



HAL
open science

THERAPIE CELLULAIRE PAR CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES HUMAINES APRES ISCHEMIE CEREBRALE

Olivier Detante

► **To cite this version:**

Olivier Detante. THERAPIE CELLULAIRE PAR CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES HUMAINES APRES ISCHEMIE CEREBRALE. Neurosciences. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT: . tel-00905941

HAL Id: tel-00905941

<https://theses.hal.science/tel-00905941>

Submitted on 19 Nov 2013

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.

Université de Grenoble

ANNEE 2010

THESE POUR LE

DOCTORAT EN CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT
Spécialité : Neurosciences / Neurobiologie

Par

M. Olivier DETANTE

Présentée et soutenue publiquement le 09/03/2010

**THERAPIE CELLULAIRE
PAR CELLULES SOUCHES
MESENCHYMATEUSES HUMAINES
APRES ISCHEMIE CEREBRALE**

Co-dirigée par Mme Chantal Rémy et M. Marc Hommel

Composition du jury :

Président : M. Rémy SADOUL
Rapporteurs : M. Norbert NIGHOGHOSSIAN
Mme Brigitte ONTENIENTE
Examineurs : Mme Nathalie KUBIS
Mme Chantal REMY
M. Marc HOMMEL

Remerciements

A mes directeurs de thèse :

- Mme **Chantal Rémy** qui, au jour le jour, a suivi et soutenu ce travail. De la constance, la rigueur scientifique, la grande amitié et la gentillesse, je ne sais que retenir et que souligner de ces dernières années en laboratoire... peut-être l'absolue nécessité des « groupes contrôles » !!! Merci pour tout.

- Le Pr **Marc Hommel** qui a activement soutenu ce projet innovant, en acceptant de me céder du temps de mon activité médicale - fait exceptionnel - au profit de l'expérimentation animale. Merci pour la qualité de l'enseignement de la neurologie vasculaire lors de mon internat et de mon assistantat. Merci surtout pour la franchise et l'amitié au cours de ces dernières années tumultueuses.

Merci au Pr **Norbert Nighoghossian**, à Mme **Brigitte Onteniente**, à M. **Rémy Sadoul** et Mme **Nathalie Kubis** d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Merci au Dr **Assia Jaillard** pour son dynamisme et son enthousiasme communicatifs dans ce projet et en recherche clinique en général. Merci de m'avoir permis de mener à bien ce projet expérimental malgré la charge de travail clinique en UNV.

Merci à **Emmanuel Barbier** pour l'enseignement de l'IRM, des ondes électromagnétiques et des mystères de l'espace k. Merci pour le soutien toujours efficace et constructif. Merci encore pour les discussions scientifiques et personnelles que nous avons régulièrement. Comme le monde n'est pas que de sciences, merci aussi pour les premiers skis de Jeanne !

Merci à **Emmanuelle Grillon** de m'avoir encadré et conseillé, de manière toujours amicale, en expérimentation animale et surtout dans le dur apprentissage du modèle animal d'ischémie cérébrale.

Merci à **Bernadette Naegele** qui a rejoint notre équipe pour trouver des liens entre la cognition des hommes et celle des rongeurs... Merci pour nos rapports amicaux tant à l'hôpital qu'en laboratoire autour d'un labyrinthe.

Merci à **Marie-Jeanne Richard** sans qui j'essaierais encore aujourd'hui de cultiver seul quelques cellules plus ou moins souches. Merci pour le soutien sans faille à ce projet translationnel de thérapie cellulaire. Dans les méandres des procédures de la biothérapie, merci d'avoir su allier l'efficacité à la sympathie.

Merci au Dr **Katia Garambois** pour tout le travail clinique effectué lors de mes absences hospitalières. Merci encore aujourd'hui pour le soutien amical très appréciable à la neurologie vasculaire clinique et expérimentale.

Merci à **Florence De Fraipont** pour l'expérience partagée en culture cellulaire et en thérapie cellulaire car ce n'est pas à la portée du premier venu de « créer » *in vitro* des cellules insulino-sécrétrices ou des neurones. Merci pour la réactivité et l'efficacité à chaque nouveau protocole.

Merci à **Samuel Valable** pour ses conseils en biologie cellulaire et en microscopie. Merci pour tous les bons moments passés ensemble en histologie, en IRM... ou au tennis !

Merci à **Hervé Mathieu** et **Vincente Dicalogero** pour les heures d'expérimentations animales partagées avec le sourire.

Merci à **Christoph Segebarth** de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Merci à **Claude Feuerstein** de suivre avec intérêt et de soutenir ce projet d'ischémie expérimentale au sein du Grenoble Institut des Neurosciences.

Je tiens à remercier les techniciennes de l'Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, pour leur accueil et leur implication en recherche, notamment « **Jacotte** » **Meo** à qui je souhaite - profitant de cette occasion - une excellente retraite loin des salles de culture, **Corinne Lucas** et **Valérie Konik-Mathevet**.

Merci à toute l'équipe du laboratoire du Pr **Fagret** pour l'accueil agréable et la collaboration à ce travail notamment **Laurent Riou**, **Julien Dimastromatteo**, **Catherine Ghezzi** et **Marie-Dominique Desruet**.

Un grand merci pour l'enthousiasme et le travail des étudiants que j'ai eu plaisir à encadrer au cours de ces années : **Delphine Dorchene**, **Romain Dalmann**, **Virginie Mayan**, et **Anaïck Moisan**. Beaucoup de leurs résultats expérimentaux sont repris dans cette thèse.

Merci aux Drs **Wilfried Vadot** et **Olivier Casez** pour le soutien actif de l'UNV de Grenoble dans des moments difficiles.

Merci aux Prs **Pierre Pollak**, **Paul Krack** et **Maurice Giroud** de m'avoir encouragé à suivre la voie hospitalo-universitaire en neurologie.

Je remercie, pour les discussions constructives et amicales, mes amis de neurologie vasculaire notamment **Bertrand Lapergue**, **Charlotte Rosso** et **David Calvet**.

Merci à tous les amis qui ont « supporté » ce travail notamment **Julien Brun**, **Renan Trovero**, **Ludovic Ecartot** et « les » **Olivier(s) Cogne**, **Béthoux**, et **Carle**.

Je remercie ma sœur **Christine Detante** et ma grand-mère **Gisèle Merle** qui m'ont toujours soutenu avec affection dans tout ce parcours médical et scientifique. Merci également à mes oncles **Marc** et **Didier Merle**.

Merci à mon grand-père, **Michel Merle** pour tout ce qu'il a fait pour moi dans ma vie. Merci pour le goût de la médecine et de la science qu'il a su me transmettre.

Une pensée à mes parents.

*Je remercie infiniment **Sara**, ma femme, pour la patience et l'écoute tout au long de ces années de médecine, de gardes, d'astreintes ou de science. L'affection que nous partageons apporte chaque jour une sérénité indispensable.*

La vie des rats

Certains rats ont un destin très exceptionnel
Ils commencent leur vie cérébrale en jouant
A des jeux de piste dans cubes et venelles
Et le docteur subtil les observe en comptant

Sur leur aptitude à comprendre et réfléchir
C'est la première phase de leur destinée
Alors vient la deuxième phase sans fléchir
Des piqûres dans la tête ou le périnée

Sont enfoncées par le médecin moins câlin
C'est la troisième phase ils sont mis en jeu
Il faut dès lors déterminer le plus malin

Celui qui résiste le mieux mais quel enjeu
Le bon et merveilleux gagnant thérapeutique
Permet à la science une avancée mirifique

Didier Merle

A Jeanne et Tristan.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	11
I.1. ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL (AVC)	12
I.1.1. Définitions : AVC et vascularisation artérielle encéphalique	12
I.1.2. Données cliniques	16
I.1.3. Données épidémiologiques	17
I.1.4. Physiopathologie de l'ischémie cérébrale	19
I.1.5. Traitements actuels de l'AVC	26
I.1.6. Mécanismes impliqués dans la récupération spontanée	31
I.2. CELLULES SOUCHES ET THERAPIE CELLULAIRE	37
I.3. THERAPIE CELLULAIRE ET ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL	43
I.3.1. Thérapie cellulaire et AVC chez l'homme : études cliniques	43
I.3.2. Transplantation dans les modèles animaux d'ischémie cérébrale	48
I.4. OBJECTIFS GENERAUX	50
II. METHODOLOGIE GENERALE	52
II.1. METHODE DE CULTURE DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES HUMAINES	52
II.2. MODELE MURIN D'ISCHEMIE CEREBRALE FOCALE	53
II.2.1. Anesthésie	53
II.2.2. Modèle d'ischémie cérébrale focale : occlusion intraluminaire transitoire	54
II.3. METHODES D'ADMINISTRATION DES CSMH	56
II.3.1. Choix de la voie d'administration chez le rat	56
II.3.2. Choix des doses étudiées chez le rat	56
II.4. METHODES D'ANALYSE COMPORTEMENTALE	57
II.4.1. Tests sensori-moteurs	57
II.4.2. Test de mémoire spatiale : labyrinthe radial	59
II.5. METHODES GENERALES D'IRM	60
II.6. METHODES D'HISTOLOGIE	61
II.7. METHODES STATISTIQUES	63
III. MARQUAGE DES CSMH POUR IRM CELLULAIRE ET MICROSCOPIE	64
III.1. METHODES	65
III.2. RESULTATS	67
III.2.1. Marquage des CSMh et viabilité	67
III.2.2. Absence de modification phénotypique des CSMh marquées et de leur potentiel de différenciation	68
III.3. DISCUSSION	70

IV. GREFFE INTRACEREBRALE DE CSMH APRES ISCHEMIE CEREBRALE	72
IV.1. MATERIEL ET METHODES	73
IV.2. RESULTATS	75
IV.2.1. Effets fonctionnels de la greffe intracérébrale de CSMh	75
IV.2.2. IRM cellulaire in vivo	76
IV.2.3. Histologie.....	78
IV.3. DISCUSSION	83
IV.3.1. Effets de la greffe intracérébrale des CSMh après ischémie	83
IV.3.2. IRM cellulaire in vivo	84
IV.4. CONCLUSION.....	85
V. INJECTION IV DE CSMH APRES ISCHEMIE CEREBRALE.....	86
V.1. MATERIEL ET METHODES	86
V.2. RESULTATS	88
V.2.1. Effets fonctionnels de l'injection IV de CSMh.....	88
V.2.2. Suivi IRM et IRM cellulaire	92
V.2.3. Histologie.....	93
V.3. DISCUSSION.....	99
V.3.1. Bénéfice fonctionnel de l'injection IV de CSMh après une ischémie cérébrale.....	100
V.3.2. Limites de l'IRM cellulaire après injection IV de CSMh marquées.....	101
V.3.3. Mécanismes d'action des CSMh administrées après une ischémie cérébrale.....	102
V.4. CONCLUSION	107
VI. BIODISTRIBUTION DE CSMH INJECTEES PAR VOIE IV APRES ISCHEMIE CEREBRALE 108	
VI.1. MATERIEL ET METHODES	109
VI.2. RESULTATS	112
VI.2.1. Marquage et viabilité des CSMh radiomarquées.....	112
VI.2.2. Lésions cérébrales en IRM.....	113
VI.2.3. Imagerie nucléaire « corps entier ».....	113
VI.2.4. Biodistribution par comptage sur organes isolés	115
VI.2.5. Histologie.....	118
VI.3. DISCUSSION	120
VI.3.1. Radiomarquage cellulaire et viabilité.....	120
VI.3.2. Les CSMh injectées par voie IV sont attirées vers la lésion ischémique cérébrale	120
VI.3.3. Quelle voie d'injection des CSMh ?.....	122
VII. EFFETS MICROVASCULAIRES DE L'INJECTION INTRACEREBRALE DE CSMH APRES ISCHEMIE	124
VII.1. MATERIEL ET METHODES.....	125
VII.2. RESULTATS	128
VII.2.1. Suivi IRM du volume lésionnel et de l'oedème.....	128
VII.2.2. Evolution des paramètres microvasculaires en IRM.....	129
VII.2.3. Paramètres microvasculaires histologiques.....	132

VII.3. DISCUSSION	134
VII.4. CONCLUSION	136
VIII. MISE EN PLACE D'UN ESSAI CLINIQUE DE THERAPIE CELLULAIRE APRES AVC	137
VIII.1. OBJECTIFS ET CRITERES DE JUGEMENT	138
<i>VIII.1.1. Objectif principal</i>	138
<i>VIII.1.1. Objectifs secondaires</i>	139
VIII.2. METHODOLOGIE	139
VIII.3. CRITERES D'INCLUSION	142
VIII.4. CRITERES DE NON INCLUSION	142
VIII.5. DONNEES SUR LE PRODUIT DE SANTE TESTE	143
VIII.6. ANALYSE STATISTIQUE.....	144
VIII.8. FAISABILITE DE L'ETUDE.....	145
VIII.9. PERSPECTIVES ET RETOMBEEES ATTENDUES	146
IX. DISCUSSION GENERALE	147
IX.1. COMPRENDRE LES MECANISMES D'ACTION DE LA THERAPIE CELLULAIRE	149
IX.2. OPTIMISER LA THERAPIE CELLULAIRE APRES UN AVC.....	150
IX.3. AMELIORER LES ESSAIS PRECLINIQUES DE THERAPIE CELLULAIRE	152
X. ANNEXES.....	154
ANNEXE 1 : ETUDES PUBLIEES SUR LA THERAPIE CELLULAIRE APRES ISCHEMIE CEREBRALE FOCAL CHEZ LES RONGEURS (AVEC SUIVI FONCTIONNEL)	154
ANNEXE 2 : FICHE DE SUIVI COMPORTEMENTAL COMPLET UTILISEE POUR LES RATS APRES ISCHEMIE CEREBRALE FOCAL	161
ANNEXE 3 : PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS REALISEES DURANT LA THESE	163
ANNEXE 4 : FINANCEMENTS OBTENUS DURANT LA THESE	165
BIBLIOGRAPHIE.....	166
LISTE DES ABREVIATIONS	178

I. INTRODUCTION

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la première cause de handicap acquis de l'adulte. En dehors de la prise en charge dans une structure de soins spécialisée, l'Unité Neuro-Vasculaire (UNV), le seul traitement efficace est la thrombolyse qui doit être administrée dans les premières heures suivant un AVC ischémique (ou infarctus cérébral). Favoriser la plasticité post-lésionnelle du cerveau représente une alternative thérapeutique majeure. C'est dans ce contexte que la thérapie cellulaire basée sur l'administration de cellules souches a émergé. Son action, fondée sur la « réparation » du tissu cérébral lésé, a montré un bénéfice sur la récupération dans des modèles d'ischémie cérébrale expérimentale. Cependant, de nombreuses questions restent en suspens concernant les mécanismes d'action de ce type de traitement. Par ailleurs, la transposition de la thérapie cellulaire à l'homme reste à ce jour limitée à des études pilotes encourageantes mais avec de faibles effectifs.

L'objectif du travail de thèse présenté ici a été d'évaluer les effets fonctionnels de l'administration de cellules souches mésenchymateuses (CSM) après ischémie cérébrale chez le rat, de préciser les modes d'action possibles de ce traitement et, en parallèle de ces travaux expérimentaux, de mettre en place un essai clinique pilote de tolérance chez l'homme. L'ensemble de ce travail de recherche translationnelle n'a été possible que grâce à une collaboration multidisciplinaire étroite entre le « Grenoble Institut des Neurosciences » GIN INSERM U 836 UJF-CEA-CHU, l'UNV du CHU de Grenoble, l'Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire (UMTCT, Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes), et le laboratoire « Radiopharmaceutiques biocliniques » INSERM U 877.

En introduction, après avoir décrit les AVC et plus particulièrement l'ischémie cérébrale, nous présenterons l'état des connaissances actuelles sur la thérapie cellulaire dans cette pathologie. Le deuxième chapitre est consacré à la présentation de la méthodologie générale commune à l'ensemble des expérimentations suivantes. Le troisième chapitre correspond à la mise en place d'un marquage des CSM humaines (CSMh) afin de pouvoir les suivre *in vivo* par IRM puis en microscopie. Les quatrième et cinquième chapitres rapportent respectivement les résultats de l'administration intracérébrale (IC) et intraveineuse (IV) de CSMh chez le rat après une ischémie cérébrale focale. Dans le sixième chapitre, nous

montrons les résultats d'une étude par scintigraphie de la biodistribution des CSMh administrées par voie IV dans le même modèle d'ischémie. Enfin, le septième chapitre est consacré aux effets de l'administration IC des CSMh sur la microvascularisation cérébrale après ischémie. Après ces parties expérimentales, le huitième chapitre est une description de notre projet d'essai clinique de thérapie cellulaire par CSMh autologues après infarctus cérébral chez l'homme, ouvrant ainsi la discussion sur l'avenir de la thérapie cellulaire en neurologie vasculaire.

I.1. Accident vasculaire cérébral (AVC)

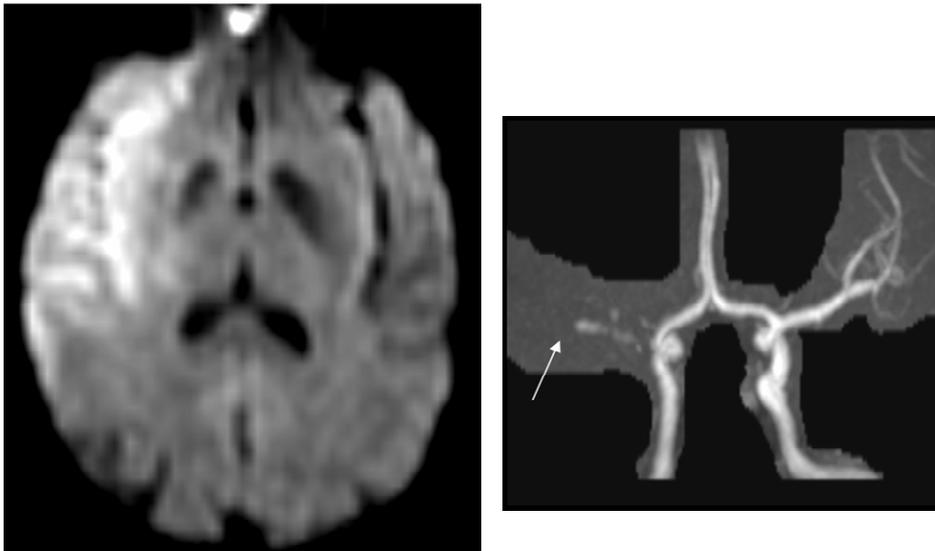
I.1.1. Définitions : AVC et vascularisation artérielle encéphalique

* **L'AVC** (Bousser & Mas, 2009) est défini cliniquement comme un déficit neurologique soudain fixe ou transitoire. On regroupe sous le terme AVC, 4 pathologies neurovasculaires distinctes :

- les AVC ischémiques qu'ils soient transitoires (accidents ischémiques transitoires) ou constitués (infarctus cérébral) représentent environ 80% des cas. Ils sont la conséquence d'une occlusion d'une artère à destinée encéphalique. Ce sous-type d'AVC, le plus fréquent, sera le sujet des travaux présentés ici (**Figure 1**).
- les AVC hémorragiques ou hématomes intraparenchymateux représentent environ 10% des cas et correspondent à une rupture d'une artère perforante au sein du parenchyme encéphalique.
- les hémorragies sous-arachnoïdiennes (5% des cas) correspondent majoritairement à la rupture d'un anévrisme artériel intracrânien au sein des méninges et non pas du parenchyme lui-même. Il s'agit d'une pathologie tout à fait distincte tant en terme de signes cliniques que de prise en charge thérapeutique.
- les thromboses veineuses cérébrales, plus rares (<1%) sont liées à l'occlusion d'un sinus veineux ou d'une veine drainant l'encéphale. Elles peuvent rester isolées ou s'accompagner d'une lésion ischémique et/ou hémorragique.

La distinction entre ces différents types d'AVC repose sur l'imagerie cérébrale (imagerie par résonance magnétique, IRM, ou tomographie par densitométrie, TDM).

Figure 1. Infarctus cérébral aigu dans le territoire de l'artère cérébrale moyenne droite. IRM pondérée en diffusion montrant en hypersignal la lésion ischémique et angiographie par IRM montrant l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne droite (flèche).



* **Chez l'homme**, la vascularisation artérielle de l'encéphale repose sur une circulation antérieure issue des deux artères carotides internes (ACI) et une circulation postérieure issue des deux artères vertébrales qui se rejoignent pour former l'artère basilaire.

Concernant la circulation antérieure, l'ACI, après avoir donné les artères ophtalmique, cérébrale antérieure et choroïdienne antérieure, se prolonge par l'artère cérébrale moyenne (ACM, diamètre = 2,3 à 2,7 mm) (**Figure 2**). Cette « continuité » ACI/ACM, explique la grande fréquence des infarctus dans le territoire cérébral moyen conséquence de la circulation logique d'un embol (artério-artériel ou d'origine cardiaque) vers ce territoire (**Figure 3**) (Tatu *et al.*, 1998). Pour modéliser cet infarctus cérébral le plus fréquent, nous avons donc choisi un modèle murin d'infarctus du territoire cérébral moyen.

Concernant la circulation postérieure, l'artère basilaire, issue des deux artères vertébrales, se termine en deux artères cérébrales postérieures après avoir assurée l'irrigation du tronc cérébral et du cervelet.

Les circulations antérieure et postérieure sont reliées par des anastomoses (artères communicantes postérieures). Ces anastomoses antéropostérieures s'ajoutent à une anastomose droite-gauche assurée par l'artère communicante antérieure reliant les deux artères cérébrales antérieures. L'ensemble de ces anastomoses constitue, à la base du crâne, le polygone artériel de Willis (**Figure 2**). Ce cercle artériel chez l'homme est fréquemment incomplet (55% de la population générale) avec de nombreuses variations anatomiques (Kapoor *et al.*, 2008) ce qui explique que l'occlusion d'une des artères porteuses puisse entraîner un infarctus cérébral en raison d'une suppléance insuffisante.

Figure 2. Vascularisation artérielle encéphalique chez l'homme. Polygone artériel de Willis.

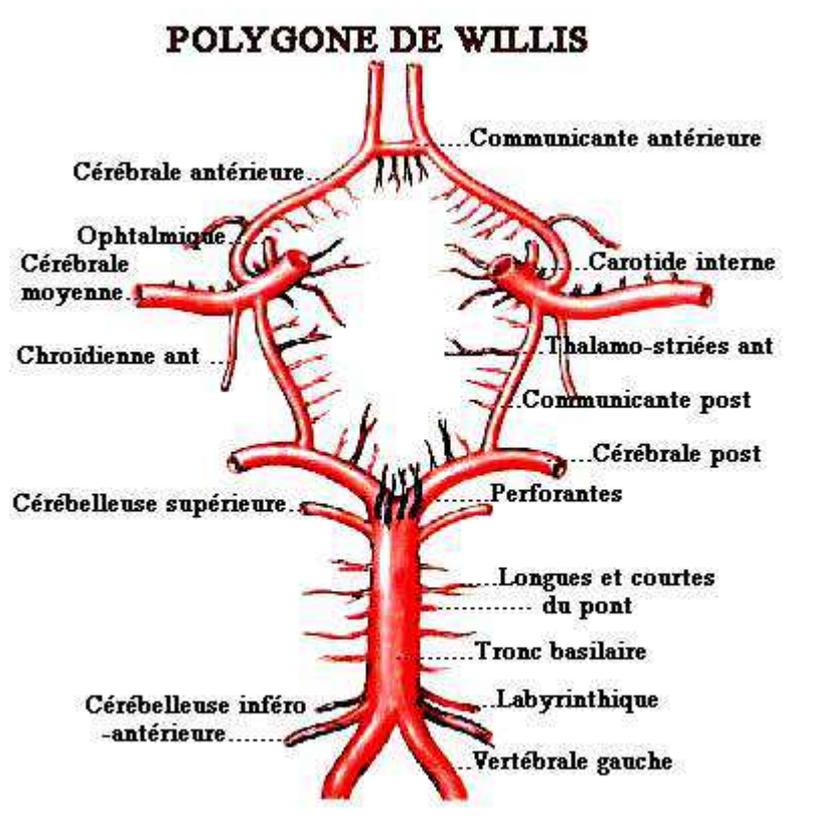
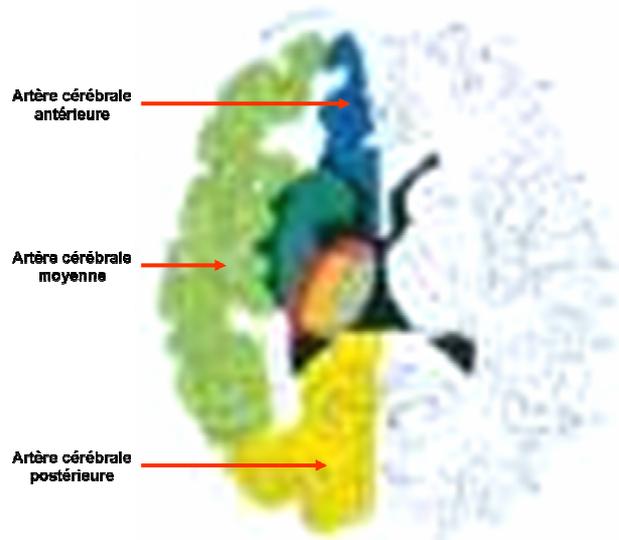


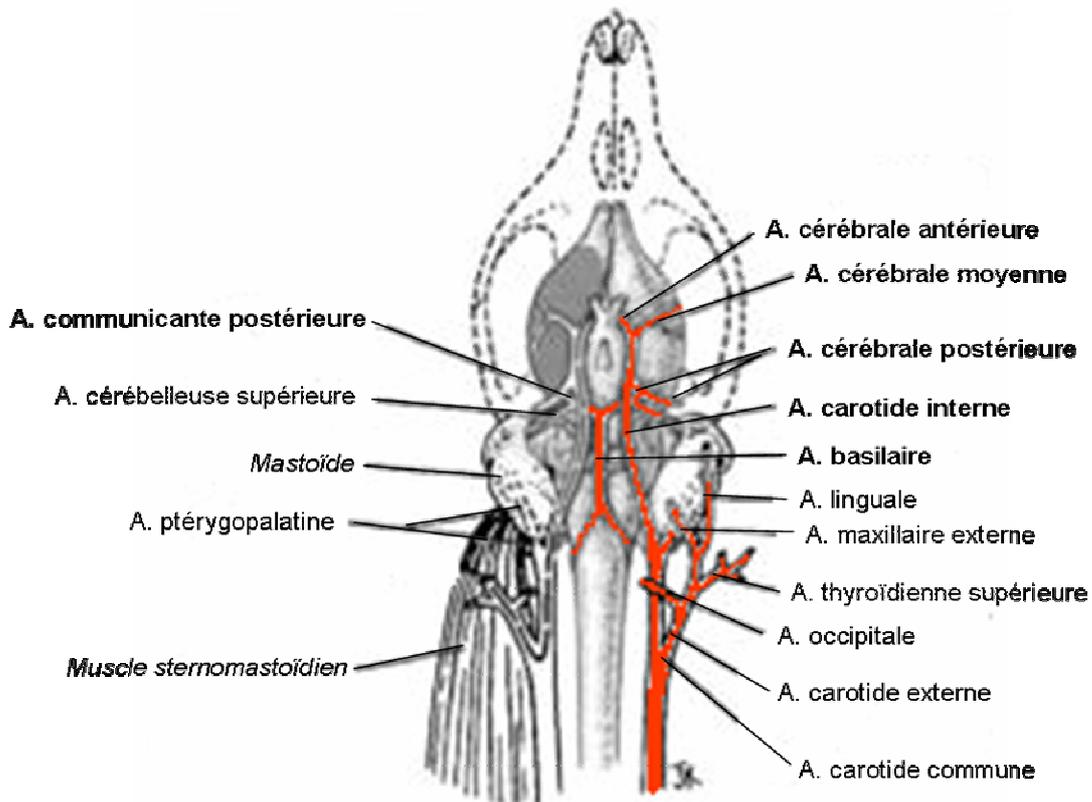
Figure 3. Principaux territoires artériels cérébraux en coupe axiale (Tatu *et al.*, 1998).



En dehors du cercle artériel de Willis, il existe des anastomoses entre l'artère carotide externe et l'ACI via l'artère ophtalmique et entre les artères cérébrales antérieure, moyenne et postérieure via les artères cortico-pie-mériennes.

* **Chez le rat**, la vascularisation artérielle de l'encéphale est relativement similaire avec un cercle artériel de type polygone de Willis (**Figure 4**). Contrairement à l'homme, les artères cérébrales antérieures se rejoignent pour former l'artère cérébrale antérieure azygos unique. Il n'existe donc pas d'artère communicante antérieure. Le diamètre de l'ACM est d'environ 0,24 mm chez le rat.

Figure 4. Vascularisation artérielle encéphalique chez le rat (Longa *et al.*, 1989).



I.1.2. Données cliniques

Les AVC se manifestent cliniquement par un déficit neurologique soudain avec différents signes de localisation centrale qui peuvent être associés notamment dans les lésions cérébrales étendues. Dans 50 à 70% des cas d'AVC, il existe un déficit moteur controlatéral à la lésion (déficit moteur complet : hémiparésie, ou partiel : hémiparésie).

Les signes d'alerte retenus habituellement sont la survenue brutale d'une faiblesse ou d'un engourdissement soudain uni ou bilatéral de la face, du bras ou de la jambe, d'une diminution ou d'une perte de vision uni ou bilatérale, d'une difficulté de langage ou de la compréhension, d'un mal de tête sévère, soudain et inhabituel, d'une perte de l'équilibre, d'une instabilité de la marche ou de chutes inexplicables (Harbison *et al.*, 2003).

Lorsque la lésion ischémique concerne les territoires de la circulation antérieure avec une atteinte corticale, il peut exister, outre le déficit moteur, un déficit sensitif controlatéral, un trouble visuel, un trouble du langage (aphasie, particulièrement suite à une lésion hémisphérique gauche), et/ou un déficit attentionnel dans un hémiespace (négligence hémispatale, particulièrement suite à une lésion hémisphérique droite). La négligence spatiale, visuelle ou multimodale et l'anosognosie observées dans les AVC dans le territoire de l'ACM, par la méconnaissance du déficit neurologique et le défaut d'information de l'hémiespace gauche, constituent un obstacle à la réorganisation du mouvement (Barer, 1990 ; Giaquinto *et al.*, 1999 ; Katz *et al.*, 1999 ; Jehkonen *et al.*, 2000). La présence de troubles cognitifs, en particulier visuo-spatiaux retardent la récupération motrice (Sheikh *et al.*, 1983 ; Robertson *et al.*, 1997 ; Sunderland *et al.*, 1999). Ce retard serait lié autant aux aspect comportementaux (tels que les difficultés attentionnelles, difficultés d'apprentissage, motivation, impersistence motrice...), qu'aux troubles attentionnels touchant les capacités de programmation (Fries *et al.*, 1993 ; Robertson *et al.*, 1997).

Lorsque la lésion concerne les territoires vertébro-basilaires (tronc cérébral, cervelet ou territoire cérébral postérieur), l'association des signes cliniques est souvent plus complexe. Il peut exister un déficit sensitif proportionnel (lésion thalamique), un trouble du champ visuel controlatéral à la lésion (hémianopsie), une atteinte des nerfs crâniens (notamment de l'oculomotricité), un trouble de la coordination motrice (syndrome cérébelleux), et/ou des vertiges.

Les signes associés, plus rares, comme les céphalées ou les troubles de vigilance, doivent faire discuter les diagnostics différentiels (hémorragie sous-arachnoïdienne, thrombose veineuse cérébrale...).

I.1.3. Données épidémiologiques

Bien que le sujet de cette thèse soit axé sur l'infarctus cérébral, l'ensemble des données épidémiologiques générales disponibles regroupe les différents sous-types d'AVC dans leur ensemble. L'AVC est une maladie fréquente et grave qui atteint 120 000 à 140 000 personnes en France chaque année (16 millions dans le monde en 2005). Les AVC sont la principale cause de handicap acquis de l'adulte, la seconde cause de décès après l'infarctus du myocarde, la première cause de décès chez la femme, et la seconde cause de démence (Murray & Lopez, 1997).

*** Incidence / prévalence :**

L'incidence annuelle des AVC en France est en moyenne de 1,6 à 2,4 nouveaux cas pour 1000 habitants et la prévalence de 4 à 6 cas pour 1000 habitants. Au cours des 20 dernières années, l'incidence n'a pas évolué de manière significative dans le registre de Dijon, mais le nombre absolu de cas a augmenté (Benatru *et al.*, 2006).

*** Age de survenue :**

L'âge moyen de survenue d'un premier AVC est de 68,6 ans pour les hommes et 72,9 ans pour les femmes (Appelros *et al.*, 2009) (respectivement 71,4 et 76,5 ans selon le registre dijonnais (Benatru *et al.*, 2006)). L'incidence des AVC augmente exponentiellement avec l'âge et de ce fait l'AVC est souvent considéré comme une maladie affectant principalement le sujet âgé. Or, 25% de ces patients ont moins de 65 ans et sont en âge de travailler (38 000 patients sur les 140 000 par an en France). Les AVC qui touchent environ 7000 personnes de 24 à 44 ans par an en France sont à l'origine de 400 décès.

*** Mortalité :**

Les taux annuels de mortalité par AVC varient entre 28 à 60 décès pour 100 000 habitants avec comme dans les autres pays européens une mortalité plus basse chez les femmes (28 pour 100 000) que chez les hommes (60 pour 100 000). Au niveau mondial, l'AVC restera en 2030 la première ou la seconde cause de mortalité avec environ 10% des décès qui lui seront attribuables (Mathers & Loncar, 2006) . Cette mortalité a diminué de manière importante au cours du temps pour l'ensemble des AVC : par exemple pour les hémorragies cérébrales, la mortalité à 28 jours a diminué de 43% à 24% à Dijon de 1985 à 2004 (Benatru *et al.*, 2006). En France, les AVC ont une mortalité hospitalière d'environ 16%.

*** Handicap :**

Première cause de handicap acquis de l'adulte aujourd'hui, la part des AVC dans le handicap parmi les différentes maladies restera très importante : les AVC seraient en 2030 à la 6^{ème} place évaluée en « Disability-Adjusted Life Year » (mesure du « poids » global d'une maladie : somme du nombre d'années de vie perdues et du nombre d'années vécues avec un handicap) (Mathers & Loncar, 2006).

Le handicap est lié aux déficits moteurs (paralysies) ou sensitifs, aux troubles du langage (aphasie) mais aussi aux troubles cognitifs, souvent sous-estimés. Environ 70% des patients survivants gardent des séquelles qui interfèrent de façon majeure avec leurs capacités fonctionnelles et cognitives (Hochstenbach *et al.*, 1998 ; Sachdev *et al.*, 2004 ; Hommel *et al.*, 2009). Alors que les conséquences du déficit moteur sur le handicap ont largement été étudiées, les répercussions sociales et professionnelles des troubles cognitifs ne sont pas évaluées systématiquement. Ces troubles correspondent non seulement aux déficits neuropsychologiques liés à la topographie lésionnelle, tels que la négligence spatiale, les agnosies (troubles de la reconnaissance) ou les apraxies (troubles de la gestuelle), mais également à une atteinte plus globale concernant les fonctions exécutives (Hochstenbach *et al.*, 1998 ; Leskela *et al.*, 1999) ou la mémoire de travail (Jaillard *et al.*, 2009), l'attention, et la fatigabilité (Ingles *et al.*, 1999 ; Carota *et al.*, 2002).

En outre, les AVC représentent une cause importante de dépression chez les malades et leur entourage. La dépression a un rôle délétère dans la récupération qu'elle soit associée ou non à l'atteinte des fonctions cognitives (Morris *et al.*, 1992 ; Kauhanen *et al.*, 1999 ; Kotila *et al.*, 1999 ; Gainotti *et al.*, 2001 ; House *et al.*, 2001).

*** Coût des AVC :**

La charge financière représentée par les AVC est très importante pour le système de santé français (8,3 milliards d'euros par an). Pour la première année après un AVC, la période aiguë de la maladie représente globalement 40% du coût, la rééducation 29% et les soins ambulatoires 8%. Pour le coût global des AVC sur une durée plus longue, la variable « handicap » explique 42% du coût des AVC. Néanmoins le coût total varie essentiellement en fonction du degré de handicap résiduel et du lieu de résidence en période chronique. Ainsi, un patient n'ayant pas récupéré la marche et nécessitant une aide permanente représente un coût d'environ 35 000 euros alors qu'un patient sans handicap résiduel représente un coût d'environ 10 000 euros. Un traitement coûteux tel que la thrombolyse ou la thérapie cellulaire permet de réduire le handicap post-AVC, peut ainsi entraîner un bénéfice en terme de qualité de vie du patient mais également de coût global de santé publique.

I.1.4. Physiopathologie de l'ischémie cérébrale

*** Hémodynamique cérébrale :**

Chez l'homme, le cerveau consomme 20% de l'oxygène total alors qu'il ne représente que 2% du poids de l'organisme. La consommation cérébrale d'oxygène est de 3 mL/100g/min avec un taux d'extraction de 40%.

Le débit sanguin cérébral (DSC) normal est de 45-50 mL/100g/min et est inversement corrélé à l'âge. Il est plus important au sein de la substance grise que de la substance blanche. Le volume sanguin cérébral (VSC) normal est de 5 mL/100g.

La pression de perfusion cérébrale (70-100 mmHg) correspond à la pression artérielle moyenne moins la pression veineuse qui est négligeable en l'absence d'hypertension intracrânienne. L'autorégulation de la pression de perfusion est rapide (< 10 s en cas d'hypotension sévère) et correspond à la réactivité vasculaire (vasodilatation et vasoconstriction) des artères extraparenchymateuses via leur innervation sympathique, des petites artères et des artérioles. En situation physiologique, cette autorégulation permet la stabilité de la pression de perfusion pour des pressions artérielles moyennes de 60 à 150 mmHg (Hossmann, 2006).

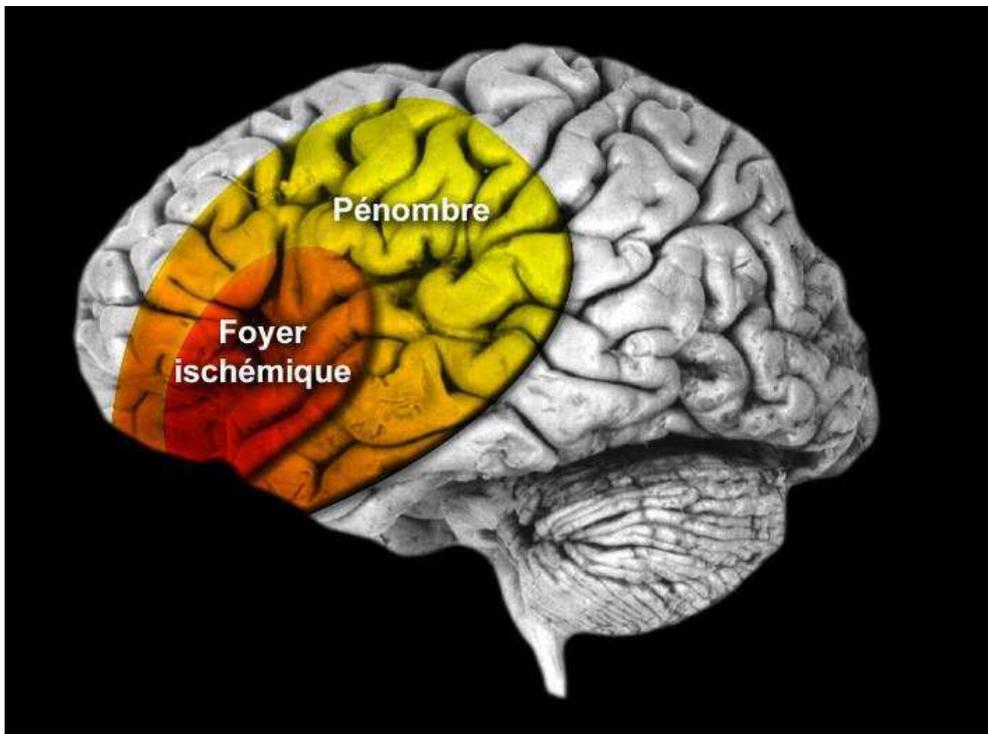
En situation d'ischémie, lors de l'occlusion d'une artère, la baisse de la pression de perfusion est compensée par une vasodilatation d'aval permettant de maintenir constants le DSC et le VSC. Lorsque cette situation se prolonge, il existe une perte de l'autorégulation marquée par une baisse du DSC. La consommation d'oxygène est alors encore maintenue par une augmentation de l'extraction d'oxygène de manière temporaire. Il existe ensuite un continuum de baisse du DSC conduisant à l'infarctus cérébral :

- 60-50% du DSC normal : perte de la synthèse protéique.
- 40% du DSC normal : arrêt des potentiels évoqués et acidose intra et extracellulaire.
- 30% du DSC normal : défaillance électrique avec une activité cellulaire de base maintenue.
- 25% du DSC normal : œdème tissulaire
- 20% du DSC normal : défaillance membranaire irréversible avec perte du gradient transmembranaire (pompes Na/K ATP dépendantes). Sortie du K^+ intracellulaire et entrée de Na^+ , Cl^- et Ca^{2+} responsables d'un œdème cytotoxique.

