

> L'intérêt clinique des biomarqueurs est de pouvoir identifier des individus à risque de développer une maladie afin d'établir des mesures préventives, diagnostiques ou thérapeutiques. Or, nous manquons actuellement d'un test rapide, sensible et pratique pour le diagnostic de l'ictus ischémique aigu. Un nombre important de molécules circulantes ont été associées aux accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques, sans qu'aucun consensus n'établisse leur utilité. En effet, ces molécules ne sont pas spécifiques du complexe neurovasculaire altéré dans l'AVC et pourraient également témoigner d'autres pathologies vasculaires. Même l'association de certains de ces marqueurs biologiques (métalloprotéinase matricielle 9, peptide natriurétique de type B, D-dimères, protéine S100B...) n'a pas permis d'obtenir des informations diagnostiques et pronostiques supplémentaires. Récemment, un nouveau type de biomarqueur, les microparticules, fragments cellulaires émis par des cellules en souffrance, s'avère être potentiellement intéressant et suffisamment robuste. Les différents déterminants antigéniques et les effecteurs moléculaires portés par ces microparticules qui, par leur origine, sont spécifiques de la cellule activée ou lésée, pourraient permettre l'identification précoce du tissu affecté. Ces microparticules pourraient être détectées non seulement dans le liquide céphalorachidien, mais aussi dans les larmes ou dans la circulation sanguine en cas de dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique. Il est donc essentiel d'évaluer leur rôle de marqueur biologique dans la prévention, le diagnostic et le suivi thérapeutique des accidents vasculaires cérébraux ischémiques. ◀

Accidents vasculaires cérébraux (2)

Ischémie cérébrale : les microparticules neurovasculaires, une alternative aux marqueurs biologiques sanguins

Eduardo Anglés-Cano, Denis Vivien
 pour le réseau STROKAVENIR



Inserm U919, Sérine protéases et physiopathologie de l'unité neurovasculaire, UMR-CNRS 6232 CINAPS, Cyceron, Caen, F-14074 France ; Université de Caen Basse-Normandie, GIP Cyceron, boulevard Henri Becquerel, 14074 Caen, France.
Eduardo.Angles-Cano@inserm.fr

Marqueurs biologiques des accidents vasculaires cérébraux ischémiques

Le cerveau se trouve sous la dépendance d'un apport continu de glucose et d'oxygène par le sang circulant. Lorsque le débit sanguin chute au-dessous d'une certaine limite, la combinaison d'une hypoperfusion et d'un déficit énergétique conduit à un arrêt réversible du fonctionnement neuronal dans la zone affectée, appelée pénombre ischémique. Le devenir de cette zone dépend de la restauration précoce de la perfusion cérébrale. Lorsqu'elle s'accroît ou se prolonge, l'ischémie entraîne la mort, ou nécrose, du tissu cérébral. On appelle infarctus cérébral un foyer d'ischémie cérébrale associant des zones de nécrose et de pénombre. Ces accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques surviennent, pour la plupart, dans un contexte d'athéromatose le plus



