



HAL
open science

Performances diagnostiques de la peroxyredoxine 1 dans la datation precoce de l'infarctus cerebral

Mathieu Bonnerot

► **To cite this version:**

Mathieu Bonnerot. Performances diagnostiques de la peroxyredoxine 1 dans la datation precoce de l'infarctus cerebral. Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. hal-01931872

HAL Id: hal-01931872

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01931872>

Submitted on 23 Nov 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE

FACULTE DE MEDECINE DE NANCY

2016

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

Par

Mathieu BONNEROT

Le jeudi 15 septembre 2016

PERFORMANCES DIAGNOSTIQUES DE LA PEROXYREDOXINE 1

DANS LA DATATION PRECOCE DE L'INFARCTUS CEREBRAL

Membres du jury :

M. le Professeur Marc DEBOUVERIE,

Président

M. le Professeur Serge BRACARD

Juge

M. le Professeur Athanase BENETOS

Juge

Mme le Docteur Natacha TURCK

Juge

M. le Docteur RICHARD Sébastien

Directeur de thèse



**Président de l'Université de Lorraine
Professeur Pierre MUTZENHARDT**

**Doyen de la Faculté de Médecine
Professeur Marc BRAUN**

Vice-doyens

Pr Karine ANGIOI-DUPREZ, Vice-Doyen
Pr Marc DEBOUVERIE, Vice-Doyen

Asseseurs :

Premier cycle : Dr Guillaume GAUCHOTTE

Deuxième cycle : Pr Marie-Reine LOSSER

Troisième cycle : Pr Marc DEBOUVERIE

Innovations pédagogiques : Pr Bruno CHENUUEL

Formation à la recherche : Dr Nelly AGRINIER

Animation de la recherche clinique : Pr François ALLA

Affaires juridiques et Relations extérieures : Dr Frédérique CLAUDOT

Vie Facultaire et SIDES : Dr Laure JOLY

Relations Grande Région : Pr Thomas FUCHS-BUDER

Etudiant : M. Lucas SALVATI

Chargés de mission

Bureau de docimologie : Dr Guillaume GAUCHOTTE

Commission de prospective facultaire : Pr Pierre-Edouard BOLLAERT

Universitarisation des professions paramédicales : Pr Annick BARBAUD

Orthophonie : Pr Cécile PARIETTI-WINKLER

PACES : Dr Chantal KOHLER

Plan Campus : Pr Bruno LEHEUP

International : Pr Jacques HUBERT

=====

DOYENS HONORAIRES

Professeur Jean-Bernard DUREUX - Professeur Jacques ROLAND - Professeur Patrick NETTER

Professeur Henry COUDANE

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain AUBREGÉ - Gérard BARROCHE - Alain BERTRAND - Pierre BEY

Marc-André BIGARD - Patrick BOISSEL - Pierre BORDIGONI - Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE

Jean-Louis BOUTROY - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL - Claude CHARDOT -

François CHERRIER - Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE - Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS

Jean-Bernard DUREUX - Gérard FIEVE - Jean FLOQUET - Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER

Hubert GERARD - Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ - Oliéro GUERCI - Claude HURIET

Christian JANOT - Michèle KESSLER - François KOHLER - Jacques LACOSTE - Henri LAMBERT - Pierre LANDES

Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE - Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS

Jean-Pierre MALLIÉ - Michel MANCIAUX - Philippe MANGIN - Pierre MATHIEU - Michel MERLE - Denise MONERET-VAUTRIN Pierre MONIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN - Gilbert PERCEBOIS
Claude PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON – François PLENAT - Jean-Marie POLU - Jacques POUREL Jean PREVOT - Francis RAPHAEL - Antoine RASPILLER – Denis REGENT - Michel RENARD - Jacques ROLAND
René-Jean ROYER - Daniel SCHMITT - Michel SCHMITT - Michel SCHWEITZER - Daniel SIBERTIN-BLANC - Claude SIMON Danièle SOMMELET - Jean-François STOLTZ - Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT - Hubert UFFHOLTZ - Gérard VAILLANT Paul VERT - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET – Jean-Pierre VILLEMOT - Michel WAYOFF - Michel WEBER

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Pierre BEY - Professeur Marc-André BIGARD – Professeur Jean-Pierre CRANCE
Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE – Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ – Professeure Simone GILGENKRANTZ Professeur Philippe HARTEMANN - Professeure Michèle KESSLER - Professeur Jacques LECLÈRE
Professeur Alain LE FAOU – Professeure Denise MONERET-VAUTRIN - Professeur Pierre MONIN
Professeur Jean-Pierre NICOLAS - Professeur Luc PICARD – Professeur François PLENAT - Professeur Jacques POUREL Professeur Michel SCHMITT – Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC - Professeur Paul VERT - Professeur Michel VIDAILHET

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : *(Anatomie)*

Professeur Gilles GROSDIDIER - Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : *(Cytologie et histologie)*

Professeur Bernard FOLIGUET – Professeur Christo CHRISTOV

3^{ème} sous-section : *(Anatomie et cytologie pathologiques)*

Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE

1^{ère} sous-section : *(Biophysique et médecine nucléaire)*

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} sous-section : *(Radiologie et imagerie médecine)*

Professeur Michel CLAUDON – Professeure Valérie CROISÉ-LAURENT

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER - Professeur René ANXIONNAT

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : *(Biochimie et biologie moléculaire)*

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

2^{ème} sous-section : *(Physiologie)*

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

4^{ème} sous-section : *(Nutrition)*

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT - Professeure Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : *(Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)*

Professeur Alain LE FAOU - Professeur Alain LOZNIIEWSKI – Professeure Evelyne SCHVOERER

2^{ème} sous-section : *(Parasitologie et Mycologie)*

Professeure Marie MACHOUART

3^{ème} sous-section : *(Maladies infectieuses ; maladies tropicales)*

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD – Professeure Céline PULCINI

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : *(Épidémiologie, économie de la santé et prévention)*

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN
Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

2^{ème} sous-section : (Médecine et santé au travail)

Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Professeure Eliane ALBUISSON – Professeur Nicolas JAY

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Professeur Pierre FEUGIER

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY - Professeur Didier PEIFFERT

Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marcelo DE CARVALHO-BITTENCOURT

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie - réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ - Professeur Gérard AUDIBERT

Professeur Thomas FUCHS-BUDER – Professeure Marie-Reine LOSSER

2^{ème} sous-section : (Réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Alain GERARD - Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT - Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET – Professeur J.Y. JOUZEAU (*pharmacien*)

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Professeur François PAILLE – Professeur Faiez ZANNAD - Professeur Patrick ROSSIGNOL

49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET RÉÉDUCATION

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Hervé VESPIGNANI - Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE

Professeur Luc TAILLANDIER - Professeur Louis MAILLARD – Professeure Louise TYVAERT

2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE – Professeur Olivier KLEIN

Professeur Thierry CIVIT - Professeure Sophie COLNAT-COULBOIS

3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)

Professeur Bernard KABUTH

5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean PAYSANT

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeure Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD - Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénéréologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeure Annick BARBAUD

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Professeur François DAP - Professeur Gilles DAUTEL - Professeur Etienne SIMON

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie ; addictologie)

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

2^{ème} sous-section : (Cardiologie)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE

Professeur Nicolas SADOUL - Professeur Christian de CHILLOU DE CHURET – Professeur Edoardo CAMENZIND

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)
Professeur Thierry FOLLIGUET – Professeur Juan-Pablo MAUREIRA
4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)
Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)
Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET
3^{ème} sous-section : (Néphrologie)
Professeure Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT
4^{ème} sous-section : (Urologie)
Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE ET CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)
Professeur Jean-Dominique DE KORWIN - Professeur Athanase BENETOS
Professeure Gisèle KANNY – Professeure Christine PERRET-GUILLAUME
2^{ème} sous-section : (Chirurgie générale)
Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

1^{ère} sous-section : (Pédiatrie)
Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER - Professeur François FEILLET
Professeur Cyril SCHWEITZER – Professeur Emmanuel RAFFO – Professeure Rachel VIEUX
2^{ème} sous-section : (Chirurgie infantile)
Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE
3^{ème} sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)
Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Olivier MOREL
4^{ème} sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)
Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)
Professeur Roger JANKOWSKI – Professeure Cécile PARIETTI-WINKLER
2^{ème} sous-section : (Ophtalmologie)
Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeure Karine ANGIOI
3^{ème} sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)
Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeure Muriel BRIX
=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL
Professeur Walter BLONDEL

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
Professeure Sandrine BOSCHI-MULLER
=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur Jean-Marc BOIVIN

PROFESSEUR ASSOCIÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur associé Paolo DI PATRIZIO
=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteure Manuela PEREZ

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Docteur Edouard BARRAT - Docteure Françoise TOUATI – Docteure Chantal KOHLER

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Docteure Aude MARCHAL – Docteur Guillaume GAUCHOTTE

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Docteur Jean-Claude MAYER - Docteur Jean-Marie ESCANYE

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médecine)

Docteur Damien MANDRY – Docteur Pedro TEIXEIRA

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Docteure Sophie FREMONT - Docteure Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN

Docteure Catherine MALAPLATE-ARMAND - Docteure Shyue-Fang BATTAGLIA – Docteur Abderrahim OUSSALAH

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Docteur Mathias POUSSEL – Docteure Silvia VARECHOVA

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Docteure Véronique DECOT-MAILLERET

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)

Docteure Véronique VENARD – Docteure Hélène JEULIN – Docteure Corentine ALAUZET

2^{ème} sous-section : (Parasitologie et mycologie (type mixte : biologique))

Docteure Anne DEBOURGOGNE (*sciences*)

3^{ème} sous-section : (Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales)

Docteure Sandrine HENARD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Epidémiologie, économie de la santé et prévention)

Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE – Docteure Frédérique CLAUDOT – Docteur Cédric BAUMANN

Docteure Nelly AGRINIER

2^{ème} sous-section (Médecine et Santé au Travail)

Docteure Isabelle THAON

3^{ème} sous-section (Médecine légale et droit de la santé)

Docteur Laurent MARTRILLE

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion : option hématologique (type mixte : clinique))

Docteur Aurore PERROT

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie : oncologie (type mixte : biologique))

Docteure Lina BOLOTINE

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Docteur Christophe PHILIPPE – Docteure Céline BONNET

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

2^{ème} sous-section : (Réanimation ; Médecine d'Urgence)

Docteur Antoine KIMMOUN (*stagiaire*)

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)

Docteure Françoise LAPICQUE – Docteur Nicolas GAMBIER – Docteur Julien SCALA-BERTOLA

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; Médecine d'Urgence ; Addictologie)

Docteur Nicolas GIRERD (*stagiaire*)

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Docteure Anne-Christine RAT

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénérologie)

Docteure Anne-Claire BURSZTEJN

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)
Docteure Laetitia GOFFINET-PLEUTRET

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire)

Docteur Fabrice VANHUYSE

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Docteur Stéphane ZUILY

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)

Docteur Jean-Baptiste CHEVAUX

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)

Docteure Laure JOLY

55^{ème} Section : OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Oto-Rhino-Laryngologie)

Docteur Patrice GALLET (*stagiaire*)

=====

MAÎTRE DE CONFÉRENCE DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Docteure Elisabeth STEYER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} Section : SCIENCES ÉCONOMIQUES

Monsieur Vincent LHUILLIER

19^{ème} Section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE

Madame Joëlle KIVITS

60^{ème} Section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE, GÉNIE CIVIL

Monsieur Alain DURAND

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Monsieur Jean REBSTOCK

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Madame Marie-Claire LANHERS – Monsieur Pascal REBOUL – Monsieur Nick RAMALANJAONA

65^{ème} Section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Monsieur Jean-Louis GELLY - Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE

Monsieur Christophe NEMOS - Madame Natalia DE ISLA - Madame Nathalie MERCIER – Madame Céline HUSELSTEIN

66^{ème} Section : PHYSIOLOGIE

Monsieur Nguyen TRAN

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Docteure Sophie SIEGRIST - Docteur Arnaud MASSON - Docteur Pascal BOUCHE

DOCTEURS HONORIS CAUSA

- Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)
- Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
- Professeure Mildred T. STAHLMAN (1982)
Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)
- Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)
- Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
*Research Institute for Mathematical Sciences de
Kyoto (JAPON)*
- Professeure Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS
(1996)
- Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)
- Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
Université d'Hô Chi Minh-Ville (VIÊTNAM)
- Professeur Daniel G. BICHET (2001)
Université de Montréal (Canada)
- Professeur Marc LEVENSTON (2005)
Institute of Technology, Atlanta (USA)
- Professeur Brian BURCHELL (2007)
Université de Dundee (Royaume-Uni)
- Professeur Yunfeng ZHOU (2009)
Université de Wuhan (CHINE)
- Professeur David ALPERS (2011)
Université de Washington (U.S.A)
- Professeur Martin EXNER (2012)
Université de Bonn (ALLEMAGNE)

À mon Maître et Président,

Monsieur le Professeur Marc DEBOUVERIE,

Professeur et chef de service du département de neurologie,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence du jury pour ce travail. Votre justesse de jugement et votre souci du détail ont été un apport précieux lors de la réalisation de cette étude. Je vous remercie pour votre confiance et pour l'enseignement de qualité dont vous m'avez fait profiter lors de mon internat. J'espère que ce travail répondra à vos attentes.

À mes Maîtres et Juges,

Monsieur le Professeur Serge BRACARD

Professeur et chef de service du département de neuroradiologie

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. J'ai eu la chance de travailler à vos côtés et j'espère avoir été à la hauteur de vos attentes. Votre calme naturel et votre connaissance du domaine neurovasculaire font de vous un exemple pour moi. Recevez, s'il vous plait l'expression de mes plus sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Athanase BENETOS

Professeur et chef de service du département de médecine interne et gériatrique

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes plus sincères remerciements et de mon plus profond respect.

Madame le Docteur Natacha TURCK

Biologiste et maitre de conférence universitaire au sein du département de science des protéines humaines au sein du CHU de Genève

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Merci pour la qualité de vos publications que j'ai longuement relues pour la réalisation de cet article et merci d'avoir parcouru tous ce chemin jusqu'à Nancy. Veuillez recevoir l'expression de mes plus sincères remerciements et de ma gratitude.

À mon directeur de thèse,

Monsieur le Docteur Sébastien RICHARD

Praticien hospitalier au sein de l'unité neurovasculaire du CHU de Nancy

Merci pour tout ce que tu as fait pour moi depuis mon premier pas dans ce service jusqu'à ce jour d'accomplissement.