Lorsque la baisse du DSC est comprise entre 20% et 40% (10-20 mL/100g/min), il n'existe pas encore de lésion cellulaire irréversible mais une perte de l'activité électrique. Cette zone

dite de pénombre se différencie du « cœur » (ou foyer) ischémique dans lequel la baisse majeure du DSC induit des lésions irréversibles des neurones, des cellules gliales puis des cellules endothéliales avec une chute du VSC ($< 2 \text{ mL}/100\text{g}$). La zone de pénombre peut évoluer vers l'infarctus ou être épargnée notamment en cas de recanalisation précoce de l'artère occluse (**Figure 5**). Elle représente donc une cible thérapeutique majeure à la phase aiguë de l'ischémie cérébrale.

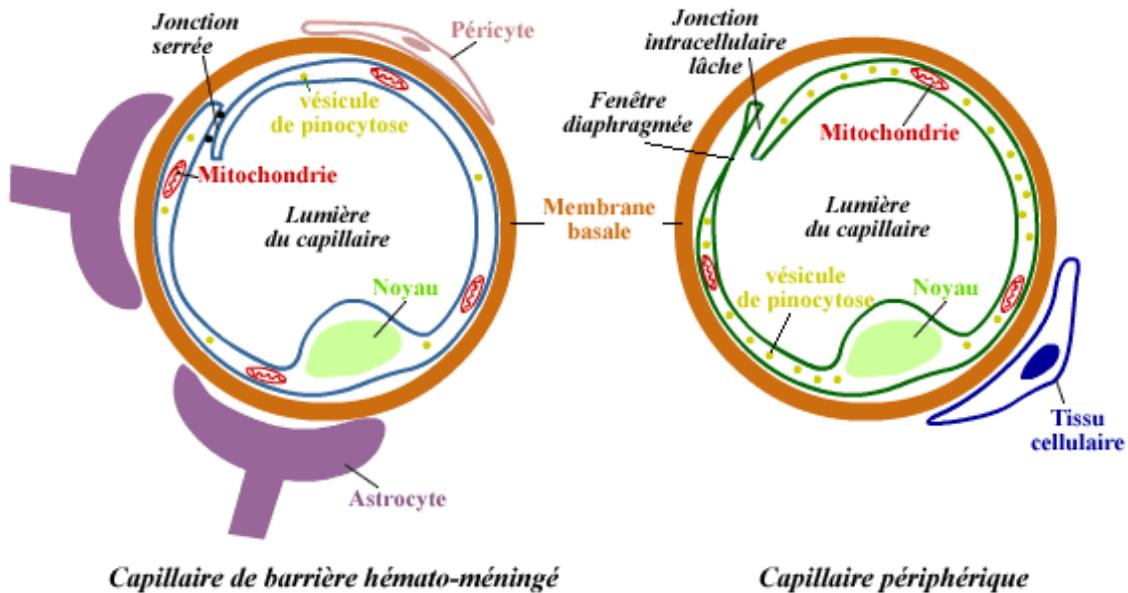
Figure 5. Phase aiguë de l'ischémie cérébrale avec un foyer ischémique siège de lésions cellulaires irréversibles et une zone de pénombre siège d'une défaillance électrique des neurones potentiellement réversible.



* Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique :

La barrière hémato-encéphalique est un élément essentiel dans les interactions sang/cerveau. L'ensemble neuro-vasculaire et glial qu'elle représente est au cœur de la physiopathologie de l'ischémie. Elle est composée de cellules endothéliales, d'une membrane basale, de pieds astrocytaires et de péricytes (**Figure 6**). Elle a une perméabilité « sélective » en condition physiologique.

Figure 6. Comparaison d'un capillaire de barrière hémato-encéphalique, composé de cellules endothéliales, d'une membrane basale, de péricytes et de pieds astrocytaires, et d'un capillaire périphérique, composé « uniquement » de cellules endothéliales et d'une membrane basale.



En condition ischémique, dès les premières heures, la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique augmente et favorise ainsi les échanges sang/tissu (Grillon *et al.*, 2008). Après une diminution transitoire de la perméabilité (à 24 heures) (Pillai *et al.*, 2009), celle-ci réaugmente rapidement. Cette augmentation est liée à celle de l'activité de la pompe Na/K ATPase endothéliale due au K^+ extracellulaire et à la présence de radicaux libres. Un œdème tissulaire apparaît en 6 à 12 heures lié au gradient osmotique plasma/tissu ischémié avec le passage de petites molécules. L'œdème vasogénique, lié à la modification de la pression oncotique, débute à 12 heures. Il devient maximum deux jours après le début de l'ischémie avec le passage possible de l'albumine. Cette augmentation de la perméabilité de la barrière est maximale entre 4 et 10 jours après l'ischémie et se maintient sur plusieurs semaines (Strbian *et al.*, 2008). Par ailleurs, la reperfusion majore la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique d'autant plus que la durée d'ischémie est prolongée (Grillon *et al.*, 2008). La

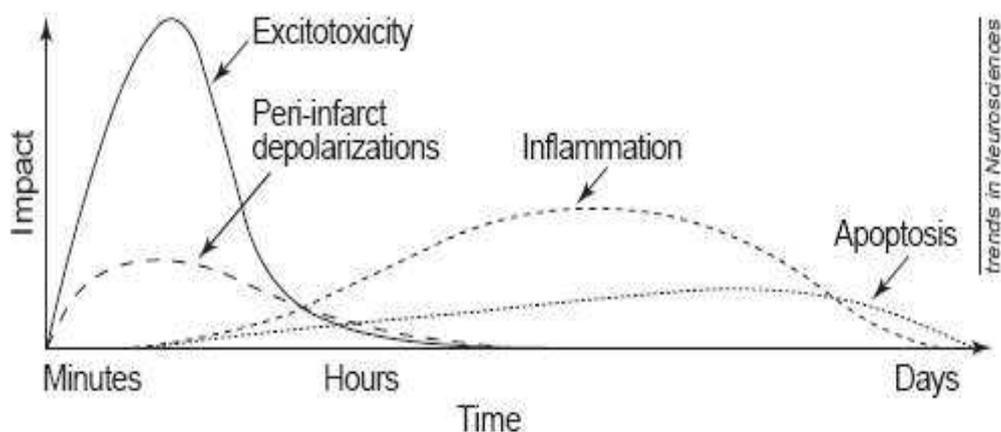
« perméabilisation » de cette barrière semble avoir un rôle délétère sur le tissu cérébral en favorisant l'adhésion et l'extravasation des leucocytes circulants et des macrophages.

Les astrocytes jouent un rôle important au niveau de la barrière hémato-encéphalique dans les échanges sang-neurones et dans la régulation du microenvironnement neuronal. Ils jouent un rôle clé lors de l'ischémie cérébrale et pourraient ainsi être une cible « gliale » non négligeable des traitements à visée neuroprotectrice (Takano *et al.*, 2009).

* Excitotoxicité et nécrose :

Immédiatement après le début de la baisse de perfusion, une nécrose des neurones et des cellules gliales est engendrée par l'afflux calcique intracellulaire. Cette augmentation du calcium intracellulaire entraîne une perturbation mitochondriale avec synthèse de radicaux libres, une activation des enzymes de dégradation cellulaire (lipases, protéases, endonucléases), et l'activation de la production de NO toxique par la NO synthase de type I. L'ischémie conduit également à la libération d'acides aminés excitateurs, dont l'aspartate et le glutamate, responsables de lésions cellulaires. L'augmentation du glutamate extracellulaire est de plus majorée par la diminution de sa recapture au niveau présynaptique et astrocytaire (Rossi *et al.*, 2000). Cette augmentation de glutamate entretient l'augmentation du calcium intracellulaire (Stanika *et al.*, 2009) majorant ainsi la nécrose par excitotoxicité (Dirnagl *et al.*, 1999) (**Figure 7**). La nécrose survenant par désintégration cellulaire a également un rôle délétère sur les cellules environnantes exposées aux produits de dégradation cytotoxiques.

Figure 7. Chronologie des mécanismes impliqués dans l'ischémie cérébrale focale (Dirnagl *et al.*, 1999).



*** NO et radicaux libres :**

L'ischémie induit la production de NO au niveau neural par la NO synthase neurale (type I), et au niveau des cellules endothéliales et gliales par la NO synthase de type II. Au niveau neural, essentiellement en situation d'ischémie-reperfusion, la NO synthase entraîne la formation de radicaux libres notamment de peroxy-nitrites contribuant à la mort cellulaire (Huang *et al.*, 1994). L'augmentation de l'activité de la NO synthase de type II favorise également la mort cellulaire (Iadecola, 1997) en majorant notamment l'excitotoxicité. Au niveau endothélial, la production de NO pourrait également avoir un effet bénéfique via l'induction d'une vasodilatation et un effet antithrombotique. Les mécanismes responsables des effets bénéfiques et/ou délétères du NO sont encore sujets à controverse.

*** Acidose et glucose :**

L'extraction du glucose au niveau cérébral est de 20%. Le métabolisme du glucose se produit quasi-exclusivement en présence d'oxygène par la glycolyse aérobie au niveau cytoplasmique et mitochondrial (oxydation phosphorylante). En situation d'ischémie, la glycolyse anaérobie produit du lactate et des ions H^+ qui ne sont pas consommés en l'absence de respiration mitochondriale. Ainsi, la baisse du pH intracellulaire ($< 6,5$) liée à cette accumulation d'ions H^+ majore l'œdème cytotoxique essentiellement au niveau des cellules gliales via la pompe H^+/Na^+ . Cette acidose, aggravée par l'hyperglycémie en situation d'ischémie, participe à l'extension de l'infarctus cérébral (Wagner *et al.*, 1992).

*** Inflammation :**

L'inflammation cérébrale consécutive à l'ischémie se traduit par une stimulation et une prolifération microgliales associées à une attraction des leucocytes circulants (Denes *et al.*, 2007). Elle peut s'accompagner d'une détérioration neurologique secondaire (Dirnagl *et al.*, 1999) et peut altérer les capacités de prolifération et de migration des précurseurs neuraux de la zone sous-ventriculaire (Pluchino *et al.*, 2008). Dans les tous premiers jours, les médiateurs de l'inflammation ont une influence délétère sur l'infarctus, alors que, dans les semaines suivantes, les cellules médiatrices de l'inflammation participent au remodelage et à la reconstruction des tissus lésés (Nighoghossian *et al.*, 2008 ; Witte & Stoll, 1997).

Lors de l'ischémie cérébrale, l'activation des intégrines et sélectines favorisent l'adhésion cellulaire. Ainsi, en plus de l'activation de la microglie par les corps apoptotiques et nécrotiques, il existe une migration des polynucléaires neutrophiles (dès le premier jour) et des macrophages (2^{ème} jour). Ces polynucléaires aggravent le stress oxydatif par l'activation

de la NO synthase II, et par l'expression de la cyclo-oxygénase 2 induisant la synthèse de radicaux libres et de prostanoïdes cytotoxiques.

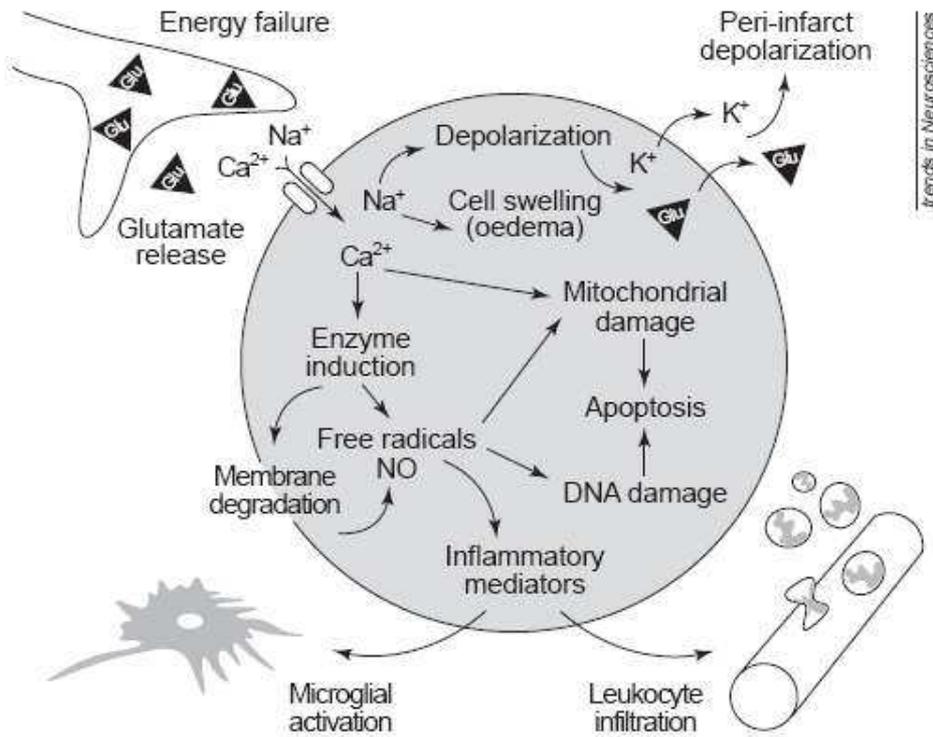
Concernant l'immunité humorale, on retrouve cette dualité des effets bénéfiques et délétères. Des cytokines telles que IL-1, IL-6, IL-10 ou TNF α aggravent les lésions cérébrales, alors que IL-10 ou TNF β ont des propriétés neuroprotectrices.

*** Apoptose :**

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée) est un processus physiologique de régulation des populations cellulaires particulièrement au sein du cerveau (Hotchkiss *et al.*, 2009). Ce phénomène actif nécessite une synthèse protéique et donc une consommation énergétique. Ainsi, au sein du foyer ischémique, les phénomènes d'apoptose sont limités ou incomplets et se combinent à la mort cellulaire par nécrose. L'apoptose est essentiellement impliquée dans la mort cellulaire dans la zone de pénombre. Elle est initiée par l'ensemble des signaux de mort cellulaire (TNF α , radicaux libres...), par la diminution locale des facteurs trophiques, par le dysfonctionnement mitochondrial en situation d'ischémie et par l'induction de gènes tels que p53 et la combinaison des gènes Bax-Bcl2 conduisant à l'activation de caspases (notamment la caspase 9). A la différence de la nécrose, l'apoptose se caractérise par la préservation initiale de la membrane cellulaire, la condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire. La cytotoxicité environnante induite par l'apoptose produisant des corps apoptotiques phagocytés est ainsi moins importante que celle induite par la nécrose conduisant à la désintégration de la cellule par œdème.

Figure 8. Résumé de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale focale.

La défaillance énergétique entraîne une dépolarisation du neurone. L'activation des récepteurs au glutamate augmente les concentrations de Ca^{2+} , Na^+ et Cl^- intracellulaires avec la formation d'un œdème cytotoxique. La diffusion du glutamate et de K^+ dans l'espace extracellulaire entraîne des vagues de dépolarisations extensives autour de la lésion. Le Ca^{2+} intracellulaire active de nombreuses enzymes (protéases, endonucléases, lipases...). La production de radicaux libres et de NO entraînent des dégâts membranaires, mitochondriaux et nucléaires (ADN) conduisant la cellule vers la mort programmée (apoptose). Ces radicaux libres induisent aussi la formation de médiateurs inflammatoires responsables de l'activation de la microglie et de l'infiltration leucocytaire (Dirnagl *et al.*, 1999).



I.1.5. Traitements actuels de l'AVC

Nous n'aborderons pas ici les traitements de prévention secondaire des AVC.

*** Unité Neuro-vasculaire (UNV) :**

La prise en charge rapide et spécifique en unité spécialisée des patients victimes d'AVC est le premier traitement efficace pour tous les patients victimes d'AVC (Hankey & Warlow, 1999). L'efficacité des UNV a été démontrée quels que soient la sévérité, l'âge des patients et le délai d'admission (Hommel *et al.*, 2002). Pour éviter un décès à 1 an, il faut hospitaliser en UNV 30 patients et pour éviter un décès ou dépendance, 14 patients.

L'hospitalisation initiale en UNV est d'autant plus efficace que l'admission du patient est précoce (< 3 heures) après l'AVC (Silvestrelli *et al.*, 2006). De plus, le bénéfice de cette hospitalisation en UNV sur la mortalité, le handicap et l'autonomie se maintient jusqu'à 10 ans après l'AVC (Indredavik *et al.*, 1999).

La prise en charge multidisciplinaire dès les premières heures, la diminution des complications d'alitement, et la précocité de la rééducation neurologique spécialisée sont autant de facteurs de bon pronostic accessibles dans ces unités de soins spécifiques.

*** Mesures générales pour tout AVC à la phase aiguë :**

Lors de la prise en charge initiale d'un patient victime d'un AVC, des mesures générales avec une surveillance clinique étroite sont essentielles pour limiter la lésion cérébrale et les complications générales, et améliorer ainsi la récupération fonctionnelle ultérieure (Adams *et al.*, 2007).

- La pression de perfusion cérébrale doit être maintenue par un alitement strict et un respect de l'hypertension artérielle réactionnelle en cas d'ischémie (arrêt des traitements antihypertenseurs, perfusion de sérum salé).

- L'hyperthermie constituant un facteur de mauvais pronostic (Saini *et al.*, 2009), les traitements antipyrétiques et antibiotiques (en cas d'infection notamment pulmonaire ou urinaire) doivent être utilisés de manière précoce.

- L'hyperglycémie est également un facteur de mauvais pronostic (Fuentes *et al.*, 2009). L'utilisation de perfusion de sérum glucosé doit être évitée et l'administration d'insuline pourrait avoir un intérêt y compris chez les patients non diabétiques (Bruno *et al.*, 2008).

- Les troubles de déglutition, responsables de pneumopathies d'inhalation précoces et aggravantes, doivent être détectés. Le patient doit rester à jeun tant que la déglutition n'est pas

optimale. L'utilisation d'une nutrition par sonde naso-gastrique doit être envisagée en cas de troubles de déglutition sévères.

- La mobilisation douce et précoce des patients permet d'éviter les complications d'alitement (escarres, douleurs, thromboses veineuses des membres inférieurs) et de limiter la spasticité ultérieure.

- La rééducation neurologique doit être initiée précocement comprenant la kinésithérapie, l'orthophonie et l'ergothérapie.

* **Thrombolyse(s) :**

Concernant l'ischémie cérébrale, la recanalisation de l'artère occluse est une urgence immédiate et permet d'améliorer le pronostic ultérieur (Rha & Saver, 2007). Cette recanalisation doit être effective le plus précocement possible pour limiter la zone d'infarctus séquellaire (Marler *et al.*, 2000). Ce concept « Time is brain » a pu être quantifié : le cerveau en situation d'ischémie perd chaque minute environ 1,9 millions de neurones, 14 milliards de synapses, et 12 km de fibres myélinisées (Saver, 2006). Il existe une fibrinolyse (ou thrombolyse) physiologique qui assure une recanalisation spontanée précoce dans 24,1% des cas. L'utilisation de la thrombolyse IV permet une recanalisation dans 46,2% des cas, la thrombolyse intraartérielle (IA) dans 63,2% des cas, la combinaison IV et IA dans 67,5% des cas, et la thrombectomie mécanique endovasculaire dans 83,6% des cas (Rha & Saver, 2007).

La thrombolyse IV par activateur du plasminogène (rt-PA ou Altéplase, Actilyse®) est le traitement recommandé dans les premières heures suivant l'infarctus cérébral. Son efficacité dans les 3 premières heures a été démontrée avec un chance de récupération doublée (odds ratio = 2,2) (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Cette efficacité a été clairement confirmée par un registre observationnel de plus de 6000 patients rapportant 39% d'évolution sans handicap après thrombolyse IV appliquée dans les 3 heures suivant l'infarctus cérébral (*vs* 29% pour les patients traités par placebo dans les essais contrôlés) (Wahlgren *et al.*, 2007). Une étude récente sur 821 patients a permis d'élargir cette fenêtre thérapeutique en démontrant une efficacité similaire de la thrombolyse IV par altéplase appliquée dans les 4,5 heures suivant l'AVC (Hacke *et al.*, 2008 ; Wahlgren *et al.*, 2008). En France, les recommandations de la Haute Autorité de Santé ont donc été révisées cette année en mentionnant l'indication du traitement par thrombolyse IV dans les 4 heures et demi suivant un infarctus cérébral.

Cependant, la très courte fenêtre thérapeutique limite encore son application à une minorité de patients. De plus, ce traitement comporte un risque important d'hémorragie cérébrale symptomatique : 1,7% dans les 24 heures suivant le traitement dans le registre observationnel

(Wahlgren *et al.*, 2007), 2,4% dans les 36 heures dans l'essai ECASS 3 (Hacke *et al.*, 2008) contre 0,2% dans le groupe placebo de ce même essai. Ce risque hémorragique grave d'environ 6-7% au total (en incluant les hémorragies plus tardives) est lié à la sévérité de l'AVC, à l'âge du patient, et aux facteurs de risque surajoutés (hypertension artérielle, hyperglycémie ou diabète). Cela a conduit à limiter l'utilisation de la thrombolyse IV aux UNV à même de prévenir et de gérer au mieux ces complications.

A l'avenir, on pourrait envisager d'élargir à 6 heures l'application de ce traitement en sélectionnant les patients par IRM de diffusion et de perfusion estimant ainsi la zone de pénombre ischémique potentiellement réversible (Thomalla *et al.*, 2006). En parallèle, se développent de nouvelles molécules thrombolytiques utilisables à des délais plus importants. Ainsi, l'injection IV de Desmoteplase, induisant un plus faible risque hémorragique, serait utilisable et efficace jusqu'à 9 heures après l'infarctus cérébral (Furlan *et al.*, 2006 ; Hacke *et al.*, 2009). Ces données encourageantes nécessitent encore à l'heure actuelle confirmation, et un essai clinique multicentrique est en cours.

La thrombolyse IA a également été évaluée dans des essais contrôlés dont les résultats sont plus discutés. Il s'agit d'un geste endovasculaire qui nécessite une artériographie sous anesthésie effectuée par une équipe de neuroradiologues expérimentés. L'étude PROACT II (Furlan *et al.*, 1999) a montré l'efficacité de la prourokinase IA associée à l'héparine chez les patients ayant une occlusion de l'ACM de moins de 6 heures. Cependant, aucune recommandation claire ne peut être établie. La thrombolyse IA pourrait être utilisée, au cas par cas, entre 4,5 et 6 heures pour les occlusions de l'ACM, et pour les occlusions de l'ACI dont la réponse à la thrombolyse IV est faible. Les occlusions de l'artère basilaire, du fait de leur très mauvais pronostic (> 80% de mortalité), sont une bonne indication à la thrombolyse IA dans des centres expérimentés. La supériorité de la voie IA sur la voie IV étant encore controversée (Schonewille *et al.*, 2009), la thrombolyse IV, plus simple en pratique, peut être envisagée particulièrement dans les hôpitaux ne disposant pas d'une équipe de neuroradiologie interventionnelle (Lindsberg & Mattle, 2006).

La thérapie combinée associant thrombolyse IV et IA pourrait être bénéfique (Mazighi *et al.*, 2009) mais cette méthode reste à évaluer dans des essais cliniques plus larges.

* **Thrombectomie mécanique :**

En neuroradiologie interventionnelle, l'extraction mécanique du caillot est possible par voie endovasculaire (Choi *et al.*, 2006). Les résultats actuels sont prometteurs pour des patients présentant une contre-indication à la thrombolyse IV (Smith *et al.*, 2005), mais également pour des patients pour lesquels la thrombolyse IV n'a pas permis de recanalisation (Smith *et*

al., 2008). Ces procédures d'extraction sont applicables et semblent efficaces jusqu'à 8 heures après l'AVC. De nombreux progrès dans ce domaine ont été effectués ces dernières années. Ainsi, la thromboaspiration sans franchissement du caillot est faisable et semblerait efficace (Clark *et al.*, 2009)

A la phase aiguë de l'ischémie, la pose de stents intracrâniens est faisable (Brekenfeld *et al.*, 2009). L'utilisation de stents et/ou d'une dilatation artérielle par angioplastie permet d'améliorer le taux de recanalisation et le pronostic fonctionnel après thrombolyse IV (Choi *et al.*, 2009) ou IA (Choi *et al.*, 2009 ; Levy *et al.*, 2006).

*** Antithrombotiques (hors thrombolytiques) :**

Concernant les antiagrégants plaquettaires, l'utilisation de l'aspirine à la phase aiguë d'un AVC ischémique est bénéfique en réduisant notamment le risque de récurrence précoce à 1,6% (vs 2,3% sans traitement) (Chen *et al.*, 2000 ; The International Stroke Trial, 1997). Les autres traitements antiagrégants (Clopidogrel, Dipyridamole), habituellement utilisés en prévention secondaire, n'ont pas fait l'objet d'essais cliniques importants à la phase aiguë. En cas de contre-indication à l'aspirine (allergie...), une dose de charge de Clopidogrel (300 mg) pourrait avoir un intérêt comme dans l'infarctus du myocarde (Gurbel *et al.*, 2003).

Concernant les anticoagulants à dose curative, leur utilisation n'est pas conseillée à la phase aiguë d'un infarctus cérébral. Bien qu'ils aient une efficacité supérieure à celle des antiagrégants pour limiter les lésions ischémiques et les récurrences précoces, ils entraînent des complications hémorragiques générales et surtout cérébrales qui contrebalancent le bénéfice constaté (Paciaroni *et al.*, 2007). Le traitement anticoagulant par héparine non fractionnée IV pourrait avoir un intérêt en milieu spécialisé avec une surveillance étroite (Schmidt *et al.*, 2004). Il existe un consensus sur l'indication de l'héparine non fractionnée à la phase aiguë de l'infarctus cérébral dans certains cas particuliers : dissection artérielle extracrânienne, occlusion ou sténose serrée de l'artère basilaire, origine cardio-embolique, infarctus aigu en évolution ou accidents ischémiques transitoires répétés (Caplan, 2003).

*** Neurochirurgie :**

A la suite d'un infarctus étendu, dit malin, dans le territoire de l'ACM, il existe un œdème cérébral majeur compressif. Ces infarctus, souvent observés chez des patients jeunes, ont un pronostic spontané très grave avec 80% de mortalité. L'hémicrâniectomie décompressive réalisée dans les 48h suivant ce type d'infarctus améliore de manière significative le pronostic (78% des patients survivants vs 21% sans crâniectomie ; 43% des patients autonomes à la marche vs 21%) (Vahedi *et al.*, 2007).

Il existe également des infarctus cérébelleux malins de très mauvais pronostic par compression du tronc cérébral et/ou hydrocéphalie. Ils représentent une bonne indication à la crâniectomie sous-occipitale décompressive (Chen *et al.*, 1992 ; Pfefferkorn *et al.*, 2009).

*** Neuroprotection :**

Alors que de très nombreuses études expérimentales chez l'animal ont démontré des effets bénéfiques de très nombreux traitements neuroprotecteurs, les résultats restent malheureusement décevants chez l'homme (Cheng *et al.*, 2004 ; STAIR - Stroke Therapy Academic Industry Roundtable, 1999). Un résultat encourageant a été suggéré par l'essai SAINT I portant sur l'administration d'un agent anti-radicaux libres (NXY059) à la phase aiguë de l'infarctus cérébral (Lees *et al.*, 2006). Malheureusement, ce bénéfice n'a pas pu être confirmé dans l'essai SAINT II (Shuaib *et al.*, 2007) remettant une nouvelle fois en cause l'avenir de la neuroprotection dans l'AVC (Savitz & Fisher, 2007). La discussion est ouverte notamment sur la qualité de la méthodologie des futurs essais (Macleod *et al.*, 2008).

*** Rééducation neurologique :**

Dès les premiers jours suivant l'AVC, la rééducation neurologique spécifique est essentielle pour aider à la récupération. L'objectif de la rééducation après un AVC est de limiter les conséquences de la lésion cérébrale sur la vie quotidienne du patient en stimulant la récupération par la plasticité cérébrale (Nudo *et al.*, 1996) puis en développant des stratégies d'adaptation au handicap résiduel (Duncan *et al.*, 2005). Après une ischémie expérimentale, les rats soumis à un environnement favorable (activités variées, interactions avec d'autres rats) ont de meilleures performances que ceux maintenus dans l'environnement d'un laboratoire standard (Johansson, 2000 ; Komitova *et al.*, 2002 ; Komitova *et al.*, 2005). Ces résultats illustrent le rôle de la rééducation et de l'environnement dans la récupération après un infarctus cérébral.

La rééducation doit associer un travail multidisciplinaire : kinésithérapie, ergothérapie, orthophonie et neuropsychologie. Lorsque le patient nécessite une surveillance en hospitalisation, cette rééducation est réalisée en service de médecine physique et réadaptation. Aucun programme de rééducation en particulier ne semble supérieur aux autres. Cependant, pour améliorer la récupération de la marche après un AVC, la rééducation neurologique « classique » peut être associée à un programme d'entraînement physique (Ramas *et al.*, 2007).

La kinésithérapie est d'autant plus efficace qu'elle débute tôt, de manière intensive et orientée vers la fonction à récupérer : marche, motricité des membres et/ou de la main (Kwakkel *et al.*,

2004 ; Van Peppen *et al.*, 2004). Les études expérimentales et d'imagerie, sur la base d'expériences de privation sensorielle et d'acquisitions de tâches, ont montré que les modifications des représentations corticales dépendaient de leur usage (Karni *et al.*, 1995 ; Rauschecker, 1997).

L'orthophonie permet dès les premiers jours une démutisation des patients aphasiques et permet de fixer les bases de la rééducation ultérieure. Elle garde un effet bénéfique à long terme pour les aphasies chroniques (Meinzer *et al.*, 2005) en stimulant la plasticité des aires du langage qui persiste encore des années après la lésion (Meinzer *et al.*, 2008).

Le handicap lié aux troubles cognitifs est important après un AVC, comme nous l'avons noté précédemment dans ce travail (voir *I.1.3. Données épidémiologiques / Handicap*). Il n'existe aujourd'hui pas de consensus clair sur les programmes de rééducation neuropsychologique à effectuer après un AVC. Ainsi la rééducation de la négligence spatiale reste débattue (Bowen *et al.*, 2002 ; Bowen & Lincoln, 2007).

La rééducation favorisant la plasticité cérébrale pourrait être optimisée par de nouvelles techniques telle que la stimulation magnétique transcrânienne répétée (Lefaucheur, 2006), l'imagerie mentale, ou l'utilisation de réalités virtuelles. Ces innovations thérapeutiques doivent encore faire l'objet d'essais cliniques plus larges pour devenir applicables en routine.

I.1.6. Mécanismes impliqués dans la récupération spontanée

Après un infarctus cérébral, on observe une récupération fonctionnelle liée à deux mécanismes principaux : 1) la restitution des fonctions du tissu ayant survécu à l'ischémie, 2) la réorganisation des réseaux neuronaux lésés correspondant à un mécanisme de plasticité. Décrite en neurosciences depuis plus d'un siècle (Berlucchi & Buchtel, 2009), la plasticité désigne la réorganisation d'un système fonctionnel consécutive à une lésion cérébrale ou à un apprentissage (Nudo, 2006). Les principaux processus cellulaires impliqués dans la plasticité cérébrale sont d'une part la neurogenèse et la synaptogenèse en étroite relation avec les autres cellules cérébrales lésées (macroglie, microglie et cellules endothéliales), et d'autre part le démasquage de connexions fonctionnellement inactives survenant dans les premières heures suivant la lésion (Chen *et al.*, 2002^a).

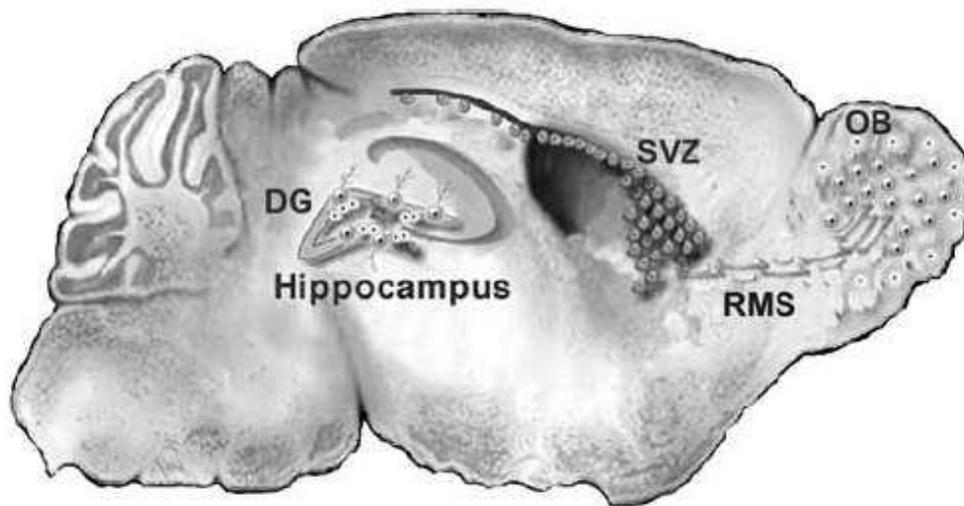
* **Hyperexcitabilité et synaptogenèse :**

Chez le rat, une augmentation de l'activité neuronale corticale a été enregistrée à proximité du centre de la lésion ischémique dès les 24 premières heures, avec un maximum à une semaine suivi d'une diminution progressive durant le premier mois et le retour à des valeurs subnormales en deux à 4 mois (Witte & Stoll, 1997). Cette hyperexcitabilité est due à une diminution de la densité des récepteurs GABA_A et AMPA et à une augmentation de celle des récepteurs NMDA. Il en résulterait une diminution de l'inhibition GABAergique, corrélée à l'augmentation de l'inhibition dans les aires non lésées à distance de l'infarctus. Cette hyperexcitabilité peut également être reliée à l'hyper-activation des régions motrices au niveau de l'hémisphère sain (Jones & Schallert, 1994 ; Weiller *et al.*, 1993). L'hyperexcitabilité cellulaire, contemporaine de la repousse synaptique, favoriserait la récupération de la lésion (Mittmann *et al.*, 1994). Cette synaptogenèse se déroule sur une période plus importante de quelques jours à plusieurs semaines. L'augmentation de la densité synaptique est associée à la repousse dendritique (expansion dendritique des neurones et des cellules gliales autour de la lésion). Sur un modèle murin, il a été montré que la récupération suite à une lésion limitée du cortex moteur était corrélée à l'expansion des champs dendritiques au niveau des régions adjacentes à la lésion (Kolb *et al.*, 2001 ; Kolb, 1987). Une lésion limitée du cortex moteur permet une récupération basée sur une réorganisation locale proche de la restitution *ad integrum*. A l'inverse, les lésions corticales étendues induisent une réorganisation extensive des systèmes afférents et efférents à l'origine d'une récupération incomplète, reflétant un mécanisme de compensation. Deux mécanismes à la phase chronique de la récupération motrice ont été mis en évidence : le recrutement des aires corticales motrices de l'hémisphère non lésé (Chollet *et al.*, 1991), et l'implication des aires fonctionnelles adjacentes à la lésion (Jaillard *et al.*, 2005 ; Weiller *et al.*, 1992). Les études portant sur la récupération motrice rapportent également le recrutement d'aires extra-motrices (notamment les aires pariétales postérieures) à la phase subaiguë (Loubinoux *et al.*, 2003). Ce recrutement « extra-moteur » initial est associé à une bonne récupération et traduirait plus la participation de l'ensemble des aires cérébrales à la récupération qu'à une plasticité locale définitive. Les schémas d'activation motrice avec une activation normale des aires motrices controlatérales et un recrutement des aires prémotrices de l'hémisphère sain sont associés à une bonne récupération. A l'inverse, l'activation d'aires distantes de la lésion est associée à une récupération incomplète. Ainsi, la repousse dendritique au niveau du cortex adjacent à la lésion conditionne la qualité de la récupération. Les efforts thérapeutiques doivent donc être orientés en ce sens pour favoriser une récupération tissulaire et fonctionnelle de qualité.

* Neurogenèse :

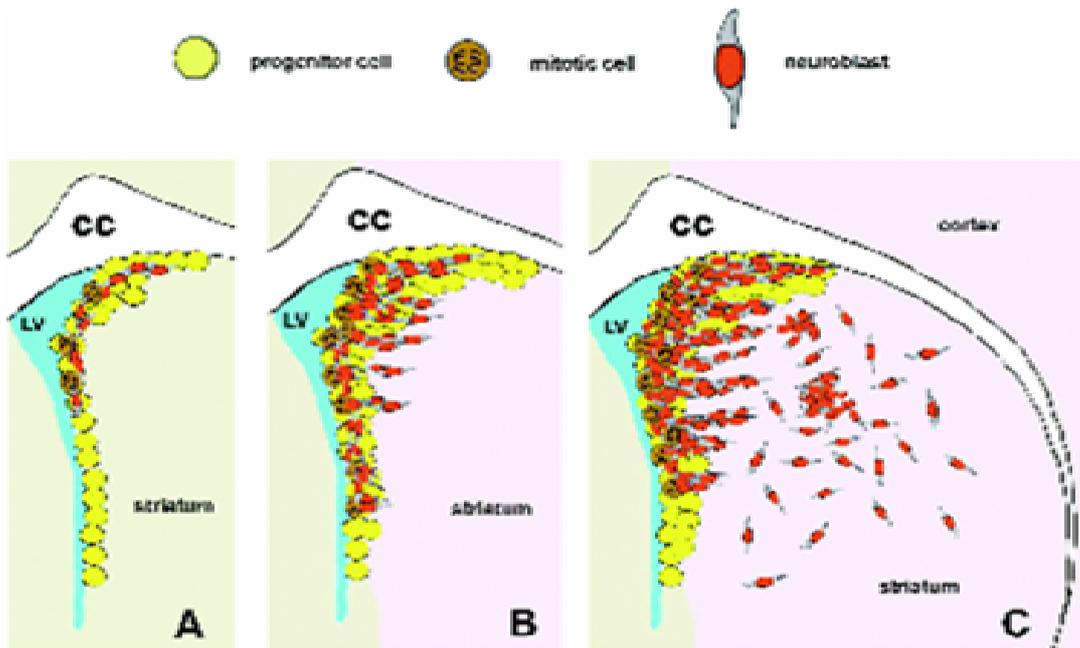
Une neurogenèse active persiste dans le cerveau adulte en l'absence de lésion cérébrale notamment dans le gyrus denté de l'hippocampe (renouvellement des cellules en grain) et au sein de la zone sous-ventriculaire chez l'animal (**Figure 9**) (Lichtenwalner & Parent, 2006). Cette neurogenèse hippocampique dans le gyrus denté existe et persiste au cours de la vie dans le cerveau humain adulte (Eriksson *et al.*, 1998).

Figure 9. Coupe sagittale d'un cerveau de rat adulte. Les deux régions présentant une neurogenèse persistante sont le gyrus denté (DG) hippocampique et la zone sous-ventriculaire (SVZ). Les progéniteurs neuraux situés sous la couche des cellules en grain au niveau de l'hippocampe prolifèrent et renouvellent les cellules en grain tout au long de la vie. Les progéniteurs de la zone sous-ventriculaire prolifèrent et donnent des neuroblastes qui migrent le long de « tubes » astrocytaires définissant le courant migratoire rostral (RMS) vers le bulbe olfactif (OB). Au niveau de ce dernier, les neuroblastes se différencient en neurones granulaires et periglomérulaires (Lichtenwalner & Parent, 2006).



