Abdelkarim et al., 2001). PJ34 (10 or 100 μ M) also protected cardiomyoblast cells against H₂O₂-induced injury (Szepes et al., 2013). In human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) culture, Mathews and Berk (2008) showed that PJ34 at 10 μ M reduced H₂O₂-induced cell death.

At last, surprisingly, our results show that minocycline reduced all agonists-induced platelet aggregation by 50-60%, suggesting that this antiaggregant effect involves a more general mechanism. Indeed, minocycline can chelate divalent metal ions, such as calcium (Glette et al., 1984). Thus, since calcium plays a major role in platelet aggregation (Varga-Szabo et al., 2009), its chelation might explain the antiplatelet effect of minocycline.

In conclusion, we confirmed that certain PARP inhibitors are antiaggregant on human blood, but most importantly, our in vitro study is the first demonstrating that PJ34 inhibits ADP-induced platelet aggregation via a potential competitive P2Y₁₂ antagonism. As it is well established that pharmacological blockade of P2Y₁₂ with thienopyridines like clopidogrel is a powerful antiplatelet strategy in the prevention of recurrent ischemic stroke, such an effect would add “another string to the bow” of PJ34, in addition to its already demonstrated beneficial effects in cerebral ischaemia, and thus strengthens its interest in stroke treatment.

Acknowledgments

We would like to thank the following Societies for funding this work: “Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire”, “Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique”, Fédération Française de Cardiologie” and “Société Française de Cardiologie”, and Lewis Neville for the gift of PJ34.

References

- Abdelkarim GE, Gertz K, Harms C, Katchanov J, Dirnagl U, Szabó C, et al. (2001). Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in in vitro and in vivo models of stroke. *Int J Mol Med* 7: 255-260.
- Alano CC, Kauppinen TM, Valls AV, Swanson RA (2006). Minocycline inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9685-9690.
- Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C (2005). Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost* 3: 85-92.
- Alexandrov AV, Grotta JC (2002). Arterial reocclusion in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Neurology* 59: 862-867.
- Alexy T, Toth A, Marton Z, Horvath B, Koltai K, Feher G, et al. (2004). Inhibition of ADP-evoked platelet aggregation by selected poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 43: 423-431.
- Balami JS, Sutherland BA, Buchan AM (2013). Complications associated with recombinant tissue plasminogen activator therapy for acute ischaemic stroke. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12: 155-169.
- Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H (2011). Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev* 25: 155-167.
- Couturier JY, Ding-Zhou L, Croci N, Plotkine M, Margail I (2003). 3-Aminobenzamide reduces brain infarction and neutrophil infiltration after transient focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol* 184: 973-980.
- Curtin NJ, Szabo C (2013). Therapeutic applications of PARP inhibitors: Anticancer therapy and beyond. *Mol Aspects Med* doi:pil: S0098-2997(13)00007-1. 10.1016/j.mam.2013.01.006.