Tu m'as toujours soutenu lors de mon internat et tu as su trouver les mots justes pour me remotiver dans les moments difficiles.

Merci de m'avoir guidé avec patience pendant ces quatre années. Ton dévouement et ta bonne humeur communicative sont pour moi un exemple.

À tous mes maitres au cours de cet internat,

À Jean Christophe Lacour, pour son calme légendaire, pour sa patience lors de ma formation à l'échographie et pour m'avoir appris à être plus méfiant.

À Gioia Mione pour sa patience et sa bonne humeur au quotidien qui en font une excellente collègue et une amie.

À Lisa Humbertjean pour m'avoir supporté comme co-interne puis comme assistante, merci pour tes précieux conseils.

À Ana Enea pour sa gentillesse et pour m'avoir appris à être plus rigoureux.

À Monsieur le Professeur Xavier Ducrocq pour la qualité de son enseignement et son humanité exemplaire dans la relation avec les patients.

À Patrick Beauchesne, pour avoir apporté sa bonne humeur en toutes circonstances et pour sa disponibilité sans égal.

À Nicolai Gospodaru pour son humour naturel et sa gentillesse.

À Irina Kilemina pour sa disponibilité et son abnégation.

À Solène Frismand qui est un exemple de curiosité et de soif de connaissance pour nous tous.

À Maud Michaud, pour avoir su se tirer des pièges Rémois et m'avoir transmis sa passion de l'EMG avec talent et humour.

À Guillaume Mathey (qui n'est pas étranger à ma venue en Lorraine), qui est un exemple d'organisation (très) personnelle et pour son humour de tous les instants.

À Mme Le Professeur Louise Tyvaert pour la richesse de son enseignement et le partage constant de ses connaissances.

À Sophie Pittion pour sa disponibilité et ses conseils avisés.

À Monsieur Etienne Godet pour sa bienveillance et sa proximité avec les internes.

À Monsieur le Professeur René Anxionnat pour sa disponibilité et sa gentillesse sans égal.

À tous les autres médecins qui m'ont accompagné dans ce parcours difficile de l'internat : Mrs les professeurs Louis Maillard, Hervé Vespignani et Luc Taillandier, Jean Pierre Vignal, Jacques Jonas, Lucie Hopes, Jean Luc Schaff, Nadine Paillot, Elena Voicu, Irina Olaru, Philippe Lonchamp, Marie Blonsky, Adrei Arosoaie, Pierre-Alexandre Baillot, Celine Renkes, Cathy Guaragna, Marc Wagner et tous ceux que j'oublie...

*À Jennifer, ma moitié, pour avoir supporté mes absences et m'avoir toujours soutenu, dans les moments de joie comme de doutes.
Pour ton caractère sans failles qui cache un cœur d'or.
Ma plus belle rencontre lors de ces quatre dernières années, ma famille.
Pour le bonheur quotidien mais intact de vivre avec toi.*

À toi le petit être que j'attends avec impatience, qui va bouleverser nos vies et nous en faire baver (au début au moins).

À mes parents, pour m'avoir transmis beaucoup de valeurs essentielles, la patience, l'ouverture d'esprit et la générosité. Pour avoir supporté mes longues années d'études et la rareté de mes apparitions.

À Jeremy, mon frère et mon double, grâce à toi je garderais toujours les pieds sur terre à mesure que tu me rappelle que je ne suis là que pour orienter les patients vers « un vrai médecin », pour tous les bons moments passé loin de l'hôpital et des études et proches de la mer et des scènes de rock.

À ma grand-mère, pour avoir toujours eu une petite attention et un petit mot réconfortant pendant toutes ces années.

À Sabrina, la meilleure belle-sœur qu'on puisse imaginer, pour sa gentillesse et son caractère bien trempé.

À mon meilleur Ami, Florian, pour ta présence dans les moments difficiles mais aussi dans nos soirées parisiennes endiablées, j'espère que tu trouveras ta voie comme moi.

À mes meilleurs amis, les tontons aixois pour avoir été ma bouffée d'oxygène et être restés soudés: Lénaïc (mon babouin, coéquipier de choc), Julien (alias Gustave, le plus barbu d'entre nous), Sylvain (alias Panda), Mika (alias Perón le héron, futur co-papa), Quentin (alias Piwoo, futur co-papa aussi), Maxime (Alias Choko) et mes expatriés du bout du monde Matthias, Adrien (alias Wéwette) et Maxou

À mes anciens co-externes Marseillais Nico (choncho), Gaëlle(Borrélioise), Mickaël (chouchou), Hélène (nounette), Sihem, Roxanne(Bouchon), Delphine, Esther, Axel, Mathieu, Samuel, Emilie, Caro.

À tous mes nouveaux copains lorrains, rencontrés pour la plupart dans de sombres contrées mosellanes Adrien, Laureline, Camille, François Xavier, Laure, Mathieu, Séverine, Audrey, Anne Sophie, Katia, Meryem, Paul, Kunga, Théo merci pour tous ces beaux souvenirs de soirées, d'apéros et de chalet-poule dans les Vosges, vous avez rendu la lorraine plus chaude de quelques degrés.

À tous mes supers co-internes actuels ou passés, sans vous l'internat n'aurait pas la même saveur, en espérant que l'ambiance positive et la convivialité continuera de vous animer, dans l'ordre : Catherine (ma première co interne en pneumo et première co interne à jamais. Tooooooh), Lavinia (chimooooon, c'est toi qui m'as tout appris en vrai), Lisa, Aurelie, Gioia Maud, Anne Charlotte (la plus courageuse des pédiatres), Camille (c'est toi qui a changé meuf), Chifaou, Basile (« ça va bien se passer ») Celso (le plus neuro des anapath, on peut toujours s'arranger...), Anne-Laure (disco-thérapeute et co interne de choc, Yep), Claire (alias professeur Chagot), Walid (La prince, futur propriétaire de l'OM), Clothilde (ma camarade de galère du Sud), Noémie (alias Nono), Guillaume (Pisché...AMS !), Thomas&Mathilde (je pouvais pas les séparer), Guillaume M. (alias docteur kiné) Nicolas, Julie, Nolwenn, Emmanuelle, Arnaud (alias Lardon), Mikael (mon bon Ferrand, toujours partant), Morgan (j'espère que tu ne feras pas ta lessive ce soir), Marion, Hélène (la « vieille » Ducroq).

À toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au sous-sol de central , Emmanuelle, Sophie, Liang, Florence, Marie Alexia, Laure, Gregory, Anne Laure, Romain, Remi, Omar, les 2 Mathieu, Gauthier, Christophe, François, Julia, Alexandre, Auriane, Caro, Alain, Christian, Laurence, Philippe, Steph, Marie-Jo, Martine, Amélie, Joris et les autres, vous formez une belle famille et c'est un plaisir de travailler avec vous je me souviendrais longtemps de nos gouters et de notre soirée de fin de stage.

*À toutes les infirmières, AS, ASH, secrétaires, kinés, ergo et orthophonistes qui sont le socle et l'âme de cet hôpital, merci d'avoir (souvent) couvert mes arrières !
Pour citer mes préférés Marilyn, Manon, Katia, Patricia, Nora Nicaise, Marie, Justine, Rosie, Adrian (encore de Metz ^^), Claudine, Claire, Laurie, Estelle, Sylvie, Marie, Cécile, Vincent, Claudie, Lola, Barbara, Theresa, Katia, Pascale, Marie O, Nathalie, Angélique, Mathilde ...
Pour ceux que j'oublie partez du principe que j'ai une mémoire défaillante et que je vous aime bien quand même*

SERMENT

« **A**u moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque ».

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

| | |
|--|-----------|
| <i>L'infarctus cérébral à heure inconnue et les méthodes de datation.....</i> | 18 |
| <i>Bases scientifiques pour datation biologique de l'infarctus cérébral par $gst-\pi/prdx1$.....</i> | 20 |
| <i>Résultats préliminaires de la méthode de datation de l'infarctus cérébral par $gst-\pi/prdx1$.....</i> | 24 |

ARTICLE

| | |
|---|-----------|
| Abstract..... | 34 |
| Introduction..... | 35 |
| Material and Methods | 36 |
| <i>PATIENT INCLUSION.....</i> | <i>36</i> |
| <i>DATA COLLECTION.....</i> | <i>37</i> |
| <i>STATISTICAL ANALYSIS.....</i> | <i>38</i> |
| <i>ETHICS.....</i> | <i>39</i> |
| Results..... | 39 |
| Discussion..... | 41 |
| Figures..... | 48 |
| Tables..... | 53 |
| Bibliography..... | 55 |
| CONCLUSION..... | 58 |
| Références bibliographiques..... | 63 |

PREMIERE PARTIE :

INTRODUCTION

1. L'INFARCTUS CÉRÉBRAL À HEURE INCONNUE ET LES MÉTHODES DE DATATION

L'infarctus cérébral à heure de début inconnue concerne un tiers des patients admis en phase aiguë. Il est défini par un horaire de début des symptômes ne pouvant être déterminé par l'anamnèse du patient. Il est classiquement représenté et réduit à l'accident vasculaire cérébral (AVC) du réveil mais concerne aussi de nombreux patients dont l'accident s'est produit en l'absence de témoin et dont l'état ne permet pas un interrogatoire avec pour seule donnée un large intervalle horaire déduit de la dernière heure où le patient aurait été vu sans symptôme (1, 2). Ce défaut d'information est dramatique puisqu'il exclut le patient des procédures de reperfusion artérielle qui représentent l'un des traitements majeurs pour améliorer le pronostic (3-6). Le danger est de restaurer la circulation cérébrale au-delà des délais admis (4,5 heures pour la thrombolyse intraveineuse, et 6 heures pour la thrombectomie) avec un risque accru de transformation hémorragique (7). Face à ce problème, les praticiens utilisent l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la comparaison des séquences Diffusion et FLuid-Attenuated Inversion Recovery (FLAIR) pour dichotomiser les patients : plus tôt ou plus tard que la limite horaire de 4,5 heures admise pour la thrombolyse intraveineuse. La séquence de diffusion démontre la présence de l'infarctus cérébral récent alors que ce dernier ne devrait apparaître sur la séquence FLAIR que 4 ou 4,5 heures suivant la survenue des symptômes. Le mismatch Diffusion/FLAIR est

alors déduit de la comparaison des deux séquences et défini par l'absence d'hyperintensité sur la séquence FLAIR due à l'infarctus diagnostiqué et délimité par la séquence de Diffusion. La mise en évidence du mismatch Diffusion/FLAIR serait un bon indicateur d'un infarctus de moins de 4,5 heures ainsi jugé dans la fenêtre horaire de la thrombolyse. Or, cette méthode reste imparfaite. Sa performance diagnostique a été évaluée par Thomalla *et al* montrant une sensibilité de 62% et une spécificité de 78% pour identifier des infarctus cérébraux de moins de 4,5 heures, et une sensibilité de 56% et une spécificité de 87% pour ceux de moins de 6 heures (Figure 1) (8). La conséquence directe est que l'on peut exclure à tort des patients dont l'âge de l'infarctus est encore comprise dans la fenêtre thérapeutique, ou poser abusivement l'indication thérapeutique au-delà des limites horaires admises avec un risque accru de transformation hémorragique. Face à ces arguments aucune méthode n'est actuellement validée pour dater l'infarctus cérébral à heure de début inconnue (9). De plus, beaucoup de centres dans le monde n'utilisent pas l'IRMc à la phase aiguë de l'AVC, ayant alors recours à la tomodensitométrie (TDMc) dont la datation de l'ischémie est encore plus imprécise. La solution serait d'apporter une méthode de datation complémentaire aux techniques d'imagerie afin d'atteindre la meilleure performance diagnostique possible pour identifier les infarctus dans les fenêtres horaires thérapeutiques des procédures de reperfusion artérielle.

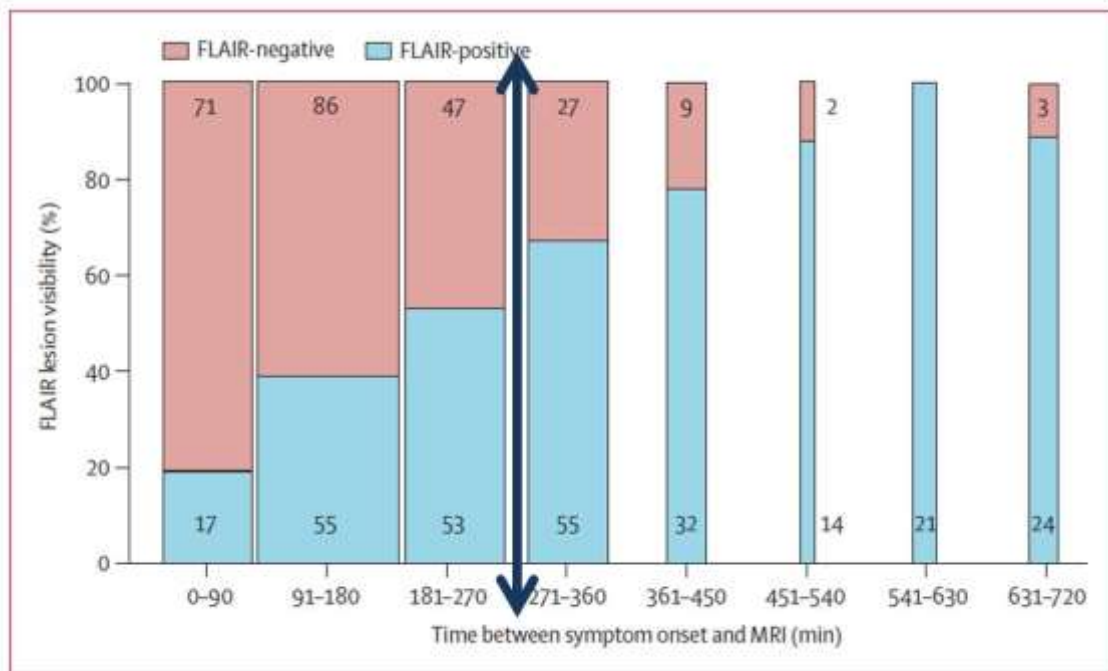


Figure 1. Mesure des pourcentages de patients présentant un mismatch diffusion/FLAIR positif et négatif en fonction du délai entre la survenue de l'infarctus cérébral et de la réalisation de l'IRMc.

Rose : Mismatch Diffusion/FLAIR positif, bleu : Mismatch Diffusion/FLAIR négatif, flèche : limite des 4,5 heures.