L'ischémie cérébrale augmente cette neurogenèse endogène en activant la prolifération des précurseurs neuraux et leur différenciation en neuroblastes qui vont migrer de la zone sous-ventriculaire vers la lésion (Zhang *et al.*, 2005) (**Figure 10**). Cette capacité de régénération neurale post-ischémie persiste dans la zone sous-ventriculaire et les hippocampes (zone sous-granulaire) chez des rats âgés (Darsalia *et al.*, 2005). Au sein de la zone sous-ventriculaire, la prolifération cellulaire neurale et astrocytaire, en situation d'ischémie, semble augmentée par la stimulation de la signalisation Notch-1 (Wang *et al.*, 2009). Chez l'homme, une telle neurogenèse induite par l'ischémie et pouvant persister plusieurs mois (Thored *et al.*, 2006) a été observée au sein de la pénombre ischémique où les neurones néoformés et les neuroblastes se localisent particulièrement en périphérie des vaisseaux soulignant le rôle prépondérant de la « niche » neuro-vasculaire (Jin *et al.*, 2006) (**Figure 11**). Favoriser la microvascularisation aurait donc un impact direct sur la neurogenèse après un AVC (Thored *et al.*, 2007).

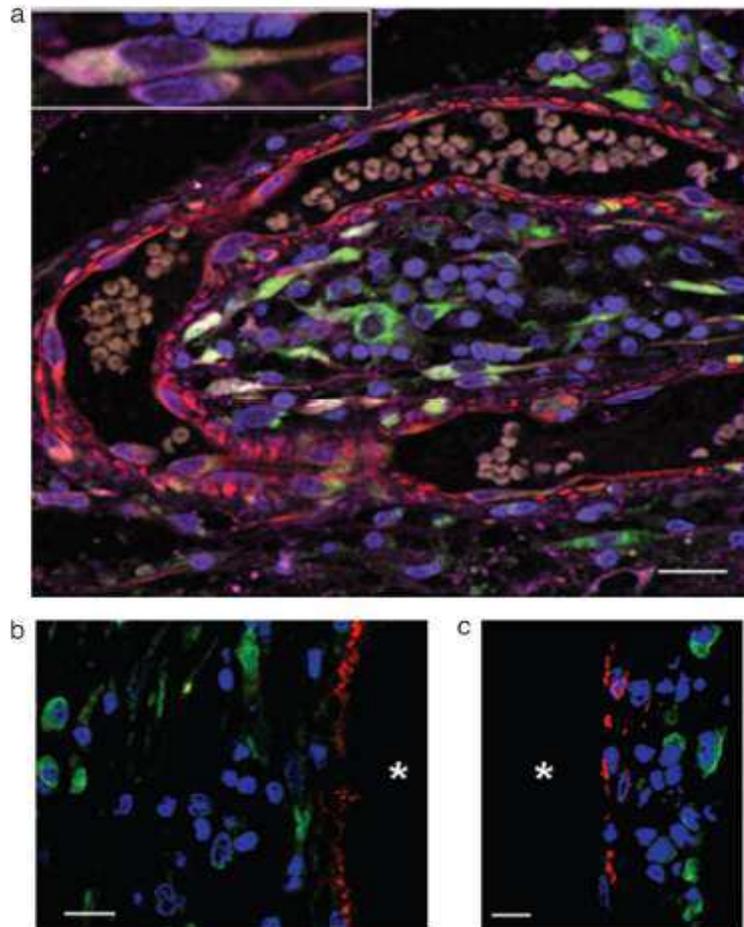
Figure 10. Neurogenèse endogène après une ischémie cérébrale focale. Coupe coronale d'un cerveau de rat adulte. **A** : divisions symétrique et asymétrique des progéniteurs neuraux (vert) au sein de la zone sous-ventriculaire. **B** : l'ischémie augmente la division de ces progéniteurs et les neuroblastes migrent vers le striatum lésé. **C** : Arrivant au sein de l'ischémie, les neuroblastes forment des amas puis se dispersent (Zhang *et al.*, 2005). LV : ventricule latéral ; CC : corps calleux.



* Angiogenèse :

Le microenvironnement cérébral est essentiel à la régénération neuronale. Venant de la zone sous-ventriculaire, les neuroblastes et neurones néoformés migrent particulièrement dans des zones périphériques à l'infarctus au sein de « niches » (ou unités) neurovasculaires spécifiques. Dans ces niches, les neurones immatures sont étroitement associés au remodelage microvasculaire (Ohab *et al.*, 2006). Neurogenèse et angiogenèse sont reliés entre autre par la production du stromal-derived factor 1 (Thored *et al.*, 2006) et de l'Angiopoïétine 1 (Ang1) favorisant la migration neuroblastique et la récupération fonctionnelle. A la phase aiguë, cette interaction neurone/vaisseau est marquée par la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, et à la phase plus tardive par l'interaction angiogenèse/neurogenèse inversant les signaux délétères de la phase aiguë en signaux de réparation tissulaire (Arai *et al.*, 2009). Chez l'homme, Jin *et al.* ont montré, sur 6 patients, cette localisation préférentielle de la neurogenèse, notamment des neurones immatures en cours de migration, autour des capillaires (**Figure 11**) (Jin *et al.*, 2006).

Figure 11. Niche neurovasculaire pour la neurogenèse induite par l'ischémie cérébrale dans le cortex humain. (Jin *et al.*, 2006). **a** : Neurones identifiés par les anticorps anti-double-cortin (vert), anti-TUC-4 (violet) et anti-nestin (rouge). Ces neurones, notamment à forme allongée (neurones en migration) (encart), apparaissent en amas à proximité des capillaires contenant les érythrocytes (*Barre d'échelle* = 20 μ m). Les cellules neurales double-cortin positives (vert) se distinguent des cellules endothéliales (facteur VIII, rouge) (**b**) et des cellules musculaires lisses (actine, rouge) (**c**) (*Barre d'échelle* = 15 μ m). * : lumière du vaisseau.

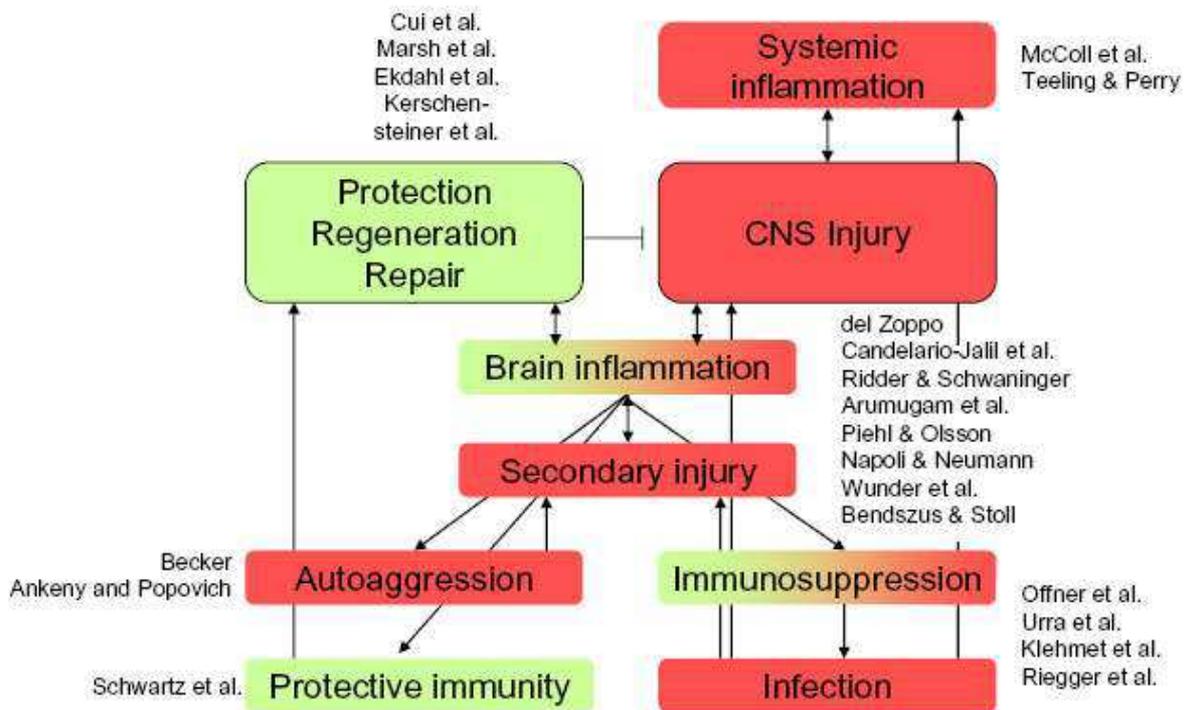


* Influence de la réaction inflammatoire post-ischémique :

Comme nous l'avons précédemment décrit (voir *I.1.4. Physiopathologie de l'ischémie cérébrale*), l'inflammation cérébrale consécutive à l'ischémie peut s'accompagner d'une détérioration neurologique dans les premiers jours alors que, dans les semaines suivantes, les cellules médiatrices de l'inflammation participent au remodelage et à la reconstruction des tissus au niveau de la lésion (Nighoghossian *et al.*, 2008 ; Witte & Stoll, 1997). Cette interaction entre le système nerveux central et le système immunitaire est complexe (**Figure 12**) (Dirnagl & Schwab, 2009). Outre les lésions inflammatoires surajoutées localement à la lésion ischémique, il existe une véritable immunodépression après un AVC. Cette immunodépression a un effet délétère en exposant à un risque infectieux élevé pouvant justifier d'une antibiothérapie préventive (Dirnagl *et al.*, 2007). A l'inverse, cette réaction

inflammatoire pourrait également avoir un rôle bénéfique en limitant des réactions immunitaires trop importantes au niveau du cerveau lésé et exposé au système immunitaire par la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique.

Figure 12. Interactions entre le système immunitaire et le système nerveux central. L'inflammation cérébrale consécutive à l'ischémie conduit d'une part à une aggravation des lésions cérébrales (en rouge) et d'autre part au remodelage et à la reconstruction des tissus (en vert). Au-delà du système nerveux central, il existe une véritable immunosuppression systémique induisant une sensibilité particulière aux infections (Dirnagl & Schwab, 2009).



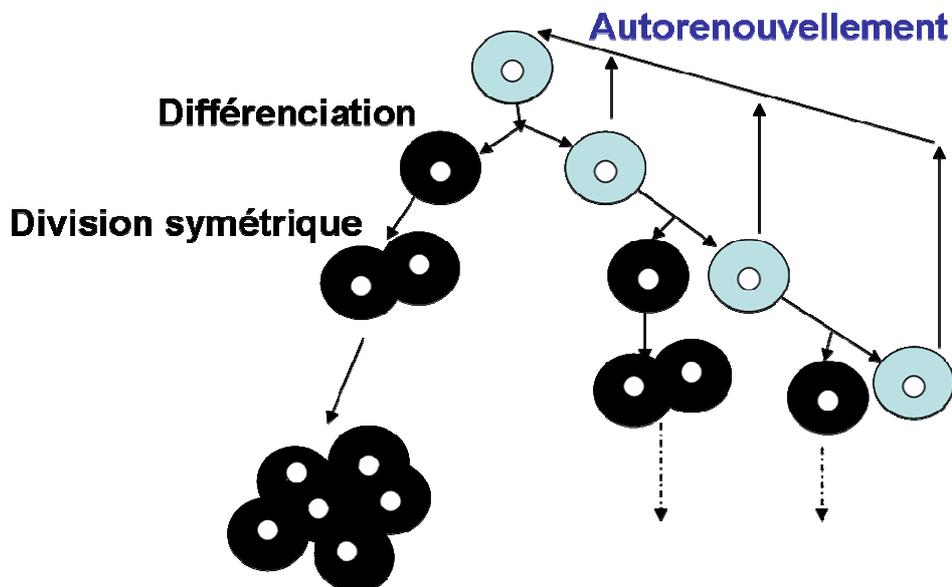
I.2. Cellules souches et thérapie cellulaire

* Cellules souches :

Les cellules souches sont des cellules avec un potentiel de différenciation en différents types cellulaires durant le développement embryonnaire et fœtal puis durant la croissance. Au sein de nombreux tissus différenciés, elles existent en tant que système de « réparation » interne (Vats *et al.*, 2005). Ces cellules indifférenciées qui peuvent rester inactives durant de longues périodes se caractérisent par trois propriétés spécifiques (**Figure 13**) :

- Division asymétrique : une cellule souche « mère » peut se diviser en une cellule souche « fille » et une cellule différenciée (Morrison & Kimble, 2006).
- Autorenewement : les cellules souches « filles » permettent l'autorenewement à long terme de la population cellulaire initiale.
- Différenciation : une cellule souche peut, dans certaines conditions, se différencier en une cellule plus spécialisée (musculaire, globule rouge, neurones...). Les cellules souches adultes se différencient habituellement en cellules du tissu dans lequel elles résident, soulignant ainsi l'importance du microenvironnement dans ce processus de différenciation.

Figure 13. Schéma de division asymétrique d'une cellule souche (bleue) en une cellule différenciée (noire) et en une cellule souche « fille » permettant l'autorenewement.

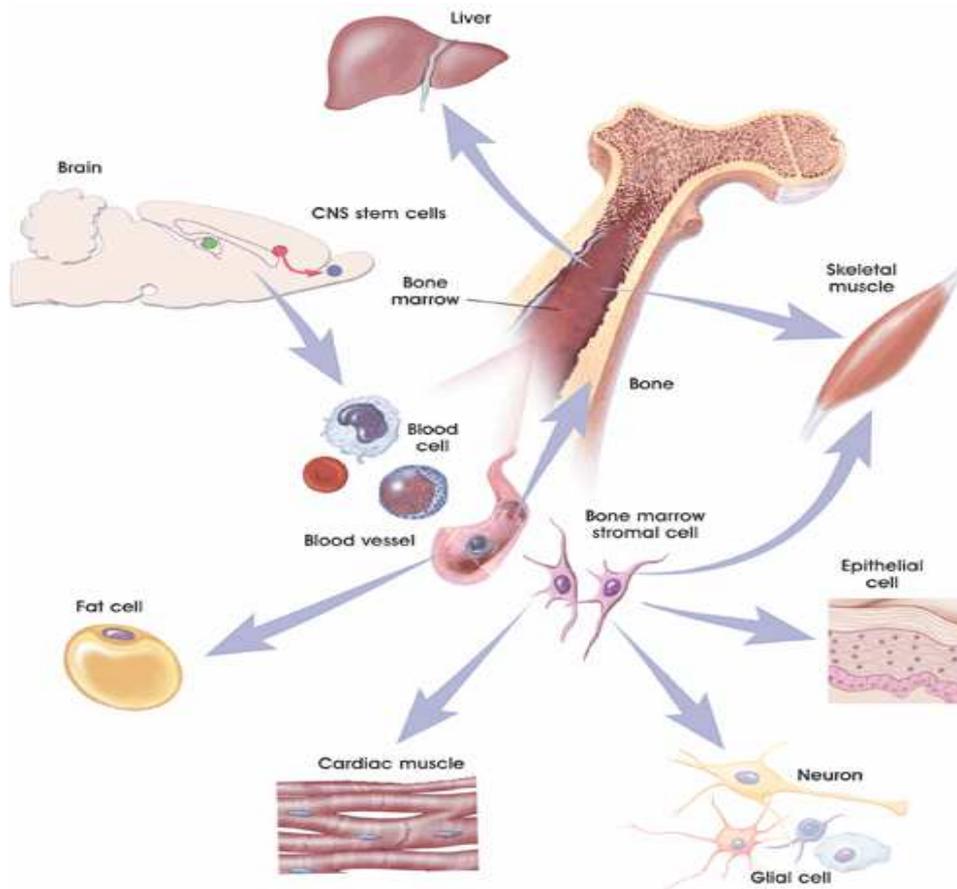


On distingue aujourd'hui les cellules souches embryonnaires, les cellules souches somatiques ou adultes, et plus récemment les cellules souches pluripotentes induites à partir de cellules adultes différenciées « reprogrammées » animales (Takahashi & Yamanaka, 2006 ; Wernig *et al.*, 2007 ; Okita *et al.*, 2007) ou humaines (Takahashi *et al.*, 2007).

Les cellules souches embryonnaires composant le blastocyste (embryon de 3 à 5 jours) sont la source de l'ensemble des tissus de l'organisme. Elles peuvent être obtenues par fécondation *in vitro* puis cultivées dans un cadre légal strict (Evans & Kaufman, 1981 ; Martin, 1981 ; Thomson *et al.*, 1998). Elles sont pluripotentes c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en tout type de cellules de l'organisme. Elles sont également immortelles ce qui leur confère une propriété de tumorigénicité (formation *in vitro* et *in vivo* de tératomes) limitant encore leur utilisation potentielle en thérapie cellulaire. Un enjeu essentiel aujourd'hui est donc de contrôler la différenciation de ces cellules *in vitro* pour produire des précurseurs cellulaires ou des cellules différenciées utilisables en médecine régénérative chez l'homme.

Les cellules souches adultes, également indifférenciées, se trouvent dans différents tissus (moelle osseuse, sang de cordon ombilical, tissu adipeux, cœur, cerveau...) dont elles permettent l'entretien et la « réparation » endogène au cours de la vie. Elles résident dans des sites spécifiques de chaque tissu : microenvironnement particulier constituant une « niche » cellulaire. Elles peuvent rester quiescentes durant de longues périodes. Leur capacité de différenciation reste limitée à certains types cellulaires : elles ne sont pas pluripotentes, comme les cellules souches embryonnaires, mais multipotentes (capables de se différencier en certains types de cellules habituellement spécifiques de leur microenvironnement de résidence). On distingue ainsi les cellules souches hématopoïétiques (CSH dans la moelle osseuse notamment), les cellules stromales de la moelle osseuse (ou cellules souches mésenchymateuses, CSM), les cellules souches neurales, les cellules souches épithéliales (système digestif), et les cellules souches cutanées. Ces cellules adultes possèderaient une propriété de transdifférenciation leur permettant de se différencier, dans certaines conditions encore mal identifiées, en cellules spécifiques différentes de celles de leur tissu d'origine (ex. : cellules souches neurales pouvant se différencier en globules rouges (**Figure 14**)). Elles ne sont pas immortelles et ne semblent pas induire de tumeurs comme les cellules souches embryonnaires.

Figure 14. Plasticité des cellules souches adultes (d'après <http://stemcells.nih.gov/info/basics/>)



Parmi ces cellules souches adultes, les cellules stromales ont été largement étudiées en expérimentations animales et semblent prometteuses pour des applications cliniques. Ces cellules adhérentes de type fibroblastiques peuvent être isolées de nombreux tissus : la moelle osseuse (CSM : 1/100 000 à 1/1 000 000 de cellules de moelle), le sang placentaire, le tissu adipeux, la membrane amniotique ou encore la membrane synoviale.

Les CSM (Pittenger *et al.*, 1999 ; Jiang *et al.*, 2002 ; Chamberlain *et al.*, 2007), issues de la moelle osseuse, sont intéressantes en vue d'applications cliniques car elles peuvent être prélevées chez le patient lui-même ce qui permet une greffe autologue et donc de s'affranchir des problèmes d'histocompatibilité. Elles sont facilement obtenues par aspiration au niveau de la crête iliaque sous anesthésie locale. Elles sont séparées des CSH et peuvent être amplifiées par culture *in vitro*. Les CSM d'origine médullaire sont des cellules adhérentes obtenues par expansion. Ce sont des cellules souches adultes multipotentes. Sur le plan phénotypique, elles expriment les antigènes SH2 (CD105), SH3 et SH4 (CD73), l'antigène Stro1, et CD90 (Thy1). Elles n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques CD34, CD45, CD14, ou les antigènes HLA de classe II. *In vitro* et *in vivo*, elles peuvent se différencier en cellules d'origine embryonnaire mésodermique : cellules stromales, ostéoblastes et adipocytes ainsi

qu'en chondrocytes. La multipotentialité des CSM s'étend à d'autres cellules n'ayant pas une origine mésodermique : neurones et cellules gliales (astrocytes) (Chen *et al.*, 2001^b), hépatocytes, cellules endothéliales (Chen *et al.*, 2003^a). La preuve d'une origine clonale n'est pas faite à ce jour. De plus, elles ont l'avantage d'être ni tumorigènes ni immunogènes (Aggarwal & Pittenger, 2005 ; Plumas *et al.*, 2005 ; Sudres *et al.*, 2006 ; Le Blanc & Ringdén, 2007), et de ne pas soulever de questions éthiques liées au clonage thérapeutique ou à l'utilisation des cellules souches embryonnaires.

*** Applications cliniques de la thérapie cellulaire (hors AVC) :**

Nous n'aborderons pas ici l'utilisation des CSM en thérapie génique ou vectorielle dans lesquelles les CSM sont utilisées comme « vecteur » d'un agent thérapeutique.

En médecine régénérative, la faisabilité et la sécurité de la thérapie cellulaire par cellules souches issues de moelle osseuse ont été rapportées dans des essais cliniques notamment de cardiologie (Giordano *et al.*, 2007). L'injection intracoronaire (Drexler *et al.*, 2006 ; Janssens *et al.*, 2006) ou IV (Hofmann *et al.*, 2005) de cellules souches autologues issues de la moelle osseuse est bien tolérée et semble bénéfique après infarctus du myocarde. La bonne tolérance de l'administration de CSM a également été rapportée dans des essais après brûlures radioinduites (Bey *et al.*, 2007). Des études d'immunologie ont permis de mettre en évidence que les CSM ont un potentiel immunomodulateur (Plumas *et al.*, 2005 ; Sudres *et al.*, 2006 ; Le Blanc & Ringdén, 2007). Sur ces données, des essais cliniques de cotransplantation de CSM et de CSH allogéniques ont montré une bonne tolérance de la procédure et une limitation de la réaction du greffon contre l'hôte (Le Blanc *et al.*, 2007). Dans une étude de phase 2 récente sur l'utilisation des CSM pour le traitement de la réaction du greffon contre l'hôte résistante aux corticoïdes (Le Blanc *et al.*, 2008), 55 patients ont été traités par injection IV de $1,4 \cdot 10^6$ CSM/kg (0,4 à $9 \cdot 10^6$). Aucun effet indésirable n'a été rapporté lors du suivi et plus de la moitié des patients ont répondu favorablement au traitement que le donneur soit ou non HLA compatible.

Une revue récente (Burt *et al.*, 2008) a synthétisé les applications cliniques actuelles des cellules souches issues du sang ou de la moelle osseuse (notamment les CSM) dans les pathologies non cancéreuses (pathologies autoimmunes, infarctus du myocarde, artériopathie périphérique). Concernant la pathologie ischémique, dans l'infarctus aigu du myocarde, 9 publications sont rapportées avec l'utilisation intracoronaire (Assmus *et al.*, 2006 ; Lunde *et al.*, 2006) ou intramyocardique de cellules issues de la moelle osseuse (cellules mononucléées (CMN) et CSM) chez 551 patients. Deux études publiées rapportent l'utilisation de CSM purifiées chez 151 patients. Concernant l'ischémie chronique du myocarde et l'insuffisance

cardiaque, 9 publications sont rapportées avec l'utilisation intracoronaire ou intramyocardique de cellules issues de la moelle osseuse (CMN et CSM) chez 382 patients. Une étude rapporte l'utilisation intracoronaire de CSM purifiées chez 45 patients. Dans l'ensemble de ces essais, il n'a été rapporté aucun effet indésirable lié à la greffe et un bénéfice est noté notamment sur la fraction d'éjection du ventricule gauche.

Actuellement, 26 essais cliniques internationaux sont en cours pour étudier la thérapie cellulaire par CSM purifiées ou par CMN de moelle osseuse (*clinicaltrials.gov* avec comme mots clés « Mesenchymal Stem Cells » sur 88 essais au total), en excluant les protocoles de neurologie (voir ci-dessous) et de traitement réparateur local (brûlures, fractures...) (**Tableau 1**).

Tableau 1. Essais cliniques en cours sur la thérapie cellulaire par CSM (hors AVC) (*clinicaltrials.gov* avec comme mots clés « Mesenchymal Stem Cells »).

Indications	Essais (n)	Pathologies
Réaction greffon contre l'hôte	8	- Hémopathies - Transplantation d'organes
Immunomodulation Pathologies dysimmunitaires	8	- Allogreffe rénale (n=2) - Maladie de Crohn (n=4) - Sclérose en plaques (n=1) - Lupus (n=1)
Greffe d'ilôt de Langerhans	1	- Diabète type 1
Médecine Régénérative	9	- Cirrhose (n=1) - Infarctus myocarde (n=4) - Myocardiopathie dilatée (n=1) - Insuffisance cardiaque (n=1) - Ostéodysplasie (n=1) - Osteogenesis imperfecta (n=1)

En neurologie, des essais cliniques de thérapies cellulaire ou tissulaire ont déjà été menés dans d'autres pathologies que l'AVC (Borlongan *et al.*, 1999 ; Lindvall & Kokaia, 2005 ; Lindvall & Kokaia, 2006) tel que la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson, les lésions médullaires ou encore la sclérose latérale amyotrophique (Mazzini *et al.*, 2006). Pour la maladie de Huntington, des allogreffes intra-striatales de neuroblastes issus de striatum fœtaux humains ont été effectuées avec des résultats initiaux encourageants (Bachoud-Levi *et al.*, 2000) mais ne se maintenant pas après quelques années (Bachoud-Levi *et al.*, 2006). Pour la maladie de Parkinson, des greffes intraputaminales de neurones dopaminergiques issus de mésencéphales fœtaux (8-9 semaines) ont semblé apporter un bénéfice fonctionnel (Lindvall *et al.*, 1990 ; Brundin *et al.*, 2000 ; Piccini *et al.*, 2000 ; Bjorklund *et al.*, 2003). Cependant, les résultats ont été variables selon les patients malgré une survie correcte du greffon (Freed *et*

al., 2001). La lourdeur technique et la quantité importante de fœtus nécessaire ne permettent pas le développement de ce traitement en pratique courante (Lindvall, 2001 ; Lindvall, 2003). Pour contourner ces difficultés techniques et éthiques d'une source humaine de tissu, des xénogreffes de neurones fœtaux de porcs (striatum ou mésencéphale) ont été réalisées et bien tolérées chez des patients présentant une maladie de Huntington ou une maladie de Parkinson (Fink *et al.*, 2000 ; Schumacher *et al.*, 2000).

Aujourd'hui, les CSM sont à l'étude dans différentes maladies neurologiques autres que l'AVC. Actuellement, 5 essais cliniques internationaux sont en cours pour étudier la thérapie cellulaire par CSM purifiées ou par CMN de moelle osseuse (*clinicaltrials.gov* avec comme mots clés « Mesenchymal Stem Cells ») (**Tableau 2**).

Tableau 2. Essais cliniques en cours sur la thérapie cellulaire par CSM en neurologie (hors AVC) (*clinicaltrials.gov* avec comme mots clés « Mesenchymal Stem Cells »). *IV* : intraveineuse ; *IA* : intrartérielle ; *IC* : intracérébrale ; *IT* : intrathécale.

Nom de l'essai	Pathologie	Source cellulaire	Voie
Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis (Cambridge, UK)	Sclérose en plaques	CSMh (2.10^6 /kg)	IV
Autologous Mesenchymal Stem Cell (MSC) Transplantation in MS (Cleveland, USA)	Sclérose en plaques	CSMh (2.10^6 /kg)	IV
Trial of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Patients With Multiple System Atrophy (Yonsei, Corée)	Atrophie multisystématisée	CSMh (40.10^6 IA + 40.10^6 IV x 3 fois)	IA + IV
Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplant for Parkinson's Disease (Jaslok, India)	Maladie de Parkinson	CSMh	IC
Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Multiple Sclerosis (Hadassah, Israel)	Sclérose en plaques	CSMh (60.10^6 IT + 20.10^6 IV)	IT+IV

I.3. Thérapie cellulaire et accident vasculaire cérébral

Concernant l'AVC, la transplantation de cellules ou thérapie cellulaire a récemment émergé (Savitz *et al.*, 2002 ; Lindvall & Kokaia, 2004 ; Roitberg, 2004 ; Haas *et al.*, 2005 ; Bliss *et al.*, 2007 ; Greenberg, 2007 ; Savitz, 2009 ; Dharmasaroja, 2009). Contrairement aux pathologies inflammatoires ou neurodégénératives, l'AVC représente un bon modèle physiopathologique pour évaluer une thérapie régénérative puisque la lésion focale survient sur un tissu cérébral sain sans processus dégénératif chronique sous-jacent. La thérapie régénérative a un intérêt particulier après un AVC puisque les capacités d'autoréparation spontanées du cerveau sont limitées (voir *I.1.6. Mécanismes impliqués dans la récupération spontanée*). Favorisant la plasticité et la neurogenèse post-lésionnelles, la thérapie cellulaire permettrait une récupération tissulaire et fonctionnelle par le remplacement des cellules détruites (neurones, glie, endothélium) et/ou un effet trophique du greffon sur le tissu cérébral épargné. Ce traitement de « réparation » du tissu cérébral détruit a montré un bénéfice sur la récupération fonctionnelle dans des modèles d'ischémie cérébrale expérimentale (Chen & Chopp, 2006). Cependant, la transposition de ce traitement à l'homme est restée à ce jour limitée à des études pilotes. Elles comportent de faibles effectifs de patients souvent âgés et ont des limitations méthodologiques importantes. Le délai, la voie optimale d'administration des cellules ainsi que la source cellulaire à utiliser restent encore très controversés.

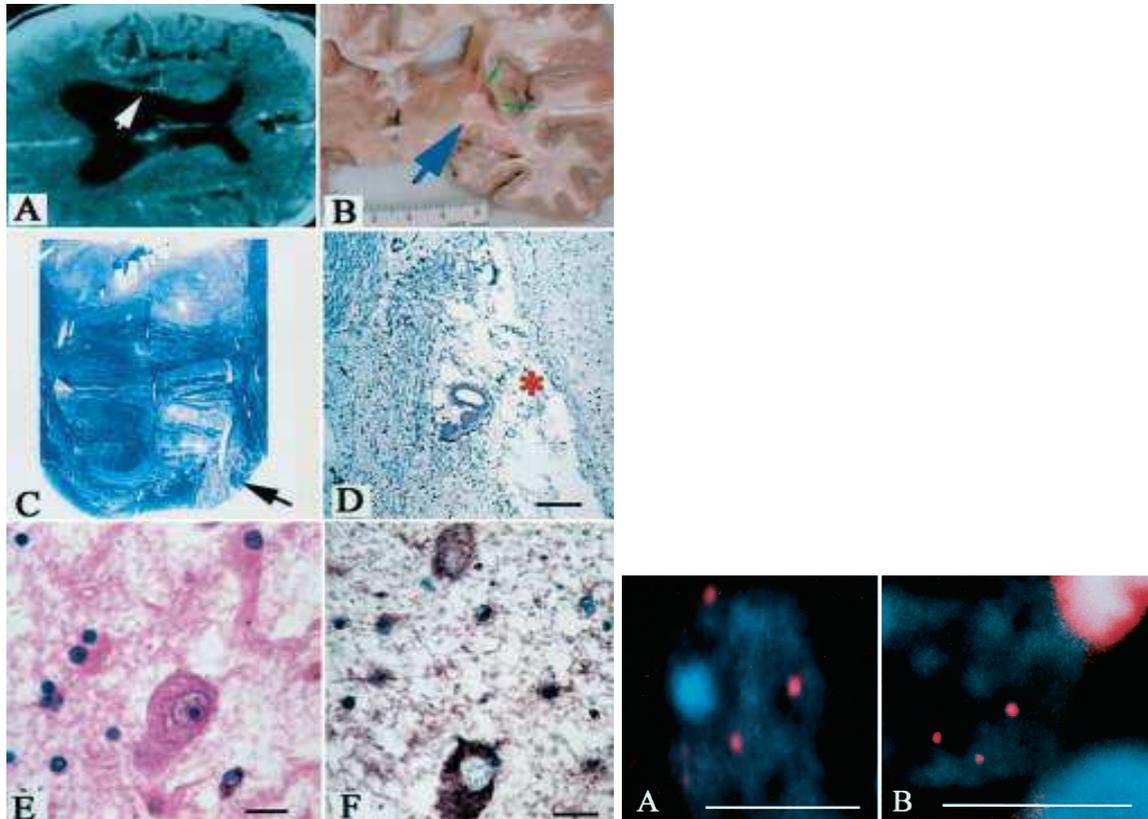
I.3.1. Thérapie cellulaire et AVC chez l'homme : études cliniques

* **Dans la première étude de tolérance et faisabilité**, 12 patients ont été traités par greffe IC après un infarctus cérébral touchant le territoire profond de l'ACM (Kondziolka *et al.*, 2000). Des neurones dérivés de neuroteratocarcinome humain (LBS-hNT, Layton Bioscience neurons) ont été transplantés par voie stéréotaxique dans la lésion, 6 mois à 6 ans après l'AVC. Un traitement immunosuppresseur par Cyclosporine a été utilisé durant 6 mois. Les auteurs ont conclu à la faisabilité et la bonne tolérance de cette thérapie cellulaire. Ils montrent un bénéfice fonctionnel significatif mais marginal 24 semaines après la greffe, bénéfice non interprétable en raison de l'absence de groupe contrôle. L'étude neuropathologique réalisée chez un patient de 71 ans, décédé 27 mois après la greffe, a permis d'identifier des neurones hNT au niveau du site de greffe sans aucune formation tumorale (Nelson *et al.*, 2002) (**Figure 15**).

Figure 15. Greffe de neurones hNT au sein d'un infarctus cérébral putaminal droit (Nelson *et al.*, 2002).

A gauche : **A** : TDM préopératoire. **B** : photographie montrant l'infarctus (flèches vertes) et le site de greffe (fleche bleue). **C** : dégénéscence du faisceau cortico-spinal droit au sein du pont (Luxol Fast Blue). **D** : histologie de l'infarctus montrant la perte axonale et la gliose (Luxol Fast Blue, *échelle* = 1 mm). **E** : neurone et gliose au site de greffe (Hématoxyline-Eosine, *échelle* = 20 μ m). **F** : immunohistochimie par anticorps anti-neurofilament (NF) montrant 2 neurones NF+ au site de greffe (*échelle* = 20 μ m).

A droite : hybridation *in situ*. **A** : coupe d'un cerveau de rat après infarctus cérébral et greffe de neurones hNT polyploïdes pour le chromosome 21 (3 points fluorescents rouges dans le noyau d'un neurone). **B** : idem au sein du site de greffe du patient. *Barre d'échelle* = 20 μ m.



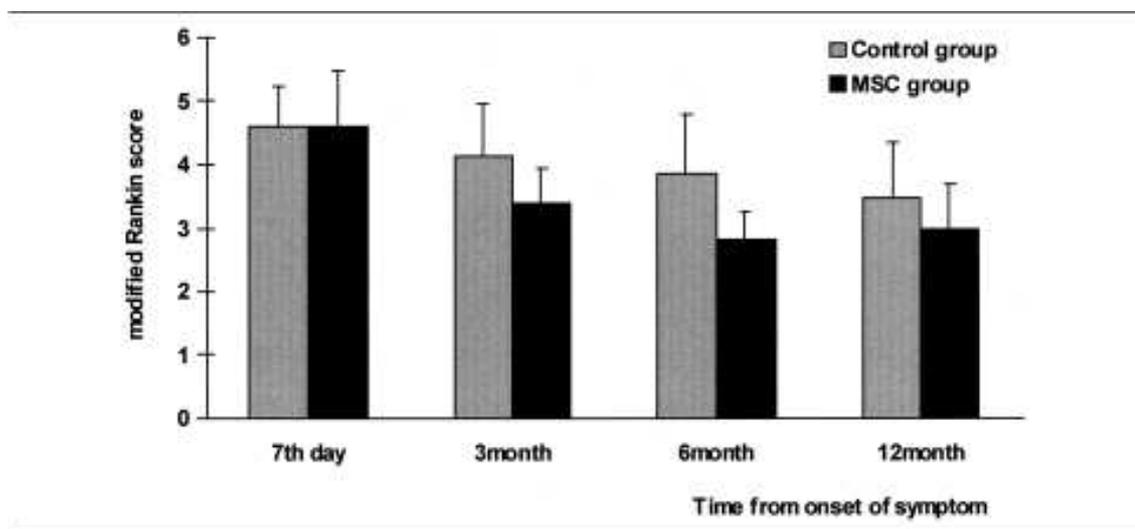
Les auteurs insistent sur l'innocuité des neurones hNT dérivés de carcinome (Pleasure *et al.*, 1992). Cependant, un recul de deux ans peut sembler court pour détecter une tumeur potentiellement induite durant des dizaines d'années (Newman *et al.*, 2005). Chez 4 patients greffés, une amélioration marquée des capacités visuo-spatiales et constructives et la mémoire non verbale a pu être observée (Stilley *et al.*, 2004).

Cette étude de phase I a été suivie d'une étude de phase II (Kondziolka *et al.*, 2005). Des neurones hNT ont été greffés par voie stéréotaxique dans la lésion, 1 à 6 ans après l'AVC (infarctus ou hématomme). Dix-huit patients ont été répartis en 3 groupes : 7 patients greffés avec $5 \cdot 10^6$ neurones hNT, 7 patients avec $10 \cdot 10^6$, et 4 patients « contrôles ». Les auteurs ont montré l'absence d'effet indésirable imputable à la greffe sur un suivi de 2 ans. Aucun effet significatif n'a pu être retrouvé.

* **Dans le premier essai avec des cellules non-tumorales**, Savitz *et al.* (Savitz *et al.*, 2005) ont étudié la tolérance et la faisabilité de la transplantation de cellules foetales porcines, pré-traitées par un anticorps anti-CMH1, chez des patients présentant un infarctus cérébral des noyaux gris centraux. Seuls 5 patients ont été traités par greffe IC au sein de la lésion 1,5 à 10 ans après l'AVC. A la vue d'effets indésirables graves (épilepsie, inflammation cérébrale ayant nécessité une biopsie), l'étude a été arrêtée. On peut discuter ici le choix d'une source cellulaire non humaine pouvant induire une réaction immunitaire responsable des effets indésirables notés.

* **L'administration de CSMh** a été étudiée chez des patients présentant un infarctus cérébral dans le territoire de l'ACM avec des déficits sévères (Bang *et al.*, 2005). Cinq patients ont reçu des CSM autologues par voie IV (50.10^6 CSM) 5 et 7 semaines après l'AVC. Ces patients ont été randomisés et comparés à 25 cas contrôles dans un suivi d'un an. Aucun effet indésirable n'a été noté mais le bénéfice fonctionnel (**Figure 16**) et la réduction du volume d'infarctus sont restés non significatifs sur ce petit nombre de patients traités.

Figure 16. Effet fonctionnel de l'injection IV de CSM autologues après infarctus cérébral chez 5 patients (vs 25 contrôles)(score de Rankin évaluant le handicap) (Bang et al., 2005)



* Plus récemment, un cas d'injection IA de CMN autologues issues de moelle osseuse a été rapporté après un infarctus cérébral dans le territoire de l'ACM (Mendonca *et al.*, 2006).

L'hétérogénéité de ces études et le peu de patients inclus ne permettent pas d'effectuer une méta-analyse (**Tableau 3**). Il persiste de nombreuses questions concernant les effets de la thérapie cellulaire après un AVC, questions auxquelles les études expérimentales chez l'animal doivent contribuer à répondre.

Tableau 3. Etudes publiées de thérapie cellulaire après AVC chez l'homme illustrant l'hétérogénéité des données actuelles. On notera les délais de greffe importants et les effectifs limités de patients traités. *AVCi* : Accident Vasculaire Cérébral ischémique (infarctus cérébral) ; *AVCh* : AVC hémorragique ; *hNT* : neurones issues de tératocarcinome humain ; *LGE* : éminence ganglionnaire latérale ; *CMN* : cellules mononucléées de moelle osseuse ; *IC* : intracérébrale ; *IV* : intraveineuse ; *IA* : intraartérielle ; *NS* : non significatif statistiquement.

Références	Sujets	Délais AVC-greffe	Source Cellulaire	Voie	Résultats
Kondziolka <i>et al.</i> , 2000	12 AVCi (61 ans)	0,5 – 6 ans	Neurones hNT	IC	- Faisabilité - Bonne tolérance
Kondziolka <i>et al.</i> , 2005	6 AVCi / 8 AVCh (58 ans) <i>vs contrôles</i> : 3 AVCi / 1 AVCh (46 ans)	1 – 6 ans	Neurones hNT	IC	- Bénéfice NS
Savitz <i>et al.</i> , 2005	5 AVCi (25-52 ans)	1,5 – 10 ans	C foetales porcines (LGE)	IC	- Effets indésirables - Arrêt de l'étude
Bang <i>et al.</i> , 2005	5 AVCi (63 ans) <i>vs contrôles</i> : 25 AVCi (59 ans)	5 et 7 semaines	CSMh autologues	IV	- Bonne tolérance - Bénéfice NS - Réduction volume lésion NS
Mendonca <i>et al.</i> , 2006	1 AVCi (54 ans)	4 jours	CMN moelle	IA	- Faisabilité - Bonne tolérance

Actuellement, 7 essais cliniques internationaux en cours sont répertoriés concernant l'utilisation de la thérapie cellulaire par CSM purifiées ou CMN de moelle osseuse après un AVC (*clinicaltrials.gov* avec comme mots clés « Stem Cells and Stroke») (**Tableau 4**).