- del Zoppo GJ (1998). The role of platelets in ischemic stroke. *Neurology* 51 (3 Suppl 3): S9-14.
- Di Minno MN, Russolillo A, Camera M, Brambilla M, De Gregorio A, Tremoli E, et al. (2011). New anti-thrombotic drugs for stroke prevention. *Curr Vasc Pharmacol* 9: 723-732.
- Dorsam RT, Kunapuli SP (2004). Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J Clin Invest* 113: 340-345.
- Fabre JE, Gurney ME (2010). Limitations of current therapies to prevent thrombosis: a need for novel strategies. *Mol Biosyst* 6: 305-315.
- Franks ZG, Campbell RA, Weyrich AS, Rondina MT (2010). Platelet-leukocyte interactions link inflammatory and thromboembolic events in ischemic stroke. *Ann N Y Acad Sci* 1207: 11-17.
- Gachet C (2008). P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost* 99: 466-472.
- Glette J, Sandberg S, Hopen G, Solberg CO (1984). Influence of tetracyclines on human polymorphonuclear leukocyte function. *Antimicrob Agents Chemother* 25: 354-357.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, et al.; ECASS Investigators (2008). Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359: 1317-1329.
- Haddad M, Beray-Berthat V, Coqueran B, Palmier B, Szabo C, Plotkine M, et al. (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, 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.
- Haddad M, Rhinn H, Bloquel C, Coqueran B, Szabó C, Plotkine M, et al. (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.
- Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, Hazekawa M, Mishima S, Fujioka M, et al. (2008). Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Stroke* 39: 951-958.
- Iyú D, Glenn JR, White AE, Fox SC, Heptinstall S (2011). Adenosine derived from ADP can contribute to inhibition of platelet aggregation in the presence of a P2Y12 antagonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 416-422.
- Kauppinen TM, Suh SW, Berman AE, Hamby AM, Swanson RA (2009). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase suppresses inflammation and promotes recovery after ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 820-829.
- Kirshner HS (2012). Antiplatelet and anticoagulation strategies in the prevention and treatment of ischemic stroke. *Curr Pharm Des* 18: 5261-5272.
- Koh SH, Park Y, Song CW, Kim JG, Kim K, Kim J, et al. (2004). The effect of PARP inhibitor on ischaemic cell death, its related inflammation and survival signals. *Eur J Neurosci* 20: 1461-1472.
- Komjáti K, Besson VC, Szabó C (2005). Poly (adp-ribose) polymerase inhibitors as potential therapeutic agents in stroke and neurotrauma. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4: 179-194.
- Komjáti K, Mabley JG, Virág L, Southan GJ, Salzman AL, 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.
- Lenzsér G, Kis B, Snipes JA, Gáspár T, Sándor P, Komjáti K, et al. (2007). Contribution of poly(ADP-ribose) polymerase to postischemic blood-brain barrier damage in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 1318-1326.
- Mathews MT, Berk BC (2008). PARP-1 inhibition prevents oxidative and nitrosative stress-induced endothelial cell death via transactivation of the VEGF receptor 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 711-717.
- Mohan KM, Wolfe CD, Rudd AG, Heuschmann PU, Kolominsky-Rabas PL, Grieve AP (2011). Risk and cumulative risk of stroke recurrence: a systematic review and meta-analysis. *Stroke* 42: 1489-1494.
- Park EM, Cho S, Frys K, Racchumi G, Zhou P, Anrather J, et al. (2004). Interaction between inducible nitric oxide synthase and poly(ADP-ribose) polymerase in focal ischemic brain injury. *Stroke* 35: 2896-2901.
- Rha JH, Saver JL (2007). The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke* 38: 967-973.
- Rubiera M, Alvarez-Sabín J, Ribo M, Montaner J, Santamarina E, Arenillas JF, et al. (2005). Predictors of early arterial reocclusion after tissue plasminogen activator-induced recanalization in acute ischemic stroke. *Stroke* 36: 1452-1456.
- Saqqur M, Molina CA, Salam A, Siddiqui M, Ribo M, Uchino K, et al.; CLOTBUST Investigators. (2007). Clinical deterioration after intravenous recombinant tissue plasminogen activator treatment: a multicenter transcranial Doppler study. *Stroke* 38: 69-74.
- Stoll G, Kleinschnitz C, Nieswandt B (2008). Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. *Blood* 112: 3555-3562.
- Szepes M, Janicsek Z, Benkő Z, Cselenyák A, Kiss L (2013). Pretreatment of therapeutic cells with poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor enhances their efficacy in an in vitro model of cell-based

- therapy in myocardial infarct. *Int J Mol Med* 31: 26-32.
- Teng F, Beray-Berthat V, Coqueran B, Lesbats C, Kuntz M, Palmier B, et al. (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.
- The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke (1995). *N Engl J Med* 333: 1581-1587.
- Tóth O, Szabó C, Kecskés M, Pótó L, Nagy A, Losonczy H (2006). In vitro effect of the potent poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor INO-1001 alone and in combination with aspirin, eptifibatide, tirofiban, enoxaparin or alteplase on haemostatic parameters. *Life Sci* 79: 317-323.
- Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B (2009). Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 7: 1057-1066.
- Weber R, Brenck J, Diener HC (2012). Antiplatelet therapy in cerebrovascular disorders. *Handb Exp Pharmacol* 210: 519-546.
- Xu L, Fagan SC, Waller JL, Edwards D, Borlongan CV, Zheng J, et al. (2004). Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. *BMC Neurol* 4: 7.
- Yip HK, Liou CW, Chang HW, Lan MY, Liu JS, Chen MC (2005). Link between platelet activity and outcomes after an ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 20: 120-128.