Figure issue de Thomalla G, Cheng B, Ebinger M, et al. DWI-FLAIR mismatch for the identification of patients with acute ischaemic stroke within 4.5 h of symptom onset (PRE-FLAIR): a multicenter observational study. *Lancet Neurol.* 2011;10:978-86.

2. BASES SCIENTIFIQUES POUR DATATION BIOLOGIQUE DE L'INFARCTUS CÉRÉBRAL PAR GST- π /PRDX1

Le Département des Sciences des Protéines Humaines (DSPH) du Centre Médico-Universitaire de Genève a étudié par technique de microdialyse l'augmentation des concentrations de certaines protéines au sein de l'infarctus cérébral (10). Parmi les protéines

identifiées, deux biomarqueurs avaient des concentrations significativement plus élevées dans le sang circulant des patients atteints d'AVC en comparaison aux contrôles. Il s'agit de deux enzymes impliquées dans le stress oxydatif : la glutathione S-transférase- π (GST- π) et la peroxyrédoxine 1 (PRDX1). Un premier travail publié en 2012 montrait une capacité de datation de la GST- π (11). Nous avons évalué dans ce travail le pouvoir de datation de la PRDX1.

La GST- π et la PRDX1 sont des enzymes ubiquitaires impliquées dans le stress oxydatif. Elles ont pour fonction la réduction des radicaux libres qui sont responsables des dommages des membranes lipidiques cellulaires et de l'ADN (12-15). Au cours de l'ischémie cérébrale il existe une induction de ces deux enzymes afin de répondre à la production de radicaux libres (16). La GST- π est l'enzyme prévalente de la famille des glutathione S-transferase classée en 8 sous-groupes (α , μ , θ , π , ζ , σ , κ et ω) (17). Son action par transfert de groupement glutathions sur des résidus cystéines est surtout décrite comme étant un acteur de la balance redox cellulaire. Cependant, elle agit aussi comme un régulateur de l'activité cellulaire par modification post-transcriptionnelle d'enzymes, de récepteurs et de facteurs de transcription (18-20). Les actions des peroxyrédoxines sont plus décrites dans la littérature et notamment concernant l'ischémie cérébrale. Le rôle de PRDX1 dans la réduction des radicaux libres est largement rappelé dans cette situation (16, 21). La PRDX1 est également induite dans les cellules endothéliales en situation d'ischémie cérébrale aiguë

et inhibe la production des molécules d'adhésion qui permettent le recrutement et la diapédèse des leucocytes responsables de l'inflammation au sein du parenchyme (22). Cependant d'autres travaux montrent que PRDX1 agit comme agent pro-inflammatoire avec pour exemple le titre évocateur « Peroxiredoxin sets the brain on fire » (23). La PRDX1 dans sa forme oxydée est libérée dans l'espace extracellulaire parenchymateux par les neurones et les cellules gliales en cours d'ischémie. Elle vient alors activer les monocytes, par l'intermédiaire de récepteurs TLR2 et 4, qui favorisent le recrutement des lymphocytes T pour initier et maintenir la cascade inflammatoire (Figure 2) (24). Quelque-soit leur rôle protecteur ou pro-inflammatoire dans l'ischémie cérébrale, tous ces éléments physiopathologiques expliquent un pic de concentration sanguine de GST- π et PRDX1 à la phase aiguë de l'infarctus cérébral : ceci par production des cellules endothéliales, par diffusion depuis l'espace extracellulaire au travers de la barrière hémato-encéphalique endommagée et depuis le liquide céphalorachidien.

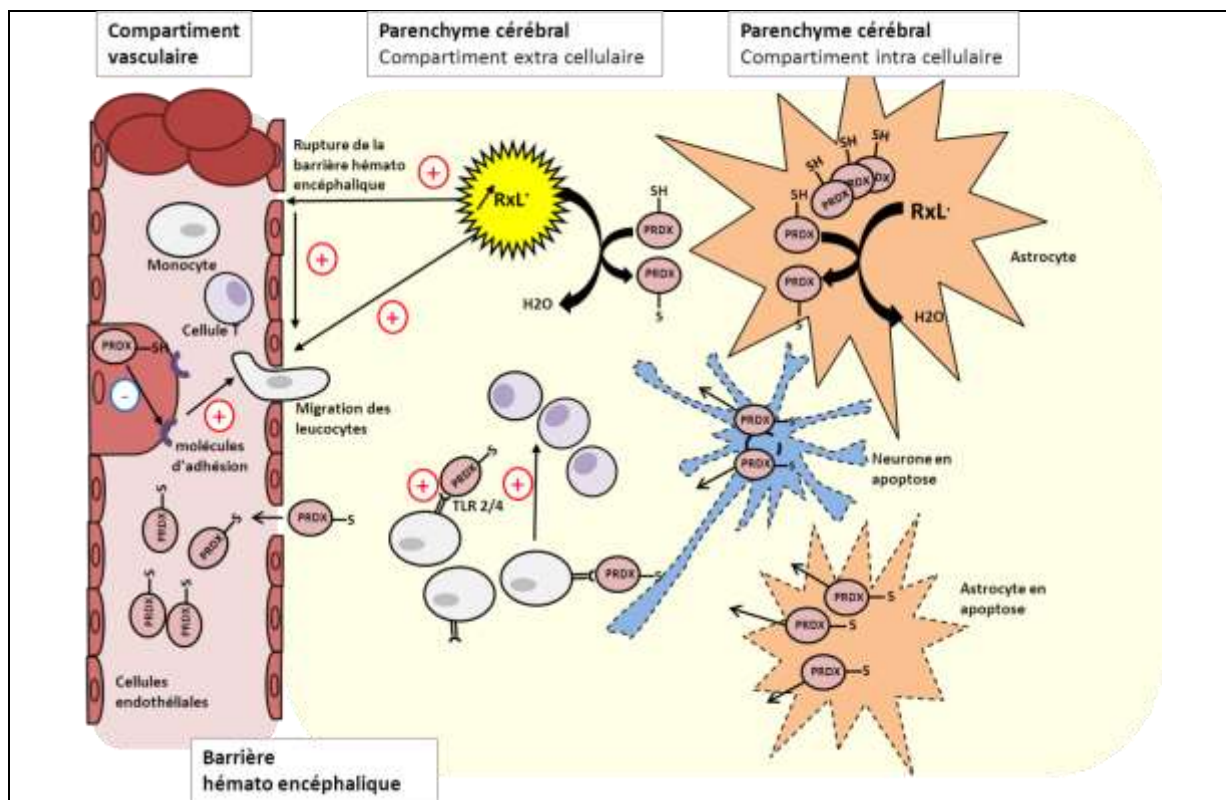


Figure 2. Différentes interventions de la peroxyrédoxine 1 (PRDX1) au décours de la phase aiguë de l'infarctus cérébral

Durant l'ischémie cérébrale, PRDX1 permet la réduction des radicaux libres et l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion responsables de la diapédèse des leucocytes dans le parenchyme cérébral. Cependant la forme oxydée de PRDX1 provenant des cellules gliales et des neurones en apoptose active les monocytes par les récepteurs TLR2 et 4 activant et entretenant l'inflammation. Les concentrations sanguines élevées de PRDX1 proviennent d'une production directe par les cellules endothéliales et d'une diffusion de l'espace extra cellulaire du parenchyme vers la lumière vasculaire au travers de la barrière hémato encéphalique endommagée.

PRDX1 : peroxyrédoxine 1, TLR 2/4: toll like receptors 2 and 4, RxL : radicaux libres.

Figure soumise à publication

3. RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES DE LA MÉTHODE DE DATATION DE L'INFARCTUS CÉRÉBRAL PAR GST- π /PRDX1

Les résultats concernant les capacités de datation de GST- π et PRDX1 proviennent de la même cohorte prospective de patients inclus au Centre Hospitalo Universitaire de Genève entre Décembre 2005 et Janvier 2008 (11). Il s'agissait de patients se présentant dans les 24 heures d'un infarctus cérébral à horaire déterminé et précis pour lesquels des prélèvements sanguins ont été réalisés à différents horaires. A noter qu'un groupe contrôle a aussi été constitué à partir de volontaires sains, de patients hospitalisés pour traitement orthopédique de fractures des membres ou pour une pathologie neurologique (sclérose en plaques, maladie de parkinson, migraines...) autre qu'un traumatisme crânien ou un évènement neurovasculaire. Les résultats concernant la GST- π ont été publiés en 2012 avec une performance diagnostique de la GST- π pour identifier les infarctus cérébraux de moins de 3 heures montrant une sensibilité de 68 % et une spécificité de 82 % (11). La performance diagnostique de GST- π pour l'identification des infarctus de moins de 6 heures n'avait pas été étudiée en 2012. Nous venons de répéter l'étude en s'intéressant cette fois à la PRDX1 et en reprenant les concentrations plasmatiques de GST- π observées.

Les résultats proviennent certes d'une cohorte modeste incluant 109 individus dans la population contrôle, pour lesquels un prélèvement sanguin unique a été réalisé et 37

patients avec infarctus cérébral avec réalisation de 82 prélèvements dont 32 dans les 3 premières heures, 7 entre 3 et 6 heures et 43 entre 6 et 24 heures.

Nous avons mis en évidence :

1. Des concentrations plasmatiques de PRDX1 et GST- π significativement plus élevées chez les patients avec infarctus cérébral en comparaison avec les témoins que ce soit pour l'ensemble des prélèvements (Figure 3) ou à partir des 3 fenêtres horaire (Figure 4). Une comparaison des caractéristiques démographiques et de la prévalence des facteurs de risque vasculaire entre la population contrôle et les patients AVC a été réalisée. La fibrillation auriculaire a été plus fréquemment trouvée chez les patients AVC ($p < 0.01$). Les concentrations élevées de PRDX1 et GST- π restent indépendamment associées à l'infarctus cérébral après ajustement à la fibrillation auriculaire. A noter que parmi les patients avec infarctus cérébral, 15 patients (40%) ont bénéficié de procédures de reperfusion artérielles cérébrales. Les niveaux de concentrations des 2 biomarqueurs ne sont pas différents entre patients traités par procédures de reperfusion et ceux qui ne le furent pas.

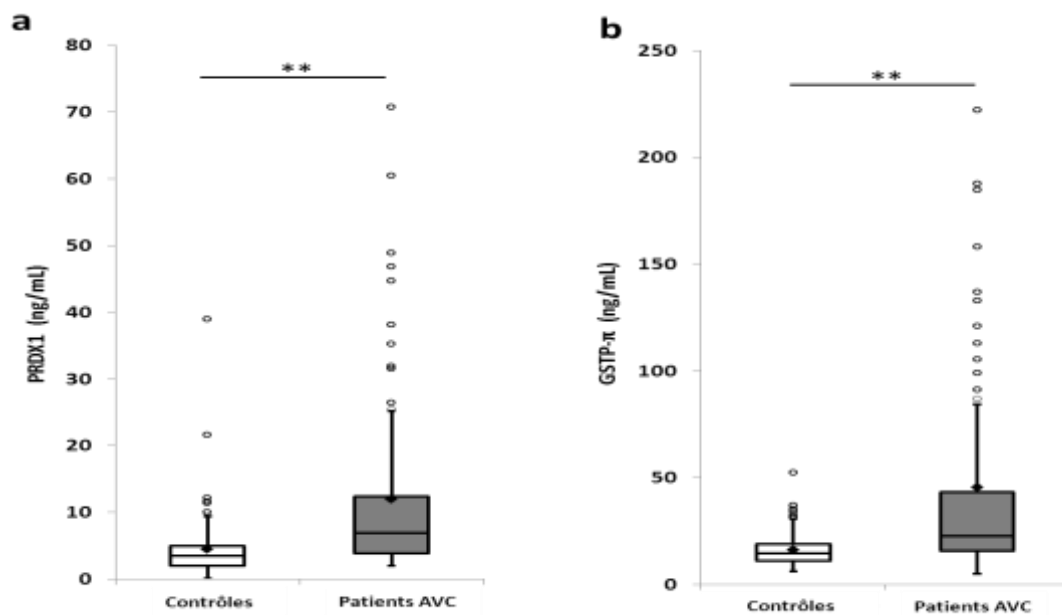


Figure 3. Concentrations plasmatiques de peroxyrédoxine 1 (a) et de glutathione s-transferase π (b) dans la population contrôle (Contrôles) et chez les patients avec infarctus cérébral (patients AVC)

Boîtes de Tukey, limites de la boîte : distance interquartile (IQR), ligne dans la boîte : médiane, lignes horizontales : valeurs adjacentes (quartile 1 - 1,5 IQR ; quartile 3 + 1,5 IQR), losange : moyenne, points : valeurs extrêmes isolées.