Tableau 4. Essais cliniques en cours sur la thérapie cellulaire après AVC (*clinicaltrials.gov* avec comme mots clés « Stem Cells and Stroke »). *CMN* : cellules mononucléées de moelle osseuse ; *CSH* : cellules souches hématopoïétiques ; *IC* : intracérébrale ; *IV* : intraveineuse ; *IA* : intraartérielle.

Nom de l'essai	Délais AVC-greffe	Source cellulaire	Voie
IV Stem Cells After Ischemic Stroke (Grenoble, France / Detante)	6 semaines	CSMh ($100 \cdot 10^6$ ou $300 \cdot 10^6$)	IV
Safety of Autologous Bone Marrow Cell Treatment for Acute Ischemic Stroke (Houston, USA / Savitz)	1 à 3 jours	CMN	IV
Autologous Cell Therapy After Stroke (Irvine, USA / Cramer)	4 jours (CMN) 3 semaines (CSM)	CMN CSM (10^6 /kg)	IV
Safety Study of Autologous Stem Cell Transplantation for Patients With Ischemic Stroke (Rio, Brésil / André, De Freitas, Mendez-Otero)	< 3 mois	CMN ($500 \cdot 10^6$)	IA
Autologous Bone Marrow Stem Cells in Middle Cerebral Artery Acute Stroke Treatment (London, UK / Habib)	7 jours	CSH	IA
Autologous Bone Marrow Stem Cells in Ischemic Stroke (Asturias, Espagne / Hernandez)	5 à 9 jours	CSH	IA
Efficacy Study of CD34 Stem Cell in Chronic Stroke Patients (Taiwan, China / Lin)	6 à 60 mois	CSH (2 à $8 \cdot 10^6$)	IC

I.3.2. Transplantation dans les modèles animaux d'ischémie cérébrale

Depuis 1992, de nombreuses études de thérapie cellulaire ont été rapportées dans des modèles animaux d'ischémie cérébrale (voir *Annexe 1* pour une synthèse des études expérimentales) (Roitberg, 2004 ; Hicks *et al.*, 2009). Les sources cellulaires utilisées pour ces transplantations chez l'animal sont variées et incluent entre autres : des cellules fœtales (Chiang *et al.*, 1999), des cellules souches embryonnaires (Hoehn *et al.*, 2002), des cellules souches neurales issues du système nerveux central humain (Kelly *et al.*, 2004 ; Roitberg *et al.*, 2006), des cellules de sang de cordon ombilical (Chen *et al.*, 2001^c ; Vendrame *et al.*, 2004), des extraits de glandes pinéales (Borlongan *et al.*, 2003), de plexus choroïdes (Borlongan *et al.*, 2004^a, 2004^b), des lignées cellulaires dérivées de neurotératocarcinome ou de neuroepithélium (Borlongan *et al.*, 1998 ; Modo *et al.*, 2004), des CMN de moelle osseuse (Brenneman *et al.*, 2010 ; De Vasconcelos Dos Santos *et al.*, 2010), et des CSM.

Depuis 2001, 70 études se sont intéressées à la récupération post-ischémie (suivi de 3 jours à 1 an) après une thérapie cellulaire (voir *Annexe 1*) (Hicks *et al.*, 2009). La voie IV a été utilisée dans 47% de ces études, la voie IC dans 41% et la voie IA dans 10%. Des cellules d'origine humaine ont été utilisées dans 46% de ces études, des cellules de rat dans 41% et de souris dans 13%. Cependant, la survie cellulaire, rapportée dans une étude sur deux, est très faible ainsi que la différenciation neurale. Il n'est pas possible d'identifier dans toutes ces études, montrant pour la plupart des effets bénéfiques, la voie d'administration et/ou le type cellulaire les plus efficaces.

* **Concernant les CSM (autres qu'humaines)**, celles-ci ont un effet bénéfique après une ischémie expérimentale que ce soit après une administration IV (Chen *et al.*, 2001^b ; 2003^a, 2003^b ; Li *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2007 ; Shen *et al.*, 2007^b ; Wu *et al.*, 2007 ; De Vasconcelos Dos Santos *et al.*, 2010), IA (Shen *et al.*, 2007^a) ou IC (Li *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2001^a ; Borlongan *et al.*, 2004^c). Ce bénéfice fonctionnel pourrait se maintenir au long cours sur au moins un an (Shen *et al.*, 2007^a).

* **Concernant les CSMh (d'origine humaine)**, Zhao *et al.* ont montré que des CSMh injectées au sein de l'infarctus, une semaine après celui-ci, avaient un effet bénéfique sur la récupération durant 6 semaines (Zhao *et al.*, 2002). Malgré la différenciation possible de ces CSMh en neurones, astrocytes, ou oligodendrocytes, l'effet fonctionnel observé serait plutôt attribuable à la stimulation de la plasticité endogène du cerveau et à la diminution de la mort des cellules issues des cellules souches neurales de l'hôte notamment au sein de la zone sous-

ventriculaire (Yoo *et al.*, 2008). Cet effet trophique a été souligné par l'injection IC de CSMh surexprimant le BDNF (brain derived neurotropic factor) (Kurozumi *et al.*, 2004). Des résultats similaires, en terme de bénéfice fonctionnel, ont été obtenus avec une injection IA de 2.10^6 CSMh (24 heures après ischémie) avec 21% de cellules survivantes, deux semaines après, et des différenciations neurale (1%) et astrocytaire (10%) possibles (Li *et al.*, 2001).

L'injection IV de CSMh, plus adaptable en pratique clinique car moins invasive, semble également tout à fait intéressante. Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2004) ont montré qu'un effet bénéfique sur un mois pouvait être obtenu par l'injection IV de 3.10^6 CSMh 24 heures après une ischémie permanente et que cet effet serait en partie lié à l'augmentation de l'IGF-1 (insulin growth factor), impliqué dans les processus de neuroprotection et de neurogenèse, et de son récepteur IGF-1R. En plus d'un effet bénéfique sur une semaine, des CSMh immortalisées et injectées par voie IV, 12 heures après ischémie transitoire, permettent une réduction du volume lésionnel avec une différenciation neurale (9%) et astrocytaire (8%) des CSMh (Honma *et al.*, 2006). L'effet bénéfique sur la plasticité cérébrale post-ischémie des CSMh injectées par voie IV peut être potentialisé soit par la combinaison à un donneur de NO (injection combinée avec 10^6 CSMh, 24 heures après ischémie transitoire) (Chen *et al.*, 2004), soit par une modification des CSMh les faisant surexprimées le GDNF (glial cell line derived neurotropic factor) (Horita *et al.*, 2006). L'effet sur l'angiogenèse des CSMh a été mis en avant par Onda *et al.* qui ont montré que l'injection IV (6 heures après une ischémie permanente) de CSMh surexprimant Ang-1 (Angiopoïétine 1) semblaient améliorer le bénéfice obtenu avec des CSMh natives en stimulant l'angiogenèse péri-lésionnelle sur un suivi de 7 jours (Onda *et al.*, 2008). Cet effet bénéfique « pro-angiogénique » a été encore amélioré avec l'utilisation IV (6 heures après ischémie permanente) de CSMh modifiées surexprimant Ang-1 et VEGF (vascular endothelial growth factor) sur un suivi de deux semaines (Toyama *et al.*, 2009).

I.4. Objectifs généraux

L'objectif général de notre travail a été d'évaluer le potentiel thérapeutique des CSMh après une ischémie cérébrale focale chez le rat, afin de préparer un essai clinique de tolérance et de faisabilité chez l'homme.

Le modèle expérimental d'ischémie focale transitoire par voie endoluminale, largement utilisé, a été choisi ici comme étant le plus représentatif d'un infarctus cérébral focal chez l'homme. Le choix de l'utilisation de CSM humaines de grade clinique a été fait avec l'idée d'utiliser une source, bien caractérisée, reproductible, et directement transposable dans un essai clinique. L'utilisation de CSMh chez le rat est réaliste, sans utilisation d'immunosuppresseurs, et a déjà été effectuée avec succès dans 5 études publiées (dont 3 sur un modèle d'ischémie transitoire et 2 sur un modèle d'ischémie permanente avec 2 essais d'injection IC, 2 d'injection IV et 1 d'injection IA) (voir *Annexe 1*) (Hicks *et al.*, 2009). Parmi ces études, à notre connaissance, seules des injections précoces à la phase aiguë de l'ischémie ont été effectuées. La majorité des études de thérapie cellulaire par CSM ont été menées avec des CSM d'origine murine injectées à la phase aiguë (14 essais dont 9 sur un modèle d'ischémie transitoire et 5 sur un modèle d'ischémie permanente). Une seule étude a montré le bénéfice de l'injection IV de CSM murines à la phase subaiguë soit 7 jours après une ischémie cérébrale (Chen *et al.*, 2001^b).

Nous avons principalement axé nos travaux, toujours dans l'idée d'une évaluation préclinique, sur l'injection IV de CSMh. Le choix de la voie IV et de l'injection à la phase subaiguë a été fait en tenant compte des contraintes inhérentes à l'utilisation clinique en condition autologue des CSMh : une voie d'injection la moins invasive possible et un délai de culture « *ex vivo* » des CSMh autologues incompressible.

1. La première étape a été la mise au point d'un marquage cellulaire des CSMh afin de les rendre détectables *in vivo* par IRM et *ex vivo* par microscopie à fluorescence. Ce marquage a été effectué sans agent de transfection pour éviter les effets cellulaires délétères de ces agents habituellement décrits. Nous avons eu comme objectif méthodologique de montrer qu'un tel marquage par microparticules fluorescentes n'influait ni la viabilité ni la différenciation des CSMh de grade clinique, et pouvait avoir un intérêt expérimental dans les suivis longitudinaux *in vivo*.

2. Pour notre première étude pilote de thérapie cellulaire par CSMh de grade clinique après une ischémie cérébrale, nous avons choisi l'injection IC directement au sein de la lésion pour s'affranchir du problème de la biodistribution générale après une injection systémique. L'objectif de cette étude *in vivo* a été d'évaluer notre capacité à suivre *in vivo* les CSMh marquées et d'évaluer la tolérance de ce traitement dans un suivi longitudinal et multiparamétrique (IRM et tests comportementaux).

3. Nous avons ensuite évalué la tolérance et les effets de l'injection IV de CSMh à distance de l'ischémie cérébrale. L'application de la thérapie cellulaire à la phase subaiguë n'avait pas été précédemment étudiée dans les essais se focalisant sur des administrations de CSM dans les premières heures après la lésion (voir *I.3.2. Transplantation dans les modèles animaux d'ischémie cérébrale*). Le choix de la voie IV et de l'injection à la phase subaiguë de l'infarctus cérébral a été fait en vue d'un essai clinique en condition autologue imposant un délai de culture « *ex vivo* » des CSMh autologues et leur administration par la voie la moins invasive possible.

4. La biodistribution générale des CSMh injectées par voie IV après un infarctus cérébral n'avait jamais été étudiée. Ces données sont pourtant nécessaires pour évaluer le risque général de ce traitement par voie systémique et/ou son potentiel thérapeutique, en quantifiant la migration des CSMh vers la lésion cérébrale. Nous avons donc effectué une étude scintigraphique de biodistribution « corps entier » des CSMh radiomarquées et injectées par voie IV après un infarctus cérébral.

5. Nous avons également étudié les effets microvasculaires par IRM *in vivo* de l'injection locale de CSMh pour préciser ce mécanisme d'action probablement important pour le bénéfice fonctionnel observé. Aucune étude similaire, à notre connaissance, n'avait été réalisée jusqu'alors.

6. Enfin, l'ensemble de ce travail expérimental et l'expertise locale ont permis de mettre en place un essai clinique innovant de tolérance et de faisabilité de l'injection IV de CSMh autologues après un infarctus cérébral chez l'homme.

II. METHODOLOGIE GENERALE

Sauf mention particulière dans la méthodologie rapportée dans chaque chapitre spécifique, les méthodes décrites ici ont été appliquées.

II.1. Méthode de culture des cellules souches mésenchymateuses humaines

La validation du procédé d'expansion a été réalisée dans le laboratoire producteur (Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire UMTCT du CHU Grenoble, Marie-Jeanne RICHARD) selon les étapes suivantes :

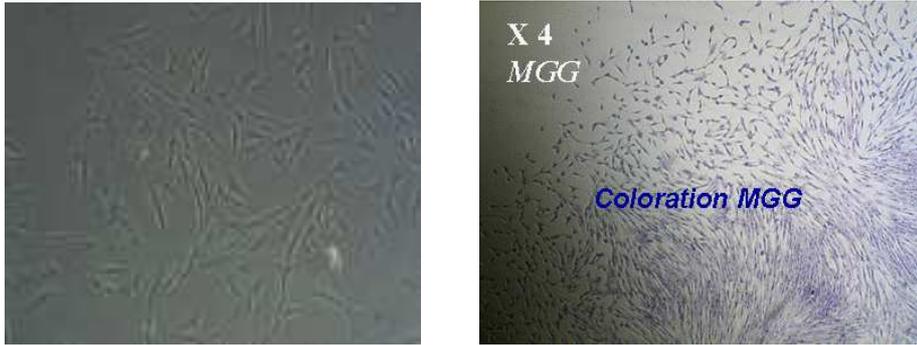
- Mise au point de cultures en collaboration avec le groupe de la société française de greffe de moelle et de thérapie cellulaire.
- Passage à un procédé répondant aux bonnes pratiques de fabrication des produits de thérapie cellulaire : système clos, produits ancillaires conformes à la réglementation, formation théorique et pratique du personnel technique (autorisation en France : TCG/04/O/008/AA).

Pour des raisons de confidentialité, certaines techniques d'expansion ou de caractérisation des CSM ne sont pas rapportées ici.

Les CSMh utilisées dans l'ensemble de nos essais ont été isolées à partir de la moelle osseuse de donneurs adultes ayant donné leur consentement éclairé. L'UMTCT a délivré des CSM humaines de grade clinique. Les méthodes de cultures ont déjà été décrites par l'UMTCT (Moriscot *et al.*, 2005 ; Plumas *et al.*, 2005). Brièvement, les CSMh sont sélectionnées par adhésion sur plastique et sont cultivées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂ dans du MEM α (minimum essential medium) supplémenté avec 100 μ g/mL de pénicilline, 100 μ g/mL de streptomycine, et 10% de sérum de veau fœtal (tous les réactifs provenant de InVitrogen, France).

Les CSM sont caractérisées par leur morphologie, leurs propriétés phénotypiques et par leur propriété à former des colonies (colony forming unit fibroblast, CFU-F) (**Figure 17**). Elles expriment les CD73, CD90 et CD105 mais n'expriment pas CD45 et CD34 (le pourcentage de cellules médullaires de type non mésenchymateux, CD45+, doit être inférieur à 1% dans le produit fini libérable). Les CSMh se différencient en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes.

Figure 17. Les CSMh sont, en culture, des cellules adhérentes de type fibroblastique (à gauche), capables de former des colonies (à droite).



II.2. Modèle murin d'ischémie cérébrale focale

Toutes les procédures d'expérimentation animale sont conformes aux lois françaises. Les protocoles les plus récents ont obtenu l'accord du comité d'éthique animale local. Une attention particulière a été apportée pour limiter le nombre d'animaux utilisés et leur douleur. Toutes les expérimentations ont été effectuées sous notre responsabilité (autorisation à expérimenter sur animaux vivants n°380806). Toutes les procédures chirurgicales ont été conduites dans des conditions d'asepsie stricte.

II.2.1. Anesthésie

Tous les gestes potentiellement douloureux et les procédures nécessitant l'immobilité des rats (chirurgie pour oACM, injections IC ou IV, IRM et imagerie nucléaire) ont été effectués sous anesthésie générale. L'induction anesthésique est initiée par l'inhalation de 5% d'isoflurane (Forène, Abbott Laboratory) dans 30% d'O₂ et 70% d'air, puis l'anesthésie est maintenue tout au long de la procédure par 1,5 à 2,5% d'isoflurane avec un masque facial.

II.2.2. Modèle d'ischémie cérébrale focale : occlusion intraluminale transitoire

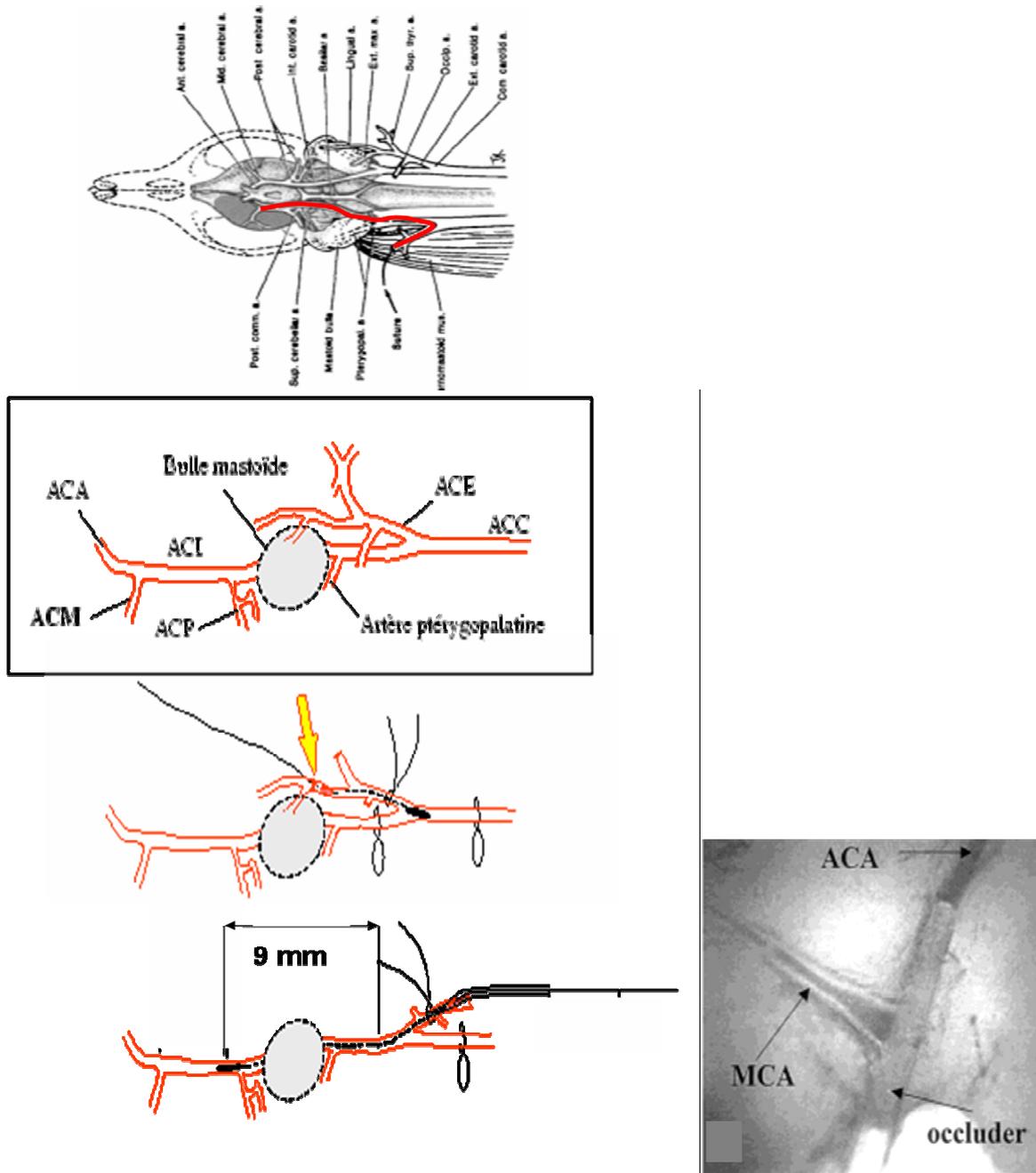
Des rats Sprague-Dawley (élevage Janvier, France) mâles, jeunes adultes, d'environ 300 g ont été utilisés pour l'ensemble de nos études.

L'ischémie cérébrale focale et transitoire a été réalisée par occlusion intraluminale de l'ACM (oACM) droite durant 90 minutes avec un monofilament (Longa *et al.*, 1989). Ce modèle d'ischémie-reperfusion est couramment utilisé dans notre laboratoire (Barbier *et al.*, 2005 ; Detante *et al.*, 2009 ; Grillon *et al.*, 2008) et permet d'obtenir des infarctus étendus striataux ou cortico-striataux. Ces lésions restent variables en volume et la réalisation chirurgicale du modèle est difficile et nécessite un apprentissage assez long pour être reproductible.

La température corporelle est maintenue à $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ avec une couverture chauffante électrique connectée à une sonde rectale. En plus de l'anesthésie générale, une anesthésie locale à la Bupivacaïne sous-cutanée est utilisée sur le site opératoire.

La bifurcation carotide droite est exposée et isolée. La carotide externe est sectionnée après le clampage définitif de sa partie avale, et clampages temporaires des carotides primitive et interne. Un cylindre de colle thermoformée (longueur = 2 mm, diamètre = 0,38 mm) attaché à fil de nylon (diamètre = 0,22 mm) est introduit dans la carotide externe puis avancé dans la carotide interne jusqu'à 9 mm après la base externe du crâne (bulle tympanique) (**Figure 18**). Les rats sont alors réveillés et le filament laissé en place durant 90 minutes. A l'issue de cette période, les rats sont rapidement testés pour authentifier un déficit neurologique : test de marche au sol (marche en cercle), flexions réflexes des membres, et réflexes sensori-moteurs (vibrisses). Ensuite les rats sont re-anesthésiés et le filament est retiré pour permettre une reperfusion.

Figure 18. Modèle d'ischémie cérébrale focale chez le rat par occlusion intraluminaire de l'artère cérébrale moyenne (oACM). Représentation anatomique (Longa *et al.*, 1989) et schéma opératoire. *ACA* : artère cérébrale antérieure, *ACI* : artère carotide interne, *ACP* : artère cérébrale postérieure, *ACE* : artère carotide externe, *ACC* : artère carotide commune.



II.3. Méthodes d'administration des CSMh

Les méthodes d'administration des CSMh seront détaillées dans chaque chapitre spécifique. Nous avons réalisé des greffes IC stéréotaxiques, et des injections IV dans la veine de la queue ou la veine saphène.

Aucun traitement immunosuppresseur n'a été utilisé en accord avec les études précédemment publiées sur l'administration de CSMh chez le rat (Chen *et al.*, 2003^a ; Li *et al.*, 2002).

II.3.1. Choix de la voie d'administration chez le rat

Des effets fonctionnels bénéfiques ont été observés chez l'animal que l'administration des cellules se fasse par voie IC, IV ou IA. En terme de bénéfice attendu, il n'existe aucun argument aujourd'hui pour privilégier l'une de ces voies (Jin *et al.*, 2005).

Initialement, pour identifier un effet fonctionnel et tissulaire de l'administration de CSMh, nous avons choisi de débiter ce travail par un essai pilote d'injection IC pour s'affranchir des problèmes de biodistribution après injection systémique. Cependant, l'administration IC de cellules souches pouvant induire des lésions cérébrales dysplasiques avec des zones de neurogenèse ectopique (notamment hippocampique) à l'origine de crises d'épilepsie, il nous a semblé logique de choisir, pour nos essais pré-cliniques, la voie d'injection la moins invasive c'est-à-dire la voie IV sur une veine périphérique. Les autres voies d'administration (IC, IA) restent utiles en terme de recherche expérimentale pour préciser des mécanismes d'action et comparer les voies d'abord.

II.3.2. Choix des doses étudiées chez le rat

Pour l'administration IC, aucune étude n'a rapporté d'effet dose. Nous avons ainsi utilisé la dose de $4 \cdot 10^5$ CSMh (dans 10 μ l de PBS-glutamine) en référence aux doses usuelles dans littérature (Chen *et al.*, 2001^a).

Dans l'étude sur l'injection de CSM par voie IV après ischémie cérébrale chez le rat, Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2001^b) ont montré un effet dose avec un bénéfice fonctionnel non significatif après l'injection de 10^6 CSM devenant significatif avec $3 \cdot 10^6$ CSM. Ces résultats nous ont conduit à utiliser cette dose élevée de CSMh dans nos essais précliniques. Un délai de 7 jours entre l'ischémie et l'injection IV de CSMh a été choisi pour se placer à distance de la phase aiguë, et donc plutôt dans la phase subaiguë durant laquelle les processus de plasticité cérébrale sont les plus importants.

II.4. Méthodes d'analyse comportementale

Voir la fiche de suivi des animaux regroupant l'ensemble des tests utilisés en Annexe 2.

II.4.1. Tests sensori-moteurs

Afin d'évaluer les déficits sensitifs et moteurs des rats après oACM, des tests sensori-moteurs reproductibles et validés sur des modèles expérimentaux d'AVC ont été utilisés : Neurological Severity Score modifié (NSS) et le test de retrait d'adhésif (TRA) (Chen *et al.*, 2001^a, 2001^b, 2001^c ; Shen *et al.*, 2007^a, 2007^b).

Les rats ont été familiarisés avec l'environnement de test (pièce calme, luminosité faible) et entraînés durant 3 jours avant l'ischémie cérébrale.

* Neurological Severity Score modifié (NSS) :

Il s'agit d'un score composite de gravité allant de 0 (normal) à 18 (déficit le plus sévère). Il comprend :

- Epreuves motrices (/6): en tenant le rat suspendu par la queue, la flexion de la patte avant, de la patte arrière et la torsion de la tête sont cotées (/3). En plaçant le rat au sol, la marche est cotée (/3) : 0 : normale, 1 : incapacité à marcher droit, 2 : marche en cercle autour du côté paralysé, 3 : chute du côté paralysé.
- Epreuves sensitives (/2) : le rat est maintenu horizontal dans les mains de l'expérimentateur. Le test de placement (/1) évalue l'absence d'opposition normale de la patte avant suite au contact des vibrisses sur un objet. Le test de proprioception de la patte avant (/1) évalue l'absence de contraction après l'appui passif de celle-ci sur un objet (/1).
- Epreuve d'équilibre (marche sur poutre, /6) : 1 : le rat agrippe le bord de la poutre, 2 : une patte tombe de la poutre, 3 : deux pattes tombent, 4 : le rat chute en plus de 40 s, 5 : en plus de 20 s, 6 : en moins de 20 s (**Figure 19**).
- Tests de réflexes (/3) : un point est noté pour l'absence de chaque réflexe suivant : méat auditif (secousse de la tête après contact du méat), cornéen (fermeture de l'œil après contact de la cornée), sursaut après un bruit bref.
- Observation de mouvements anormaux involontaires et/ou de crise épileptique (/1) témoignant habituellement d'une lésion cérébrale très sévère.

Figure 19. Marche sur poutre (cotée de 0 à 6) pour le Neurological Severity Score (NSS, coté de 0 à 18 au total).



*** Test de retrait d'adhésif (TRA) :**

Pour ce test, deux bouts de papier adhésif (d'environ 1 cm²) sont fixés sur la face palmaire des deux poignets et le rat est mis seul dans une cage propre. Le temps mis pour retirer les deux papiers est noté (s). L'essai est limité à 2 minutes. Quatre essais, séparés d'au moins 5 minutes de repos, sont effectués et moyennés. Ce test nécessite l'apprentissage de la technique de retrait, la plus efficace consistant à utiliser les dents plutôt que les pattes (**Figure 20**).

Figure 20. Test de retrait d'adhésif sur pattes avant.



II.4.2. Test de mémoire spatiale : labyrinthe radial

La récupération sensori-motrice est particulièrement rapide chez les rats après une ischémie cérébrale. Ainsi, pour un suivi longitudinal de la récupération, il est intéressant d'évaluer les fonctions cognitives plus élaborées comme la mémoire spatiale qui reste perturbée durant au moins deux mois après la lésion (Yonemori *et al.*, 1996 ; Yonemori *et al.*, 1999). Nous n'avons pas, pour des raisons logistiques, utilisé la classique piscine de Morris (recherche de plateforme immergée). Nous avons utilisé, comme test de mémoire spatiale, un labyrinthe radial à 8 bras (Bioseb, France) (**Figure 21**).

Figure 21. Labyrinthe radial à 8 bras (Bioseb, France).



Nous avons adapté une tâche de rappel libre (après un délai court) précédemment décrite : « Delayed match to sample » (Buccafusco, 2000).

Ce test nécessite un apprentissage quotidien durant 3 semaines consécutives avant l'ischémie cérébrale. Les 3 premiers jours consistent en une habituation simple au labyrinthe. A l'issue de ceux-ci, les séances d'entraînement proprement dites sont débutées.

De la nourriture sucrée en boulette (Smacks[®] Kellogs) est positionnée à l'extrémité de 3 bras non consécutifs dans les cupules prévues à cet effet.

La session d'encodage de la consigne est effectuée en fermant à leur origine les 5 bras vides et en laissant ouverts les 3 bras avec nourriture. Le rat doit trouver les 3 boulettes. Le temps mis pour effectuer cette tâche est relevé (limité à 5 min) ainsi que le nombre d'erreurs (retours dans des bras déjà visités).

L'animal est alors remis en position centrale sous une boîte noire durant 30 s. Des boulettes sont repositionnées dans les 3 mêmes bras et tous les bras sont ouverts.

Après ces 30 s de délai, dans la session de rappel, le rat doit retrouver les boulettes. Le temps mis pour effectuer cette tâche est relevé (limité à 5 min) ainsi que le nombre d'erreurs : retours dans des bras avec nourriture déjà visités, entrées dans les bras vides.

II.5. Méthodes générales d'IRM

Trois aimants horizontaux adaptés pour l'IRM du petit animal ont été utilisés dans les études présentées ici :

- 2,35 T (Bruker, France) : diamètre = 40 cm, gradients Magnex Scientific Ltd (Oxford, UK) piloté par console SMIS Ltd (Guilford, UK).
- 7 T (Magnex Scientific Ltd, Oxford, UK) : diamètre = 20 cm, gradients Magnex Scientific Ltd (Oxford, UK) piloté par console SMIS Ltd (Guilford, UK).
- 7 T (Bruker Biospec 70/20 USR Avance III) : diamètre = 21 cm.

Pour l'acquisition d'image, les rats ont été anesthésiés à l'Isoflurane par masque facial et la température corporelle contrôlée par sonde rectale reliée à une couverture chauffante à eau. Lors des expériences les plus récentes, un contrôle du rythme respiratoire pendant l'acquisition a été utilisé.

Toutes les séquences d'IRM utilisées dans nos essais expérimentaux sont transposables chez l'homme en étude clinique. Les séquences, habituelles dans les études sur l'ischémie cérébrale, ont été effectuées :

- T_1 pondérée en écho de spin (T_1SE) : séquence permettant la visualisation de la zone de lésion et l'identification, après injection de Gadolinium, des zones de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique.

- T_2 pondérée en écho de spin (T_2SE) : séquence permettant la visualisation en hypersignal de la lésion et la délimitation de celle-ci après la phase aiguë.

- images pondérées en diffusion (Dif) et cartographie du coefficient apparent de diffusion (CAD) : séquences permettant la visualisation quasi-immédiate de l'ischémie cérébrale en identifiant la zone présentant une restriction marquée de la diffusion de l'eau et correspondant à la zone d'œdème cellulaire (voir *I.1.4. Physiopathologie de l'ischémie cérébrale*).

- écho de gradient (en 3 dimensions) pondérées en T_2^* (EG- T_2^*) : séquence très sensible aux artefacts permettant de dépister une éventuelle hémorragie et de détecter les cellules marquées par des particules paramagnétiques (Hoehn *et al.*, 2002 ; Modo *et al.*, 2004).

D'autres séquences spécifiques ont été utilisées notamment pour étudier la microvascularisation. Celles-ci seront détaillées dans les chapitres concernés.

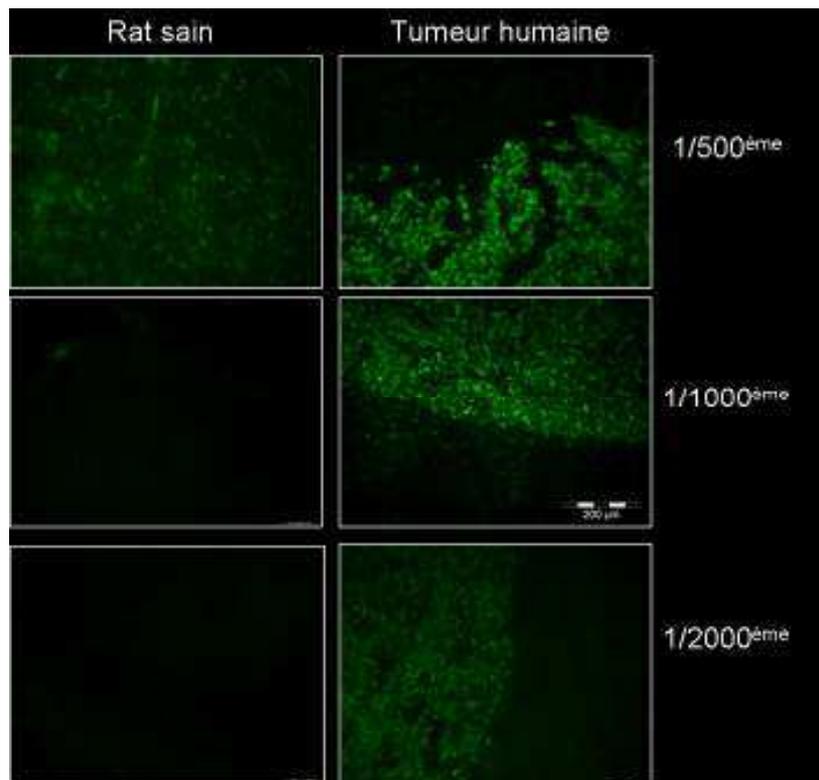
II.6. Méthodes d'histologie

Les cerveaux ont été prélevés après décapitation des rats sous anesthésie profonde à l'Isoflurane. Les prélèvements ont été immédiatement congelés dans une solution d'Isopentane à environ -50°C puis stockés à -80°C . Des coupes de 10 à 20 μm ont été effectuées au cryotome dans une enceinte maintenue entre -18 et -20°C .

Des immunomarquages ont été utilisés pour identifier les cellules dérivées des CSMh :

- Les cellules dérivées des CSMh ont été identifiées par un anticorps monoclonal anti-noyaux humains (HuNu, MAB1281 Chemicon Int.). Cet anticorps marque les noyaux de tous les types de cellules humaines. Ce marquage a été optimisé par des essais préliminaires sur des tumeurs humaines implantées dans le cerveau de rat. L'utilisation d'une dilution importante à $1/1000^{\text{ème}}$ voire $1/2000^{\text{ème}}$ limite nettement le bruit de fond (**Figure 22**). Suite à ces résultats, cet anticorps primaire HuNu a donc été incubé sur coupes (à 4°C , durant une nuit) à une dilution élevée ($1/2000^{\text{ème}}$). Un anticorps secondaire fluorescent anti-IgG de souris (Jackson laboratory, MA, USA) a ensuite été utilisé à la dilution standard de $1/500^{\text{ème}}$ durant une heure.

Figure 22. Optimisation du marquage des cellules humaines par l'anticorps anti-noyaux humains (MAB1281, HuNu, Chemicon Int.). Comparaison de marquages effectués sur des cerveaux sains et sur des cerveaux dans lesquels une tumeur d'origine humaine avait été préalablement implantée. *Echelle = 200 μ m.*



- Pour visualiser les neurones, l'anticorps polyclonal anti-neurofilament (NF200, N4142 Sigma, fait chez le lapin) a été utilisé à la dilution de 1/500^{ème} avec un anticorps secondaire fluorescent anti-IgG de lapin dilué à 1/200^{ème}.

- Pour visualiser les astrocytes notamment les astrocytes activés, l'anticorps polyclonal anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein, 20334 DakoCytomation, fait chez le lapin) a été utilisé à la dilution de 1/500^{ème} avec un anticorps secondaire fluorescent anti-IgG de lapin dilué à 1/100^{ème}.

- Pour visualiser les vaisseaux, l'anticorps polyclonal anti-facteur VIII de von Willebrand (DakoCytomation, fait chez le lapin) a été utilisé pour identifier les cellules endothéliales à la dilution de 1/500^{ème} avec un anticorps secondaire fluorescent anti-IgG de lapin dilué à 1/100^{ème}. L'anticorps, fait chez la chèvre, dirigé contre le collagène IV (1/2000^{ème}) avec un anticorps secondaire fluorescent anti-IgG de chèvre (1/200^{ème}) a également été utilisé pour visualiser la lame basale des vaisseaux cérébraux.

Ces marquages spécifiques ont été utilisés, dans certaines expériences de ce travail, en double marquage, couplés au marquage HuNu pour identifier la différenciation de CSMh dans ces différents types de cellules cérébrales.

Tous les noyaux cellulaires (sans spécificité d'espèce) ont été marqués au montage des lames par la solution de Hoechst (fluorescence bleue). Comme décrit précédemment, les particules M-SPIO ont été visualisées en fluorescence spontanée. Toutes les observations microscopiques ont été effectuées par microscopie à fluorescence (Nikon, Eclipse E600, Japon).

II.7. Méthodes statistiques

Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. Les erreurs moyennes standard ont été utilisées pour la représentation graphique des résultats des tests comportementaux. Un $p < 0,05$ a été considéré comme significatif.

Pour les mesures répétées de manière exhaustive (notamment pour les données des tests comportementaux), une ANOVA sur mesures répétées a été utilisée après avoir vérifié l'homogénéité des variances (test de Levene).

Pour les comparaisons inter-groupes des moyennes, le t-test de Student pour échantillons non appariés a été utilisé après avoir vérifié l'homogénéité des variances (test de Levene). Pour les comparaisons intra-groupes (par exemple les comparaisons hémisphère droit *vs* gauche), le t-test de Student pour échantillon appariés a été utilisé. En cas d'inhomogénéité des variances d'échantillons indépendants, le test non-paramétrique de Mann-Whitney a été réalisé.

Le logiciel SPSS 11.5 (SPSS Inc) a été utilisé pour l'ensemble des analyses.

III. MARQUAGE DES CSMh POUR IRM

CELLULAIRE ET MICROSCOPIE

La possibilité de suivre des cellules souches *in vivo* après une greffe locale, une injection IV, ou IA peut permettre d'apporter des réponses utiles aux questions en suspens sur la meilleure dose et/ou la meilleure voie d'administration à utiliser. Les CSMh peuvent être efficacement radiomarquées pour l'imagerie nucléaire (voir *II.1.3. Radiomarquage des CSMh pour imagerie nucléaire*) (Gao *et al.*, 2001 ; Barbash *et al.*, 2003 ; Allers *et al.*, 2004 ; Kraitchman *et al.*, 2005 ; De Haro *et al.*, 2005 ; Bindslev *et al.*, 2006 ; Correa *et al.*, 2007 ; Detante *et al.*, 2009). Cependant, des dégâts cellulaires radio-induits peuvent survenir notamment sur la prolifération (Detante *et al.*, 2009) et la différenciation cellulaires (Brenner *et al.*, 2004).

Pour contourner ce problème, les cellules souches peuvent être marquées pour l'IRM par des particules paramagnétiques (Hinds *et al.*, 2003 ; Bulte & Kraitchman, 2004 ; Arbab *et al.*, 2006) et peuvent ainsi être identifiées *in vivo* dans les reins (Hauger *et al.*, 2006 ; Itrich *et al.*, 2007), le cœur (Hill *et al.*, 2003 ; Kraitchman *et al.*, 2003 ; Kraitchman *et al.*, 2005) ou le cerveau (Bulte *et al.*, 1999 ; Bulte *et al.*, 2002 ; Hoehn *et al.*, 2002 ; Jendelova *et al.*, 2003). Les particules superparamagnétiques (« superparamagnetic iron oxides », SPIO) sont des agents de contraste négatif en IRM induisant un hyposignal sur les images T₂ pondérées en écho de spin (T₂SE) et les images d'écho de gradient pondérées en T₂* (EG-T₂*), à l'inverse des agents de contraste positif qui induisent un hypersignal sur les images pondérées en T₁ (chélates de Gadolinium) (Shyu *et al.*, 2007). Les SPIO sont composés de particules de fer pouvant être associées à un dextran (Ferumoxides) ou à un carboxydextran (Ferucarbotran). La « famille » des SPIO inclut des particules nanométriques (« Ultrasmall SPIO », USPIO) telles que le Ferumoxtran. Les SPIO micrométriques (M-SPIO) telles que les particules ferriques fluorescentes (« Iron Fluorescent Particles », IFP, Bangs Laboratory, Fisher, IN, USA) contiennent un fluorophore pour l'histologie et l'évaluation de l'efficacité du marquage (Hill *et al.*, 2003 ; Hinds *et al.*, 2003 ; Shapiro *et al.*, 2004 ; Valable *et al.*, 2007).