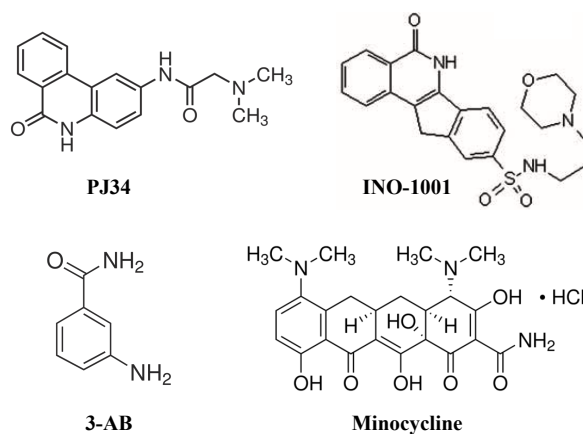


Figure 1

Chemical structure of the four PARP inhibitors: PJ34, 3-AB, INO-1001 and minocycline

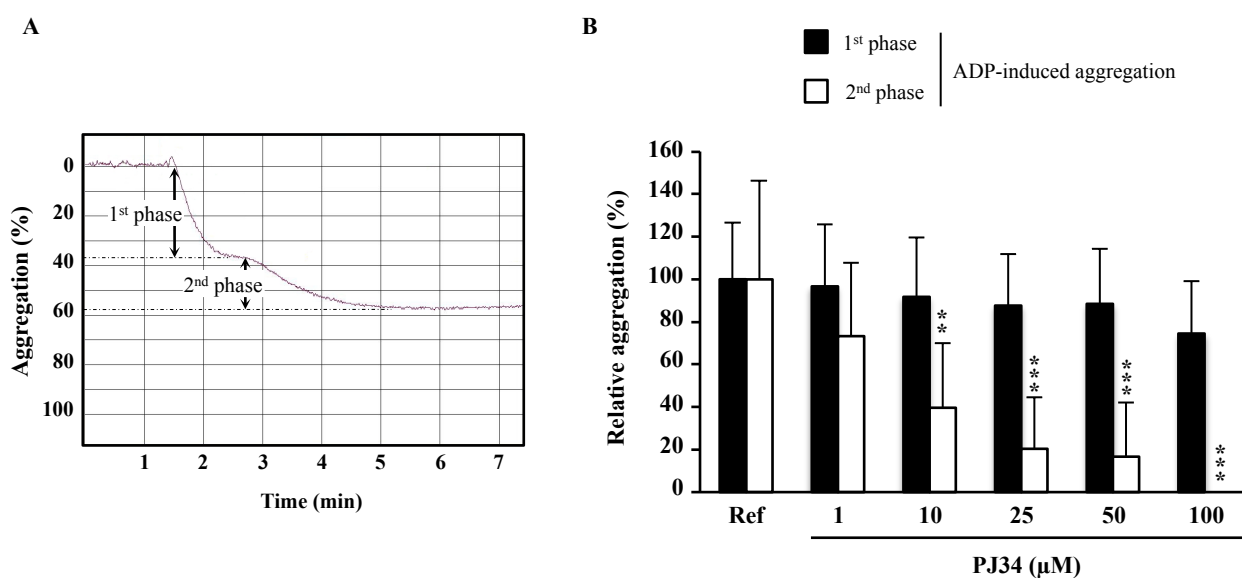


Figure 2

Effect of PJ34 on both phases of ADP-induced platelet aggregation. ADP concentration (1.5 to 5 μM) was determined for each donor to produce a biphasic aggregation curve (A). Human PRP samples were pre-incubated in the absence (= reference, Ref; normalized to 100%) or presence of PJ34 and then stimulated with ADP (B). Results are presented as the mean $\pm$ SD ($n = 6-7$) and expressed relatively to ADP the reference. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, significantly different from the corresponding ADP reference (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

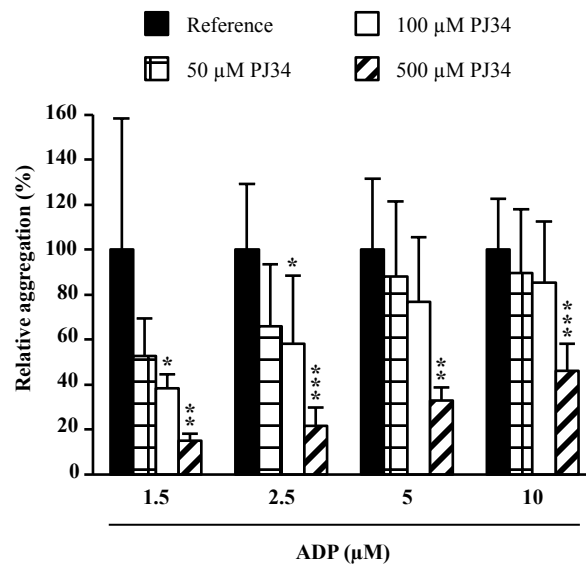


Figure 3

Effect of incremental concentrations of ADP on platelet aggregation in the presence of PJ34. Human PRP samples were pre-incubated in the absence (= reference; normalized to 100%) or presence of PJ34 and then stimulated with ADP. Results are presented as the mean $\pm$ SD ($n = 4-7$) and expressed relatively to the ADP reference. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, significantly different from the corresponding ADP reference (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