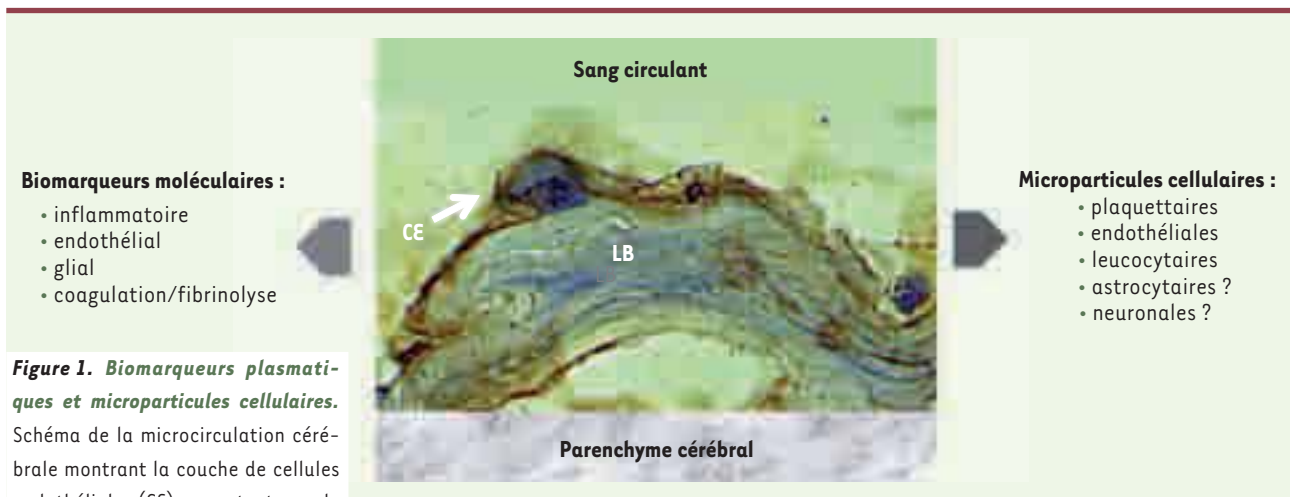


Figure 1. Biomarqueurs plasmatiques et microparticules cellulaires.

Schéma de la microcirculation cérébrale montrant la couche de cellules endothéliales (CE) en contact avec le

sang circulant et la lame basale (LB) voisinant avec le parenchyme cérébral. La cellule endothéliale est marquée par un anticorps monoclonal anti-tPA (*tissu plasminogen activator*) couplé à la peroxidase [29]. L'activation de la coagulation, du système fibrinolytique, de cellules sanguines, endothéliales et gliales se manifeste par la formation ou la libération de molécules témoignant de la lésion neurovasculaire. Ces cellules activées peuvent également émettre des microparticules cellulaires, messagers et témoins de la lésion.

souvent située au niveau de la bifurcation de l'artère carotide primitive et qui se prolonge sur les premiers centimètres de l'artère carotide interne. Les mécanismes par lesquels ces lésions athéromateuses provoquent une ischémie cérébrale sont multiples : formation d'un thrombus obstruant l'artère au niveau de la lésion elle-même (accident thrombotique), détachement d'un fragment de plaque d'athéromatose allant emboliser brutalement une artère distale, ces événements étant probablement associés à des anomalies hémodynamiques. L'analyse systématique de ces mécanismes par des techniques d'imagerie et par des méthodes biologiques reflétant la physiopathologie des lésions devrait aboutir à l'identification de biomarqueurs permettant de prévoir la survenue d'accidents ischémiques, ou, dès que la thrombose est constituée, d'éviter l'évolution dans la zone de pénombre ischémique vers la mort du tissu. En effet, la stimulation et l'activation cellulaires dans la zone de pénombre (par exemple par des stimulus oxydatifs), les interactions cellulaires avec les cellules inflammatoires au sein des lésions de la zone infarctée, se manifestent par la libération de médiateurs bioactifs solubles et de fragments membranaires, ces derniers dénommés microparticules cellulaires (MP). Leur identification dans le sang circulant (surtout si elle est faite de façon préventive avant la survenue de l'accident ischémique ou au cours des accidents transitoires), représente un atout majeur dans le diagnostic et le traitement des accidents ischémiques. Nous décrivons ici l'apport relatif de marqueurs circulants et discutons l'intérêt de la nouvelle voie de recherche sur les MP dans l'évaluation de l'ischémie cérébrale.