Pour optimiser le marquage par USPIO (Lewin *et al.*, 2000 ; Hoehn *et al.*, 2002) ou par SPIO (Kraitchman *et al.*, 2003 ; Arbab *et al.*, 2004 ; Kostura *et al.*, 2004 ; Arbab *et al.*, 2005 ; Kraitchman *et al.*, 2005 ; Walczak *et al.*, 2008), des agents de transfection sont généralement utilisés *ex vivo*. Cependant, les effets cellulaires délétères de ces agents n'ont pas été complètement étudiés. Une inhibition marquée de la différenciation en chondrocytes (Kostura

et al., 2004) et une altération du potentiel ostéogénique (Farrell *et al.*, 2008) ont été observées après marquage par SPIO de CSMh en utilisant des méthodes de transfection. Un marquage SPIO des CSMh sans agent de transfection a été rapporté par Hsiao *et al.* (Hsiao *et al.*, 2007). Ils ont obtenu des résultats encourageants pour détecter des CSMh par IRM *in vitro* (1,5 T). Cependant, il n'a pas été rapporté de résultats concernant la différenciation chondrocytaire de ces CSMh marquées. Les M-SPIO couplées à un marqueur fluorescent telles que les IFP ont été utilisées dans notre laboratoire pour suivre par IRM des macrophages marqués et injectés par voie IV dans un modèle de tumeur cérébrale (Valable *et al.*, 2007). Hinds *et al.* ont montré que ces particules ne modifiaient pas la viabilité et les capacités de différenciation des CSM porcines (Hinds *et al.*, 2003). Des CSM porcines marquées et injectées au sein d'un infarctus du myocarde chez le porc ont pu être suivies par IRM (Hill *et al.*, 2003). Cependant, en raison du peu de données valables sur les effets de ces M-SPIO sur les cellules souches notamment humaines, ces particules ne sont pas actuellement autorisées pour des essais cliniques.

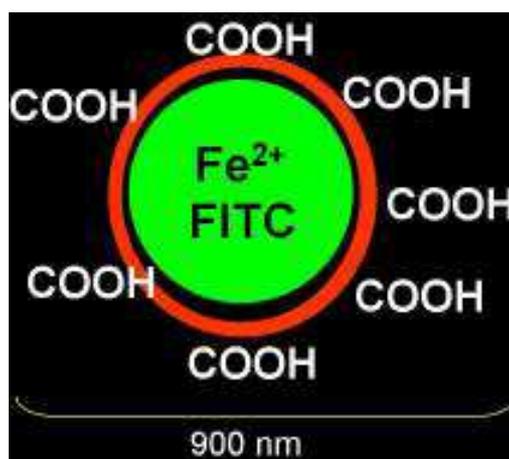
Ainsi nous avons eu comme objectif méthodologique de montrer que le marquage par M-SPIO fluorescentes effectué sans transfection n'influçait ni la viabilité, la prolifération, ni la différenciation des CSM humaines de grade clinique.

III.1. Méthodes

* Marquage des CSMh avec M-SPIO (IFP) :

Des CSMh (à 50-60% de confluence en culture) ont été incubées durant 18 à 20 heures, à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂, avec 12 µl (soit 76,1 µg Fe) de solution de M-SPIO (IFP, Bangs Lab.) par flasque de culture de 75 cm² contenant 6 ml de milieu de culture (soit 2 µl/ml ou 12,7 µg Fe/ml). Ces IFP (diamètre = 0,9 µm ; 63,4% de magnétite poids/poids) sont des particules d'oxyde de fer carboxylées contenant un fluorophore vert « Dragon-green » proche de la fluorescence FITC (excitation = 480 nm ; émission = 520 nm) (**Figure 23**). Après incubation avec les M-SPIO, les CSMh ont été rincées deux fois au PBS (phosphate-buffered saline) pour retirer les particules non absorbées et ont été remises en culture ou trypsinées.

Figure 23. SPIO micrométriques (M-SPIO, Iron Fluorescent Particles, IFP, Bangs Laboratory, Fisher, IN, USA) associant des particules de fer (détectable par IRM) à un fluorophore (détectable en microscopie) utilisées pour le marquage des CSMh.



*** Efficacité du marquage, phénotype cellulaire et viabilité :**

L'efficacité du marquage a été évaluée par microscopie à fluorescence et par cytométrie en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) sur 25 000 cellules. Les CSMh ont été phénotypées par cytométrie en utilisant les immunomarquages CD45-cychrome, CD73-PE, CD90-PE et CD105-PE (BD PharMingen). La cytométrie a également été utilisée pour vérifier la viabilité des CSMh avec un marquage 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD, BD PharMingen). Pour évaluer la prolifération *in vitro* des CSMh marquées, nous avons effectué des cultures avec compte de colonies. Cette caractérisation a été répétée sur deux lots différents de CSMh.

*** Contenu cellulaire en fer :**

Par spectroscopie d'absorption atomique (spectromètre Hitachi 28270), le contenu intracellulaire en fer a été évalué dans un lysat cellulaire de CSMh marquées (2 jours après le marquage) et comparé à celui de CSMh natives contrôles. Cette mesure du contenu en fer a été répétée sur deux lots différents de CSMh.

*** Différenciation des CSMh :**

Cette expérience a été réalisée sur deux cultures de CSMh de donneurs différents.

Pour induire la différenciation en adipocytes, les CSMh marquées et non marquées ont été cultivées à 20 000 cells/cm² dans du MEM α contenant 10% de sérum de veau foetal, 1 μ M de dexaméthasone, 10 μ g/mL d'insuline, 0,5 mM de 3-isobutyl-1-méthylxanthine et 100 μ M d'indométhacine (Sigma, France). Après 21 jours, les cellules obtenues ont été fixées et incubées avec de l'huile rouge pour identifier les vacuoles lipidiques.

Pour induire la différenciation ostéoblastique, les CSMh ont été cultivées dans du MEM α contenant 10% de sérum de veau fœtal, 10 mM de β -glycerophosphate, 10^{-7} M de dexaméthasone et 0,1 mM d'acide ascorbique. Après 21 jours, les cellules obtenues ont été fixées et marquées par le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / nitrobleu tétrazolium (BCIP/NBT, Sigma, France) révélant l'activité phosphatase alcaline témoin de l'ostéogénèse. Pour la chondrogénèse, les CSMh ont été différenciées en amas de haute densité ($2,5 \times 10^6$ cellules par amas) dans du MEM α contenant 10^{-7} M de dexaméthasone, 0,17 mM d'acide ascorbique, 40 μ g/mL de L-proline, 1 mM de pyruvate de sodium, de l'insuline, de la transferrine, de la sélénite de sodium, de l'acide linoléique, et 10 ng/mL de Transforming Growth Factor- β 3. Après 21 jours, les amas cellulaires ont été coupés par cryotome (coupes de 10 μ m d'épaisseur), fixés et marqués par 0,5% de bleu d'alcan.

III.2. Résultats

III.2.1. Marquage des CSMh et viabilité

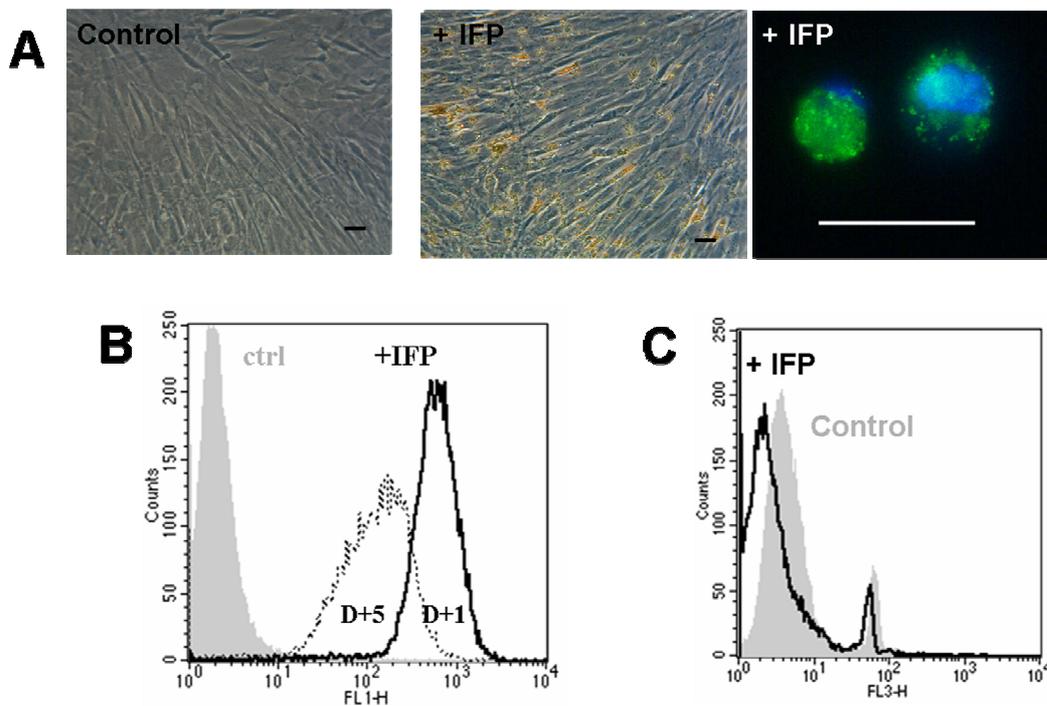
Différentes durées d'incubation avec les M-SPIO ont été essayées (30 min à 20 heures) ainsi que différentes concentrations de particules pour optimiser le marquage des CSMh. Les incubations brèves ont entraîné un marquage uniquement sur la membrane cellulaire sans marquage cytoplasmique. Ainsi, les CSMh ont été exposées aux M-SPIO durant 18 à 20 heures pour une bonne efficacité de marquage sans modification de leur aspect microscopique. La microscopie en fluorescence a confirmé une accumulation cytoplasmique des particules (**Figure 24A**). Les données de cytométrie ont montré qu'un jour après le marquage, 99% des CSMh étaient marquées et restaient marquées durant 5 jours après deux divisions cellulaires (**Figure 24B**).

Deux jours après le marquage, la concentration en fer était de $32,6 \pm 10,1$ nmol ($1,8 \pm 0,6$ μ g) dans un lysat de 10^6 CSMh marquées (soit 1,8 pg or 6,6 IFP /cell) *versus* $0,5 \pm 0,1$ nmol (0,03 μ g) pour 10^6 CSMh contrôles non marquées (0,03 pg /cell).

La viabilité des CSMh n'a pas été affectée par le marquage par M-SPIO (**Figure 24C**). Le pourcentage de cellules mortes était de 7,6% pour les CSMh contrôles et de 5,1% pour les CSMh marquées. De plus, la capacité des CSMh à former des colonies a été similaire entre les CSMh marquées (30 CFU / 100 cellules) et non marquées (29 CFU / 100 cellules).

Figure 24. Marquage des CSMh sans agent de transfection.

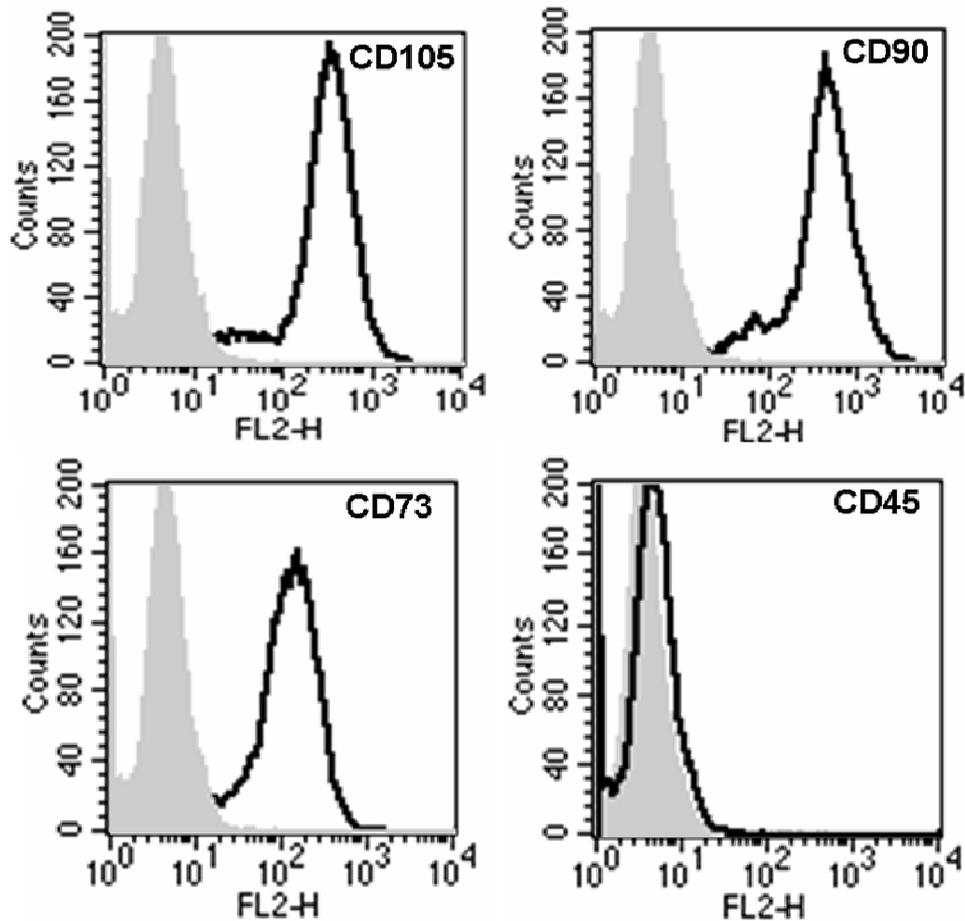
- A. La présence de particules intracellulaires a été observée par microscopie simple et confirmée par microscopie à fluorescence (M-SPIO en vert, autour du noyau marqué en Hoechst en bleu) révélant une bonne accumulation cytoplasmique des M-SPIO.
 - B. Cytométrie en flux : un jour (D+1) après le marquage (+IFP), 99% des CSMh contenaient des particules et restaient marquées durant 5 jours (D+5), après 2 divisions cellulaires. La diminution de l'intensité de fluorescence correspond à la redistribution des particules durant les divisions cellulaires.
 - C. Analyse de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux (7-Amino-Actinomycine D) montrant que la viabilité des CSMh n'est pas affectée par le marquage aux M-SPIO.
- Echelle = 50 μ m. Expérience répétée sur 2 lots de CSMh.*



III.2.2. Absence de modification phénotypique des CSMh marquées et de leur potentiel de différenciation

La cytométrie a montré que les M-SPIO n'affectaient pas les caractéristiques de base des CSMh (**Figure 25**). Plus de 96% des CSMh marquées exprimaient CD73, CD90 et CD105 sans exprimer les marqueurs hématopoïétiques tels que le CD45.

Figure 25. Phénotype des CSMh après marquage par M-SPIO. Les CSMh ont été marquées par des anticorps anti-CD45, CD73, CD105 (ligne noire) ou par des immunoglobulines IgG contrôles (courbe grise) et ont été analysées en cytométrie en flux. Le marquage ne modifie pas le phénotype habituel de CSMh : plus de 96% des CSMh marquées expriment CD73, CD90 et CD105 et n'expriment pas le marqueur hématopoïétique CD45.
Expérience répétée sur 2 lots de CSMh



De plus, le marquage par M-SPIO n'a pas affecté la capacité des CSMh à se différencier en adipocytes, ostéoblastes, et chondrocytes. Nous avons pu détecter respectivement des vésicules lipidiques, l'activité phosphatase alcaline, et le collagène II pour les cellules marquées aussi bien que pour les non marquées (**Figure 26**).

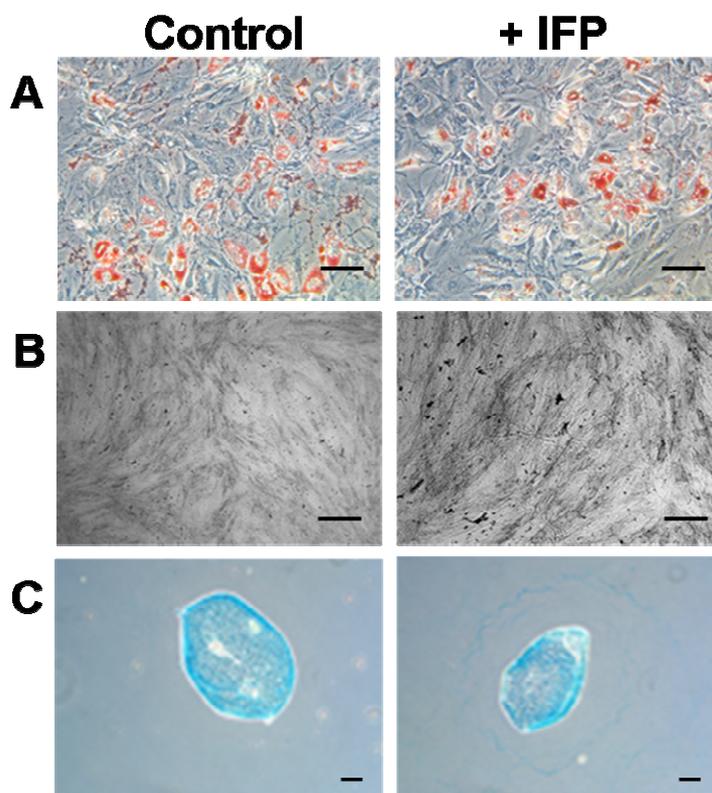
Figure 26. Capacité de différenciation des CSMh après marquage par M-SPIO. Celle-ci a été évaluée pour les CSMh marquées (+ IFP) et contrôles non marquées, après 21 jours de culture en milieux spécifiques. Le marquage par M-SPIO des CSMh n'affecte pas les capacités de différenciation « classiques » des CSMh.

A. Marquage à l'huile rouge des vésicules lipidiques témoignant de l'adipogenèse.

B. Activité phosphatase alcaline témoignant de l'ostéogenèse.

C. Détection du collagène II par le bleu alcian sur un amas cellulaire issu de CSMh témoignant de la chondrogenèse.

Echelle = 25 µm. Expérience répétée sur 2 lots de CSMh.



III.3. Discussion

Nos résultats indiquent que, sans agent de transfection, les particules M-SPIO (IFP) assurent un marquage intracellulaire efficace des CSMh et que ce marquage ne modifie pas leur viabilité, leur prolifération, leur phénotype ou leur différenciation.

Nous avons effectué ici un marquage des CSMh en additionnant simplement la solution d'IFP au milieu de culture (2 µL/mL). Cette procédure simple permet un marquage efficace sur presque 100% des CSMh avec une concentration moyenne par CSMh de 1,8 pg (soit 6,6 particules) comparable à ce que nous avons observé avec les monocytes/macrophages marqués selon la même méthode (2,9 pg /cellule) (Valable *et al.*, 2007). Avec des méthodes sans transfection, différentes performances de marquage ont été obtenues avec des SPIO

fluorescentes telles que l'Endorem[®] dans des CSM de rat (17,5 pg /cellule après 72 heures d'incubation) (Jendelova *et al.*, 2003) ou le Ferucarbotran dans des CSMh (23,4 pg /cellule après 24 heures d'incubation) (Hsiao *et al.*, 2007). Avec des M-SPIO identiques aux nôtres (IFP, Bangs Lab.) pour marquer des CSM porcines, une concentration intracellulaire de fer plus élevée (mais variable) a été observée en utilisant une solution plus concentrée en M-SPIO (20 à 380 pg /cellule après 18 heures d'incubation de 10 µl d'IFP /mL de milieu) (Hill *et al.*, 2003). Ce marquage moins important des CSMh en comparaison aux CSM porcines ou aux macrophages pourrait être lié à une moindre capacité de phagocytose.

Après de multiples divisions cellulaires (temps de doublement *in vitro* des CSMh = 50 heures), nous avons observé que les M-SPIO se distribuaient correctement aux cellules filles avec une diminution proportionnelle de la fluorescence. D'autres études ont rapporté des résultats similaires avec les CSM porcines avec une diminution progressive de la fluorescence suivant les divisions cellulaires (Hinds *et al.*, 2003). Ces données sont tout à fait encourageantes pour envisager le suivi *in vivo* de populations de cellules prolifératives.

Malgré l'incorporation de fer et du fluorophore dans les cellules, aucun impact sur le phénotype, la prolifération ou la différenciation des CSMh n'a été observé avec notre méthode simple et efficace. A l'inverse, les méthodes de marquage par transfection semblent induire des altérations de la capacité de différenciation des CSMh notamment en chondrocytes (Kostura *et al.*, 2004) et ostéoblastes (Farrell *et al.*, 2008). Pour les futurs essais, il faudrait donc privilégier les méthodes de marquage passif simple sans agent de transfection.

IV. GREFFE INTRACEREBRALE DE CSMh APRES ISCHEMIE CEREBRALE

Comme nous l'avons décrit en introduction, l'utilisation des CSMh pour la réparation tissulaire repose sur leur capacité à survivre longtemps dans un tissu d'intérêt et à s'y différencier en différents types cellulaires (Chamberlain *et al.*, 2007). Les CSMh issues de la moelle osseuse peuvent se différencier en neurones (Krampera *et al.*, 2007 ; Woodbury *et al.*, 2000) et favoriser la réparation structurale et fonctionnelle du cerveau dans des modèles murins d'ischémie cérébrale (Chen *et al.*, 2001^a, 2001^b, 2001^c, 2003^a 2003^b ; Li *et al.*, 2002 ; Borlongan *et al.*, 2004^c ; Liu *et al.*, 2007 ; Shen *et al.*, 2007^a, 2007^b ; Onda *et al.*, 2008). La capacité à suivre *in vivo* ces cellules souches après une injection IV ou une greffe IC est importante pour répondre aux questions pratiques de la meilleure voie d'administration, la meilleure source de cellules et la meilleure dose à utiliser.

Dans l'essai expérimental pilote décrit dans ce chapitre, notre objectif a été d'étudier la faisabilité, l'innocuité et les effets fonctionnels de la greffe IC de CSMh après ischémie cérébrale chez le rat. Des CSMh marquées par M-SPIO ont été greffées pour vérifier l'utilité de ce marquage, décrit en *Méthodologie générale* tant pour l'IRM *in vivo* que pour la microscopie. Pour cette première étude pilote de thérapie cellulaire par CSMh de grade clinique après une ischémie cérébrale, nous avons choisi l'injection IC directement au sein de la lésion pour s'affranchir du problème de la biodistribution générale après une injection systémique. L'objectif de cette étude *in vivo* a été d'évaluer notre capacité à suivre *in vivo* les CSMh marquées et d'évaluer la tolérance de ce traitement dans un suivi longitudinal et multiparamétrique (IRM et tests comportementaux).

IV.1. Matériel et méthodes

Cet essai a été conduit selon le schéma expérimental suivant sur 4 semaines :

<i>Entraînement</i>	J0	J1	J2	J7	J14	J15	J21	J28
C	oACM IRM 1	Greffe IC IRM 2	C	C	C	IRM 3	C	IRM 4 Histologie

C : tests comportementaux ; oACM : occlusion de l'artère cérébrale moyenne ; IC : intracérébrale.

* Transplantation intracérébrale et groupes expérimentaux :

Un jour (J1) après une ischémie cérébrale induite par oACM droite transitoire, 14 rats ont été randomisés en deux groupes :

- 1) les rats traités ont reçu une greffe IC de 4.10^5 CSMh marquées par M-SPIO (suspendues dans 10 μ L de PBS-glutamine) au sein de la lésion cérébrale (n=7),
- 2) les rats contrôles ont reçu une injection IC de 10 μ L de PBS-glutamine (milieu de suspension cellulaire) (n=7).

Pour l'injection IC, les rats ont été fixés dans un cadre stéréotaxique. Avec une seringue de Hamilton de 25G et selon les coordonnées de l'atlas de Paxinos-Watson (Paxinos George & Watson Charles, 1998), 7 μ L de la solution (CSMh ou PBS-glutamine) ont été injectés au sein de la lésion, dans le striatum droit (0 mm antéro-postérieur ; 3 mm latéral; 6 mm de profondeur par rapport au bregma) puis 3 μ L dans le cortex droit (0/3/2 mm) au débit de 1 μ L/min au pousse-seringue électrique. Après l'injection, l'aiguille a été retirée lentement.

* Analyse comportementale :

Tous les rats ont été suivis par les tests sensori-moteurs décrits précédemment : le neurological severity score modifié (NSS) et le test de retrait d'adhésif (TRA). Ils ont été examinés avant l'ischémie puis à J2, J7, J14, J21 après la lésion. Une analyse de variance pour mesures répétées a été utilisée.

* IRM cérébrale *in vivo* :

Immédiatement après l'ACM (à J0), à J1, J15, et J28, une IRM (aimant horizontal, 2,35 T Bruker) a été réalisée avec : des images pondérées en diffusion (Dif, TR/TE = 2000/80 ms, taille de voxel = 234 x 234 x 1000 μm , 2 moyennages), une séquence T₂SE (TR/TE = 2000/80 ms, taille de voxel = 234 x 234 x 1000 μm , 2 moyennages), une séquence en écho de gradient 3D pondérées en T₂* (EG-T₂*, TR/TE = 400/25 ms, taille de voxel = 234 x 234 x 469 μm , 1 moyennage). La lésion ischémique a été délimitée manuellement sur toutes les coupes montrant la lésion et mesurée sur les images Dif à J0 et J1, puis sur les images T₂SE ensuite, ces dernières donnant un meilleur contraste de signal après la phase aiguë. Le volume lésionnel a été calculé en multipliant le nombre de pixels par la surface unitaire d'un pixel et par l'épaisseur de coupe.

Pour chaque rat, la durée de la procédure d'IRM fut d'environ 40 minutes.

* Histologie :

Tel que décrit en *Méthodologie générale*, les CSMh ont été identifiées par l'anticorps HuNu avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris marqué en fluorescence TRITC (rouge). Pour visualiser les neurones, les astrocytes et les vaisseaux, les anticorps anti-neurofilament, anti-GFAP, et anti-collagène IV ont été utilisés respectivement. Un marquage anti-ED1 (CD68) à la dilution de 1/2000^{ème} avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris (1/500^{ème}) a été utilisé pour identifier les macrophages et les cellules microgliales. Un anticorps secondaire marqué en fluorescence TRITC (rouge) a été utilisé pour l'ensemble de ces marquages. Une contre-coloration des noyaux avec le milieu de Hoechst a été effectuée. La fluorescence spontanée en vert des M-SPIO a été observée.

Les surfaces vasculaires ont été estimées en pourcentage avec l'outil « analyse particules » (logiciel ImageJ WCIF) sur le marquage de lame basale des vaisseaux cérébraux (collagène IV), après binarisation des images. Les surfaces individuelles des vaisseaux ont été mesurées en μm^2 (1 pixel = 193 x 193 nm). Toutes les photographies ont été prises dans le cortex lésé, dans le site de greffe striatale, et dans le striatum controlatéral.

IV.2. Résultats

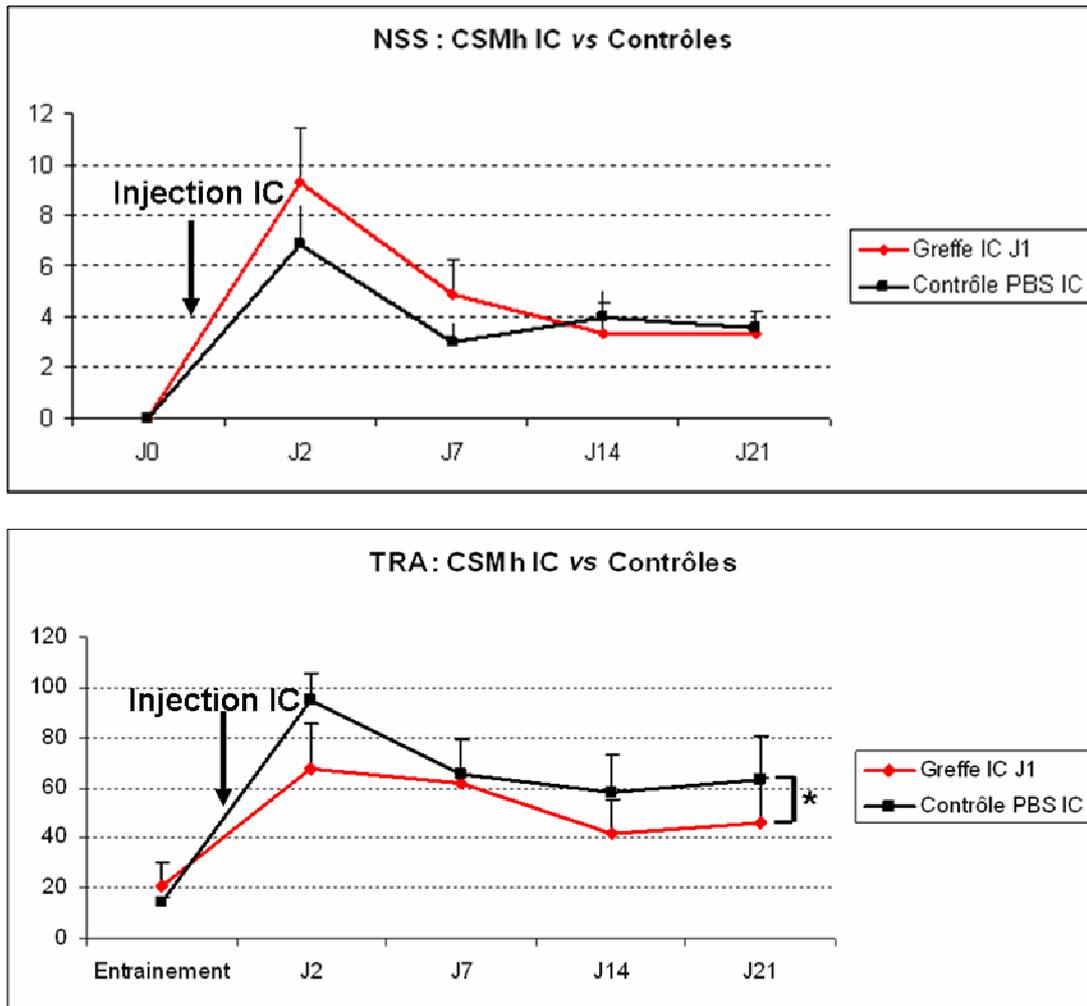
IV.2.1. Effets fonctionnels de la greffe intracérébrale de CSMh

Tous les rats, durant les 90 minutes d'oACM, ont présenté un déficit neurologique gauche authentifiant la souffrance cérébrale en cours.

A l'injection et durant le suivi, aucun effet secondaire attribuable aux CSMh n'a été observé. Aucune réaction inflammatoire majeure et aucune tumeur (notamment au site de greffe) n'a été identifiée.

Durant les 3 semaines de suivi après la greffe, la récupération sensori-motrice a été meilleure pour les rats traités par CSMh IC comparés aux rats contrôles (ANOVA pour mesures répétées ; NSS : non significatif ; TRA : $p=0,031$) (**Figure 27**). Ce bénéfice semble plus marqué 2 à 3 semaines après l'injection.

Figure 27. Effets fonctionnels de la greffe intracérébrale (IC) de CSMh effectuée un jour après une ischémie focale. NSS (Neurological severity score, exprimé en score brut) et test de retrait d'adhésif (TRA, exprimé en s). Moyennes \pm erreurs standard moyennes ; ANOVA pour mesures répétées. * : $p < 0,05$.



IV.2.2. IRM cellulaire *in vivo*

Immédiatement après l'oACM à J0, les images de diffusion ont authentifié une lésion cortico-striatale droite chez tous les rats (volume = $109 \pm 64 \text{ mm}^3$). Aucune transformation hémorragique n'a été observée sur les séquences EG-T₂* initiales.

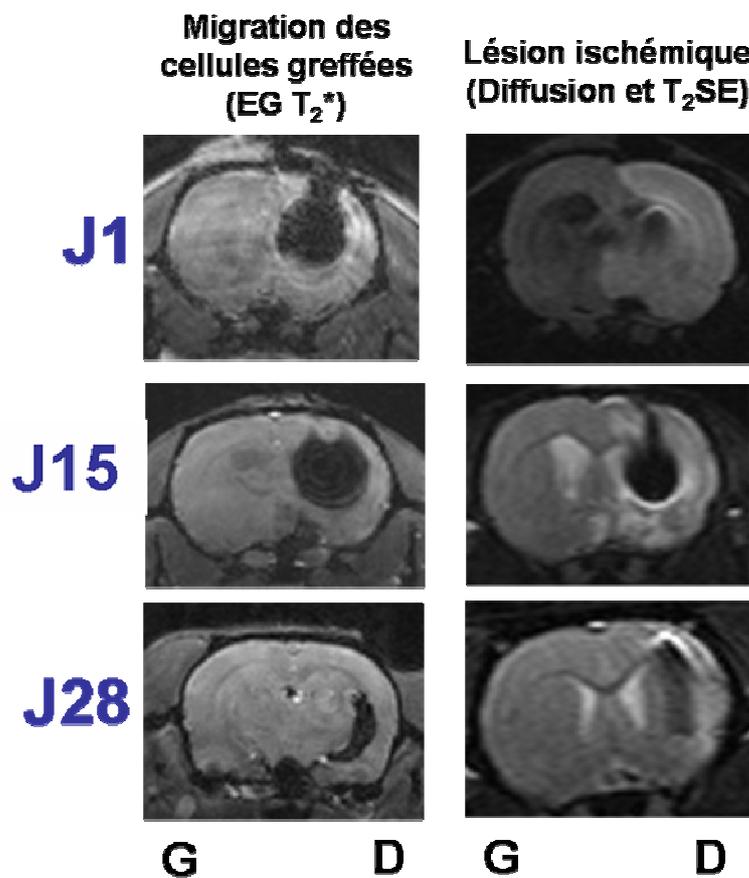
Après la greffe, à J1, J15, et J28, la présence de M-SPIO a été identifiée *in vivo* dans les deux sites d'injection (striatum et cortex) en Dif et EG-T₂* (**Figure 29**). Un artefact de susceptibilité magnétique est observé comme un hyposignal important, particulièrement sur les images EG-T₂*, correspondant à la présence des particules ferriques. En raison de la

déformation anatomique induite par cet hyposignal, le volume lésionnel n'a pas pu être mesuré après la greffe.

Durant 4 semaines, nous avons observé une diminution de la taille de l'hyposignal EG-T₂* et un déplacement de celui-ci le long de la capsule externe homolatérale à la lésion et à la greffe (**Figure 28**).

Aucune anomalie n'a été observée, chez les rats du groupes contrôles, notamment pas d'hyposignal sur les images EG-T₂*.

Figure 28. Suivi IRM de CSMh marquées par M-SPIO et greffées au sein d'un infarctus cérébral. On note, chez un même rat (représentatif du groupe greffé), le déplacement de l'hyposignal des zones de greffe striatale et corticale vers la profondeur et le long de la capsule externe homolatérale. *G* : gauche ; *D* : droite.



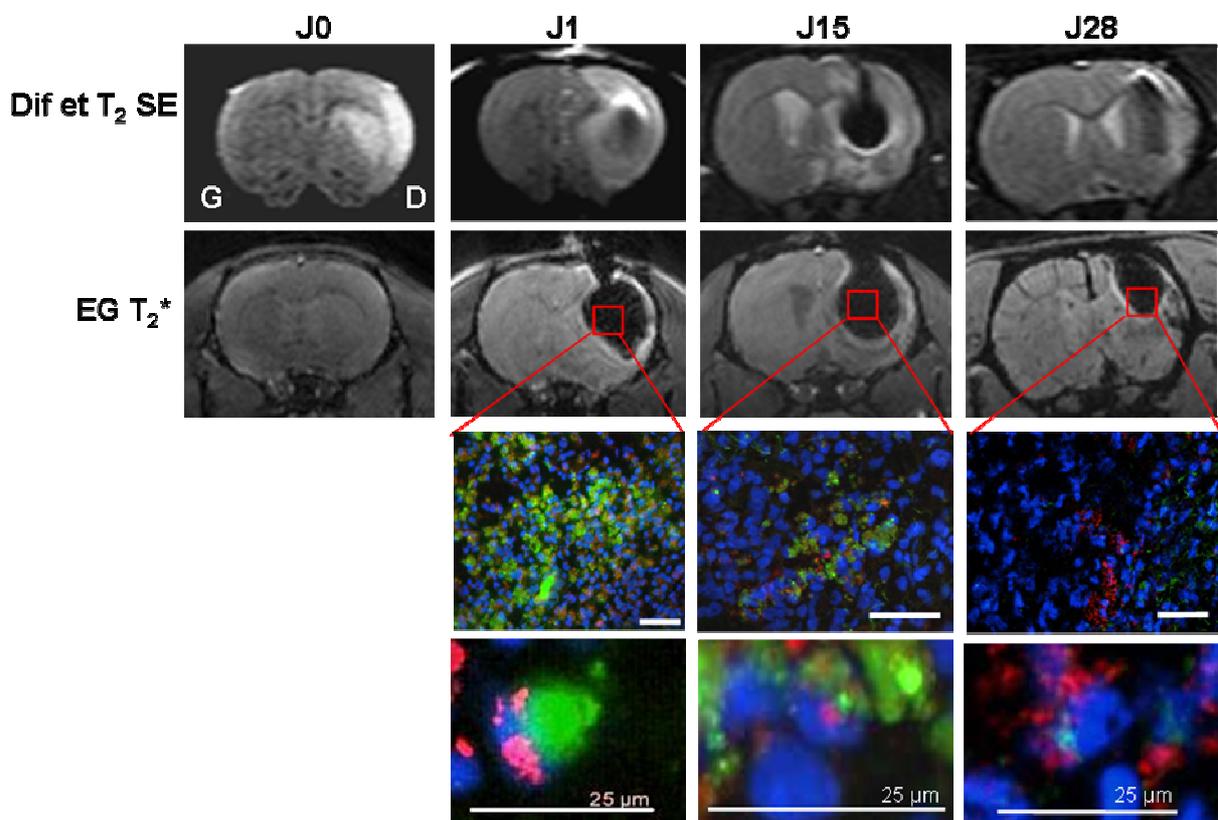
IV.2.3. Histologie

Des cellules humaines (HuNu positives) avec une fluorescence spontanée cytoplasmique due aux M-SPIO ont pu être identifiées au sein de la zone d'infarctus. Cela témoigne de la présence de cellules dérivées des CSMh greffées autour des points d'injection jusqu'à au moins 15 jours. La quantité de M-SPIO, observée en microscopie, diminue au cours du temps mais reste détectable en IRM (**Figure 29**). Au cours du suivi et notamment 28 jours après la lésion, de nombreuses particules M-SPIO libres ont été observées traduisant un relargage de celles-ci. Dans le groupe contrôle, aucune fluorescence spécifique (HuNu ou M-SPIO) n'a été observée.

Figure 29. Détection de CSMh marquées par IRM *in vivo* et histologie.

Immédiatement après l'oACM (J0), on observe la lésion cortico-striatale droite (Dif) sans hémorragie sur la séquence EG-T₂*. Après l'injection intracérébrale, des M-SPIO sont identifiées *in vivo* à J1, J15 et J28, dans les deux sites de greffe (cortex et striatum lésés). Un artefact de susceptibilité magnétique est visualisé comme un large hyposignal particulièrement sur les images EG-T₂* lié à la présence des particules de fer. Les images sont issues de rats différents du groupe traité, représentatifs de chaque temps.

Par microscopie à fluorescence dans la lésion après la greffe, tous les noyaux cellulaires sont visualisés par la coloration de Hoechst (bleue). Les particules M-SPIO fluorescentes sont directement observées (en vert) et colocalisées au marquage par anticorps anti-noyaux humains (rouge) pour identifier des cellules dérivées des CSMh marquées. Les images au plus fort grossissement (en bas) authentifient la survie de cellules humaines ayant gardé un marquage M-SPIO intracytoplasmique jusqu'à 28 jours. La quantité de M-SPIO au site de greffe décroît au cours du temps mais reste détectable par IRM jusqu'à au moins 28 jours. Echelle = 50 μ m (ou 25 μ m notée).