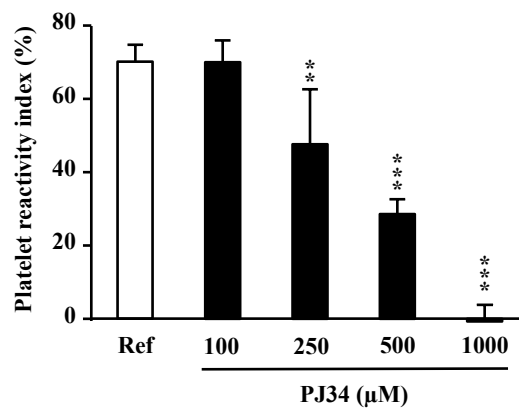


Figure 4

Effect of PJ34 on VASP phosphorylation. Human whole blood was pre-incubated in the absence (reference, Ref) or presence of PJ34 and stimulated with ADP. A low PRI is associated with a high VASP phosphorylation state and thus reflects P2Y₁₂ inhibition. Results are presented as the mean $\pm$ SD ($n = 3-4$) and expressed relatively to the reference. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, significantly different from the reference (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

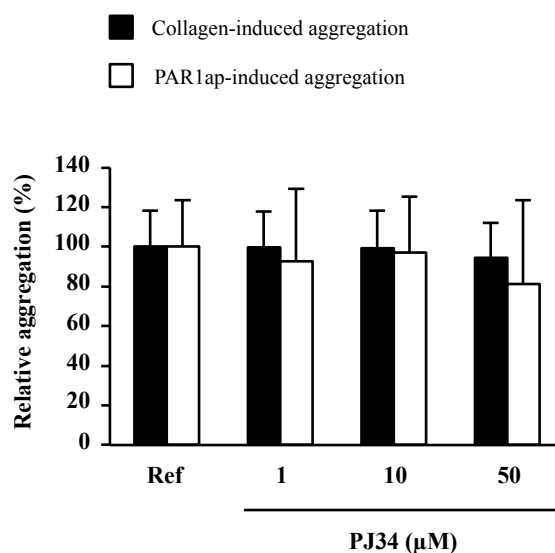


Figure 5

Effect of PJ34 on collagen- and PAR1ap-induced platelet aggregation. Human PRP samples were pre-incubated in the absence (= reference, Ref; normalized to 100%) or presence of PJ34 and then stimulated with either collagen (1 to 2 μg/ml) or PAR1ap (1 to 2 μM). Results are presented as the mean ± SD (n = 7-8) and expressed relatively to the reference.

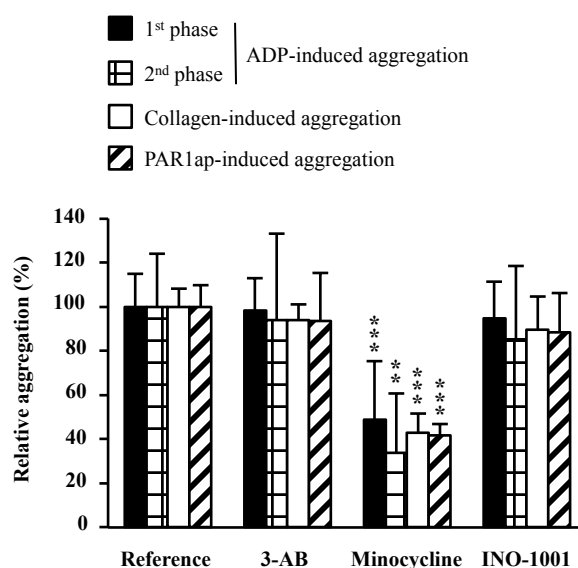


Figure 6

Effect of other PARP inhibitors (3-AB, minocycline and INO-1001) on ADP-, collagen- or PAR1ap-induced platelet aggregation. Human PRP samples were pre-incubated in the absence (= reference; normalized to 100%) or presence of PARP inhibitor (50 μM) and then stimulated with ADP (1.5 to 5 μM; to produce a biphasic aggregation curve), collagen (1 to 2 μg/ml) or PAR1ap (1 to 1,5 μM). Results are presented as the mean ± SD (n = 5-6) and expressed relatively to the reference. **P<0.01 and ***P<0.001, significantly different from the reference (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).