Biomarqueurs solubles

Ces biomarqueurs sont en général des molécules solubles circulantes (Figure 1) caractéristiques de la réaction inflammatoire aiguë déclenchée par l'accident ischémique (cytokines, protéine C réactive, fibrinogène) [1], ou libérées par l'endothélium activé (molécules

d'adhésion). Elles peuvent aussi résulter de réactions d'activation de la coagulation (facteurs activés VIII, VII et fragment F1.2 de la prothrombine) et de son inhibition (expression de la thrombomoduline, de la protéine C, de la protéine S) ou encore d'un processus de fibrinolyse secondaire à la formation du thrombus (présence de D-dimères) [2]. Ces molécules reflètent un état inflammatoire ou des modifications de l'hémostase, mais ne sont pas spécifiques d'une lésion cérébrovasculaire et sont aussi détectées au cours de l'ischémie cardiaque [3]. Le nombre de biomarqueurs sanguins associés aux AVC ischémiques est important (70 ont été dénombrés récemment dans la littérature [1, 4], mais aucun consensus n'émerge actuellement pour en recommander un ou plusieurs pour une utilisation clinique [5]. Ces marqueurs solubles issus de cellules en souffrance lors d'un accident ischémique (protéine basique de la myéline, émolase spécifique des neurones, S100B d'origine gliale, thrombomoduline d'origine endothéliale) témoignent de la gravité de la lésion mais leur valeur prédictive n'a pas encore été établie [6]. D'ailleurs, S100B, qui est pourtant un marqueur glial, peut également avoir une origine extracrânienne et son utilité actuelle dans le diagnostic des AVC ischémiques reste à démontrer [7]. L'étude groupée de certains de ces biomarqueurs comme la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP-9), le peptide natriurétique de type B (BPN), les D-dimères et la protéine S100B, a révélé une spécificité trop faible pour que ce panel de biomarqueurs puisse être utilisé en clinique indépendamment des études d'imagerie [8-10]. À l'heure actuelle, l'augmentation

Cytométrie en flux* (sondes fluorescentes) [30]

- Annexine V : dosage global de microparticules
- Anticorps spécifiques : origine cellulaire et nombre de MP

Système de capture de microparticules (capteurs immobilisés) [31]**

- Annexine V : quantification de la phosphatidylsérine
- Anticorps spécifiques : identification de l'origine cellulaire

Méthodes en développement (étude du mouvement brownien des MP)

- Diffusion dynamique de la lumière (DLS) [32] : taille des MP
- « Single particle tracking »*** : utilisation de sondes fluorescentes.
 - Détection de la taille et de l'origine cellulaire

Tableau I. Méthodes de détection des microparticules. * Limite de détection : longueur d'onde du laser, 488 nm. ** Captation indépendante de la taille. *** Braekmans K, Plawinski L, Doeuvre L, Anglés-Cano E (manuscrit en préparation).

de la concentration d'une molécule normalement impliquée dans la régulation de la fluidité sanguine ou de l'intégrité vasculaire, deux paramètres garants de la perfusion du tissu cérébral, ne constitue pas en soi un argument suffisant pour la considérer comme un biomarqueur efficace. Certaines de ces molécules pourraient être considérées, au mieux, comme des facteurs prédisposant à un état prothrombotique (homocystéine, Lp(a), anticorps antiphospholipides, fibrinogène, facteur VII) plus que comme des biomarqueurs de l'ischémie cérébrale [4]. C'est l'irruption dans la circulation d'une molécule et/ou de composants cellulaires qui en sont normalement absents, et témoignent donc de processus physiopathologiques précédant l'ischémie ou ses complications, qui pourrait être considérée comme un véritable biomarqueur. Les microparticules émises par des cellules activées correspondent à cette définition car leurs caractéristiques sont spécifiques de la cellule stimulée ou lésée. Ceci est d'autant plus intéressant que certains des biomarqueurs dit solubles seraient en réalité portés par les MP [11, 12].