A l'issue des 28 jours de suivi, nous avons noté des colocalisations cellulaires du marquage GFAP avec la fluorescence spontanée cytoplasmique des M-SPIO et la coloration de Hoechst suggérant la différenciation possible des CSMh marquées en astrocytes. De la même manière, la colocalisation cellulaire du marquage NF200 avec la fluorescence cytoplasmique des M-SPIO suggère la différenciation possible des CSMh marquées en neurones (**Figure 30**). Bien que ces différenciations soient observables chez tous les rats à des temps différents, nous avons noté, un taux faible (~ 1%) de différenciation en cellules spécifiques. Nous avons observé un nombre important de particules libres ou présentes au sein d'autres cellules notamment des macrophages et/ou cellules microgliales (**Figure 31**). Ainsi les M-SPIO peuvent être relarguées et restées libres ou être à nouveau phagocytées par d'autres cellules cérébrales (gliales ou neurales). Pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu effectuer des observations avec une « triple » fluorescence qui aurait permis d'identifier une éventuelle colocalisation du marquage HuNu avec les marquages de cellules différenciées et les M-SPIO.

Figure 30. Différenciation des CSMh greffées par voie intracérébrale dans la lésion ischémique.
Histologie réalisée 28 jours après la lésion ischémique.

- A. Repérage par IRM des régions d'intérêt : coupe coronale en séquence de diffusion (à gauche) et coupe axiale T₁SE (à droite).
- B. Colocalisation cellulaire du marquage GFAP (rouge) avec la fluorescence spontanée cytoplasmique des IFP et la coloration de Hoechst (bleu) suggérant la différenciation de CSMh marquées en astrocytes.
- C. Colocalisation cellulaire du marquage NF200 (rouge) avec la fluorescence spontanée cytoplasmique des IFP et la coloration de Hoechst (bleu) suggérant la différenciation de CSMh marquées en neurones.

Echelle = 50 μ m

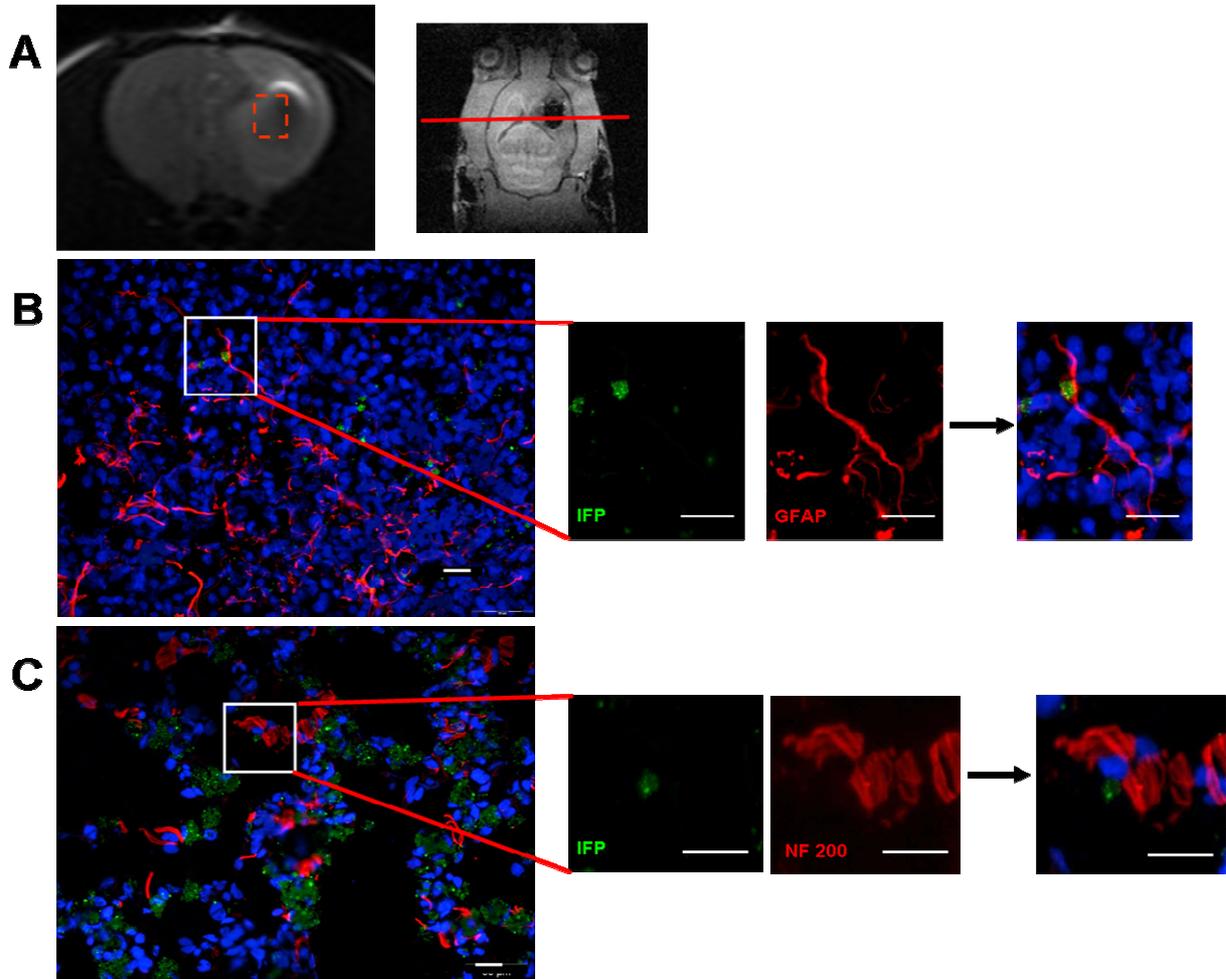
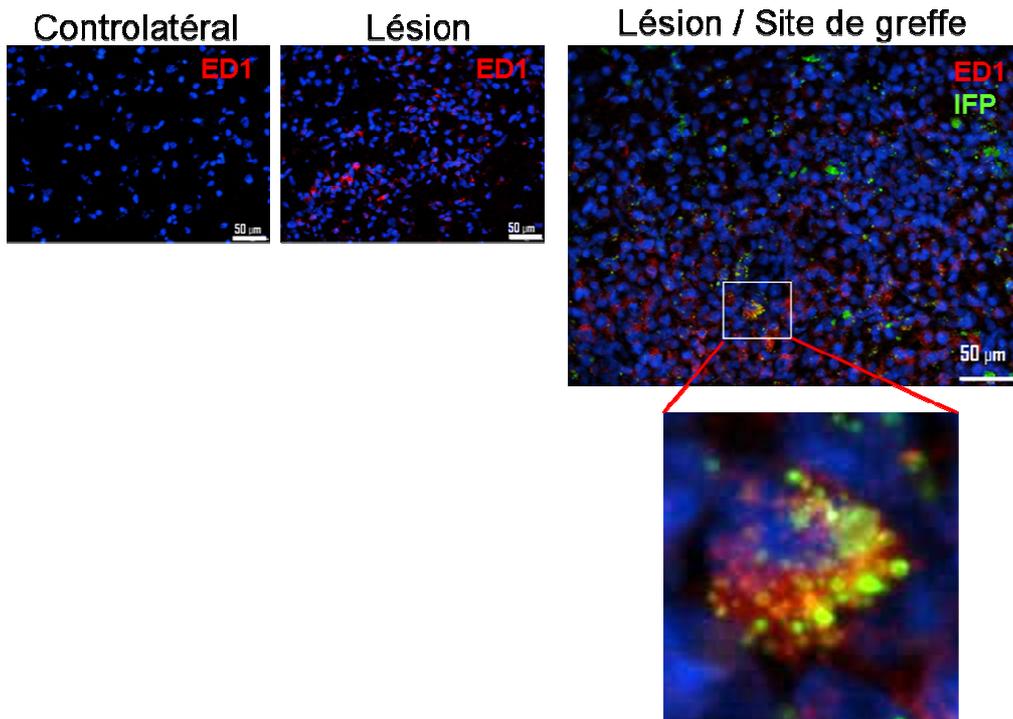
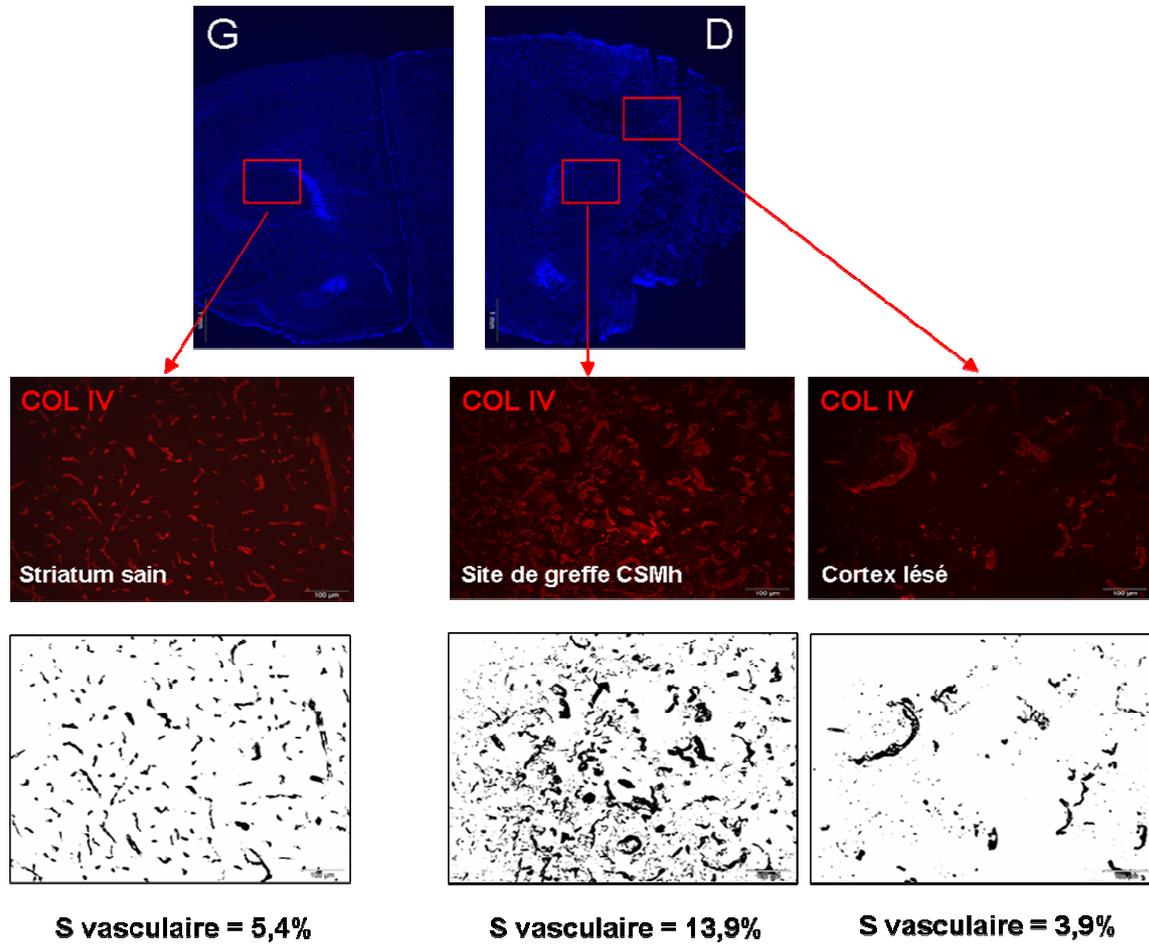


Figure 31. Les particules M-SPIO (IFP en autofluorescence verte) peuvent être relarguées par les CSMh et phagocytées *in situ* par les cellules microgliales et/ou macrophages marquées ici par l'anticorps anti-ED1 (CD68, rouge). Histologie réalisée 28 jours après la lésion ischémique.



Pour l'étude vasculaire, les résultats obtenus n'ont pas permis l'exploitation statistique des données (difficultés de mise en place du marquage vasculaire). Le marquage du collagène IV a permis de limiter le bruit de fond observé par le marquage du facteur VIII. En raison de difficultés techniques, le double marquage avec l'anticorps HuNu n'a pas permis d'obtenir des données satisfaisantes. Comme résultat pilote, en simple marquage du collagène IV, 28 jours après la lésion ischémique, nous avons observé une densité microvasculaire semble-t'il plus élevée au site de greffe que dans le reste de l'infarctus et que dans l'hémisphère controlatéral (**Figure 32**). Ces résultats n'ont pas été approfondis ici, faisant l'objet d'une autre étude spécifique sur la microvascularisation (voir *chapitre VII. Effets microvasculaires de l'injection intracérébrale de CSMh après ischémie*).

Figure 32. Quantification de la surface vasculaire au sein du site de greffe (striatum droit), du cortex lésé comparés au striatum controlatéral. Images microscopiques effectuées chez un même rat (montrées à titre d'exemple représentatif), 15 jours après ischémie cérébrale, suggérant un effet proangiogénique au site de l'injection locale de CSMh. Histologie réalisée 28 jours après la lésion ischémique. *G* : gauche ; *D* : droite ; *COL IV* : collagène IV.



IV.3. Discussion

L'administration IC au sein d'un infarctus cérébral de CSMh marquées par M-SPIO est bien tolérée et semble améliorer le pronostic fonctionnel sur un suivi de 4 semaines. Ces CSMh marquées peuvent être détectées et suivies par IRM *in vivo* et par microscopie.

IV.3.1. Effets de la greffe intracérébrale des CSMh après ischémie

Nous avons montré ici que des CSMh greffées précocément au sein d'une lésion ischémique peuvent survivre et se différencier en cellules différenciées d'intérêt (neurones, astrocytes). Malgré cette différenciation possible en neurones et astrocytes, le taux de différenciation des CSMh reste faible dans notre essai comme dans ceux rapportés dans la littérature. L'effet fonctionnel observé serait ainsi plutôt attribuable à la stimulation de la plasticité endogène du cerveau et à la diminution de la mort des cellules issues des cellules souches neurales de l'hôte notamment au sein de la zone sous-ventriculaire (Yoo *et al.*, 2008) par la sécrétion de facteurs trophiques. Cet effet trophique est souligné par l'injection IC de CSMh surexprimant le BDNF induisant un bénéfice sur la récupération associé à une réduction du volume lésionnel (Kurozumi *et al.*, 2004).

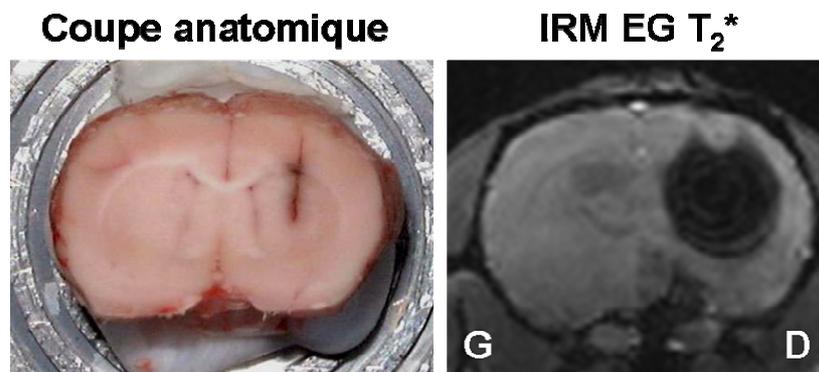
Le bénéfice de l'injection IC de CSMh suggéré dans notre étude pilote est limité en raison du faible nombre de rats par groupe. Le TRA semble plus sensible, notamment pour le suivi au long cours, que le score composite NSS plus adapté pour l'évaluation initiale du déficit neurologique. En effet, le TRA nécessite un apprentissage par les rats de la procédure de retrait, rendant ce test plus difficile à effectuer que les tests moteurs « simples » (marche, équilibre) du score NSS. La variabilité inter-individuelle importante des données de l'analyse comportementale limite également la signification des résultats obtenus. Le bénéfice et la bonne tolérance de la greffe IC des CSMh sont en accord avec les résultats des études de la littérature. Comme nous l'avons décrit en introduction, des CSMh injectées au sein de l'infarctus, une semaine après celui-ci, ont un effet bénéfique durant 6 semaines (Zhao *et al.*, 2002).

En plus de la différenciation neurale directe des CSMh et de leur effet neuroprotecteur, une action sur la microvascularisation pourrait participer au bénéfice fonctionnel et tissulaire (Chen *et al.*, 2003^a). Nos résultats sont ici limités et l'effet microvasculaire des CSMh a été précisé dans une autre étude (voir *chapitre VII*). De plus, les CSMh pourraient avoir un rôle favorable par le biais de leur activité immunomodulatrice (Aggarwal & Pittenger, 2005 ; Plumas *et al.*, 2005) sur l'inflammation post-ischémique.

IV.3.2. IRM cellulaire *in vivo*

L'IRM cellulaire pourrait être utile pour étudier les capacités de migration des CSMh au sein d'un infarctus cérébral. Dans les modèles d'ischémie expérimentale, l'IRM est habituellement utilisée pour suivre des CSM marquées par SPIO après une injection IC (Jendelova *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2007), IA (Walczak *et al.*, 2008) ou IV (Jendelova *et al.*, 2003 ; Walczak *et al.*, 2008). Les SPIO réduisent le T_2^* et induisent une perte de signal sur les images EG- T_2^* . La sensibilité de ces séquences EG- T_2^* permet la détection d'une faible quantité de cellules marquées (Shapiro *et al.*, 2004). Comparées aux nanoparticules SPIO (Ferumoxides), les M-SPIO plus grosses réduisent davantage le T_2^* et augmentent ainsi les effets de susceptibilité magnétiques sur les images (Hinds *et al.*, 2003). Ainsi, ce marquage par M-SPIO pourrait abaisser le seuil de détection cellulaire. Cela aurait un intérêt pour permettre le suivi cellulaire durant une longue période notamment après une administration IV conduisant à une plus faible quantité de cellules au sein de la lésion cérébrale. Cependant, à cause de cette sensibilité élevée des séquences EG- T_2^* , un hyposignal très important est observé après une greffe IC. Le volume de cet artefact n'est pas corrélé au petit volume de l'injection et induit des déformations anatomiques rendant impossible le suivi de la taille de lésion (**Figure 33**).

Figure 33. Greffe intracérébrale de CSMh marquées par M-SPIO. Comparaison du trajet anatomique de la greffe stéréotaxique et de l'important hyposignal induit en IRM (séquence écho de gradient pondérée en T_2^* , EG T_2^*). *G* : gauche, *D* : droite.



Ces déformations d'images sont à prendre en compte tout particulièrement dans les premiers jours suivant la greffe locale de cellules marquées.

Malgré cet inconvénient, nous avons pu observer qu'un marquage cellulaire aux M-SPIO pouvait être détecté par IRM jusqu'à 28 jours avec un hyposignal se réduisant avec le temps en parallèle de la diminution du nombre de particules au sein de la lésion. Ces résultats sont

en accord avec les études rapportées sur le marquage par SPIO de CSMh greffés par voie IC (Kim *et al.*, 2007).

Concernant le suivi à long terme, des questions persistent sur la stabilité du marquage intracellulaire *in vivo*. En effet, malgré une bonne stabilité de celui-ci et une viabilité correcte des CSMh marquées observées *in vitro* (voir *II. Méthodologie générale*), les CSMh greffées au sein d'un infarctus peuvent mourir et relarguer les particules *in vivo*. Ces particules relarguées, toujours détectées en IRM, peuvent rester libres ou être phagocytées par d'autres cellules comme les macrophages et/ou les cellules microgliales. Ainsi, les données histologiques sont essentielles après un suivi par IRM pour confirmer la localisation intracellulaire (ou visualiser un relargage) des particules. Pour cela, les M-SPIO présentent l'avantage d'être spontanément fluorescentes et donc plus facilement identifiables en microscopie. Il convient d'être prudent dans l'interprétation des hyposignaux en IRM et de compléter toujours le suivi par IRM *in vivo* par une étude histologique.

Un autre point est à prendre en considération dans les études d'IRM cellulaire utilisant des particules ferriques. Les transformations hémorragiques pouvant survenir après une ischémie/reperfusion peuvent induire un hyposignal en EG-T₂* (habituellement au sein de l'infarctus) identique à celui induit par les M-SPIO (Valable *et al.*, 2007). Un examen IRM après l'ischémie/reperfusion et avant la greffe doit être systématiquement réalisé pour contrôler l'absence d'hémorragie. Ensuite, la localisation et l'aspect de l'hyposignal en EG-T₂* doit être noté et un contrôle histologique doit être effectué à l'issue de ce suivi *in vivo*.

IV.4. Conclusion

Dans ce premier essai pilote de thérapie cellulaire par greffe IC de CSMh de grade clinique après une ischémie cérébrale, nous avons observé que les M-SPIO peuvent être des particules utiles pour suivre en IRM une population de CSMh greffées localement dans un infarctus cérébral. Cependant, il est essentiel de rester prudent sur l'interprétation des seules données d'IRM et de compléter celles-ci par une étude histologique systématique. La fluorescence des M-SPIO permet ce contrôle histologique de leur localisation intra ou extracellulaire. Ces particules n'induisent pas de modification cellulaire *in vitro* et ne semblent pas non plus interagir avec les capacités fonctionnelles *in vivo* de ces CSMh. La bonne tolérance de ce traitement nous a incités à poursuivre nos essais précliniques en étudiant les effets de l'injection IV des CSMh.

V. INJECTION IV DE CSMh APRES ISCHEMIE CEREBRALE

L'objectif de cette étude a été d'évaluer les effets fonctionnels de l'injection IV de CSMh chez le rat, une semaine après une ischémie cérébrale. Nous avons évalué la tolérance et les effets de l'injection IV de CSMh à distance de l'ischémie cérébrale. L'application de la thérapie cellulaire à la phase subaiguë n'avait pas été précédemment étudiée dans les essais se focalisant sur des administrations de CSMh dans les premières heures après la lésion (voir I.3.2. *Transplantation dans les modèles animaux d'ischémie cérébrale*). Une seule étude a montré le bénéfice de l'injection de CSM murines à la phase subaiguë soit 7 jours après une ischémie cérébrale (Chen *et al.*, 2001^b). Le choix de la voie IV et de l'injection à la phase subaiguë de l'infarctus cérébral a été fait en vue d'un essai clinique en condition autologue imposant un délai de culture « *ex vivo* » des CSMh autologues et leur administration par la voie la moins invasive possible.

V.1. Matériel et méthodes

Cet essai a été conduit selon le schéma expérimental suivant sur 7 semaines :

<i>Entraînement</i>	J0	J2-J3	J6	J8	J9-J10	J14	S3	S4	S5	S6	S7
C			C		C	C	C	C	C	C	C
	oACM	IRM 1		Injection IV	IRM 2				IRM 3		IRM 4 Histologie

C : tests comportementaux ; *oACM* : occlusion de l'artère cérébrale moyenne ; *IV* : intraveineuse.

* Groupes expérimentaux :

Huit jours (J8) après une ischémie cérébrale induite par oACM droite, 25 rats ont été randomisés en deux groupes :

1) les rats traités ont reçu une injection IV (dans une veine de la queue) de $3 \cdot 10^6$ CSMh marquées par M-SPIO (suspendues dans 1 mL de PBS-glutamine) (n=13),

2) les rats contrôles ont reçu une injection IV de 10 mL de PBS-glutamine (milieu de suspension cellulaire) (n=12).

*** Analyse comportementale :**

Tous les rats ont été suivis, en aveugle du traitement, par les tests sensori-moteurs décrits précédemment : le NSS et le TRA. Pour évaluer les fonctions cognitives plus élaborées (mémoire spatiale), ils ont également été suivis par une épreuve de mémoire spatiale en labyrinthe radial à 8 bras.

Ils ont été examinés avant la lésion cérébrale, avant l'injection soit 6 jours (J6) après la lésion cérébrale puis à J9 (soit un jour après l'injection), J14 et 3, 4, 5, 6 et 7 semaines après l'ischémie.

Un t-test pour échantillons indépendants et une analyse de variance pour mesures répétées (pour NSS et TRA) ont été utilisés.

*** IRM cérébrale *in vivo* :**

Après l'oACM, une IRM (aimant horizontal, 7 T Magnex Scientific Ltd) à J2, J10 (soit 2 jours après l'injection de CSMh), puis à 5 et 7 semaines après la lésion avec : une séquence T₂SE (TR/TE = 2500/60 ms, taille de voxel = 234 x 234 x 1000 µm, 2 moyennages), une séquence multi-EG-T₂* (TR = 5000 ms, 6 échos de gradient = 6 à 38 ms, taille de voxel = 234 x 234 x 1000 µm, 2 moyennages). La lésion ischémique a été délimitée manuellement sur toutes les coupes et mesurée sur les images T₂SE en aveugle du traitement. Le volume lésionnel a été calculé en multipliant le nombre de pixels par la surface unitaire d'un pixel et par l'épaisseur de coupe.

Pour chaque rat, la durée de la procédure d'IRM fut d'environ 45 minutes.

*** Histologie :**

A l'issue des 7 semaines de suivi, les cerveaux ainsi que des échantillons de foie, de rate et de muscle strié (patte arrière) ont été prélevés. Tel que décrit en *II. Méthodologie générale*, les CSMh ont été identifiées par l'anticorps HuNu à la dilution de 1/2000^{ème} avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris marqué en fluorescence TRITC (rouge).

Dans les cerveaux de 12 rats traités par CSMh IV et de 7 rats contrôles (environ 2 coupes par rats), 4 régions d'intérêt ont été systématiquement observées : striatum et zone sous-corticale ipsilatéraux à la lésion, et striatum et zone sous-corticale controlatéraux. Les images ont été acquises dans les zones présentant la plus forte densité de marquage HuNu visible. Les cellules humaines (HuNu-positives) ont été comptées manuellement à l'aide d'une grille (logiciel ImageJ WCIF, www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/imagej/) positionnée sur l'image.

Ce nombre a été rapporté en pourcentage du nombre total de noyaux cellulaires (Hoechst, outil ImageJ « nucleus counter »).

Pour visualiser les neurones, les astrocytes et les cellules endothéliales, les anticorps anti-NF200, anti-GFAP, et anti-facteur VIII ont été utilisés respectivement. Les noyaux cellulaires ont été marqués par le milieu de Hoechst. La fluorescence spontanée (en vert) des M-SPIO a été observée.

Les surfaces vasculaires ont été estimées en pourcentage, sur 54 images du groupe traité (sur 8 rats, environ 3 coupes par rats) et 43 images du groupe contrôle (sur 7 rats, environ 3 coupes par rats), avec l'outil « analyse particules » (logiciel ImageJ WCIF) sur le marquage des cellules endothéliales (facteur VIII), après binarisation des images. Les surfaces individuelles des vaisseaux ont également été mesurées en μm^2 (1 pixel = 193 x 193 nm). Toutes les photographies ont été prises de manière systématique, au « hasard », dans les mêmes régions d'intérêt pour chaque lame (cortex et striatum lésés et controlatéraux). Elles ne correspondent donc pas forcément aux zones de plus grande densité vasculaire observable.

V.2. Résultats

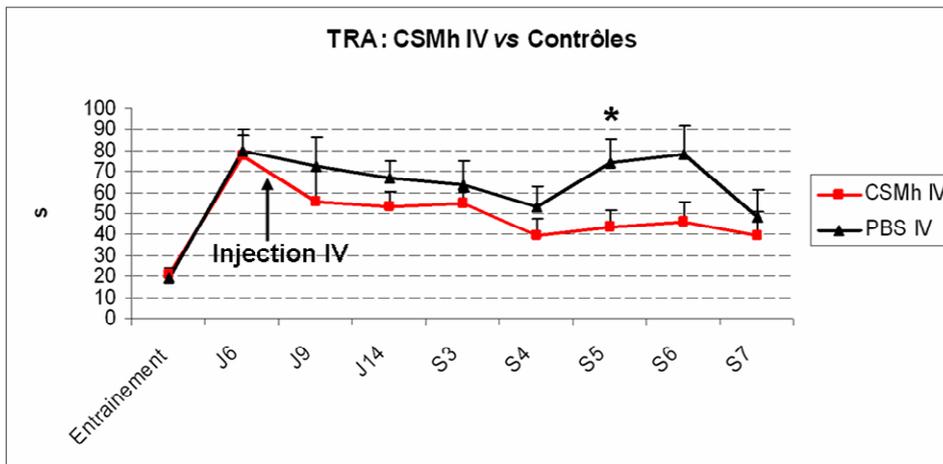
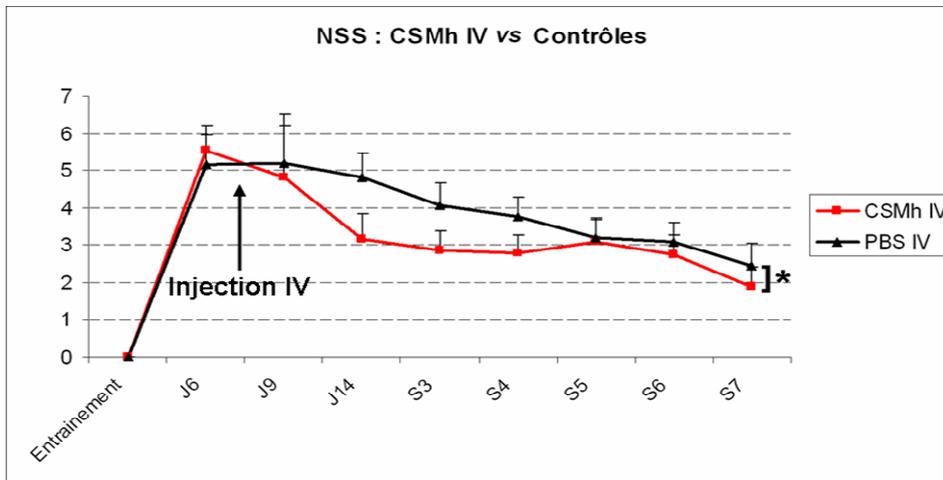
V.2.1. Effets fonctionnels de l'injection IV de CSMh

Tous les rats, durant les 90 minutes d'oACM, ont présenté un déficit neurologique gauche authentifiant la souffrance cérébrale en cours.

A l'injection IV et durant le suivi, aucun effet secondaire attribuable aux CSMh n'a été observé notamment aucun trouble respiratoire. Aucune réaction inflammatoire majeure et aucune tumeur (notamment au point d'injection) n'a été identifiée.

Durant les 7 semaines de suivi, la récupération sensori-motrice a été meilleure pour les rats traités par CSMh IV comparés aux rats contrôles (ANOVA pour mesures répétées ; NSS : $p=0,007$). Ce bénéfice sensori-moteur semblait plus marqué à distance de l'injection selon les résultats du TRA (groupes traité vs contrôle ; à 5 semaines : $43,8 \pm 27,4$ s vs $74,3 \pm 34,2$ s, $p = 0,031$ et à 6 semaines : $46,3 \pm 33,2$ s vs $77,9 \pm 42,1$ s, $p = \text{ns} (0,069)$) (**Figure 34**).

Figure 34. Effets sensori-moteurs de l'injection intraveineuse (IV) de CSMh effectuée 8 jours après une ischémie cérébrale. NSS (Neurological severity score, exprimé en score brut) et test de retrait d'adhésif (TRA, exprimé en s). Moyennes \pm erreurs standard moyennes. * : $p < 0,05$.

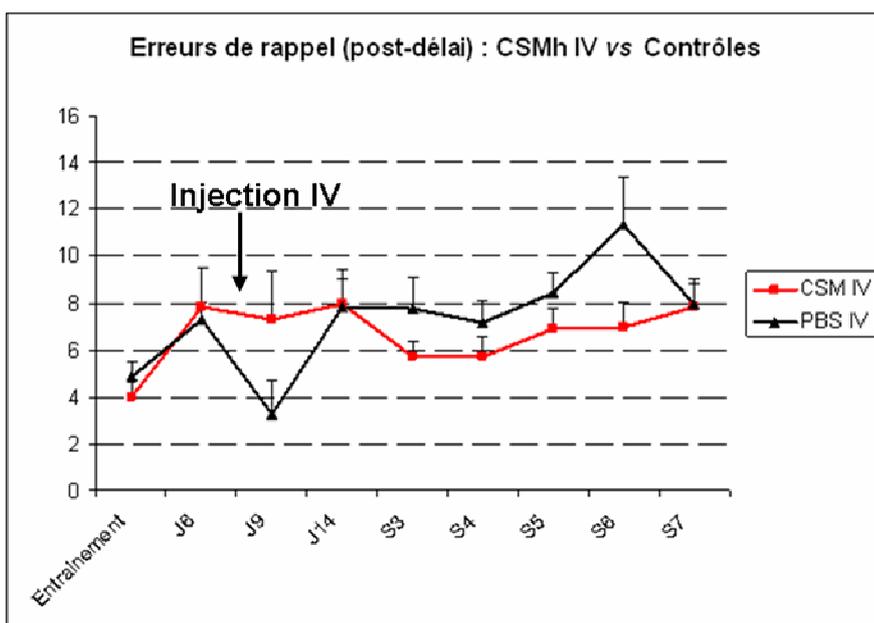
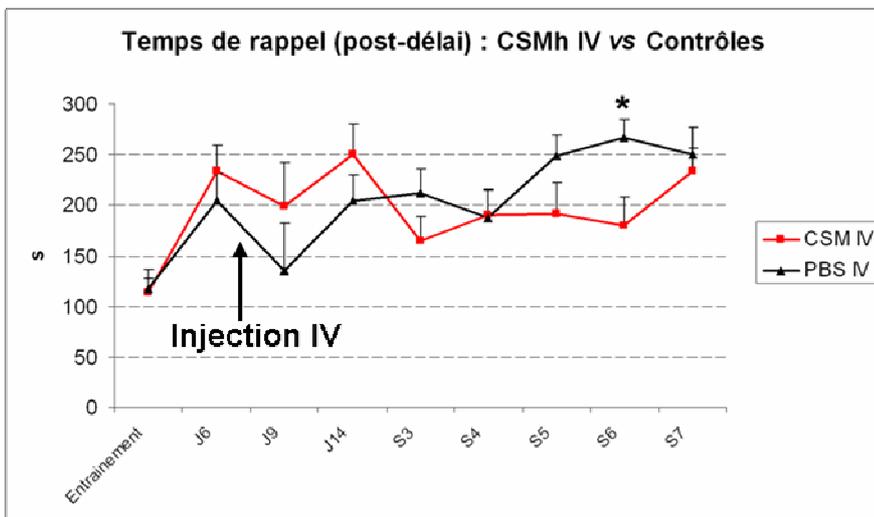
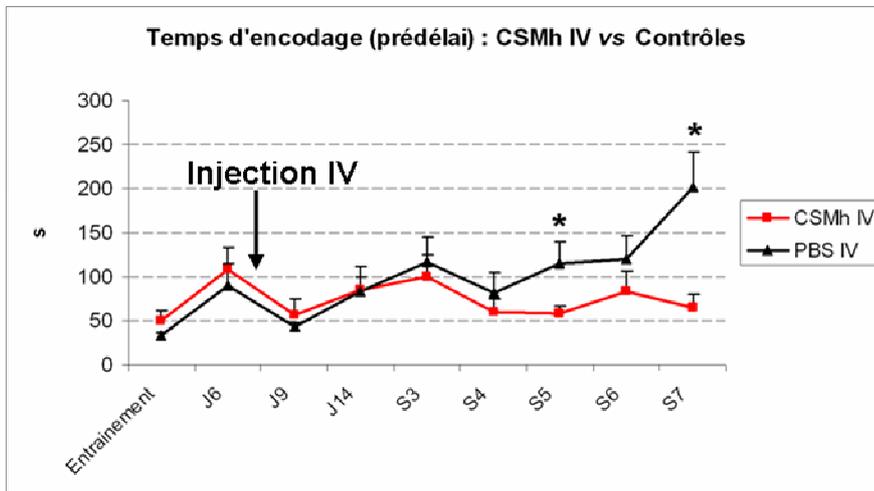


Concernant l'évaluation de la mémoire spatiale sur labyrinthe radial, la récupération a également été meilleure pour les rats traités par CSMh IV comparés aux rats contrôles. Comme l'effet noté sur les tests sensori-moteurs, le bénéfice « cognitif » était également plus marqué à distance du traitement, globalement après 3 semaines de suivi (**Figure 35**).

Lors de la session d'encodage (limitée à 5 minutes), le temps mis pour effectuer la tâche a été plus court pour le groupe traité avec une différence devenant significative à 5 et 7 semaines de suivi (groupes traité vs contrôle ; à 5 semaines : $58,9 \pm 8,5$ s vs $115,3 \pm 24,8$ s, $p = 0,044$ et à 7 semaines : $65,5 \pm 14,9$ s vs $202,1 \pm 39,9$ s, $p = 0,008$).

Lors de la session de rappel (limitée à 5 minutes), le temps mis pour effectuer la tâche a aussi été plus court pour le groupe traité à partir de 3 semaines de suivi avec une différence significative à 6 semaines (groupes traité vs contrôle ; $180,4 \pm 27,1$ s vs $266,9 \pm 17,9$ s, $p = 0,019$). A partir de 3 semaines de suivi et jusqu'à 7 semaines, le groupe traité a fait moins d'erreurs à cette épreuve de rappel que le groupe contrôle sans atteindre cependant une différence significative. Parmi ces erreurs, on a observé un nombre plus faible de persévérations (retours dans un bras ayant contenu un aliment mais déjà visité) pour le groupe traité avec une différence devenant significative à 5 semaines de suivi (groupes traité vs contrôle ; $0,6 \pm 0,2$ persévérations vs $2,0 \pm 0,4$ persévérations, $p = 0,009$).

Figure 35. Effets sur la mémoire spatiale de l'injection intraveineuse (IV) de CSMh effectuée 8 jours après une ischémie cérébrale. Ce test de mémoire spatiale en labyrinthe radial à 8 bras comporte une première session d'encodage (3 bras ouverts contenant un aliment et 5 bras vides fermés) puis, après 30 s, une session de rappel (tous les bras ouverts dont les 3 mêmes bras contenant un aliment). *Moyennes ± erreurs standard moyennes. * : $p < 0,05$.*

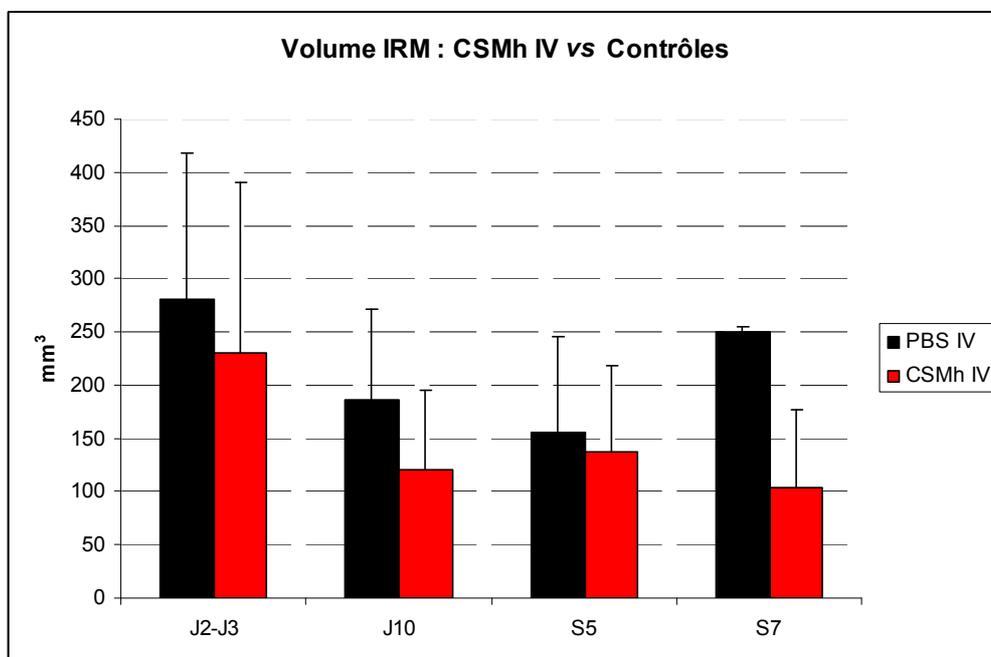


V.2.2. Suivi IRM et IRM cellulaire

* Suivi du volume lésionnel :

Contrairement à ce que nous avons observé après l'injection IC de CSMh marquées, nous n'avons pas observé de déformations anatomiques notables induites par le marquage M-SPIO. Les volumes lésionnels ont donc pu être mesurés au cours du suivi. Nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives entre les volumes d'infarctus des deux groupes (traité et contrôle) à J2, J10, 5 et 7 semaines après l'oACM (**Figure 36**). A 7 semaines, le volume lésionnel était de $250,6 \pm 4,5 \text{ mm}^3$ pour le groupe contrôle et de $103,1 \pm 73,2 \text{ mm}^3$, pour le groupe traité ($p = 0,074$).