PRDX1: Peroxyrédoxine 1, GST- π : glutathione s-transferase π , **: différence significative (Mann-Whitney) entre les contrôles et les patients AVC, $p < 0,01$. (données soumises à publication)

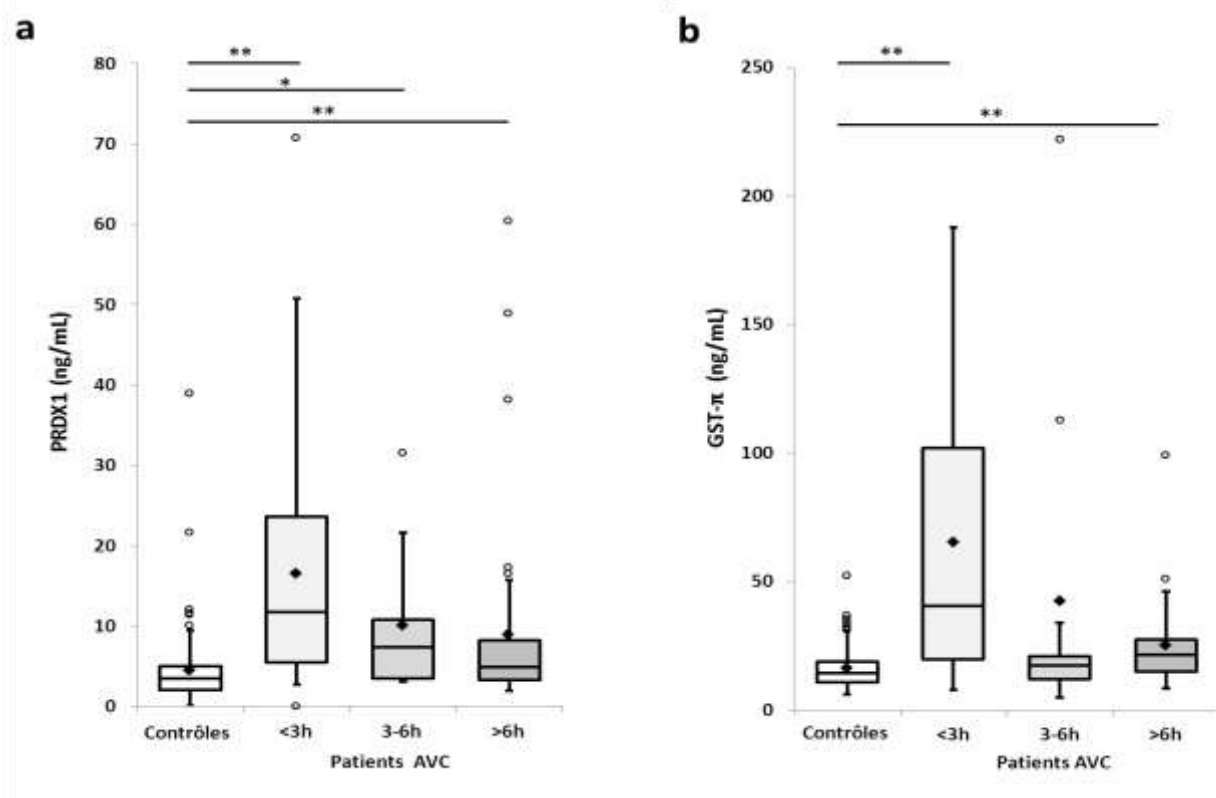


Figure 4. Concentrations plasmatiques de la peroxyredoxine 1 (a) et de la glutathione s-transferase π (b) dans la population contrôle (Contrôles) et chez les patients avec infarctus cérébral (patients AVC) pour les différentes fenêtres horaires

Boîtes de Tukey, limites de la boîte : distance interquartile (IQR), ligne dans la boîte : médiane, lignes horizontales : valeurs adjacentes (quartile 1 – 1,5 IQR ; quartile 3 + 1,5 IQR), losange : moyenne, points : valeurs extrêmes isolées.

PRDX1: Peroxyrédoxine 1, GST- π : glutathione s-transferase π , <3h: prélèvements dans les 3 premières heures, 3-6h: prélèvements entre 3 et 6 heures, >6h: prélèvements après 6 heures suivant la survenue de l'infarctus cérébral, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$. (données soumises à publication)

2. des concentrations significativement plus élevées avant 3 heures vs. après 3 heures pour PRDX1 et GST- π , ainsi que avant 6 heures vs. après 6 heures mais seulement pour PRDX1 (Figure 5). Ceci après dichotomisation des prélèvements avant et après 3 heures, puis avant et après 6 heures suivant la survenue de l'infarctus cérébral. Le pic de concentrations des 2 biomarqueurs serait donc situé dans les premières heures qui suivent la survenue de l'infarctus cérébral.

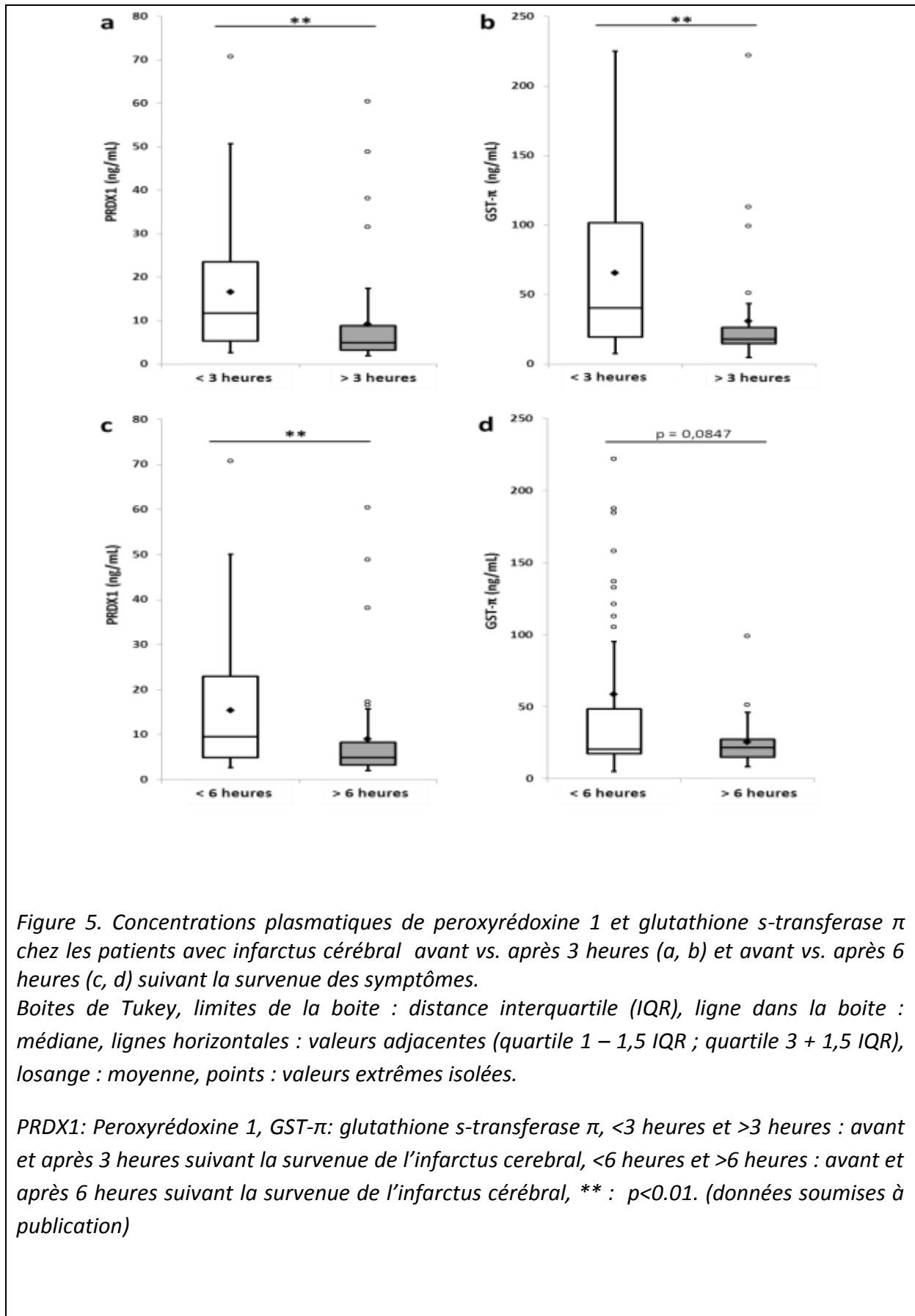


Figure 5. Concentrations plasmatiques de peroxyrédoxine 1 et glutathione s-transferase π chez les patients avec infarctus cérébral avant vs. après 3 heures (a, b) et avant vs. après 6 heures (c, d) suivant la survenue des symptômes.

Boîtes de Tukey, limites de la boîte : distance interquartile (IQR), ligne dans la boîte : médiane, lignes horizontales : valeurs adjacentes (quartile 1 – 1,5 IQR ; quartile 3 + 1,5 IQR), losange : moyenne, points : valeurs extrêmes isolées.

PRDX1: Peroxyrédoxine 1, GST- π : glutathione s-transferase π , <3 heures et >3 heures : avant et après 3 heures suivant la survenue de l'infarctus cérébral, <6 heures et >6 heures : avant et après 6 heures suivant la survenue de l'infarctus cérébral, ** : $p < 0.01$. (données soumises à publication)

3. La performance diagnostique de PRDX1, au moyen d'une analyse ROC, comme cela avait déjà été fait précédemment pour la GST- π (11). Le dosage plasmatique de PRDX1 montre une sensibilité de 53% et une spécificité de 86% pour identifier les infarctus cérébraux de moins de 3 heures, et une sensibilité de 49% et une spécificité de 88% pour identifier les infarctus cérébraux de moins de 6 heures. Sensibilité et spécificité ont été calculées à partir de l'indice de Youden (Figure 6).

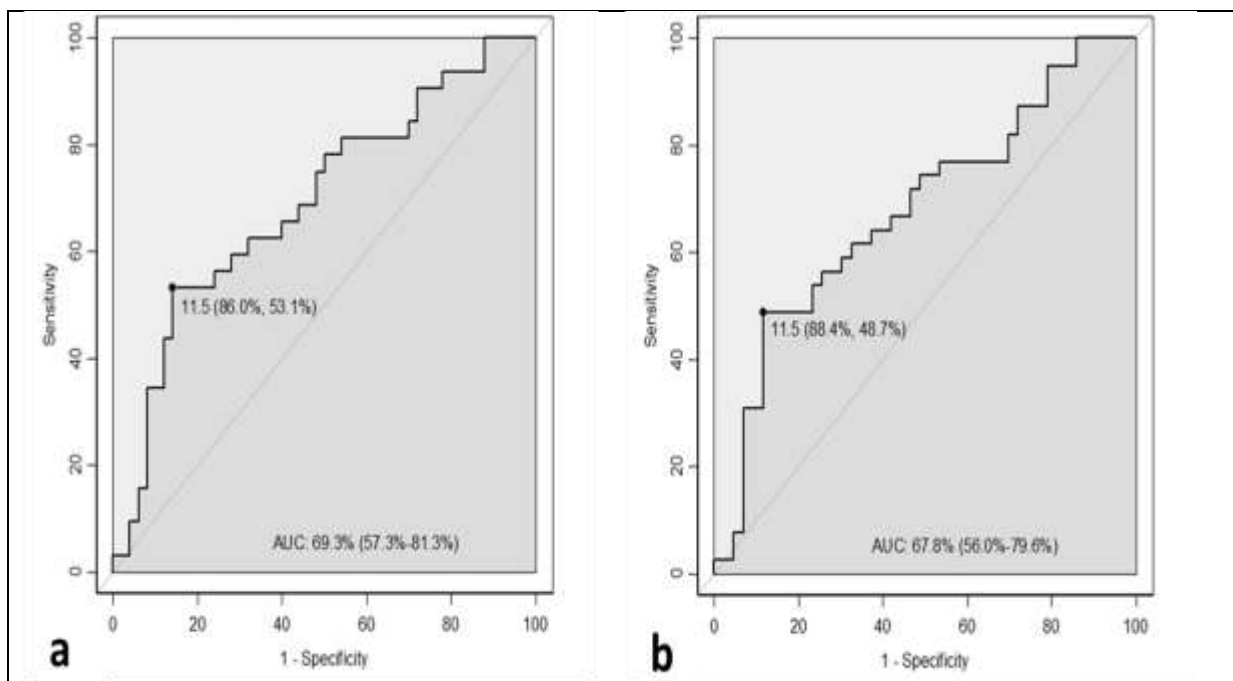


Figure 6. Performance diagnostique de peroxyrédoxine 1 pour le diagnostic des infarctus cérébraux de moins de 3 heures (a) et de moins de 6 heures (b) par analyse ROC

Seuil (spécificité, sensibilité par indice de Youden), AUC : aire sous la courbe (intervalle de confiance à 95%).(données soumises à publication)

Notre étude préliminaire a pour limite majeure un nombre restreint de patients et de prélèvements dans les différentes fenêtres horaire-en particulier entre 3 et 6 heures après la survenue de l'AVC. Ceci contribue à la dispersion des résultats et entraîne un défaut de discrimination des infarctus de moins de 3 heures de ceux de moins de 6 heures. De plus, ceci ne nous a pas permis d'évaluer la combinaison des performances diagnostiques obtenues pour GST- π et PRDX1. Les patients inclus dans cette cohorte ont été évalués le plus souvent par TDMc conduisant à un manque d'informations importantes comme le mismatch diffusion/FLAIR et le volume de l'infarctus cérébral. La limite horaire choisie de 3 heures n'est pas la plus pertinente et nous devons nous attacher à identifier les infarctus de moins de 4,5 heures. Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de corrélation entre la gravité de l'accident vasculaire cérébrale mesuré par le score National Institute of Health Stroke Score (NIHSS) et le niveau de concentration des biomarqueurs. Cependant ce point devra être à nouveau vérifié en incluant le volume de l'infarctus.

La meilleure stratégie pour obtenir une méthode de datation de l'infarctus cérébral serait combiner les performances des 2 biomarqueurs envisagés, puis ensuite avec d'autres intervenant à des temps différents (molécules d'adhésion, marqueurs de l'inflammation et de nécrose). Il serait également intéressant de mesurer la performance diagnostique de datation de l'infarctus cérébral d'une méthode alliant des critères biologiques (biomarqueurs) et radiologiques (mismatch diffusion/FLAIR).

DEUXIEME PARTIE:
ARTICLE

Diagnostic performance of peroxiredoxin 1 and glutathione s-transferase π to determine time-of-onset of acute cerebral infarction

Sébastien Richard^{1,2,3*†}, Vanessa Lapierre^{3†}, Nicolas Girerd², Mathieu Bonnerot¹, Pierre R.

Burkhard⁴, Linnéa Lagerstedt³, Serge Bracard⁵, Marc Debouverie¹, Natacha Turck³ and Jean-

Charles Sanchez³.

¹ Department of Neurology, Stroke Unit, University Hospital of Nancy, 54035 Nancy, France

² Centre d'Investigation Clinique Plurithématique Pierre Drouin, University Hospital of Nancy, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

³ Department of Human Protein Sciences, University Medical Center, 1206 Geneva, Switzerland

⁴ Department of Neurology, University Hospital of Geneva, 1205 Geneva, Switzerland

⁵ Department of Neuroradiology, University Hospital of Nancy, 54035 Nancy, France

* Corresponding author

†: These authors contributed equally to this work

Article submitted to *Scientific reports*

Abstract

Accurately determining time-of-onset of cerebral infarction is important to clearly identify patients who could benefit from reperfusion therapies. We assessed the kinetics of peroxiredoxin 1 (PRDX1) and glutathione s-transferase π (GST- π), proteins involved in oxidative stress during the acute phase of ischemia, and their ability to determine stroke onset in a population of patients with known onset of less than 24 hours and in a control group. Median PRDX1 and GST- π levels were significantly higher in stroke patients compared to controls. Levels of both proteins were also higher from blood samples withdrawn before vs. after 3 hours following stroke onset, and before vs. after 6 hours for PRDX1 only. ROC analysis was performed to assess diagnosis performance of biomarkers to identify cerebral infarction occurring < 3 hours (PRDX1: area under the curve (AUC)=69%, sensitivity (Se)=53% and Specificity (Sp)=86%; GST- π : AUC=72%, Se=54%, Sp=89%) and < 6 hours (PRDX1: AUC=68%, Se=49%, Sp=88%; GST- π : AUC=63%, Se=43%, Sp=92%). These first results suggest PRDX1 and GST- π levels could be the basis of a new method of cerebral infarction dating.