Microparticules membranaires : messagers de l'activation cellulaire

Les MP cellulaires sont des microvésicules membranaires (taille : 0,1 à 1 µm) émises par des cellules activées ou en cours d'apoptose [12]. Elles sont présentes dans la circulation mais aussi dans la paroi vasculaire athérotrombotique [13]. Les MP cellulaires d'origine endothéliale [14] ou plaquettaire [15] pourraient jouer, en effet, un rôle important dans la genèse de la lésion ischémique (Figure 1). Ces MP sont actuellement considérées comme des marqueurs d'activation cellulaire dans plusieurs situations pathologiques [16]. Elles portent à leur surface la phosphatidylsérine, un phospholipide normalement présent dans le feuillet interne de la

membrane. La phosphatidylsérine permet l'assemblage de facteurs de la coagulation et leur activation par le facteur tissulaire, le récepteur transmembranaire du facteur VII, présent sur certaines de ces MP. L'expression de la phosphatidylsérine permet également la détection et le comptage de MP par cytométrie en flux ou par capture sur phase solide à l'aide de l'annexine V, qui possède une forte affinité pour les phospholipides anioniques et la phosphatidylsérine (Tableau I). Des méthodes basées sur les propriétés physiques des MP (mouvement brownien) sont en cours de développement (Tableau I). La plupart des études réalisées sur les MP analysent leur activité procoagulante et leur rôle déterminant comme facteur de risque thrombotique [16]. Ainsi, une élévation de la quantité de MP endothéliales et plaquettaires circulantes a été rapportée au cours des AVC [17, 18]. Cependant,

il s'agit d'une simple relation d'association [19], car ni le nombre absolu ni la proportion relative de MP endothéliales ou plaquettaires ne pourront orienter le diagnostic vers une localisation intracérébrale en l'absence de manifestations cliniques. Les paramètres importants sont la qualité et le phénotype de ces microparticules qui pourraient déterminer si elles ont été produites sous l'influence de facteurs libérés au niveau d'une lésion. Hormis les glycoprotéines identifiant leur origine endothéliale ou plaquettaire et la surface procoagulante de phosphatidylsérine, ces MP portent, en fonction de leur origine cellulaire, d'autres molécules bioactives : le facteur tissulaire, des facteurs de croissance et cytokines, des récepteurs membranaires, des activateurs du plasminogène et des métalloprotéinases [11, 12, 20, 21]. Les MP cellulaires constituent donc un biomarqueur fiable de certaines maladies car elles sont, par définition, spécifiques de la cellule activée ou lésée dont elles reflètent la composition. Les lésions ischémiques ou inflammatoires altérant les composants cellulaires des structures neurovasculaires du système nerveux central pourraient se manifester par l'émission de MP, dont l'identification serait utile à la prédiction, au diagnostic et au suivi des AVC ischémiques. Ces MP pourraient être retrouvées dans le LCR (liquide céphalorachidien), les larmes ou le sang circulant en cas de dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique. En effet, des microparticules d'origine plaquettaire et endothéliale ont déjà été détectées dans le LCR au cours de traumatismes crâniens ou d'AVC hémorragiques [22, 23] et des MP issues de cellules souches neuroépithéliales exprimant la molécule prominine-1 (désignée selon la nomenclature internationale *cluster* CD133) ont été retrouvées dans les larmes [24]. Il est intéressant de noter que des MP d'origine gliale ont été identifiées dans le LCR au cours de la sclérose en plaque [25]. Cette démarche paraît d'autant plus prometteuse que la détection et l'analyse des microparticules spécifiquement liées aux AVC pourraient bénéficier de techniques protéomiques [26-28]. La valeur clinique de ce biomarqueur dépendra de son pouvoir à identifier des individus à haut risque avant toute manifestation clinique de la maladie ; si tel est le cas, les MP cellulaires pourraient constituer un autre outil essentiel dans la prévention, le diagnostic et le suivi thérapeutique des accidents vasculaires cérébraux ischémiques [17]. ♦

Le concept de complexe neurovasculaire (neurovascular unit en anglais)

Complexe ou entité anatomofonctionnelle dont la structure comprend les neurones, les microvaisseaux (endothélium et lame basale) et les cellules de support : astrocytes, péricytes et microglie. Au sein de ce complexe se trouve la barrière hémato-encéphalique dont le principal composant est l'endothélium en contact avec des éléments périvasculaires (pieds astrocytaires, péricytes et neurones). Cet ensemble permet les échanges gazeux, métaboliques et nutritionnels, et constitue le support des communications intercellulaires et de la signalisation des interactions cellule/matrice [33] (→).