Keywords

Acute cerebral infarction, biomarker, , glutathione s-transferase, peroxiredoxin 1, stroke

Introduction

While cerebrovascular biomarkers have been widely used to diagnose, define the severity and predict prognosis of patients with cerebral ischemia(1,2), only one study has assessed their kinetic at the acute phase of stroke (3). However, this could be an interesting field of research as many proteins are synthesized, released and activated during this period. Moreover, it would help to answer an important clinical question: how to accurately determine the time-of-onset of acute ischemic stroke in patients of unknown onset so as to perform reperfusion therapies within recommended time windows. In current clinical practice, physicians attempt to determine time of onset using cerebral magnetic resonance imaging (MRI) and the diffusion/fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) mismatch. However, this method is not completely reliable (4). Furthermore, an increasing number of centers worldwide use CT scan which is less accurate than MRI assessment of onset during the acute phase of stroke. However, no specific method of dating cerebral ischemia is recommended to decide on thrombolysis in patients with stroke of unknown onset (5). Thus, finding a new method complementary to MRI or CT scan could result in clear guidelines or recommendations for the evaluation of cerebral infarction of unknown onset. Dayon *et al.* observed the presence of high levels of two enzymes involved in oxidative stress, peroxiredoxin 1 (PRDX1) and glutathione s-transferase π (GST- π), in the serum of patients with cerebral infarction (6). Moreover, GST- π levels were found to be associated

with stroke onset in a prospective cohort of patients with acute ischemic stroke (3). From a prospective cohort of patients with ischemic stroke at precise onset from whom blood samples were withdrawn at different time, we studied the kinetics of PRDX1 and GST- π and their diagnostic performance to identify cerebral infarction of less than 3 and 6 hours.

Material and Methods

Patient inclusion

Patients from Geneva university hospital were prospectively included over a period of two years (1st December 2005 to 1st January 2008).

The inclusion criteria for patients were: age > 18 years; diagnosis of cerebral infarction following neurological examination and cerebral imaging (MRI or CT scan); known and precise time of first symptoms within the first 24 hours following onset; and consent (from patient or relatives) to take part in the study. The exclusion criteria were: pregnancy; known oncological disease; cirrhosis; renal failure; myocardial infarction or medical history of stroke of less than 3 months; ongoing treatment with neuroleptics and lithium; hemorrhagic stroke; subarachnoid hemorrhage; all cerebral traumatic lesions (including subdural, epidural, parenchymal hematoma and contusions); Inclusions were not consecutive depending of the presence of medical and paramedical staff in charge of the study (from Monday to Friday during usual working hours).

A control group was constituted from patients with no history of cerebrovascular disease. They were healthy volunteers, patients admitted for limbs fractures without any neurological lesion, and patients from the Neurology department admitted for multiple sclerosis, Parkinson disease or migraine.

Data Collection

Cerebral infarction was diagnosed following evaluation by a neurologist and time of stroke onset was precisely specified from patient, relatives and/or first medical assistance interview. Demographic and clinical data were collected including sex, age, vascular risk factors (hypertension, diabetes mellitus, tobacco consumption), medical history of atrial fibrillation and coronary heart disease, and National Institute of Health Stroke Score (NIHSS) at admission. Use of reperfusion therapies was also noted.

Following inclusion, patients underwent blood withdrawals within different times: during the first 3 hours, between 3 and 6 hours, and after 6 hours following stroke onset. The number of blood withdrawal depended on the time of inclusion and the presence of the paramedical staff in charge of the study. Patients from the control group underwent only one blood withdrawal.

GST- π and PRDX1 plasma levels were determined for each blood sample in the Department of Human Protein Sciences of the Medical Center of Geneva as previously described for GST- π (3) and using the PRDX1 (Human) ELISA kit, Abnova. All measurements were blinded. The

reproducibility of the assay was assessed by determining intra- and inter-run coefficients of variation.

Statistical analysis

All analyses were carried out using IBM SPSS Statistics software, version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Continuous variables were described as median, mean \pm standard deviation, categorical factors as frequency and percentage.

To identify differences of PRDX1 and GST- π levels in stroke patients vs. controls, first comparison was performed between both groups for clinical characteristics and biomarkers levels (overall and for each time window) using Mann-Whitney U test, Chi-Square test and Fisher's exact test when appropriate. PRDX1 and GST- π levels were adjusted for clinical characteristics found to be statistically different between both groups. In the stroke patients, biomarkers levels were also compared for those who had been treated with reperfusion therapies vs. those who had not using the Mann-Whitney U test.

To identify an influence of the NIHSS score on PRDX1 and GST- π levels, stroke patients were divided in four quartiles according to their NIHSS score at admission and biomarker levels compared using Kruskal-Wallis test.

To identify significant differences in PRDX1 and GST- π levels in stroke patients from blood samples withdrawn before vs. after 3 hours, and before vs. after 6 hours following onset,

biomarker levels were dichotomized (<3 vs. >3 hours, and <6 vs. >6 hours) and compared using Mann-Whitney U test.

To assess diagnostic performance of PRDX1 and GST- π to identify cerebral infarction of less than 3 hours and less than 6 hours, ROC analysis was performed to determine the area under the curve (AUC) and 95% interval confidence (95%CI), sensitivity (Se) and specificity (Sp) using the Youden index, and related threshold.

Significant difference was defined as $p < 0.05$.

Ethics

This study was approved by the Ethics Committee of the N.A.C. (Neuclid, Apsic, Chirurgie) Department of the Geneva University Hospitals (study CER05–026 (05–058)). It was carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. Each patient, or a legally authorized representative, was informed about the study and gave consent to participate.

Results

Thirty-seven patients with ischemic stroke were included from whom 82 blood samples were withdrawn: 32 samples during the first 3 hours, 7 between 3 and 6 hours, and 43 after 6 hours following stroke onset. One hundred and nine patients constituted the control group (4 healthy volunteers, 51 with various neurological disease other than stroke, and 54 patients admitted for orthopedic conditions). The characteristics of stroke patients and the

control population are summarized in table 1. The only significant difference between the two groups was the prevalence of atrial fibrillation ($p < 0.01$).

Intra- and inter-run coefficients of variation of PRDX1 plasma level measurements were below 15%. Overall PRDX1 and GST- π median levels were significantly higher in stroke patients than in control population: respectively 6.9 ± 13.7 vs. 3.5 ± 4.5 ng/mL ($p < 0.01$) and 22.7 ± 50.7 vs. 14.5 ± 7.6 ng/mL ($p < 0.01$) (figure 1, table 2) and this difference remained significant after adjustment for atrial fibrillation. No significant difference for PRDX1 ($p = 0.38$) and GST- π levels ($p = 0.06$) were found between the groups of stroke patients classified according to the NIHSS score at admission.

Median PRDX1 levels were significantly higher in the < 3 hours (11.7 ± 15.6 ng/mL, $p < 0.01$), 3-6 hours (7.3 ± 10 ng/mL, $p < 0.05$), and > 6 hours (4.9 ± 11.9 ng/mL, $p < 0.01$) time windows in stroke patients than in the control population (figure 2a). Median GST- π levels were significantly higher in the < 3 hours (40.5 ± 57 ng/mL, $p < 0.01$), and > 6 hours (21.5 ± 18.9 ng/mL, $p < 0.01$) time windows in stroke patients than in the control population (figure 2b).

Biomarker levels were not different in the stroke patients treated with reperfusion therapies or not, for all samples (PRDX1: 32 ± 5.1 ng/mL vs. 50 ± 7.6 ng/mL, $p = 0.19$; GST- π : 23 ± 38.7 ng/mL vs. 38 ± 19.8 ng/mL, $p = 0.07$), and in each time window (data not shown).

In the stroke patients, median PRDX1 and GST- π levels were significantly higher in blood samples withdrawn before vs. after 3 hours following onset (PRDX1: 11.7 ± 15.6 ng/mL vs. 5

± 11.6 ng/mL, $p < 0.01$ and GST- π : 40.5 ± 57 ng/mL vs. 18.2 ± 40.2 ng/mL, $p < 0.01$) (figures 3a and 3b, table 2). Only PRDX1 levels were significantly higher in blood samples withdrawn before vs. after 6 hours following onset (9.6 ± 14.9 ng/mL vs. 4.9 ± 11.9 ng/mL, $p < 0.01$) (figures 3c and 3d, table 2).

The diagnostic performance of PRDX1 and GST- π levels to identify cerebral infarction of less than 3 and 6 hours are represented by ROC curves in figure 4. ROC analysis to identify cerebral infarction of less than 3 hours gave for PRDX1 an AUC of 69% (95%CI: 57-81%), a Se of 53% and a Sp of 86%, for GST- π an AUC of 72% (95%CI: 58-85%), a Se of 54% and a Sp of 89% (figures 4a and 4b, table 2). For identification of cerebral infarction of less than 6 hours diagnosis performance of PRDX1 gave an AUC of 68% (95%CI: 56-80%), a Se of 49% and a Sp of 88%, and for GST- π an AUC of 63% (95%CI: 49-77%), a Se of 43% and a Sp of 92% (figures 4c and 4d, table 2).

Discussion

The results of our study show that PRDX1 and GST- π levels are high during the first hours following stroke onset suggesting that it could play a role in identifying patients with cerebral infarction who fall within the therapeutic window for reperfusion therapies. One third of patients with cerebral infarction are admitted with unknown time onset (7,8). As a result they cannot benefit from thrombolysis which is considered as one of the main

treatment to improve outcome at the acute phase of ischemic stroke. Reperfusion therapies administered after the accepted cut-off could expose patients to serious hemorrhagic transformation. The main objective of a method to accurately specify the time of the stroke is therefore to exclude with certainty patients who do not fall within this therapeutic window. This means the highest Sp is required for a method to identify patients within the therapeutic window. The current radiological method of estimating stroke onset time (Diffusion/FLAIR mismatch) has been evaluated by Thomalla *et al.* (2) who found an Se of 62% and an Sp of 78% to identify cerebral infarction of less than 4.5 hours and a Se of 56% and a Sp of 87% for less than 6 hours. Diagnosis performances of PRDX1 and GST- π levels are comparable even if we worked on a window of less than 3 hours instead of 4.5 hours. The identification of proteins with kinetics associated with cerebral infarction onset could improve the diagnostic performance of cerebral MRI by means of a combined strategy. Concerning our first results, diagnostic performance are about equal for GST- π and PRDX1 to identify cerebral infarction of less than 3 hours and PRDX1 seems to have the highest ability for cerebral infraction of less than 6 hours.

PRDX-1 and GST- π belong to the antioxidant enzymes involved in the neutralization of reactive oxygen species (ROS) resulting from oxidative stress (9,10). Their induction and activation at different levels of cerebral infarction and inflammation, mainly described for peroxiredoxins, explain high serum levels observed in stroke patients by Dayon *et al.* and in

our study (6). ROS are responsible for alteration of membrane lipids, proteins and DNA (11). Their production rises with cerebral ischemia and even during reperfusion promoting neuronal death (12). In this context, antioxidant enzymes convert ROS into less reactive components (13). GST- π is the most prevalent isozyme in the multi-gene family of glutathione S-transferases classified in 8 subcategories. The encoding gene is located on the chromosome 11 (14). GST- π is firstly reported as an antioxidant agent through reaction with ROS, highly participating in the balance of cellular redox homeostasis. However, its action is more complex. Glutathionylation promoted by GST- π leads to post-translational modifications and regulation of proteins as enzymes, receptors and transcription factors (15). GST- π is able to inhibit mitogen-activated kinases, and consequently inflammatory reactions and apoptosis (16,17). It has been known as a potential mechanism of drug resistance in cancer (15). GST- π repartition is also ubiquitous but implication during cerebral infarction and inflammation is less described as peroxiredoxins. Peroxiredoxins are abundant and ubiquitous proteins with a cysteine residue near the N-terminal portion which interact with ROS and reduce their activity. The gene encoding PRDX1 is located on the human chromosome 1p34 (18). Ischemia would induce PRDX1 production in the brain in response to oxidative stress to reduce ROS and enhance production of antioxidant agents (19). It has been suggested that induction of peroxiredoxins reduces the ischemic area in animal models of stroke (20). Moreover, in models of cerebral inflammation, PRDX1 induced by oxidative

stress protects the integrity of the blood brain barrier and prevent expression of cell adhesion molecules which mediate leucocyte migration into the parenchyma (21). On the contrary, oxidized peroxiredoxins released into extracellular spaces following neuronal death enhance inflammation inherent to stroke and are held responsible for extension of infarction (22). They act as damage-associated molecular pattern molecules activating macrophage through toll like receptors 2 and 4, then recruit T cells and finally maintain the inflammation cascade (23) (figure 5). Overall, whether their actions are favourable or not, these data support increased levels of PRDX1 during cerebral ischemia. The presence of both biomarkers in the blood would be the result of a direct production by endothelial cells, diffusion from the cerebrospinal fluid and the extracellular space due to disruption of blood brain barrier (3,6). PRDX1 production is usually described as a secondary reaction to cerebral infarction occurring 12 hours after onset (23). However in our study, the highest levels of PRDX1 and GST- π are found in the first 3 hours followed by a decrease.

We recognize some limitations of this first study. The studied time windows do not allow us to conclude on the diagnostic performance of PRDX1 and GST- π to identify cerebral infarction of less than 4.5 hours which is the therapeutic window of intravenous thrombolysis for most patients suffering from ischemic stroke. Furthermore, the sample size was small and we had insufficient human resources to systematically withdraw blood for each time window and in particular between 3 and 6 hours where we had few samples. This

mainly explains the distribution of biomarker values in the various subgroups and the lack of discrimination to differentiate cerebral infarctions of less than 3 hours from those of less than 6 hours. Moreover, it prevents us from combining the PRDX1 and GST- π results to assess the timing ability of a panel which is the best strategy to improve diagnostic performance of a biologic method. However, we can hypothesize that the function of both biomarkers during stroke are too similar and concurrent to be complementary in estimating time of cerebral infarction. Although we did not find significant increase of biomarker levels in patients with elevated NIHSS score, we believe that the severity of a stroke assessed by clinical and radiological criteria has to be taken account in interpreting biomarker levels. Most of our stroke patients were examined with cerebral CT scan leading to a lack of important information as infarction volume and diffusion/FLAIR mismatch.