(→) Voir Figure 3 de l'article de R. Bordet et al., page 852 de ce numéro

SUMMARY

Cellular microparticles, potential useful biomarkers in the identification of cerebrovascular accidents

The clinical utility of biomarkers depends on their ability to identify high-risk individuals in order to establish preventive, diagnostic or therapeutic measures. Currently, no practical, rapid and sensitive test is available for the diagnosis of acute ischemic stroke. A number of soluble molecules have been identified that are merely associated to these cerebrovascular accidents. Despite this association not a single molecule has the characteristics of a true biomarker directly involved in the pathophysiology of ischemic stroke—none of them is organ-specific and may therefore be elevated in the context of medical comorbidities. When explored as a combination of biomarkers, e.g. matrix metalloproteinase 9, brain natriuretic protein, D-dimer, protein S100B, the question still remains whether serial biomarker analysis provides additional prognostic information. Even S100B, a glial activation protein, has a low specificity for acute ischemic stroke because it may originate from extracranial sources. Current knowledge from the field of cell-derived microparticles suggests that these membrane fragments may represent reliable biomarkers as they are cell-specific and are released early in the pathophysiological cascade of a disease. These microparticles can be found not only in the cerebrospinal fluid but also in tears and circulating blood in case of blood-brain barrier dysfunction. They represent a new challenge in stroke diagnosis and management. ♦

REMERCIEMENTS

Nous exprimons nos remerciements à Laurent Plawinski et Loïc Dæuvre pour leurs commentaires et critiques. Eduardo Anglés-Cano et Denis Vivien sont membres du septième Programme cadre de la Communauté européenne (FP7/2007-2013, grant n° 201024). Le projet sur les microparticules est développé dans le cadre d'un contrat d'interface Inserm-CHU de Caen (Pr Fausto Viader) octroyé à Eduardo Anglés-Cano.

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Del Zoppo GJ, Levy DE, Wasiewski WW, et al. Hyperfibrinogenemia and functional outcome from acute ischemic stroke. *Stroke* 2009 ; 40 : 1687-91.
2. Kang DW, Yoo SH, Chun S, et al. Inflammatory and hemostatic biomarkers associated with early recurrent ischemic lesions in acute ischemic stroke. *Stroke* 2009 ; 40 : 1653-8.
3. Di Napoli M, Singh P. Is plasma fibrinogen useful in evaluating ischemic stroke patients? Why, how, and when. *Stroke* 2009 ; 40 : 1549-52.
4. Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, Sandercock P. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* 2009 ; 40 : e380-9.

5. Whiteley W, Tseng MC, Sandercock P. Blood biomarkers in the diagnosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* 2008 ; 39 : 2902-9.
6. Jauch EC, Lindsay C, Broderick J, et al. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke: the National Institute of Neurological Disorders and Stroke recombinant tissue plasminogen activator Stroke Study. *Stroke* 2006 ; 37 : 2508-13.
7. Dassan P, Keir G, Brown MM. Criteria for a clinically informative serum biomarker in acute ischaemic stroke: a review of S100B. *Cerebrovasc Dis* 2009 ; 27 : 295-302.
8. Lynch JR, Blessing R, White WD, et al. Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke* 2004 ; 35 : 57-63.
9. Reynolds MA, Kirchick HJ, Dahlen JR, et al. Early biomarkers of stroke. *Clin Chem* 2003 ; 49 : 1733-9.
10. Laskowitz DT, Kasner SE, Saver J, et al. Clinical usefulness of a biomarker-based diagnostic test for acute stroke: the biomarker rapid assessment in ischemic injury (BRAIn) study. *Stroke* 2009 ; 40 : 77-85.
11. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* 2004 ; 11 : 156-64.
12. Doeuve L, Anglés-Cano E. Cell-derived microparticles unveil their fibrinolytic and proteolytic function. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 37-44.
13. Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* 2007 ; 49 : 772-7.
14. Simak J, Gelderman MP, Yu H, et al. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost* 2006 ; 4 : 1296-302.
15. Cherian P, Hankey GJ, Eikelboom JW, et al. Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes. *Stroke* 2003 ; 34 : 2132-7.
16. Morel O, Toti F, Hugel B, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 ; 26 : 2594-604.
17. Doeuve L, Plawinski L, Toti F, Anglés-Cano E. Cell-derived microparticles: a new challenge in neuroscience. *J Neurochem* 2009 ; 110 : 457-68.
18. Horstman LL, Jy W, Minagar A, et al. Cell-derived microparticles and exosomes in neuroinflammatory disorders. *Int Rev Neurobiol* 2007 ; 79 : 227-68.
19. Namba M, Tanaka A, Shimada K, et al. Circulating platelet-derived microparticles are associated with atherothrombotic events: a marker for vulnerable blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 ; 27 : 255-6.
20. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2007 ; 110 : 2432-9.
21. Canault M, Leroyer AS, Peiretti F, et al. Microparticles of human atherosclerotic plaques enhance the shedding of the tumor necrosis factor- α converting enzyme/ADAM17 substrates, tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor-1. *Am J Pathol* 2007 ; 171 : 1713-23.
22. Morel N, Morel O, Petit L, et al. Generation of procoagulant microparticles in cerebrospinal fluid and peripheral blood after traumatic brain injury. *J Trauma* 2008 ; 64 : 698-704.
23. Huang M, Hu YY, Dong XQ. High concentrations of procoagulant microparticles in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with acute basal ganglia hemorrhage are associated with poor outcome. *Surg Neurol* 2009.
24. Marzesco AM, Janich P, Wilsch-Brauninger M, et al. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci* 2005 ; 118 : 2849-58.
25. Scolding NJ, Morgan BP, Houston WA, et al. Vesicular removal by oligodendrocytes of membrane attack complexes formed by activated complement. *Nature* 1989 ; 339 : 620-2.
26. Wiszorski M, Lemaire R, Stauber J, et al. MALDI imaging: a new technology to discover and validate new biomarkers. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 Spec No 1 : 31-6.
27. Miguet L, Sanglier S, Schaeffer C, et al. Microparticles: a new tool for plasma membrane sub-cellular proteomic. *Subcell Biochem* 2007 ; 43 : 21-34.
28. Zappaterra MD, Lisgo SN, Lindsay S, et al. A comparative proteomic analysis of human and rat embryonic cerebrospinal fluid. *J Proteome Res* 2007 ; 6 : 3537-48.
29. Anglés-Cano E, Balaton A, Le Bonniec B, et al. Production of monoclonal antibodies to the high fibrin-affinity, tissue-type plasminogen activator of human plasma. Demonstration of its endothelial origin by immunolocalization. *Blood* 1985 ; 66 : 913-20.
30. Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004 ; 2 : 1844-5.
31. Hugel B, Zibairi F, Freyssinet JM. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004 ; 2 : 846-7.
32. Lawrie AS, Albanan A, Cardigan RA, et al. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang* 2009 ; 96 : 206-12.
33. Bordet R, Ouk T, Onteniente B, et al. Ischémie cérébrale : les pistes thérapeutiques de demain. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 847-54.

TIRÉS À PART
E. Anglés-Cano