To address these issues, we plan further studies including highest number of patients with standardized cerebral imaging (MRI with assessment of diffusion/FLAIR mismatch and infarction volume) and systematic blood withdrawals in different and narrower window times. We will also assess the influence of criteria of severity (NIHSS score, stroke volume) on biomarker levels. Furthermore, it would be of high interest to combine the diagnostic performance of PRDX1 and GST- π along with other proteins released or activated at different times during cerebral ischemia and inflammation. In this way, the diagnostic performance of necrosis markers such as S100b or other proteins involved at different stage

of inflammation as cell adhesion molecules will be explored (24,25). In addition, a combination of a future biologic method with the radiological diffusion/FLAIR mismatch method could represent the most interesting panel. However, the practical application of a biologic time estimation method to safely administer reperfusion therapies to patients with ischemic stroke of unknown onset will not be possible without rapid bedside evaluation of biomarkers levels. To meet this requirement, we plan to introduce a rapid decentralized method of protein measurement (ref).

In conclusion, this analysis of the kinetics of proteins involved in oxidative stress during stroke showed that they could be the basis of a biological method of estimating time of cerebral infarction. These preliminary results have to be confirmed in a larger study. .

Moreover, other biomarkers of cerebral infarction and inflammation should be explored to complete the findings. A combination of biologic and radiologic approaches could constitute a way of identifying stroke patients who can safely be administered reperfusion therapies.

This would lead to recommendations for the evaluation of patients with ischemic stroke of unknown onset.

Acknowledgements

Felicity Neilson, Matrix Consultants, for having reviewed the English language with scientific expertise.

Figures

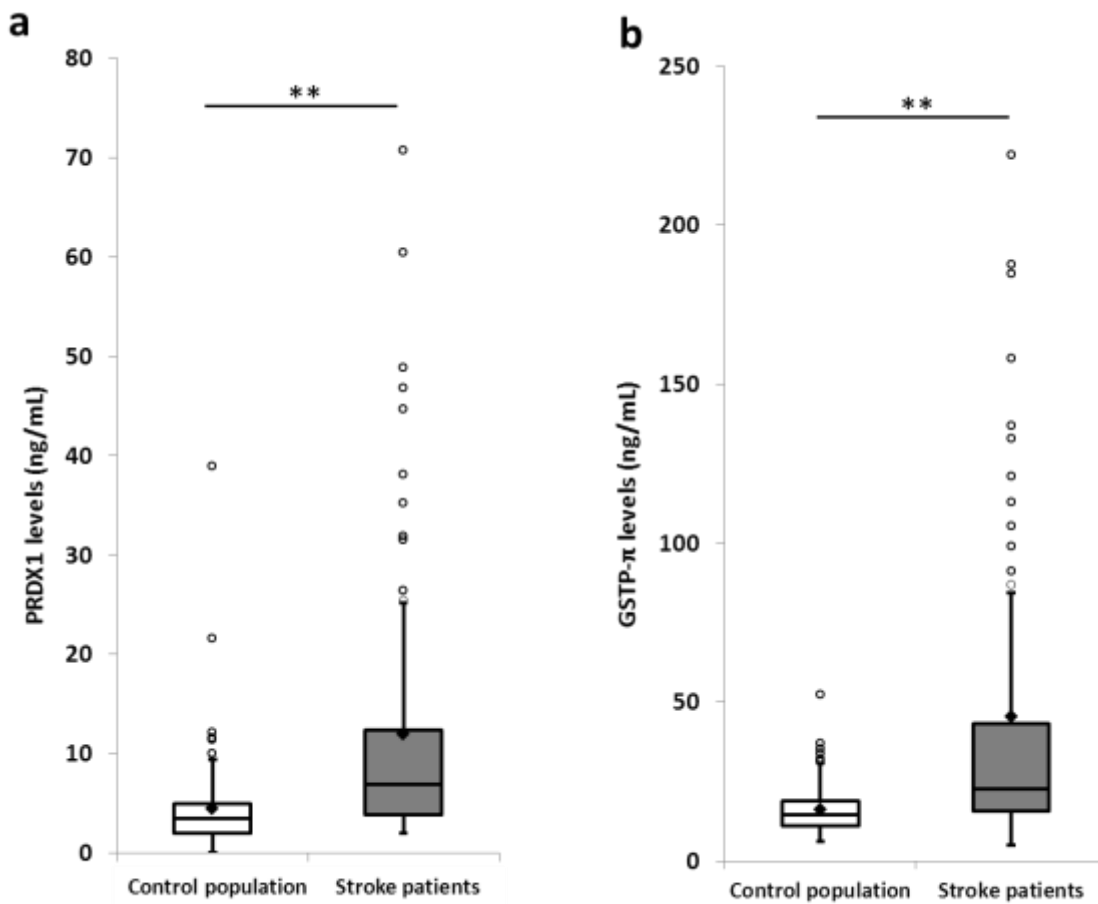


Figure 1. Peroxiredoxin 1 (a) and glutathione s-transferase π (b) levels in the control population and stroke patients

Tukey's box-and-whisker plots, box limits: interquartile range (IQR), middle line: median, diamond: mean, vertical lines: adjacent values (1st quartile - 1.5 IQR; 3rd quartile + 1.5 IQR), dots: outliers.

Peroxiredoxin 1 and glutathione s-transferase π levels from 109 collections in control population and 82 collections from stroke patients.

PRDX1: Peroxiredoxin 1, GST- π : glutathione s-transferase π , **: $p < 0.01$.

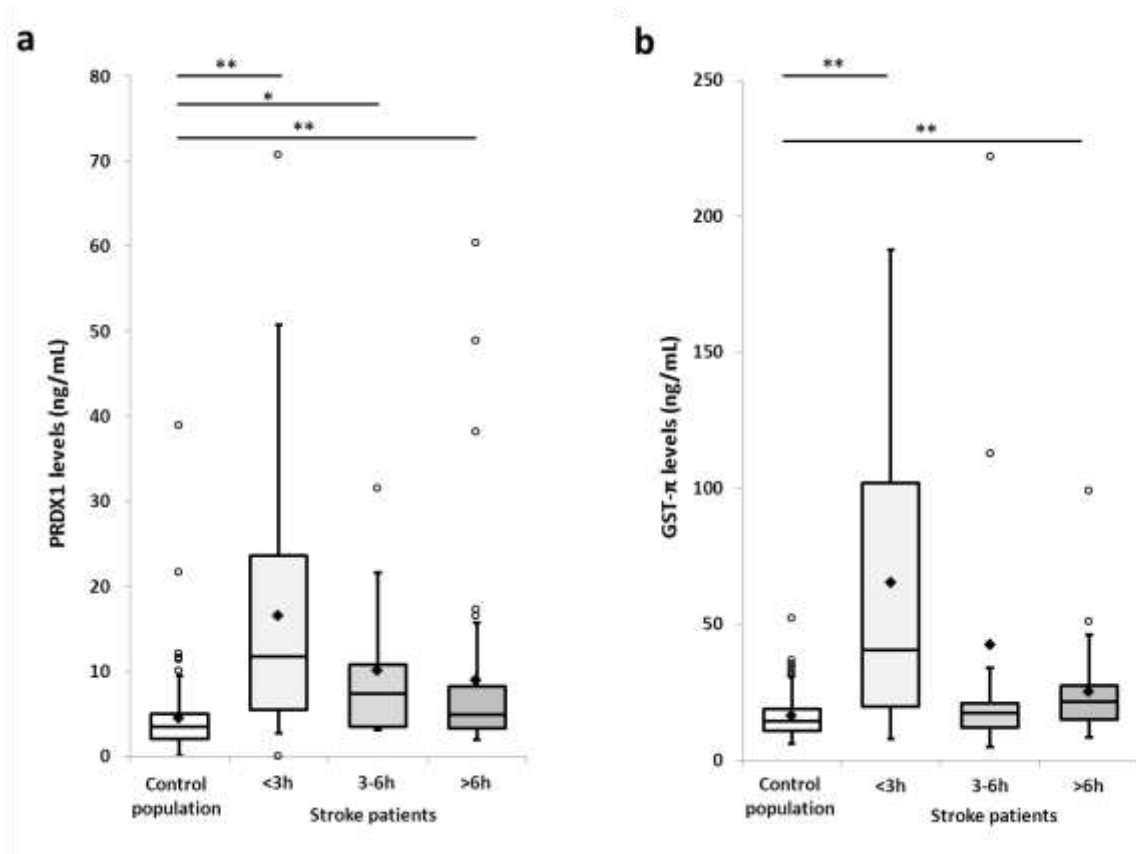


Figure 2. Peroxiredoxin 1 (a) and glutathione s-transferase π (b) levels in control population and stroke patients per time window

Tukey's box-and-whisker plots, box limits: interquartile range (IQR), middle line: median, diamond: mean, vertical lines: adjacent values (1st quartile - 1.5 IQR; 3rd quartile + 1.5 IQR), dots: outliers. Biomarker levels from 109 collections in control population and 82 collections from stroke patients (32 samples during the first 3 hours, 7 samples between 3 and 6 hours, and 43 samples after 6 hours following stroke onset).

PRDX1: Peroxiredoxin 1, GST- π : glutathione s-transferase π , < 3h: within the first 3 hours, 3-6h: between 3 and 6 hours, > 6h: after 6 hours following stroke onset, *: p<0.05, **p<0.01.

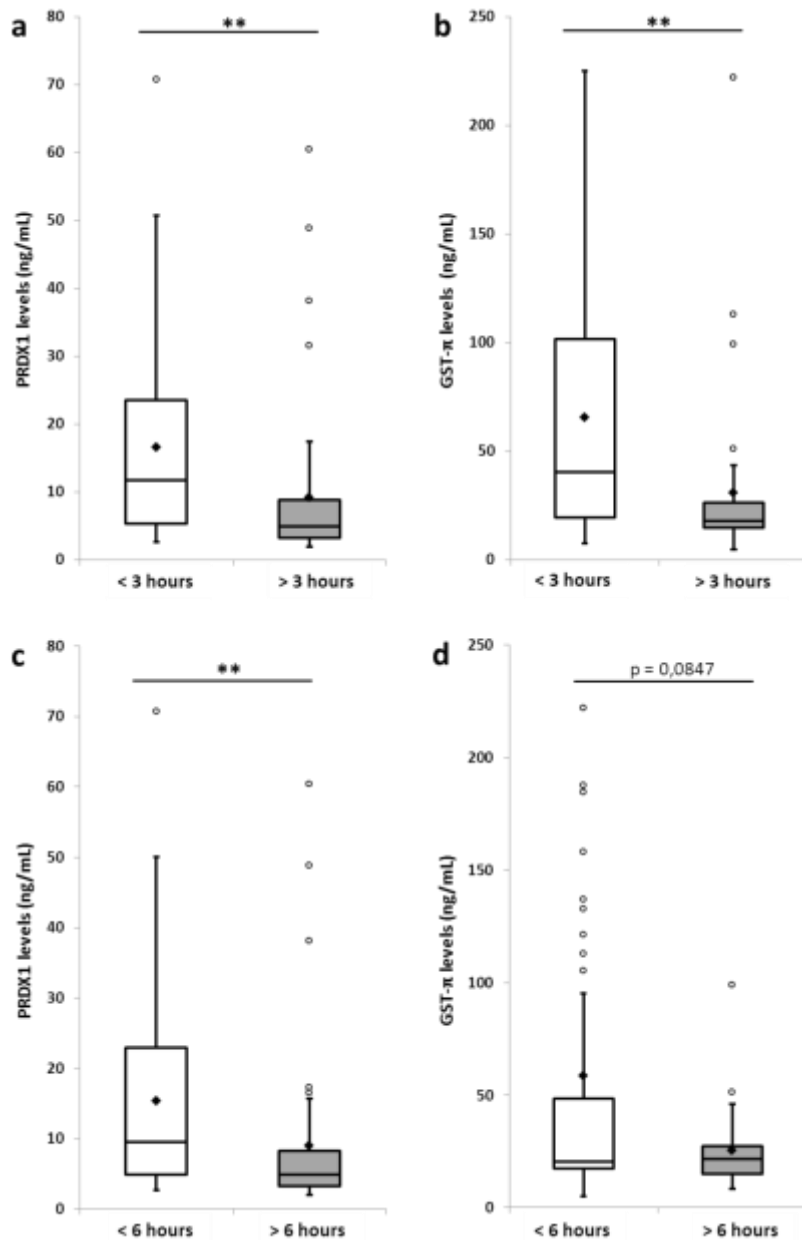


Figure 3. Peroxiredoxin 1 and glutathione s-transferase π levels in stroke patients before and after 3 hours (a, b) and before and after 6 hours (c, d) following onset of cerebral infarction

Tukey's box-and-whisker plots, box limits: interquartile range (IQR), middle line: median, diamond: mean, vertical lines: adjacent values (1st quartile - 1.5 IQR; 3rd quartile + 1.5 IQR), dots: outliers. Biomarker levels from 82 samples from stroke patients (32 samples before 3 hours, 50 samples after 3 hours, 39 samples before 6 hours and 43 samples after 6 hours).

PRDX1: Peroxiredoxin 1, GST- π : glutathione s-transferase π , < 3 hours and > 3 hours: before and after 3 hours following onset of cerebral infarction, < 6 hours and > 6 hours: before and after 6 hours after stroke onset, **: p < 0.01.

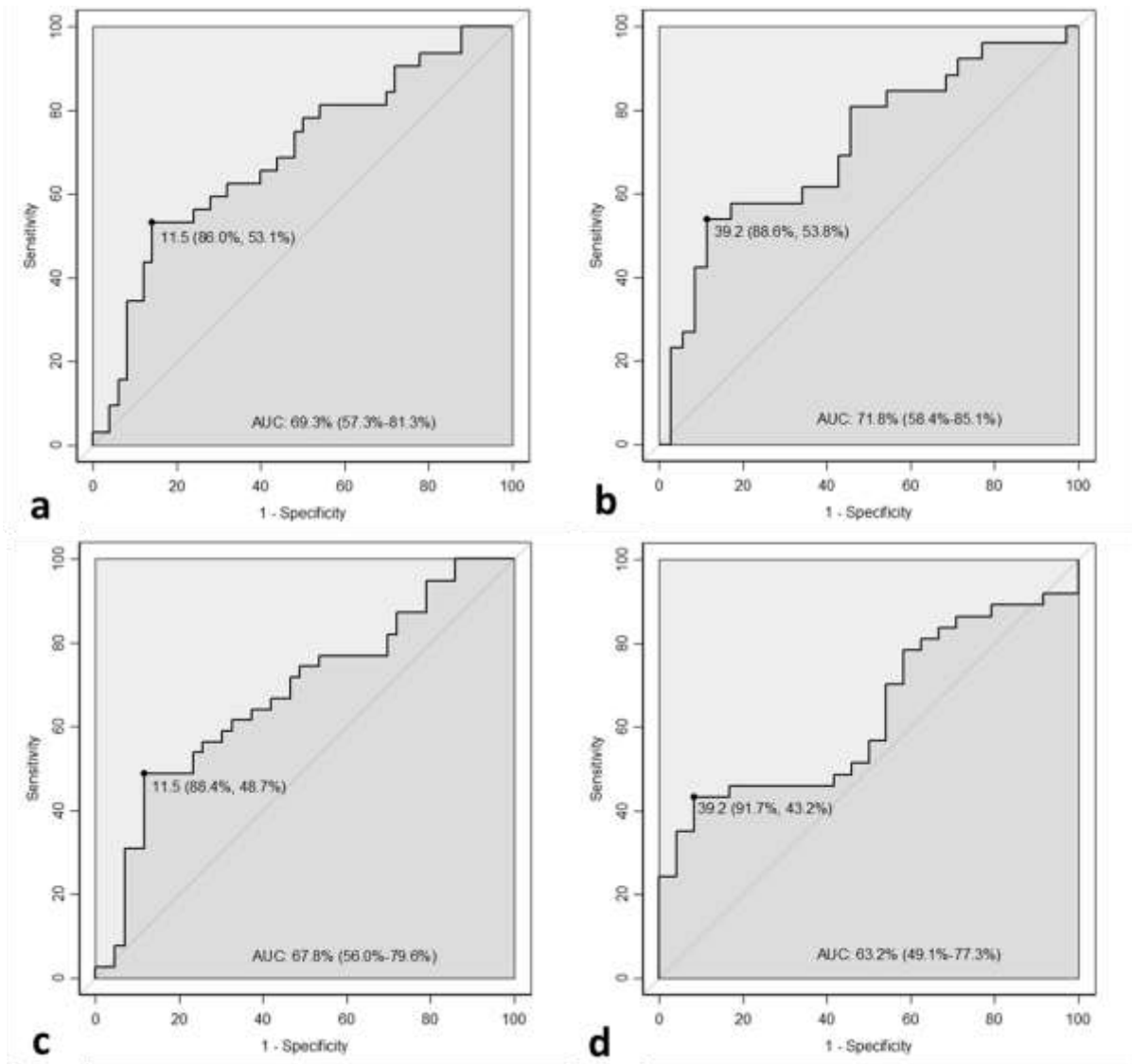


Figure 4. ROC analysis for diagnosis performance of peroxiredoxin 1 and glutathione s-transferase π to identify cerebral infarction of less than 3 hours (respectively a and b) and 6 hours (respectively c and d) following onset of cerebral infarction

Results described as cut-off (ng/mL) determined with Youden index criterion, respective specificity and sensitivity, area under the curve (AUC) and 95% confidence interval.

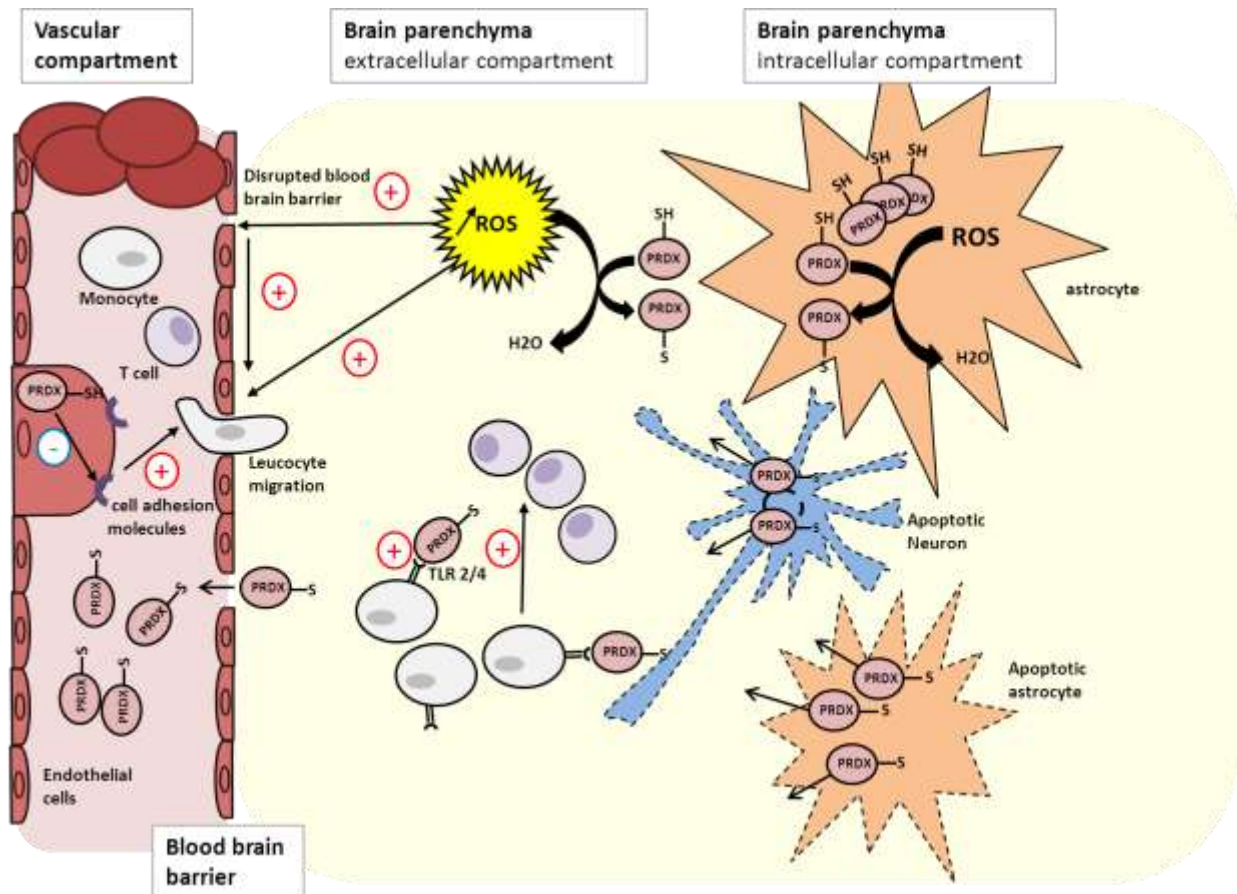


Figure 5. Different roles of peroxiredoxins during cerebral infarction

During cerebral ischemia, peroxiredoxins permit reduction of reactive oxygen species in less reactive components and inhibit expression of cell adhesion molecules in endothelial cells promoting leucocyte migration in the brain parenchyma. However, the oxidized form produced and released from apoptotic cells is able to activate monocytes and promote inflammation in the brain parenchyma. High serum levels of peroxiredoxins would result from production of endothelial cells and diffusion from the extracellular into the vascular compartment through disrupted blood brain barrier.

PRDX: peroxiredoxin, TLR 2/4: toll like receptors 2 and 4, ROS: reactive oxygen species.

Tables

| Characteristics | Control population (n=109) | Stroke patients (n=37) | p value |
|------------------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------|
| Age (years) | | | |
| Median (range) | 69 (26-88) | 71 (43-89) | 0.13 ^a |
| Female sex | | | |
| n (%) | 48 (44%) | 16 (43%) | 0.93 ^b |
| NIHSS score | | | |
| Median (range) | - | 8 (0-21) | - |
| Atrial fibrillation | | | |
| n (%) | 6 (5%) | 16 (43%) | <0.01 ^b |
| Diabetes mellitus | | | |
| n (%) | 14 (12%) | 4 (11%) | 0.99 ^c |
| Dyslipidemia | | | |
| n (%) | 20 (18%) | 6 (16%) | 0.77 ^b |
| Hypertension | | | |
| n (%) | 51 (47%) | 21 (56%) | 0.29 ^b |
| Myocardial infarction | | | |
| n (%) | 2 (2%) | 1 (3%) | 0.99 ^c |
| Tobacco | | | |
| n (%) | 42 (38%) | 18 (49%) | 0.28 ^b |
| Reperfusion therapies | | | |
| n (%) | - | 15 (40%) | - |

Table 1. Population characteristics

NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale, a: Mann–Whitney U test, b: Chi-Square test, c: Fischer exact test.

| | | PRDX1 | GST-π |
|--|---|--------------------------|--------------------------|
| Control population vs. Stroke patients | Control population median level ± standard deviation (ng/mL) n=109 | 3.5 ± 4.5 ** | 14.5 ± 7.6 ** |
| | Stroke patients median level ± standard deviation (ng/mL) n=82 | 6.9 ± 13.7 | 22.7 ± 50.7 |
| Diagnostic performance : identification of cerebral infarction < 3 hours | < 3 hours median level ± standard deviation (ng/mL) n=32 | 11.7 ± 15.6 ** | 40.5 ± 57 ** |
| | > 3 hours median level ± standard deviation (ng/mL) n=50 | 5 ± 11.6 | 18.2 ± 40.2 |
| | ROC analysis AUC (95%CI) Sensitivity, Specificity | 69% (57-81%) 53%, 86% | 72% (58-85%) 54%, 89% |
| Diagnostic performance : identification of cerebral infarction < 6 hours | < 6 hours median level ± standard deviation (ng/mL) n=39 | 9.6 ± 14.9 ** | 20.5 ± 60.1 |
| | > 6 hours median level ± standard deviation (ng/mL) n=43 | 4.9 ± 11.9 | 21.5 ± 18.9 |
| | ROC analysis AUC (95%CI) Sensitivity, Specificity | 68% (56-80%) 49%, 88% | 63% (49-77%) 43%, 92% |

Table 2. Peroxiredoxin 1 and glutathione s-transferase π performances to diagnose and to date cerebral infarction

PRDX1: Peroxiredoxin 1, GST-π: glutathione s-transferase π, 95% CI: 95% confidence interval, **: p<0.01.

Bibliography

1. Whiteley W, Tian Y and Jickling GC. Blood biomarkers in stroke: research and clinical practice. *Int J Stroke* 2012; 7: 435-439.
2. Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, et al. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* 2009; 40: e380-389.
3. Turck N, Robin X, Walter N, et al. Blood glutathione S-transferase- π as a time indicator of stroke onset. *PLoS One* 2012; 7: e43830.
4. Thomalla G, Cheng B, Ebinger M, et al. DWI-FLAIR mismatch for the identification of patients with acute ischaemic stroke within 4.5 h of symptom onset (PRE-FLAIR): a multicentre observational study. *Lancet Neurol* 2011; 10: 978-986.
5. Jauch EC, Saver JL, Adams HP Jr, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2013; 44: 870-947.
6. Dayon L, Turck N, Garcí-Berrocoso T, et al. Brain extracellular fluid protein changes in acute stroke patients. *J Proteome Res* 2011; 10: 1043-1051.
7. Wouters A, Lemmens R, Dupont P, et al. Wake-up stroke and stroke of unknown onset : a critical review. *Front Neurol* 2014; 5: 153.
8. Barber PA, Zhang J, Demchuk AM, et al. Why are stroke patients excluded from TPA therapy? An analysis of patient eligibility. *Neurology* 2001; 56: 1015-1020.
9. Poynton RA and Hampton MB. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840: 906-912.

10. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, et al. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* 1997; 272: 27812-27817.
11. Michiels C, Raes M, Toussaint O, et al. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 235-248.
12. Keller JN, Huang FF, Zhu H, et al. Oxidative stress-associated impairment of proteasome activity during ischemia-reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 1467-1473.
13. Zhang L, Huang S, Chen Y, et al. Icaritin inhibits hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity by up-regulating sirtuin type 1-dependent catalase and peroxiredoxin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010; 107: 899-905.
14. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, et al. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 2001; 482: 21-26.
15. Tew KD and Townsend DM. Regulatory functions of glutathione S-transferase P1-1 unrelated to detoxification. *Drug Metab Rev* 2011; 43: 179-193.
16. Sun S, Zhang H, Xue B, et al. Protective effect of glutathione against lipopolysaccharide-induced inflammation and mortality in rats. *Inflamm Res* 2006; 55: 504-510.
17. Luo L, Wang Y, Feng Q, et al. Recombinant protein glutathione S-transferases P1 attenuates inflammation in mice. *Mol Immunol* 2009; 46: 848-857.
18. Neumann CA, Cao J and Manevich Y. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. *Cell Cycle* 2009; 8: 4072-4078.

19. Tao RR, Wang H, Hong LJ, et al. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21: 1-16.
20. Leak RK, Zhang L, Luo Y, et al. Peroxiredoxin 2 battles poly(ADP-ribose) polymerase 1- and p53-dependent prodeath pathways after ischemic injury. *Stroke* 2013; 44: 1124-1134.
21. Schreibelt G, van Horssen J, Haseloff RF, et al. Protective effects of peroxiredoxin-1 at the injured blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 256-264.
22. Garcia-Bonilla L and Iadecola C. Peroxiredoxin sets the brain on fire after stroke. *Nat Med* 2012; 18: 858-859.
23. Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, et al. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med* 2012; 18: 911-917.
24. Kabadi SV, Stoica BA, Zimmer DB, et al. S100B inhibition reduces behavioral and pathologic changes in experimental traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35: 2010-2020.
25. Richard S, Lagerstedt L, Burkhard PR, et al. E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 as biomarkers of 3-month outcome in cerebrovascular diseases. *J Inflamm (Lond)* 2015; 12: 61.
26. He L, Nan T, Cui Y, et al. Development of a colloidal gold-based lateral flow dipstick immunoassay for rapid qualitative and semi-quantitative analysis of artesunate and dihydroartemisinin. *Malar J.* 2014;13:127.

TROISIEME PARTIE :

CONCLUSION

La collaboration qui existe entre les unités fondamentales et cliniques suivantes

- **Le Centre d'Investigation Clinique Plurithématique 1433 du CHRU de Nancy (CIC-P),**
- **L'Unité Neurovasculaire (UNV) du service de Neurologie du CHRU de Nancy,**
- **Le service de Neuroradiologie Diagnostique et Thérapeutique du CHRU de Nancy,**
- **Le Centre d'Investigation Clinique Innovation Technique du CHRU de Nancy (CIC-IT)**
- **Le DSPH du Centre Médico Universitaire de Genève,**

Nous amène donc à proposer une étude clinique prospective multicentrique afin d'identifier et de valider une méthode biologique de datation de l'infarctus cérébral à partir de GST- π et PRDX1. La perspective à terme est de produire un outil de dosage rapide utilisable « au chevet » du patient permettant en quelques minutes d'indiquer si le patient se présentant avec un infarctus cérébral à heure de début inconnue peut être considéré comme étant dans les limites horaires des procédures de reperfusion.

Nous envisageons de constituer une cohorte prospective de patients inclus dans les 12 heures suivant un déficit évocateur d'un AVC dont l'heure des premiers symptômes est précisément connue. Ainsi nous pourrions en objectif principal évaluer la performance diagnostique du couple GST- π /PRDX1 pour identifier les infarctus de moins de 4,5 heures.

En objectif secondaire nous évaluerons les performances de datation du panel GST- π /PRDX1 pour d'autres limites horaires (moins de 3 et 6 heures) et celles du panel GST- π /PRDX1/IRMc

(en associant donc des indicateurs biologiques et radiologiques), les performances diagnostiques des 2 biomarqueurs pour différencier l'accident vasculaire cérébral des stroke mimics (conditions autres que neurovasculaire mimant les symptômes de l'AVC), et pour différencier l'infarctus de l'hémorragie cérébrale. Ces deux derniers points sont aussi d'actualité, l'enjeu étant de trouver des moyens diagnostiques de l'infarctus cérébral simples, rapides et fiables réalisables dès le lieu de survenue du déficit neurologique pour le début précoce de la thrombolyse intraveineuse. Les perspectives sont l'évaluation d'autres biomarqueurs impliqués dans l'infarctus cérébral mais à des temps différents et dont le pouvoir de datation pourrait être synergique avec celui de GST- π /PRDX1. Enfin, nous envisageons ultérieurement le développement d'un kit immunologique utilisable au chevet du patient, et permettant de détecter en quelques minutes les taux seuils des biomarqueurs indicateurs des délais de survenue de l'infarctus cérébral.

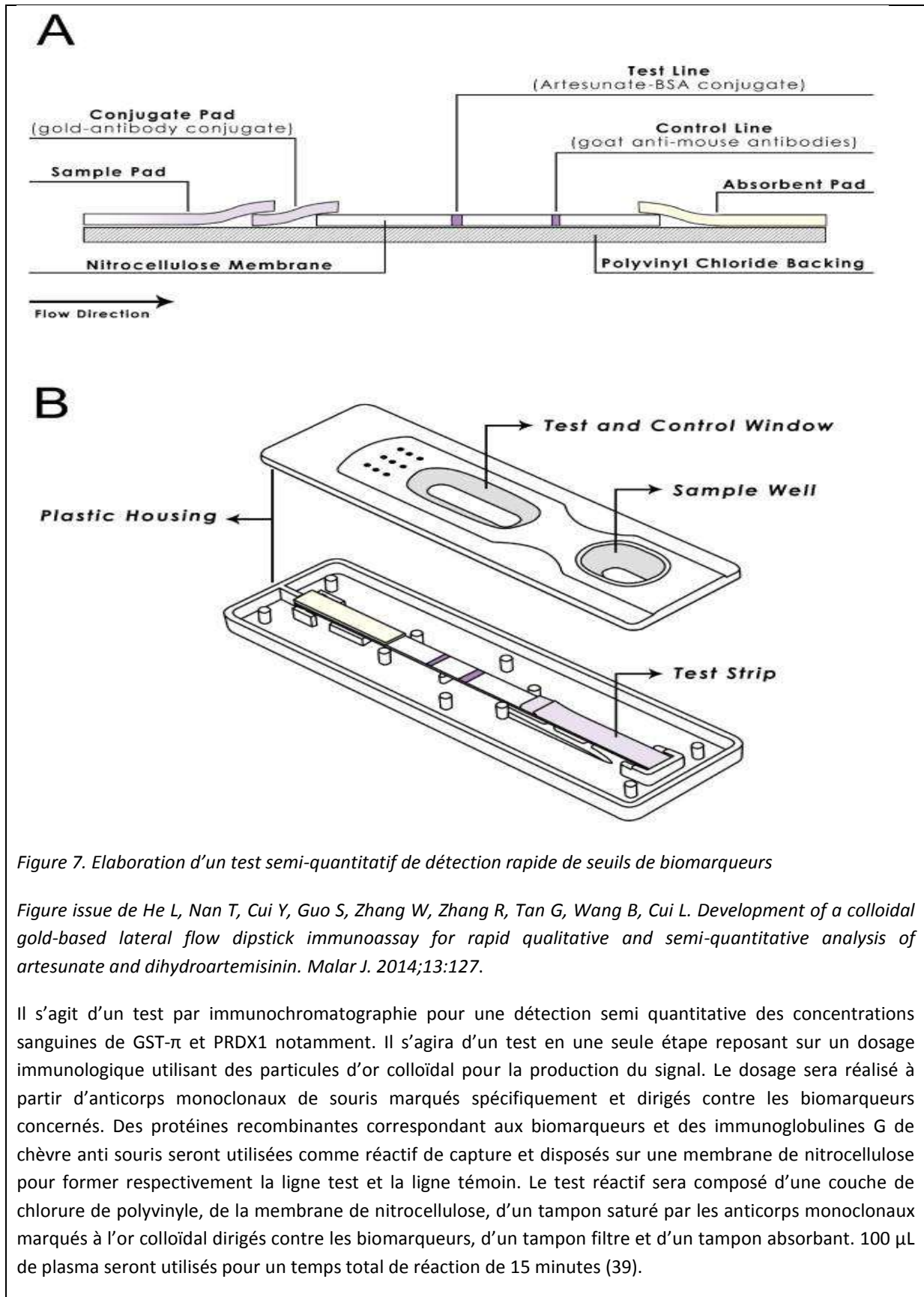


Figure 7. Elaboration d'un test semi-quantitatif de détection rapide de seuils de biomarqueurs

Figure issue de He L, Nan T, Cui Y, Guo S, Zhang W, Zhang R, Tan G, Wang B, Cui L. Development of a colloidal gold-based lateral flow dipstick immunoassay for rapid qualitative and semi-quantitative analysis of artesunate and dihydroartemisinin. *Malar J.* 2014;13:127.

Il s'agit d'un test par immunochromatographie pour une détection semi quantitative des concentrations sanguines de GST- π et PRDX1 notamment. Il s'agira d'un test en une seule étape reposant sur un dosage immunologique utilisant des particules d'or colloïdal pour la production du signal. Le dosage sera réalisé à partir d'anticorps monoclonaux de souris marqués spécifiquement et dirigés contre les biomarqueurs concernés. Des protéines recombinantes correspondant aux biomarqueurs et des immunoglobulines G de chèvre anti souris seront utilisées comme réactif de capture et disposés sur une membrane de nitrocellulose pour former respectivement la ligne test et la ligne témoin. Le test réactif sera composé d'une couche de chlorure de polyvinyle, de la membrane de nitrocellulose, d'un tampon saturé par les anticorps monoclonaux marqués à l'or colloïdal dirigés contre les biomarqueurs, d'un tampon filtre et d'un tampon absorbant. 100 μ L de plasma seront utilisés pour un temps total de réaction de 15 minutes (39).

L'extension des indications de la thrombolyse de l'infarctus cérébral reste un enjeu majeur. Cette étude évalue une méthode inédite de datation de l'ischémie cérébrale, peu invasive, rapide et facile d'utilisation. Elle pourrait aboutir à des recommandations fortes d'évaluation de l'infarctus cérébral à heure inconnue en vue des procédures de reperfusion artérielle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Wouters A, Lemmens R, Dupont P, et al. Wake-up stroke and stroke of unknown onset : a critical review. *Front Neurol* 2014; 5: 153.
2. Barber PA, Zhang J, Demchuk AM, et al. Why are stroke patients excluded from TPA therapy? An analysis of patient eligibility. *Neurology* 2001; 56: 1015-1020.
3. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (NINDS). *N Engl J Med* 1995;333:1581-7.
4. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2008;359:1317-29.
5. Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2015;372:11-20.
6. Campbell BC, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, et al. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med* 2015;372:1009-18.
7. Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, Brott TG, Toni D, Grotta JC, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet*. 2010;375:1695-703.
8. Thomalla G, Cheng B, Ebinger M, et al. DWI-FLAIR mismatch for the identification of patients with acute ischaemic stroke within 4.5 h of symptom onset (PRE-FLAIR): a multicenter observational study. *Lancet Neurol*. 2011;10:978-86.
9. Jauch EC, Saver JL, Adams HP Jr, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2013; 44: 870-947.
10. Dayon L, Turck N, Garcí-Berrocoso T, et al. Brain extracellular fluid protein changes in acute stroke patients. *J Proteome Res* 2011; 10: 1043-1051.

11. Turck N, Robin X, Walter N, et al. Blood glutathione S-transferase- π as a time indicator of stroke onset. *PLoS One* 2012; 7: e43830.
12. Poynton RA and Hampton MB. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840: 906-912.
13. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, et al. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* 1997; 272: 27812-27817.
14. Michiels C, Raes M, Toussaint O, et al. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 235-248.
15. Keller JN, Huang FF, Zhu H, et al. Oxidative stress-associated impairment of proteasome activity during ischemia-reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 1467-1473.
16. Tao RR, Wang H, Hong LJ, et al. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21: 1-16.
17. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, et al. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 2001; 482: 21-26.
18. Tew KD and Townsend DM. Regulatory functions of glutathione S-transferase P1-1 unrelated to detoxification. *Drug Metab Rev* 2011; 43: 179-193.
19. Sun S, Zhang H, Xue B, et al. Protective effect of glutathione against lipopolysaccharide-induced inflammation and mortality in rats. *Inflamm Res* 2006; 55: 504-510.
20. Luo L, Wang Y, Feng Q, et al. Recombinant protein glutathione S-transferases P1 attenuates inflammation in mice. *Mol Immunol* 2009; 46: 848-857.
21. Leak RK, Zhang L, Luo Y, et al. Peroxiredoxin 2 battles poly(ADP-ribose) polymerase 1- and p53-dependent prodeath pathways after ischemic injury. *Stroke* 2013; 44: 1124-1134.

22. Schreibelt G, van Horssen J, Haseloff RF, et al. Protective effects of peroxiredoxin-1 at the injured blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 256-264.
23. Garcia-Bonilla L and Iadecola C. Peroxiredoxin sets the brain on fire after stroke. *Nat Med* 2012; 18: 858-859.
24. Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, et al. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med* 2012; 18: 911-917.
25. Thomalla G, Fiebach JB, Østergaard L, et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to test efficacy and safety of magnetic resonance imaging-based thrombolysis in wake-up stroke (WAKE-UP). *Int J Stroke*. 2014;9:829-36.
26. Whiteley W, Tian Y and Jickling GC. Blood biomarkers in stroke: research and clinical practice. *Int J Stroke* 2012; 7: 435-439.
27. Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, et al. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* 2009; 40: e380-389.
28. Haute Autorité de Santé. Recommandations de bonne pratique. Accident vasculaire cérébral : prise en charge précoce (alerte, phase préhospitalière, phase hospitalière initiale, indications de la thrombolyse). 2009.
29. Bousser MG, Amarenco P, Chamorro A, Fisher M, Ford I, Fox KM, et al. Terutroban versus aspirin in patients with cerebral ischaemic events (PERFORM): a randomised, double-blind, parallel-group trial. *Lancet*. 2011;377:2013-22.
30. Sacco RL, Diener HC, Yusuf S, et al. Aspirin and extended-release dipyridamole versus clopidogrel for recurrent stroke. *N Engl J Med*. 2008;359:1238-51.

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Objectifs de l'étude : Évaluer les performances diagnostiques de deux biomarqueurs sanguins, la peroxyredoxine 1 (PRDX1) et la glutathion S-transférase (GST- π), protéines ubiquitaires impliquée dans le stress oxydatif pour la datation précoce à 3h et 6h de l'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, afin d'appliquer cette méthode de datation aux infarctus cérébraux d'horaire de début inconnu. **Méthode :** Etude prospective incluant entre décembre 2005 et janvier 2008 au CHU de Genève les patients atteints d'infarctus cérébral d'horaire de début connu survenu dans les 24h précédant l'inclusion. Prélèvement sanguin réalisé avant la 3^e heure, entre 3 et 6 heure puis après la 6^e heure suivant l'installation des symptômes. Un groupe contrôle est constitué de patients atteints de pathologies diverses non neurologiques et neurologiques non neurovasculaires et ne subit qu'un prélèvement. L'ensemble des données cliniques pertinentes est recueilli. **Résultats :** un total de 82 prélèvements a été réalisé sur 37 cas et 109 chez les témoins. Dans l'ensemble, les concentrations de PRDX1 et GST- π sont significativement plus élevées chez les cas comparativement au groupe contrôle. Dans le groupe AVC, PRDX1 et GST- π sont significativement plus élevées dans les 3 premières heures mais PRDX1 est la seule à montrer une augmentation significative dans les 6 premières heures comparativement à après. L'analyse par courbes ROC pour évaluer la performance diagnostique des biomarqueurs retrouve pour la datation avant 3h (pour PRDX1 une aire sous la courbe (AUC)=69%, une sensibilité (Se)=53% et une spécificité (Sp)=86%, pour GST- π AUC=72%, Se=54%, Sp=89%) et pour la datation avant 6h (pour PRDX1 AUC=68%, Se=49%, Sp=88% et GST- π AUC=63%, Se=43% et Sp=92%). **Conclusion :** Les performances diagnostiques de PRX1 et GST- π apparaissent prometteuses pour la datation des AVC ischémique d'horaire inconnu. Toutefois cette méthode ne pourra s'appliquer qu'après une étude sur plus grande échelle répondant à un protocole de recueil plus rigoureux et incluant les données de l'IRM, ainsi que d'autres biomarqueurs.

TITRE EN ANGLAIS: Diagnostic performance of peroxiredoxin 1 and glutathione s-transferase π to determine time-of-onset of acute cerebral infarction

THÈSE : MÉDECINE SPÉCIALISÉE – ANNÉE 2016

MOTS CLEFS : infarctus cérébral aigu ; biomarqueur ; glutathion S-Transférase ; Peroxyredoxine ; accident vasculaire cérébral.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
Faculté de Médecine de Nancy
9, avenue de la Forêt de Haye
54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex