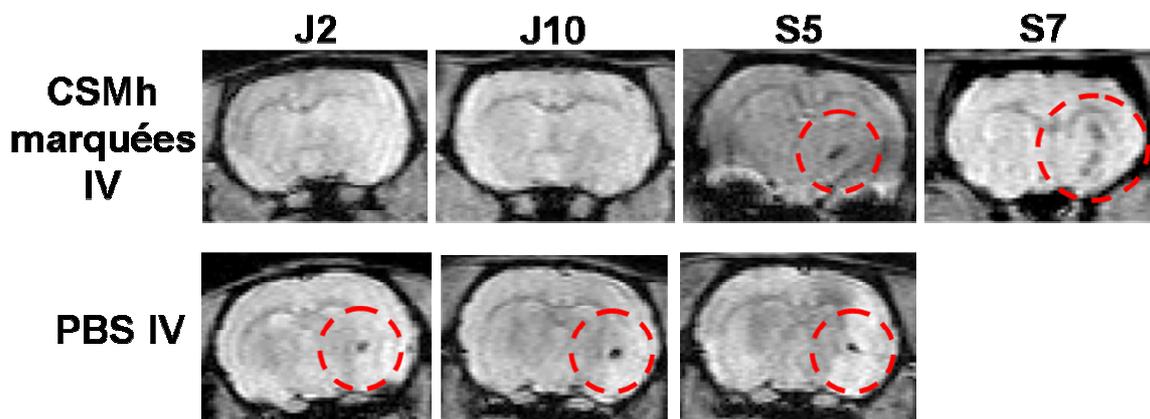
Figure 36. Suivi IRM des volumes d'infarctus (en mm^3) durant 7 semaines. Aucune différence significative n'a été observée entre le groupe contrôle et le groupe traité par injection intraveineuse de CSMh marquées. Mesures effectuées sur les images IRM T₂SE. J : jour ; S : semaine.



* IRM cellulaire *in vivo* :

Avec la séquence IRM EG-T₂*, nous avons observé de petits hyposignaux au sein de l'infarctus chez 3 rats du groupe traité (n=13). Nous n'avons jamais observé d'hyposignal sur les images de la première IRM, à J2 (soit avant l'injection de CSMh marquées). Des hyposignaux équivalents en forme et en taille ont été observés chez deux rats du groupe contrôle (n=12) et ce dès la première IRM. Ces hyposignaux en EG-T₂* peuvent donc correspondre soit à la présence du marquage cellulaire par M-SPIO soit à des microsaignements qu'il n'est pas possible de différencier par cette méthode IRM (**Figure 37**).

Figure 37. IRM cellulaire *in vivo* en EG-T₂* après injection intraveineuse (IV). Des hyposignaux sont visibles chez des rats du groupe traité par CSMh marquées par M-SPIO et chez des rats du groupe contrôle (injection IV de PBS-gln). Ces images peuvent donc correspondre soit à la présence du marquage cellulaire par M-SPIO soit à des microsaignements qu'il n'est pas possible de différencier par cette méthode IRM. Chaque ligne correspond au suivi d'un même rat de chaque groupe.



V.2.3. Histologie

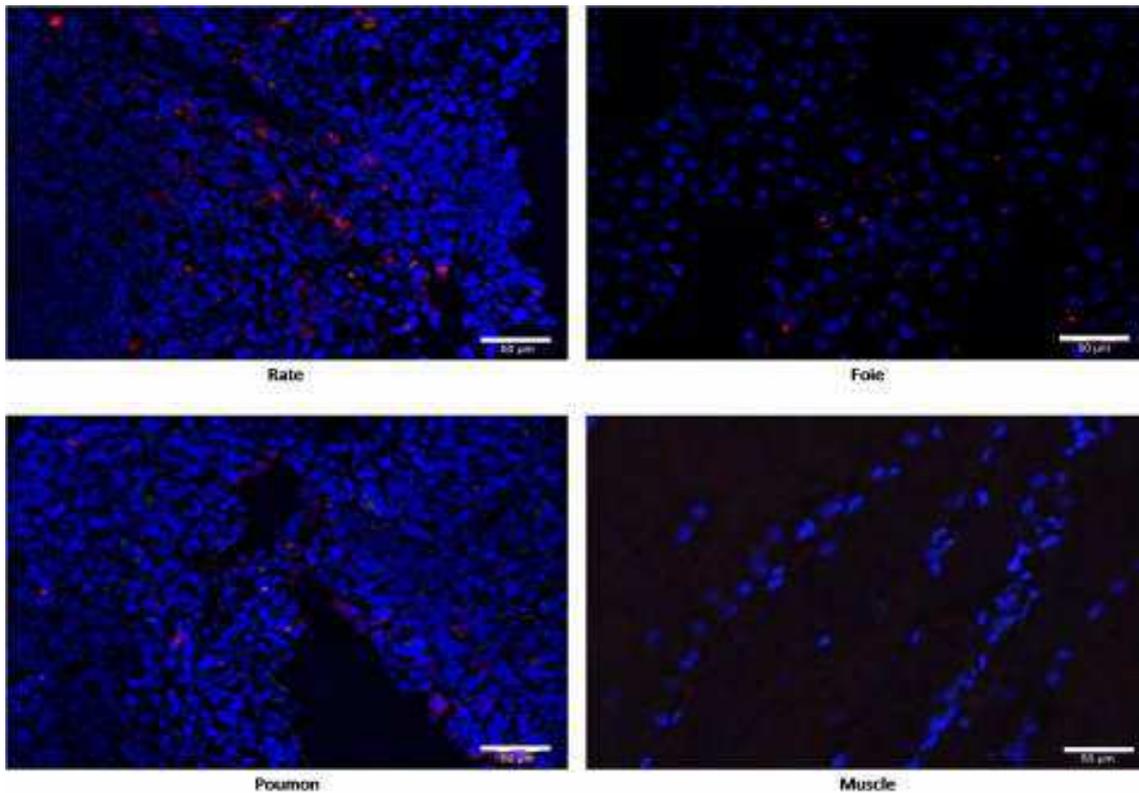
* Histologie du foie, de la rate, des poumons et des muscles :

A l'issue des 7 semaines de suivi, le marquage HuNu a permis d'observer la présence de cellules humaines au sein du foie, de la rate et des poumons chez les rats traités par CSMh IV. Aucune cellule humaine n'a été observée dans les muscles striés examinés (n = 15 lames) (**Figure 38**). Aucune cellule HuNu-positive n'a été trouvée dans les organes des rats contrôles.

Les particules M-SPIO (IFP, fluorescence verte) ont été recherchées systématiquement. Aucune particule n'a été observée sur l'ensemble de ces organes dans les deux groupes, suggérant le relargage des M-SPIO par les CSMh (ou une lyse de ces CSMh) avec l'élimination des particules libres.

Aucune formation tumorale n'a été observée dans ces différents organes.

Figure 38. Répartition des cellules humaines HuNu-positives dans la rate, le foie, le poumon et le muscle, 7 semaines après l'injection intraveineuse de CSMh. Marquage des noyaux humains par anticorps anti-HuNu (rouge) avec une coloration de l'ensemble des noyaux par le milieu de Hoechst (bleu). *Echelle = 50 μ m.*



*** Répartition des cellules humaines dans le cerveau :**

A l'issue des 7 semaines de suivi, le marquage HuNu a permis d'observer la présence de cellules humaines au sein du cerveau chez tous les rats traités par CSMh IV. D'un point de vue qualitatif, des cellules humaines ont été retrouvées groupées dans des zones limitées du cerveau, avec une prédominance striatale, témoignant d'une répartition hétérogène au sein de chaque hémisphère.

D'un point de vue quantitatif, aucune différence entre les 4 régions d'intérêt (striatum et zone sous-corticale des deux hémisphères) n'a été observée pour le groupe traité. En analysant les zones où le maximum de marquage était visible dans chacune des régions, aucune différence n'a été mise en évidence entre l'hémisphère lésé (striatum = $3,9 \pm 3,8\%$ de cellules HuNu-positives / nombre total de cellules ; cortex = $3,5 \pm 4,0\%$) et l'hémisphère sain controlatéral (striatum = $4,8 \pm 4,4\%$; cortex = $2,5 \pm 3,6\%$) (**Figure 39**).

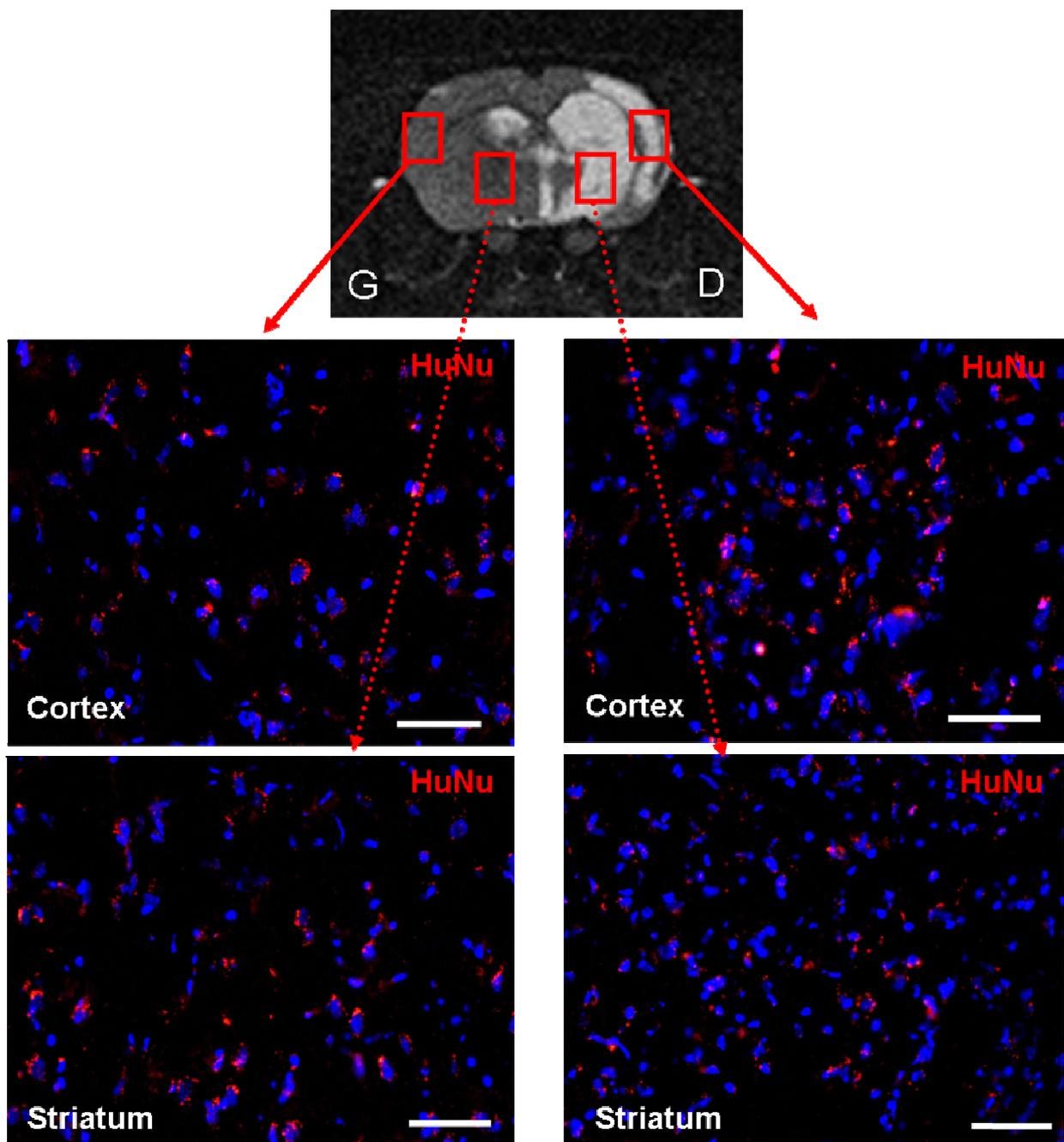
Les particules M-SPIO (IFP, fluorescence verte), recherchées systématiquement, n'ont été observées qu'en très faible quantité chez un seul rat (sur 13 rats traités). Pour les 3 rats traités chez lesquels avaient été observés de petits hyposignaux en IRM EG-T₂*, aucune M-SPIO n'a

été observée en histologie. Comme dans les autres organes, ce résultat suggère le relargage des M-SPIO par les CSMh et leur élimination du cerveau.

Aucune cellule HuNu-positive n'a été trouvée dans les cerveaux des rats contrôles.

Aucune formation tumorale n'a été observée dans les les deux groupes.

Figure 39. Répartition des cellules humaines HuNu-positives dans le cerveau, 7 semaines après l'injection intraveineuse de CSMh (effectuée 8 jours après une ischémie cérébrale droite). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux hémisphères. Marquage des noyaux humains par anticorps anti-HuNu (rouge) avec une coloration de l'ensemble des noyaux par le milieu de Hoechst (bleu). *D : droite ; G : gauche. Echelle = 50 µm.*



*** Différenciation des CSMh dans le cerveau :**

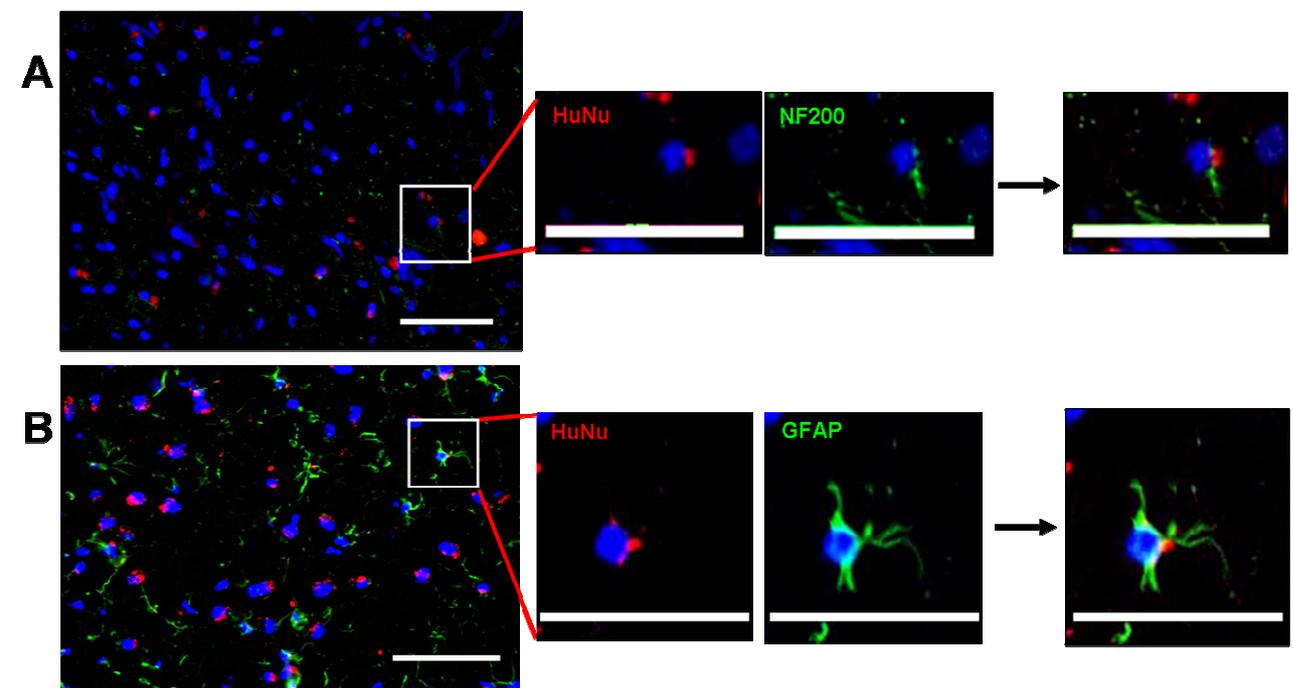
L'absence de particules M-SPIO observables a permis l'utilisation de double marquage : HuNu / GFAP et HuNu / NF200 pour identifier d'éventuelles différenciations des CSMh en cellules spécifiques (astrocytes et neurones).

A l'issue des 7 semaines de suivi, nous avons observé une colocalisation cellulaire du marquage GFAP avec le marquage HuNu et la coloration de Hoechst suggérant la différenciation possible des CSMh en astrocytes viables. De la même manière, la colocalisation cellulaire du marquage NF200 avec le marquage HuNu suggère la différenciation possible des CSMh marquées en neurones (**Figure 40**). Nous avons observé ce phénomène de différenciation sur tous les prélèvements du groupe traité. Cependant, comme nous l'avons noté après l'injection IC de CSMh, le taux de différenciation a semblé très faible (< 1%).

Figure 40. Différenciation des CSMh injectées par voie intraveineuse 8 jours après une lésion ischémique. Photographies prises au sein de l'infarctus après 7 semaines de suivi.

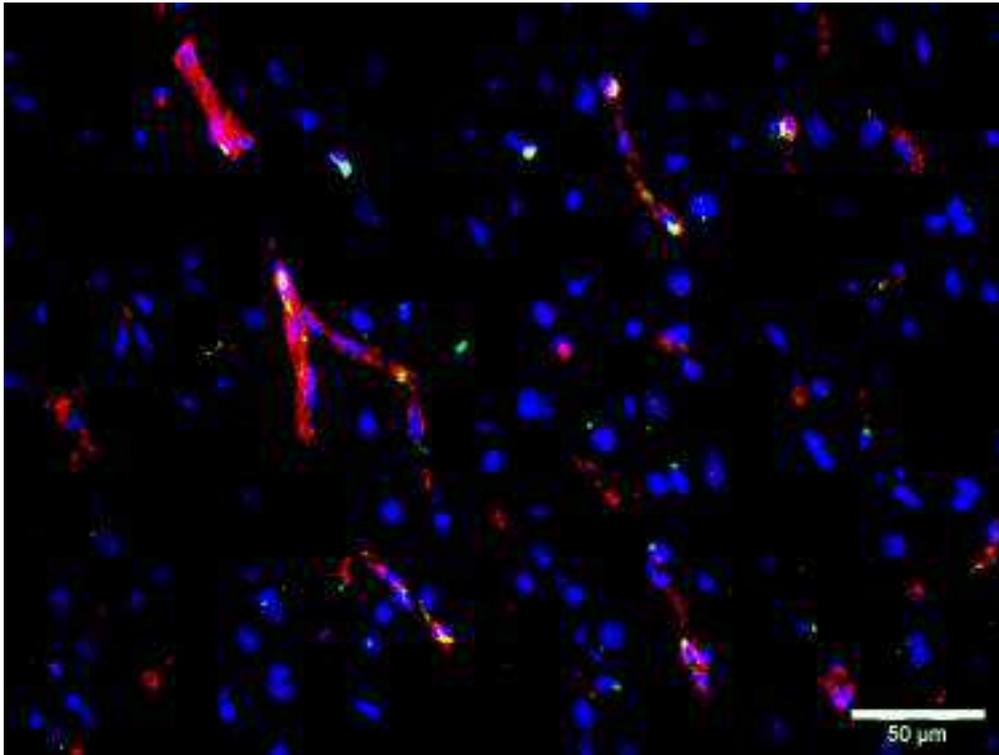
- A. Colocalisation cellulaire du marquage des noyaux humains (HuNu) (rouge) avec le marquage des neurofilaments (NF200) (vert) et la coloration de Hoechst (bleu) suggérant la différenciation des CSMh marquées en neurones.
- B. Colocalisation cellulaire du marquage HuNu (rouge) avec le marquage GFAP des astrocytes (vert) et la coloration de Hoechst (bleu) suggérant la différenciation des CSMh marquées en astrocytes.

Echelle = 50 μ m



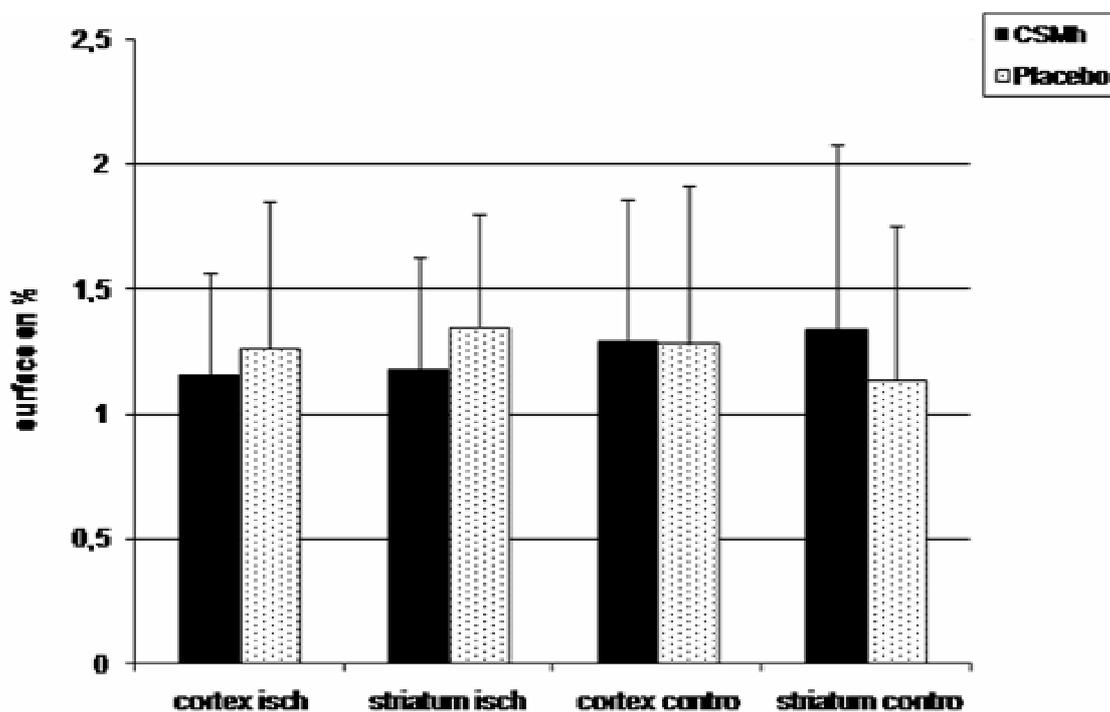
Le marquage du facteur VIII couplé au marquage HuNu a permis d'observer de rares colocalisations témoignant d'une différenciation des CSMh en cellules endothéliales. Nous n'avons pas montré de distribution préférentielle des cellules HuNu-positives à proximité des vaisseaux observés (**Figure 41**).

Figure 41. Distribution des cellules humaines HuNu-positives (en vert) par rapport aux vaisseaux (marqués par le facteur VIII, en rouge) dans le striatum lésé d'un rat traité par CSMh intraveineuses après une ischémie cérébrale. Echelle = 50 μ m.



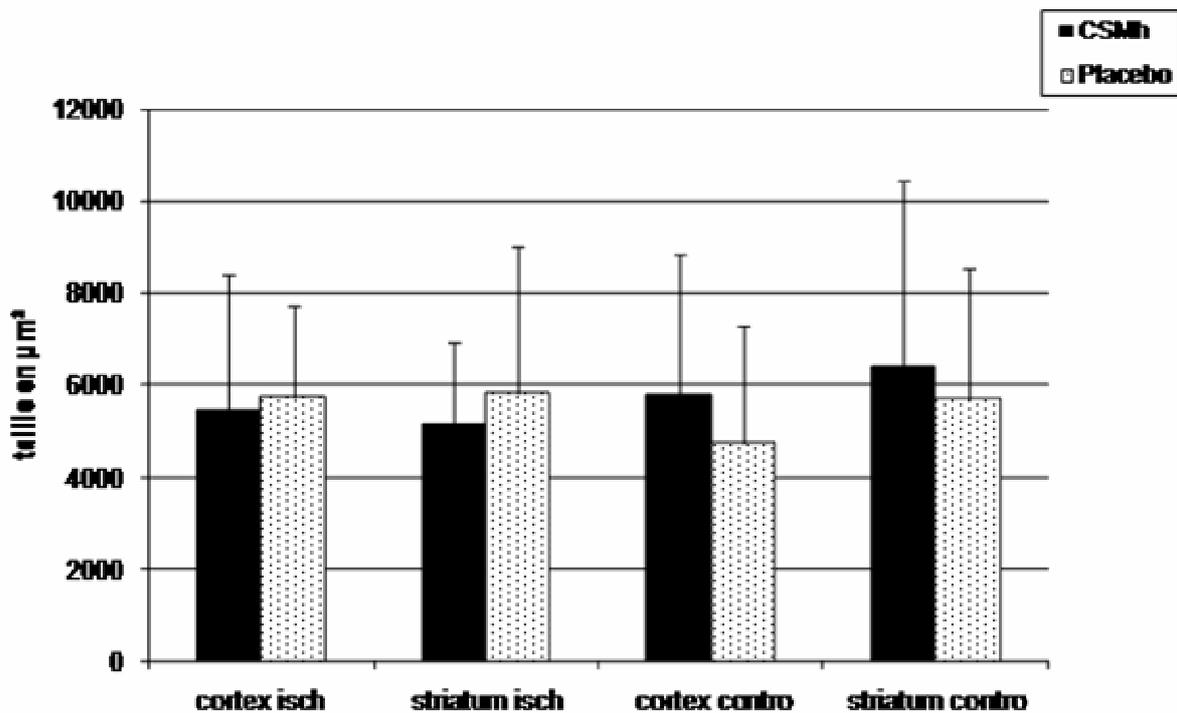
Les surfaces vasculaires dans les cerveaux des deux groupes représentaient globalement 1 à 1,5% des surfaces totales examinées (pour le groupe traité : striatum lésé = $1,2 \pm 0,4\%$, cortex lésé = $1,2 \pm 0,4\%$, striatum sain = $1,3 \pm 0,7\%$, cortex sain $1,3 \pm 0,6\%$; pour le groupe contrôle : striatum lésé = $1,4 \pm 0,5\%$, cortex lésé = $1,3 \pm 0,6\%$, striatum sain = $1,1 \pm 0,6\%$, cortex sain = $1,3 \pm 0,6\%$). Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les groupes, entre l'hémisphère sain et l'hémisphère lésé, ou entre les régions d'intérêt striatale et corticale (**Figure 42**).

Figure 42. Surfaces vasculaires estimées par le marquage du facteur VIII (% des surfaces examinées en microscopie). Comparaison de 4 régions d'intérêt (7 semaines après une ischémie) du groupe traité par injection intraveineuse de CSMh (barres noires) et du groupe contrôle (placebo, barres en pointillés). *Isch* : ischémie (hémisphère droit) ; *contro* : controlatéral (hémisphère gauche) ; moyennes \pm écarts-types.



La surface individuelle de chaque vaisseau a été analysée. Cette surface individuelle moyenne était globalement de 5 à 7 mm² (pour le groupe traité : striatum lésé = $5,2 \pm 1,8$ mm², cortex lésé = $5,4 \pm 3,0$ mm², striatum sain = $6,4 \pm 4,0$ mm², cortex sain $5,8 \pm 3,0$ mm² ; pour le groupe contrôle : striatum lésé = $5,8 \pm 3,2$ mm², cortex lésé = $5,7 \pm 2,0$ mm², striatum sain = $5,7 \pm 2,8$ mm², cortex sain = $4,7 \pm 2,5$ mm²). Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les groupes, entre l'hémisphère sain et l'hémisphère lésé, ou entre les régions d'intérêt striatale et corticale (**Figure 43**).

Figure 43. Surfaces individuelles des vaisseaux estimées par le marquage du facteur VIII. Comparaison de 4 régions d'intérêt (7 semaines après une ischémie) du groupe traité par injection intraveineuse de CSMh (barres noires) et du groupe contrôle (placebo, barres en pointillés). *Isch* : ischémie (hémisphère droit) ; *contro* : controlatéral (hémisphère gauche) ; moyennes \pm écarts-types.



V.3. Discussion

Nous avons montré lors de cette étude que l'injection IV de CSMh, une semaine après un infarctus cérébral chez le rat, est bien tolérée et apporte un bénéfice fonctionnel tant sensori-moteur que cognitif de manière prolongée. Nous n'avons pas observé d'effet du traitement sur le volume d'infarctus mesuré par IRM.

A l'issue des 7 semaines de suivi, en histologie, des cellules humaines viables dérivées des CSMh sont observables tant dans l'hémisphère lésé que dans l'hémisphère sain avec une répartition hétérogène à prédominance striatale. Il semble exister, pour une très petite partie de ces cellules, des différenciations possibles en neurones, en astrocytes, et en cellules endothéliales. Nous n'avons pas mis en évidence, en histologie, d'effet microvasculaire du traitement.

V.3.1. Bénéfice fonctionnel de l'injection IV de CSMh après une ischémie cérébrale

Nous avons observé un effet fonctionnel bénéfique de l'injection IV de CSMh de grade clinique effectuée une semaine après une ischémie cérébrale transitoire (phase subaiguë), sans aucun effet indésirable. Nous n'avons pas noté d'effet fonctionnel du marquage M-SPIO des CSMh puisque un bénéfice fonctionnel comparable a été obtenu avec l'injection IV de CSMh natives non marquées chez 5 rats (données non montrées).

Nos résultats complètent ceux de la littérature qui rapportent des effets bénéfiques d'injections IV, sur des suivis allant de plusieurs jours à un an. A notre connaissance, aucune n'a porté sur l'injection IV à la phase subaiguë, situation pourtant plus réaliste, comme nous l'avons vu en introduction, pour une application clinique autologue. Seules des injections précoces à la phase aiguë de l'ischémie ont été effectuées. Ainsi, Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2004) ont montré qu'un bénéfice sur un mois pouvait être obtenu par l'injection IV de 3.10^6 CSMh 24 heures après une ischémie permanente (phase aiguë). Une seule étude a montré le bénéfice de l'injection de CSM murines à la phase subaiguë soit 7 jours après une ischémie cérébrale (Chen *et al.*, 2001^b). D'autres chercheurs ont montré un bénéfice de l'administration IV de CSMh modifiées : CSMh immortalisées injectées 12 heures après l'ischémie (Honma *et al.*, 2006), CSMh surexprimant le GDNF (Horita *et al.*, 2006), CSMh surexprimant Ang-1 injectées 6 heures après l'ischémie (Onda *et al.*, 2008), ou CSMh surexprimant Ang-1 et VEGF injectées 6 heures après l'ischémie (Toyama *et al.*, 2009).

Nous n'avons pas observé d'effet significatif des CSMh sur le volume lésionnel en IRM. Conformément à ces résultats, aucune étude n'a montré de réduction du volume lésionnel après une injection de CSMh IV. Exceptée une étude sur l'injection IV de CSM murines effectuée le lendemain de l'ischémie (Wu *et al.*, 2008), seules les injections IV de CSMh modifiées (immortalisées (Honma *et al.*, 2006) ou surexprimant le GDNF (Horita *et al.*, 2006)) semblent entraîner une réduction significative du volume de l'infarctus.

Concernant les tests comportementaux utilisés, le TRA est plus sensible et plus reproductible que le NSS. A ces tests sensori-moteurs, l'ajout de tests comportementaux plus élaborés et plus sensibles comme le test de mémoire spatiale sur labyrinthe radial semble tout à fait adapté à un suivi au long cours (Buccafusco, 2000). Aucune étude de thérapie cellulaire n'a été effectuée en utilisant ce labyrinthe radial. Par contre, le labyrinthe aquatique (piscine de Morris) a été utilisé avec succès comme test de mémoire et d'apprentissage spatial dans des études concernant la thérapie cellulaire après une ischémie cérébrale (Modo *et al.*, 2002 ; Mimura *et al.*, 2005 ; Honma *et al.*, 2006 ; Pavlichenko *et al.*, 2008 ; Liao *et al.*, 2009). Modo

et al. (Modo *et al.*, 2002) ont révélé un effet différentiel entre la greffe intraventriculaire de cellules souches neurales uniquement efficace sur la récupération de la mémoire spatiale et la greffe intracérébrale uniquement efficace sur la récupération sensori-motrice. Ces résultats soulignent l'intérêt d'utiliser des tests multiples pouvant identifier des processus différents de récupération sensorimotrice et de récupération cognitive. Concernant l'injection IV de CSM, deux études ont montré un bénéfice cognitif (par labyrinthe aquatique) sur plusieurs semaines après une injection de CSMh immortalisées (Honma *et al.*, 2006) ou après une injection de CSM murines effectuée un et 3 jours après l'ischémie (Pavlichenko *et al.*, 2008). A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'effet « cognitif » de l'administration de CSMh non modifiées de grade clinique utilisées dans notre essai.

Malgré un intérêt évident pour affiner le suivi comportemental lorsque les tests sensori-moteurs n'évoluent plus en raison d'une moindre sensibilité (effet « plancher »), ces tests cognitifs élaborés nécessitent une mise en place et un entraînement des animaux longs et contraignants. De plus, les résultats obtenus montrent une variabilité individuelle importante selon la motivation du rat, son état général, l'environnement de test... Notre test basé sur la récompense (nourriture sucrée en cas de succès avec jeûn préalable des rats, stimulus positif) ne nous semble pas assez incitateur. Ainsi, une optimisation de notre labyrinthe radial est en cours avec la mise en place, dans les bras « incorrects », de plaques électriques dissuasives (non douloureuses) activées en cas d'échec (stimulus aversif).

Au-delà des études expérimentales, ces résultats soulignent aussi l'importance d'une évaluation complète des fonctions cognitives lors d'essais cliniques thérapeutiques après un AVC pour ne pas mesestimer un effet potentiel (Leskela *et al.*, 1999 ; Jaillard *et al.*, 2009).

V.3.2. Limites de l'IRM cellulaire après injection IV de CSMh marquées

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent concernant l'injection IC de CSMh marquées, l'IRM cellulaire peut être utile pour détecter les cellules greffées et étudier leurs capacités de migration au sein d'un infarctus cérébral. La sensibilité des séquences EG-T₂* permet la détection d'une faible quantité de cellules marquées (Shapiro *et al.*, 2004) et les M-SPIO, comparées aux nanoparticules SPIO, réduisent d'avantage le T₂* et augmentent ainsi les effets de susceptibilité magnétique sur les images (Hinds *et al.*, 2003).

Malgré cela, nous n'avons pas observé ici, de manière formelle, des hyposignaux en IRM correspondant à la présence de M-SPIO contrairement à ce qui est affirmé par d'autres après l'injection IV de cellules souches neurales marquées (Song *et al.*, 2009). En effet, même chez

les 3 rats traités par injection IV de CSMh marquées et présentant un hyposignal en IRM EG-T₂* jusqu'à 7 semaines de suivi, il n'a pas été retrouvé de particules à l'étude histologique alors que des cellules humaines ont pu être identifiées. Cela pourrait s'expliquer par le relargage des particules par les CSMh (ou par la lyse de ces CSMh) puis l'élimination quasi-complète des particules. Ainsi, la très faible quantité restante, voire l'absence, de particules ne permettrait pas une détection fiable par IRM et/ou microscopie à long terme.

De plus, des hyposignaux identiques ont été observés chez des rats du groupe contrôle (non traité). Chez ces rats contrôles, les hyposignaux ont été visualisés dès la première IRM (deux jours après l'ischémie) ce qui n'a pas été le cas chez les rats traités chez qui les hyposignaux sont apparus uniquement après l'injection de CSMh marquées. Cela pourrait suggérer que dans le groupe traité les hyposignaux observés correspondent à des particules M-SPIO et dans le groupe contrôle à des microsaignements précoces après l'ischémie. Cependant cela ne peut être prouvé puisque l'étude histologique n'a pas permis de confirmer ces données.

Les données d'IRM cellulaire *in vivo*, nous paraissent insuffisantes pour détecter la présence de CSMh marquées après une injection systémique, les transformations hémorragiques après une ischémie pouvant induire un hyposignal EG-T₂* identique à celui induit par les M-SPIO (Valable *et al.*, 2007). Comme nous l'avons noté après l'injection IC de CSMh, les données histologiques sont essentielles après un suivi par IRM pour confirmer ou infirmer la présence des microparticules.

D'autres techniques de détection cellulaire plus sensibles et applicables *in vivo* pourraient avoir un intérêt dans le suivi de cellules greffées telles que la microscopie confocale *in vivo* (Tran-Dinh *et al.*, 2006) ou encore l'imagerie nucléaire (Detante *et al.*, 2009) (voir chapitre suivant : VI. Biodistribution de CSMh injectées par voie IV après ischémie cérébrale).

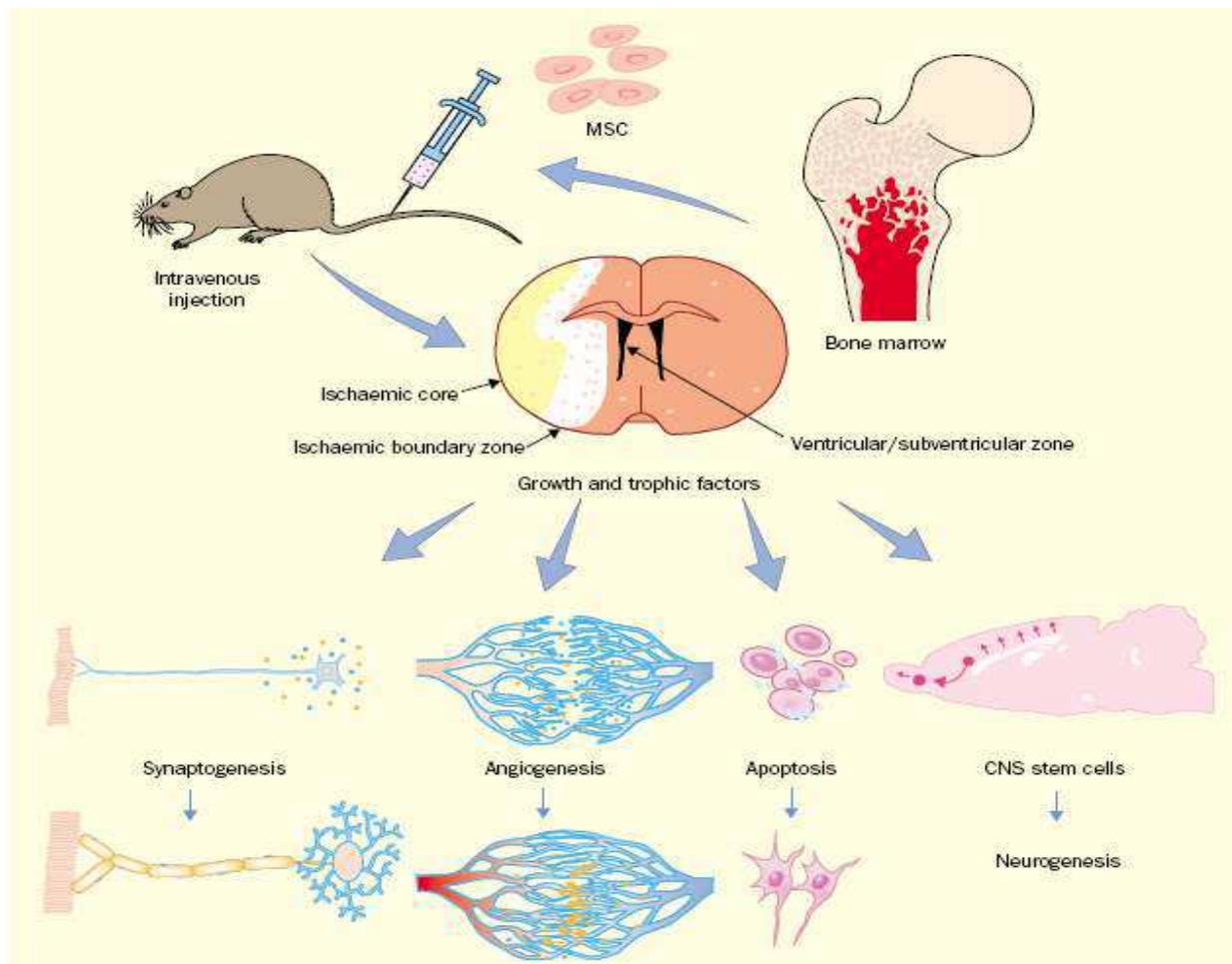
V.3.3. Mécanismes d'action des CSMh administrées après une ischémie cérébrale

Sur l'ensemble des tests utilisés ici, le bénéfice fonctionnel de l'injection IV de CSMh n'est pas immédiat mais apparaît environ un mois après. Ce délai d'action pourrait correspondre, non pas à un effet neuroprotecteur immédiat sur l'œdème cellulaire et/ou la nécrose, mais à des effets cellulaires plus « lents » tels que la neurogenèse induite et/ou la migration de neuroblastes : phénomènes cellulaires survenant plusieurs semaines après un infarctus cérébral (Thored *et al.*, 2006 ; Thored *et al.*, 2009).

Malgré la différenciation possible des CSMh survivantes en différentes cellules d'intérêt (neurones, cellules gliales et cellules endothéliales), déjà rapportée (Chen *et al.*, 2003^a), il

semble que ce seul phénomène de « remplacement » cellulaire direct soit insuffisant pour expliquer le bénéfice fonctionnel significatif de l'injection IV de CSMh. Et ce d'autant plus que l'intégration fonctionnelle des neurones néoformés reste sujet de controverse. Il paraît de plus en plus probable que la sécrétion paracrine de facteurs de croissance ainsi que l'immunomodulation jouent un rôle important dans l'effet bénéfique observé (**Figure 44**) (Chopp & Li, 2002 ; Chopp *et al.*, 2009).

Figure 44. Schéma illustrant les différents mécanismes d'action des CSM injectées par voie intraveineuse après une ischémie cérébrale. On retrouve le rôle prépondérant de la sécrétion de facteurs neurotrophiques ou proangiogéniques ainsi que de la stimulation de la neurogenèse endogène (Chopp & Li, 2002).



*** Stimulation de la neurogenèse et de la synaptogenèse endogènes :**

Dans le cerveau humain en l'absence de lésion, des cellules de moelle osseuse injectées par voie systémique peuvent entrer et générer des neurones (Mezey *et al.*, 2003). Mezey *et al.* ont observé des échantillons post-mortem de cerveau de 4 femmes atteintes de leucémie ou de déficience immunitaire génétique et traitées par une greffe de moelle osseuse d'un donneur

masculin. Un à 9 mois après la greffe, dans tous les cerveaux, ils ont pu identifier des cellules contenant un chromosome Y. La plupart de ces cellules étaient des cellules endothéliales ou gliales mais des neurones « Y-positifs » ont pu être identifiés notamment dans l'hippocampe et le cortex répartis de manière hétérogène sous forme d'amas. Dans le cerveau de la plus jeune patiente (âgée de deux ans), 7 neurones sur 10 000 étaient issus du donneur.

Après une ischémie cérébrale, nous avons montré ici qu'il existait un bénéfice de l'injection IV de CSMh par la différenciation possible de ces CSMh en neurones. Ces résultats confirment les données de la littérature. Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2003^a) ont montré que des CSM, issues de la moelle osseuse de rat et transplantées chez des rats au sein de la lésion, peuvent survivre, se différencier en neurones et améliorer ainsi la récupération fonctionnelle. Ces auteurs ont également reproduit cet effet bénéfique après une administration IV de CSM avec une différenciation de celles-ci en cellules neurales (Chen *et al.*, 2001^b). Cette différenciation directe des CSM en neurones, bien que possible, reste limitée en quantité et semble insuffisante pour expliquer seule le bénéfice fonctionnel observé.

Comme nous l'avons décrit en introduction, il a été observé que la lésion ischémique pouvait stimuler la neurogenèse par l'intermédiaire des précurseurs neuraux endogènes (Lindvall *et al.*, 2004 ; Macas *et al.*, 2006 ; Ohab *et al.*, 2006). Chez l'homme, une telle neurogenèse induite par l'ischémie peut persister plusieurs mois (Thored *et al.*, 2006). Cette neurogenèse endogène induite par l'ischémie pourrait être amplifiée par la présence de CSM au sein du cerveau. La présence de cellules neurales et de cellules gliales a été observée dans les régions périventriculaires après injection de CSM, suggérant que les CSM, même en faible quantité, peuvent stimuler les cellules souches neurales endogènes et induire ainsi une neurogenèse efficace responsable de la récupération fonctionnelle (Chen *et al.*, 2003^b ; Shen *et al.*, 2007^b). Cet effet bénéfique sur la neurogenèse endogène viendrait ainsi s'ajouter à la différenciation directe des CSM en neurones.

La synaptogenèse induite par les CSM est un élément complémentaire de la restauration cellulaire, le bourgeonnement dendritique et la formation de nouvelles synapses favorisant le remodelage glial et axonal qui sous-tend les phénomènes de plasticité cérébrale (Liu *et al.*, 2007). La synaptogenèse pourrait avoir un effet bénéfique non seulement sur le tissu lésé mais aussi sur l'ensemble de l'encéphale en favorisant la plasticité du tissu sain.

Cet effet de l'injection IV de CSM sur la neurogenèse et la synaptogenèse endogènes pourrait reposer sur la production paracrine de facteurs trophiques. Plusieurs études ont montré que les CSM favorisent la production de facteurs neurotrophiques et/ou proangiogéniques : BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor), VEGF... (Chen *et al.*, 2002^b). L'amélioration de la récupération observée après ischémie cérébrale traitée par injection IV

de CSM semble corrélée à l'augmentation des facteurs neuro-trophiques BDNF et NGF au sein de la lésion avec une réduction de l'apoptose et une prolifération cellulaire dans la zone sous-ventriculaire (Li *et al.*, 2002). Cela a été confirmé par l'injection de CSMh surexprimant le BDNF qui semble conférer un effet bénéfique supérieur (Kurozumi *et al.*, 2004 ; Kurozumi *et al.*, 2005).

*** Immunomodulation et réduction de l'apoptose :**

Les CSMh pourraient avoir un rôle favorable additionnel par le biais de leur activité immunomodulatrice sur l'inflammation post-ischémique. Les CSM ont des propriétés immunomodulatrices *in vitro* : inhibition de la prolifération, de la différenciation et du chimiotactisme des lymphocytes B, et inhibition de la prolifération des lymphocytes T (Aggarwal & Pittenger, 2005 ; Plumas *et al.*, 2005). *In vivo*, les CSM améliorent l'issue des transplantations allogéniques en favorisant la prise de la greffe. Elles ont un rôle favorable sur la composante inflammatoire des lésions tissulaires (Chamberlain *et al.*, 2007) notamment cérébrales après une encéphalomyélite expérimentale (Zappia *et al.*, 2005), en réduisant l'infiltration leucocytaire cérébrale et par inhibition de l'activation lymphocytaire T au niveau des organes lymphoïdes. Cet effet sur la régulation immunitaire est à l'origine de l'utilisation des CSM dans diverses pathologies inflammatoires chroniques telles que la réaction du greffon contre l'hôte (Le Blanc *et al.*, 2008) ou, en neurologie, la sclérose en plaques (Burt *et al.*, 2008).

Comme nous l'avons vu en introduction, la réaction inflammatoire après une ischémie cérébrale se traduit par une prolifération gliales et une attraction des leucocytes (Dirnagl *et al.*, 1999). Dans les premiers jours, les médiateurs de l'inflammation (IL-6...) et les molécules d'adhésion (ICAM et VCAM-1) impliqués dans les réactions inflammatoires cérébrales et la migration des CSM greffées (Brooke *et al.*, 2008) ont une influence délétère sur l'infarctus, alors que, dans les semaines suivantes, les cellules médiatrices de l'inflammation participent à la reconstruction du tissu. L'activation de la microglie (résidente ou issue de la moelle osseuse) avec notamment l'expression d'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) au sein de la zone sous-ventriculaire est corrélée à la prolifération et la migration des neuroblastes (maximale 6 semaines après l'ischémie). Cette accumulation de la microglie avec un phénotype « proneurogénique » aurait donc un effet bénéfique sur la continuité de la neurogenèse après une ischémie cérébrale (Thored *et al.*, 2009).

Des CSMh injectées, un jour après une ischémie cérébrale, au sein de l'hippocampe de souris diminuent la mort cellulaire hippocampique via la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la réaction inflammatoire post-ischémique et l'augmentation de l'expression

de gènes neuroprotecteurs tels que Ym1 et Igf-1 exprimés par la microglie et les macrophages activés (Ohtaki *et al.*, 2008). Cet effet bénéfique des CSM est retrouvé chez le rat après une ischémie cérébrale focale traitée, un jour après, par une injection IV de CSMh induisant une prolifération lymphocytaire sans induction de lymphocytes T cytotoxiques avec une limitation des phénomènes d'apoptose (Li *et al.*, 2002).

Dans le cadre de nos travaux sur l'effet thérapeutique des CSMh après une ischémie cérébrale, l'action de celles-ci sur l'inflammation est l'objet d'essais en cours en 2010. L'utilisation de l'IRM *in vivo*, avec l'utilisation d'USPIO, pourrait avoir un intérêt dans la caractérisation de cette réaction inflammatoire et l'influence de la thérapie cellulaire sur celle-ci (Nighoghossian *et al.*, 2007).

*** Effets des CSM sur l'angiogenèse.**

Après une ischémie cérébrale, le remodelage microvasculaire joue un rôle prépondérant pour favoriser la neurogenèse endogène, la migration des neuroblastes (Thored *et al.*, 2007) et la formation de « niches » neurovasculaires propices à la récupération (Ohab *et al.*, 2006).

Nous n'avons pas montré ici d'effet de l'injection IV des CSMh sur la microvascularisation cérébrale. Cependant, notre étude histologique a été réalisée tardivement, 7 semaines après l'ischémie soit 6 semaines après le traitement. L'étude de cet effet des CSMh sur la microvascularisation a fait l'objet d'un essai spécifique montrant un effet plus précoce des CSMh (voir *chapitre VII. Effets microvasculaires de l'injection intracérébrale de CSMh après ischémie*).

Dans la littérature, il semble que les CSM aient un effet sur l'angiogenèse pouvant s'ajouter aux effets sur la neurogenèse et l'inflammation (Navaratna *et al.*, 2009). L'injection IV de CSMh augmente la production de VEGF, bénéfique sur le remodelage tissulaire (Wang *et al.*, 2005 ; Hermann & Zechariah, 2009), et du récepteur 2 au VEGF avec l'induction d'une angiogenèse dans la périphérie de l'infarctus corrélée à une réduction du volume de celui-ci (Chen *et al.*, 2002^b ; Chen *et al.*, 2003^a ; Liu *et al.*, 2006). De plus, l'administration intrastriatale ou IV de CSM de souris chez le rat après une ischémie cérébrale restaure le débit sanguin cérébral et la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Borlongan *et al.*, 2004^c). L'injection IV (précoce) de CSMh surexprimant Ang-1 semble plus efficace sur la néovascularisation et le débit sanguin en périphérie de l'infarctus que l'injection de CSMh « natives » (Onda *et al.*, 2008). Cet effet est encore majoré par l'injection IV (6h après l'ischémie) de CSM surexprimant Ang-1 et VEGF (Toyama *et al.*, 2009). Ces résultats soulignent l'importance de l'effet microvasculaire des CSM sur le bénéfice observé.

V.4. Conclusion

Nous avons observé une bonne tolérance et un effet bénéfique sur la récupération de l'injection IV de CSMh de grade clinique effectuée une semaine après une ischémie cérébrale focale. Ce bénéfice pourrait être lié, outre la différenciation directe des CSMh en neurones et cellules gliales, à des effets trophiques, microvasculaires et/ou immunomodulateurs favorisant une neurogenèse endogène prolongée. L'utilisation du marquage cellulaire des CSMh par M-SPIO pour le suivi *in vivo* des cellules par IRM est décevante. Ce marquage ne permet pas la détection fiable d'une faible quantité de particules ou de cellules marquées (notamment après une injection IV), et ces particules ne peuvent pas être différenciées des microsaignements. L'étude histologique reste donc essentielle pour identifier les cellules greffées survivantes et leur devenir. Pour préciser la biodistribution des CSMh après une injection systémique, tant dans le cerveau que dans le reste de l'organisme, nous avons poursuivi nos travaux avec une étude d'imagerie nucléaire.

VI. BIODISTRIBUTION DE CSMh INJECTÉES PAR VOIE IV APRES ISCHEMIE CEREBRALE

Dans les études expérimentales montrant un bénéfice de l'administration de CSMh après ischémie cérébrale, peu de données sont rapportées sur la quantité de CSMh localisées dans la lésion et sur la redistribution et/ou l'élimination des autres organes (Devine *et al.*, 2003). L'imagerie cellulaire des CSMh peut fournir de telles données. Comme nous l'avons précédemment décrit dans ce travail, les CSM ont déjà été marquées avec des particules paramagnétiques pour un suivi par IRM (Hinds *et al.*, 2003). Des organes tels que les reins, le foie (Hauger *et al.*, 2006 ; Itrich *et al.*, 2007), le cœur (Hill *et al.*, 2003 ; Kraitichman *et al.*, 2005), ou le cerveau (Jendelova *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2007) ont pu être étudiés *in vivo*. Cependant, comme nous venons de le décrire dans le chapitre précédent, l'IRM semble avoir une trop faible sensibilité pour la détection cellulaire après une injection IV, et l'IRM cellulaire « corps entier » n'est pas à l'heure actuelle applicable en routine expérimentale.

Le marquage radioactif des CSMh (Bindslev *et al.*, 2006) et l'imagerie nucléaire sont plus adaptés pour des études de biodistribution dans l'ensemble de l'organisme. En raison de sa courte demi-vie (6 heures) et de son énergie d'émission bien adaptée aux caméras gamma assurant une haute qualité d'image, le ^{99m}Tc (Technetium) semble plus intéressant que l' ^{111}In (Indium) pour le suivi à court terme des CSMh *in vivo* (Allan *et al.*, 1993 ; Becker *et al.*, 1988). Le ^{99m}Tc est un agent radioactif largement utilisé en pratique clinique pour la scintigraphie en médecine nucléaire. Le ^{99m}Tc -HexamethylPropylène Amine Oxime (^{99m}Tc -HMPAO) est un complexe lipophile qui est réduit en un complexe hydrophile par un mécanisme glutathion dépendant après son entrée dans la cellule (Neirinckx *et al.*, 1988). Il permet ainsi un marquage stable pour le suivi cellulaire *in vivo*. De nombreux types de cellules ont déjà été marqués par ^{99m}Tc -HMPAO pour étudier leur biodistribution sur des périodes allant jusqu'à 24 heures. Chez la souris, Allers *et al.* (Allers *et al.*, 2004) ont observé une activité pulmonaire, hépatique, et splénique 24 heures après une injection IV de CSMh marquées par ^{99m}Tc -HMPAO. Gao *et al.* (Gao *et al.*, 2001) ont confirmé ces résultats chez le rat sain après une injection IV de CSMh marquées par ^{111}In . Ils ont pu observer une activité

précoce dans les poumons qui se redistribuait dans le foie, les reins, la rate et les os longs, 48 heures après l'injection. Des études d'imagerie nucléaire ont également été réalisées dans des pathologies telles que les lésions traumatiques de la moelle épinière (De Haro *et al.*, 2005) ou l'infarctus du myocarde (Barbash *et al.*, 2003 ; Kraitichman *et al.*, 2005). Les CSM radiomarquées furent détectées principalement dans les poumons, le foie, les reins, le myocarde lésé, et la rate à la suite d'une injection IV. Un cas clinique a plus récemment été rapporté concernant l'injection de CMN de moelle osseuse radiomarquées par ^{99m}Tc (Correa *et al.*, 2007). Neuf jours après un infarctus cérébral, des CMN ont été injectées par voie IA. Vingt-quatre heures plus tard, les CMN marquées furent observées par imagerie nucléaire au sein de la lésion cérébrale, et aussi dans le foie et la rate.

A notre connaissance, aucune étude n'a été effectuée sur la biodistribution des CSMh injectées par voie IV après un AVC. Ces données sont pourtant nécessaires pour évaluer le risque de la thérapie cellulaire par voie systémique après un AVC et/ou son potentiel thérapeutique, en quantifiant la migration des CSMh vers la lésion cérébrale.

L'objectif de l'étude préclinique présentée ici a donc été d'évaluer la biodistribution dans l'ensemble du corps de CSMh radiomarquées par ^{99m}Tc -HMPAO après une injection IV à des rats sains et des rats ayant un infarctus cérébral.

VI.1. Matériel et méthodes

* Radiomarquage des CSMh :

Les CSMh sont isolées à partir de moelle osseuse selon la technique décrite en Méthodologie générale. Pour chaque rat, environ 7.10^6 CSMh ont été incubées durant 15 minutes dans 370 MBq de ^{99m}Tc -HMPAO préparé selon les instructions du fabricant (Ceretek[®], GE Healthcare). La préparation a été utilisée dans les 30 minutes suivant la reconstitution (Piera *et al.*, 1990). Les cellules ont été rincées à deux reprises et resuspendues dans 1 mL de PBS pour l'injection IV. Ces conditions de marquage ont été choisies suite à des essais préliminaires *in vitro*. La cytométrie de flux au 7-AAD a été utilisée pour vérifier la viabilité des CSMh, 24 et 48 heures après le radiomarquage. La capacité de prolifération des CSMh marquées a été évaluée en culture par la formation de colonies (CFU-F).

*** Modèle animal et groupes expérimentaux :**

Dix-huit rats Sprague-Dawley (Janvier, France) entre 250 g et 300 g ont été randomisés en deux groupes : 1) un groupe avec un infarctus cérébral focal droit induit par oACM (technique décrite en *II. Méthodologie générale*) (n=9) ; 2) un groupe contrôle sans lésion cérébrale (n=9). Tous les rats ont reçu une injection IV de CSMh radiomarquées.

Quatre rats supplémentaires ont été utilisés comme témoins avec injection IV de ^{99m}Tc-HMPAO seul (sans CSMh) après oACM et vérification de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique en IRM.

*** IRM cérébrale :**

Une IRM (aimant horizontal, 7 T Bruker Avance III) a été effectuée pour mesurer le volume de la lésion ischémique par une séquence T₂SE (TR/TE = 2500/60 ms, champ de vue = 30 mm, épaisseur de coupe = 1 mm, matrice = 128x128, 2 moyennages) chez 5 rats, de un à 3 jours après l'oACM. Pour évaluer la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, une semaine après oACM chez les 4 rats supplémentaires, des séquences T₂SE et T₁SE (même résolution spatiale) ont été effectuées avant et après l'injection IV de Gd-Dota (Guerbet, France) à la dose de 200 µmol/kg de Gd.

*** Injection IV de CSMh :**

Les CSMh radiomarquées (dans 1 mL de PBS) ont été injectées lentement dans la veine saphène. Une semaine après ischémie cérébrale, le groupe « oACM » a reçu ainsi $3,4 \pm 1,2 \cdot 10^6$ cellules (correspondant à une activité injectée de $78,8 \pm 35,1$ MBq). Le groupe contrôle a reçu $3,2 \pm 1,1 \times 10^6$ cellules ($76,4 \pm 24,7$ MBq). Cette dose de cellules injectées correspondait aux doses thérapeutiques habituelles pour les administrations IV (Chen et al., 2001 ; Li et al., 2002).

Pour évaluer la biodistribution du ^{99m}Tc-HMPAO seul, celui-ci a été injecté chez les 4 rats supplémentaires (activité injectée de $81,1 \pm 3,6$ MBq), une semaine après oACM.

*** Imagerie nucléaire « corps entier » :**

Immédiatement après l'injection IV des CSMh radiomarquées, les rats ont été installés dans un berceau placé verticalement devant une caméra gamma « petit animal » à deux têtes (imageur gamma, Biospace Lab, Paris, France). Les deux détecteurs furent positionnés de manière asymétrique afin que les images scintigraphiques des parties haute et basse du rat puissent être acquises simultanément. Le logiciel d'acquisition gamma (Biospace Lab) a été utilisé pour l'acquisition d'image. La fenêtre d'énergie pour le ^{99m}Tc fut de 122 à 170 keV, et

la correction de la décroissance fut automatiquement appliquée au comptage. L'acquisition d'image a débuté immédiatement après l'injection de CSMh-^{99m}Tc et a duré 120 minutes pour tous les rats (9 oACM et 9 contrôles) (imagerie initiale). Une autre acquisition de 120 minutes a été débutée 18 heures après l'injection pour 4 rats oACM et 4 rats contrôles (imagerie tardive). Les animaux furent réveillés entre ces deux sessions.

*** Biodistribution par comptage sur organes isolés :**

Immédiatement après la fin de l'imagerie initiale (soit 120 minutes après l'injection IV de CSMh-^{99m}Tc), 5 rats oACM et 5 rats contrôles furent euthanasiés au Pentobarbital intracardiaque sous anesthésie à l'Isoflurane. L'euthanasie des 4 rats oACM et 4 rats contrôles restants fut effectuée immédiatement après l'imagerie tardive (soit 20 heures après l'injection IV de CSMh-^{99m}Tc).

Après ces euthanasies, des échantillons d'organes furent prélevés, rincés dans du sérum physiologique et pesés : hémisphère cérébral gauche et droit, cœur, thyroïde, glande salivaire, estomac, foie, rate, rein, poumon, muscle squelettique (patte postérieure). Des échantillons de sang et d'urines furent également prélevés. L'activité CSMh-^{99m}Tc fut mesurée par compteur gamma (Cobra II, Packard Instruments) avec une fenêtre d'énergie de 120-160 keV. Tous les comptes furent corrigés du bruit de fond et de la décroissance (durant le temps de comptage).

*** Histologie :**

Des échantillons de poumon, rate, foie, et cerveau furent prélevés avant le comptage gamma dans les deux groupes. Ces échantillons furent stockés à -80° et coupés avec un cryostat en coupes de 20 µm. Comme décrit précédemment (voir *II. Méthodologie générale*), les CSMh furent identifiées par un anticorps anti-noyau humain (MAB1281 / HuNu ; 1/2000) avec une coloration par le milieu de Hoechst avant une observation au microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse E600, Japon).

*** Analyse des données :**

Analyse d'image : le logiciel Gamma-vision (Biospace Lab) a été utilisé pour une analyse en aveugle des images planaires. Les ROI furent dessinées sur le cerveau entier, le poumon, les reins droit et gauche. Aucune ROI n'a été utilisée sur le foie en raison de la superposition foie/poumon en image plinaire. L'activité mesurée dans les ROI a été exprimée en coups / min / mm² (cpm/mm²). Une décroissance de 18 heures fut appliquée pour la quantification des ROI obtenues lors des imageries tardives. Les activités mesurées dans les ROI des images

initiales et tardives ont été normalisées par rapport à la dose injectée exprimée en GBq et ont donc été exprimées en cpm/mm²/GBq.

Analyse de la biodistribution sur organes isolés : l'activité des organes, du sang et des urines a été exprimée en coups par minute (cpm), corrigée de la décroissance par rapport au temps d'injection, et normalisée par rapport au poids de l'échantillon concerné (g) et à la dose injectée exprimée en cpm. Pour plus de clarté, les résultats, initialement exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme d'échantillon (%DI/g), ont été finalement exprimés en 10⁻³ %DI/g.

*** Analyse statistique :**

Pour les comparaisons inter-groupes des moyennes, le t-test de Student pour échantillons non appariés a été utilisé après avoir vérifié l'homogénéité des variances (test de Levene). Pour les comparaisons intra-groupes (par exemple les comparaisons hémisphère droit vs gauche), le t-test de Student pour échantillon appariés a été utilisé. En cas d'inhomogénéité des variances d'échantillons indépendants, le test non-paramétrique de Mann-Whitney a été réalisé.

VI.2. Résultats

VI.2.1. Marquage et viabilité des CSMh radiomarquées

L'efficacité du marquage des CSM par le ^{99m}Tc-HMPAO (pourcentage d'activité du radiotraceur incorporé dans les cellules par rapport à l'activité totale du radiotraceur mélangé aux cellules) a été de 26,7 ± 11,6%. Des tests *in vitro* ont montré que plus de 96% de l'activité cellulaire initiale restait stable dans les CSMh durant 4 heures après le marquage.

Par cytométrie en flux au 7-AAD, nous avons pu observer que la viabilité des CSMh radiomarquées par ^{99m}Tc-HMPAO était de 97,9% et 96,1% respectivement à 24 et 48 heures après le marquage (vs ~98% de viabilité pour des CSMh non marquées). Les CSMh furent également cultivées pour évaluer leur capacité à former des colonies. Après 10 jours de culture cellulaire, aucune colonie n'a été observée pour les CSMh radiomarquées alors que 29% des CSMh non marquées étaient capables de former des colonies.

VI.2.2. Lésions cérébrales en IRM

Tous les rats ayant subi une oACM, reveillés durant l'occlusion artérielle (90 minutes), avaient un déficit sensori-moteur correspondant à l'ischémie cérébrale en cours. Aucun déficit n'a été noté chez les rats contrôles. Les lésions cérébrales (infarctus et œdème) ont été authentifiées par IRM, de un à 3 jours suivant l'oACM. Le volume moyen a été de $262,5 \pm 193,7 \text{ mm}^3$.

Les 4 rats supplémentaires ayant eu une IRM avec injection de Gadolinium une semaine après ischémie présentaient tous une augmentation marquée de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique.

VI.2.3. Imagerie nucléaire « corps entier »

Immédiatement après leur marquage, les CSMh ont été injectées. Chaque groupe a reçu le même nombre de CSMh ($3,4 \pm 1,2 \times 10^6$ cellules pour le groupe oACM ; $3,2 \pm 1,1 \times 10^6$ cellules pour le groupe contrôle) correspondant à la même radioactivité injectée (respectivement, $78,8 \pm 35,1 \text{ MBq}$ et $76,4 \pm 24,7 \text{ MBq}$).

Concernant l'activité globale mesurée sur le corps entier, nous avons observé que $29,5 \pm 7\%$ (groupes oACM) et $27,6 \pm 6,6\%$ (groupe contrôle) de l'activité mesurée à deux heures étaient toujours visualisés à 20 heures.

L'activité mesurée au sein du cerveau après ischémie semblait, de manière non significative, plus élevée que celle mesurée chez le groupe contrôle sans lésion (groupe oACM : $23,3 \pm 3,5 \text{ cpm/mm}^2/\text{GBq}$ à 2 heures et $8,7 \pm 1,8 \text{ cpm/mm}^2/\text{GBq}$ à 20 heures ; groupe contrôle : $20,3 \pm 3,5 \text{ cpm/mm}^2/\text{GBq}$ à 2 heures et $7,9 \pm 2,1 \text{ cpm/mm}^2/\text{GBq}$ à 20 heures) (**Figure 45, Tableau 5**).

Un « piégeage » pulmonaire précoce et important a été observé par l'activité pulmonaire élevée initialement chez tous les rats. Ce phénomène a été transitoire puisque cette activité a diminuée de manière très importante entre les sessions d'imagerie initiale et tardive (groupe oACM : de $2749,2 \pm 544,6$ à $231,3 \pm 39,6 \text{ cpm/mm}^2/\text{GBq}$; groupe contrôle : de $2209,9 \pm 487,2$ à $153,5 \pm 75,8 \text{ cpm/mm}^2/\text{GBq}$).

Enfin, la voie d'élimination des CSMh semble être principalement rénale. L'activité rénale est restée stable au cours du temps et aucune différence n'a été observée entre les deux groupes.

Figure 45. Imagerie nucléaire « corps entier ». Deux détecteurs sont placés verticalement de manière asymétrique. La première acquisition d'images (durée = 2h) a débuté immédiatement après l'injection IV de CSMh-^{99m}Tc (0-2 heures) (A et B). Une seconde acquisition a été effectuée le lendemain de 18 à 20 heures après l'injection (18-20 heures) (C et D). Des régions d'intérêt ont été dessinées sur le cerveau, un poumon, et les reins. Les images montrées ici proviennent des rats les plus représentatifs de chaque groupe à chaque temps. Les échelles d'activité sont différentes entre les images initiales (2h) et les images tardives (20h) en raison de la forte décroissance radioactive durant cette période expérimentale.

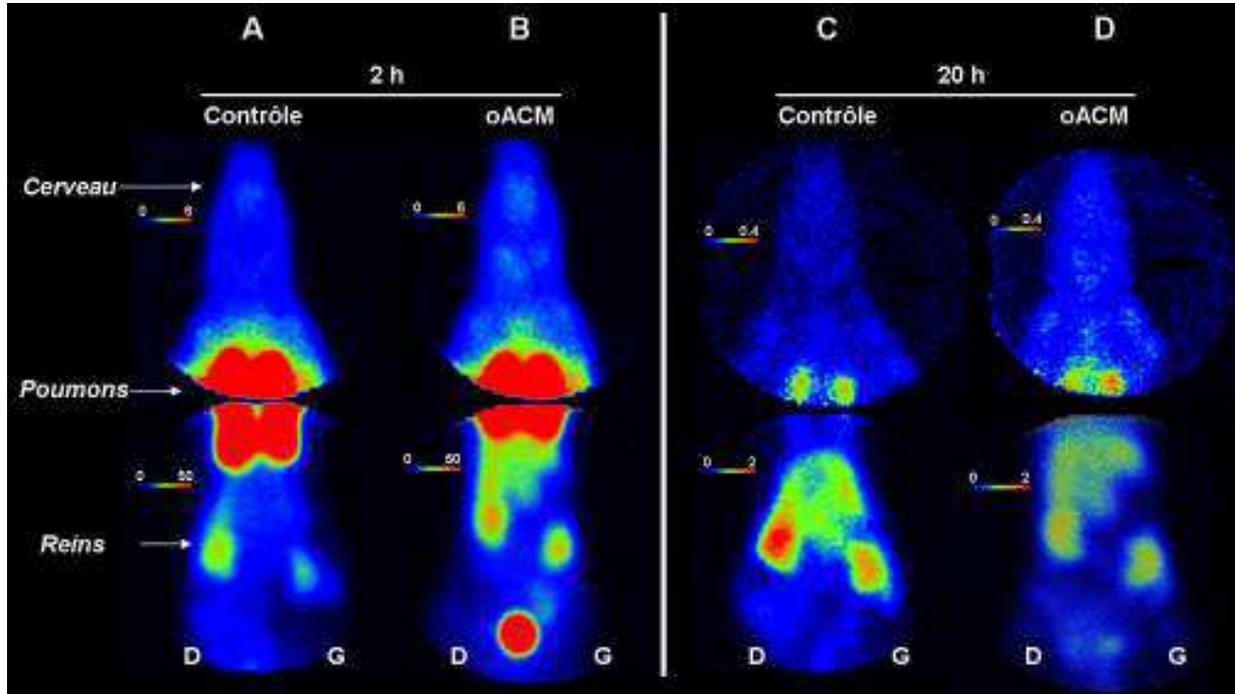


Tableau 5. Quantification sur imagerie nucléaire « corps entier ». Les résultats, corrigés de la décroissance, sont exprimés en coups / minute / mm² / GBq injecté (cpm/mm²/GBq) : moyenne ± SD. L'évolution (en pourcentage, moyenne ± SD) entre les deux acquisitions a été calculée par groupe à partir des valeurs obtenues des 4 rats imagés à 0-2 heures et à 18-20 heures. *G* : gauche ; *D* : droit ; *ns*: non significatif.

	0-2 heures			18-20 heures		
	Contrôles (n=9)	oACM (n=9)	p	Contrôles (n=4)	oACM (n=4)	p
Cerveau	20,3 ± 3,5	23,3 ± 3,5	ns	7,9 ± 2,1 (-62 ± 6%)	8,7 ± 1,8 (-65 ± 1%)	ns
Poumon	2209,9 ± 487,2	2749,2 ± 544,6	0,042	153,5 ± 75,8 (-94 ± 3%)	231,3 ± 39,6 (-91 ± 3%)	ns
Rein D	382,6 ± 151,6	379,4 ± 123,6	ns	353,3 ± 72,2 (+13 ± 28%)	372,4 ± 56,6 (+6 ± 33%)	ns
Rein G	314,4 ± 101,3	340,4 ± 143,0	ns	310,0 ± 39,8 (+1 ± 21%)	330,3 ± 53,8 (-6 ± 33%)	ns

VI.2.4. Biodistribution par comptage sur organes isolés

Deux heures après l'injection des CSMh-^{99m}Tc, l'activité de l'hémisphère droit lésé chez les rats oACM tendait à être plus élevée que chez les contrôles non lésés ($11,6 \pm 2,8 \times 10^{-3} \% \text{ DI/g}$ vs $7,9 \pm 2,5 \times 10^{-3} \% \text{ DI/g}$; $p=0,059$). Une différence plus marquée est apparue 20 heures après l'injection ($6,5 \pm 0,9 \times 10^{-3} \% \text{ DI/g}$ vs $3,6 \pm 1,2 \times 10^{-3} \% \text{ DI/g}$; $p=0,010$). Environ une cellule sur 10 000 CSMh-^{99m}Tc injectées a migré vers l'hémisphère lésé chez les rats oACM, soit deux fois plus que chez les contrôles. De plus, l'activité de l'hémisphère controlatéral (sain) était significativement plus élevée dans le groupe oACM que dans le groupe contrôle (**Tableau 6**). Dans le groupe oACM, l'activité initiale de l'hémisphère lésé était plus importante que celle de l'hémisphère sain ($11,6 \pm 2,8 \times 10^{-3} \% \text{ DI/g}$ vs $9,8 \pm 1,7 \times 10^{-3} \% \text{ DI/g}$; $p=0,024$) (**Figure 46**).

Une semaine après l'ischémie, l'injection IV de ^{99m}Tc-HMPAO seul entraînait une activité plus élevée au sein de l'hémisphère gauche (sain) que de l'hémisphère droit lésé, deux heures et 20 heures après l'injection (activité moyenne hémisphères droit / gauche = $0,93 \pm 0,02$ et $0,89 \pm 0,10$ respectivement) en dépit d'une altération importante de la barrière hémato-encéphalique dans la lésion.

Les résultats de comptage sur organes ont montré que les CSMh pouvaient « coloniser » une lésion ischémique cérébrale après une injection systémique, et ce en dépit du piégeage pulmonaire initial, confirmé par comptage sur poumon isolé. Ce piégeage précoce est suivi d'une redistribution retardée qui a été observée dans les deux groupes (groupe contrôle : de $18696,0 \pm 14675,6 \times 10^{-3} \% \text{ DI/g}$ 2 heures après injection à $1181,7 \pm 862,7 \times 10^{-3} \% \text{ DI/g}$ 20 heures après ; groupe oACM : de $11578,6 \pm 11552,6 \times 10^{-3} \% \text{ DI/g}$ à $485,5 \pm 241,6 \times 10^{-3} \% \text{ DI/g}$).

L'injection IV de ^{99m}Tc-HMPAO seul après oACM a entraîné une bien moindre activité pulmonaire aux deux temps d'observation ($2340,7 \pm 180,7 \times 10^{-3} \% \text{ DI/g}$ 2 heures après injection et $1213,9 \pm 468,1 \times 10^{-3} \% \text{ DI/g}$ à 20 heures).

Le comptage sur organes a également confirmé que les reins étaient principalement impliqués dans l'élimination des CSMh-^{99m}Tc comme le montrent les activités importantes urinaire et rénale.

Enfin, l'activité splénique augmentait significativement de deux à 20 heures après l'injection. Cette augmentation contrastait avec les décroissances d'activité mesurées dans tous les autres organes. Ce résultat suggère que les CSMh seraient séquestrées dans la rate.

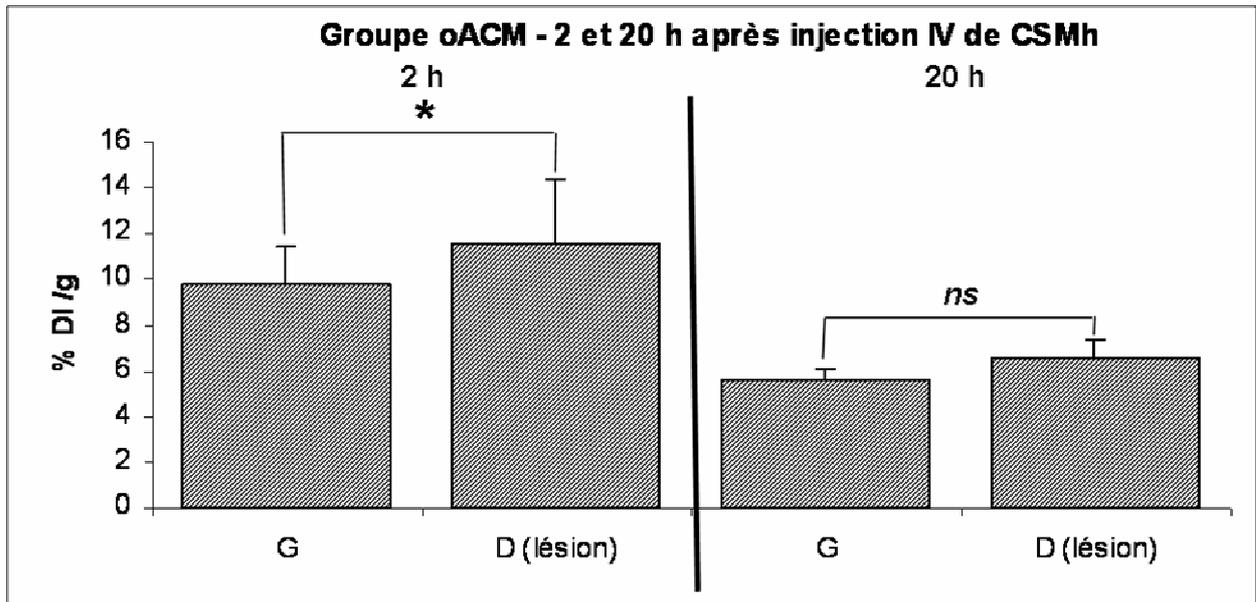
Nous n'avons pas observé de corrélation entre la taille de la lésion cérébrale et la biodistribution dans les différents organes.

Tableau 6. Biodistribution des CSMh par comptage sur organes isolés. Une comparaison entre les groupes contrôle et oACM a été effectuée (t-test pour échantillons indépendants). L'activité du traceur a été mesurée 2 et 20 heures après l'injection intraveineuse de CSMh-^{99m}Tc et est exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme d'organe (10^{-3} %DI/g) : moyenne \pm écart-type. Tous les comptages tissulaires ont été corrigés du bruit de fond et de la décroissance. Les activités des hémisphères droit (lésé) et gauche ont été mesurées pour le groupe oACM et l'activité du cerveau entier a été mesurée pour le groupe contrôle. L'évolution en pourcentage a été calculée par groupe à partir des valeurs moyennes obtenues des 5 rats sacrifiés à 2 heures et des 4 rats sacrifiés 20 heures après l'injection.

Organes	2 heures			20 heures		
	Contrôles (n=5)	oACM (n=5)	p	Contrôles (n=4)	oACM (n=4)	p
Cerveau G	7,9 ± 2,5	9,8 ± 1,7	ns	3,6 ± 1,2 (-54%)	5,6 ± 0,5 (-43%)	0,022
Cerveau D	7,9 ± 2,5	11,6 ± 2,8	ns (0,059)	3,6 ± 1,2 (-54%)	6,5 ± 0,9 (-44%)	0,010
Sang	169,9 ± 69,8	145,5 ± 41,4	ns	22,8 ± 4,0 (-87%)	32,0 ± 11,5 (-78%)	ns
Coeur	76,3 ± 17,4	103,4 ± 30,5	ns	26,3 ± 3,2 (-66%)	29,1 ± 9,8 (-72%)	ns
Thyroïde	34,5 ± 9,9	82,9 ± 52,5	ns	19,4 ± 4,0 (-44%)	24,5 ± 7,5 (-70%)	ns
Gl. salivaire	43,0 ± 7,7	49,7 ± 24,8	ns	14,2 ± 1,7 (-67%)	20,6 ± 2,6 (-59%)	0,006
Estomac	66,4 ± 21,2	120,4 ± 59,7	ns	25,2 ± 3,0 (-62%)	35,5 ± 20,3 (-71%)	ns
Foie	1363,9 ± 320,0	1508,1 ± 265,4	ns	1011,5 ± 182,2 (-26%)	1311,3 ± 380,6 (-13%)	ns
Rate	851,9 ± 266,7	796,7 ± 274,1	ns	1434,0 ± 468,3 (+68%)	1825,6 ± 522,8 (+129%)	ns
Rein	2607,3 ± 661,7	3094,8 ± 657,7	ns	2261,0 ± 438,7 (-13%)	3356,4 ± 165,1 (+8%)	0,003
Poumon	18696,0 ± 14675,6	11578,6 ± 11552,6	ns	1181,7 ± 862,7 (-94%)	485,5 ± 241,6 (-96%)	ns
Urine	22479,6 ± 4112,5	27325,4 ± 15781,0	ns	1105,7 ± 732,3 (-95%)	1555,1 ± 1433,3 (-94%)	ns
Muscle	32,8 ± 15,8	27,0 ± 20,4	ns	5,4 ± 1,5 (-84%)	10,2 ± 3,0 (-62%)	0,028

G : gauche ; D : droit ; gl. : glande ; oACM : occlusion de l'artère cérébrale moyenne ; ns : non significatif.

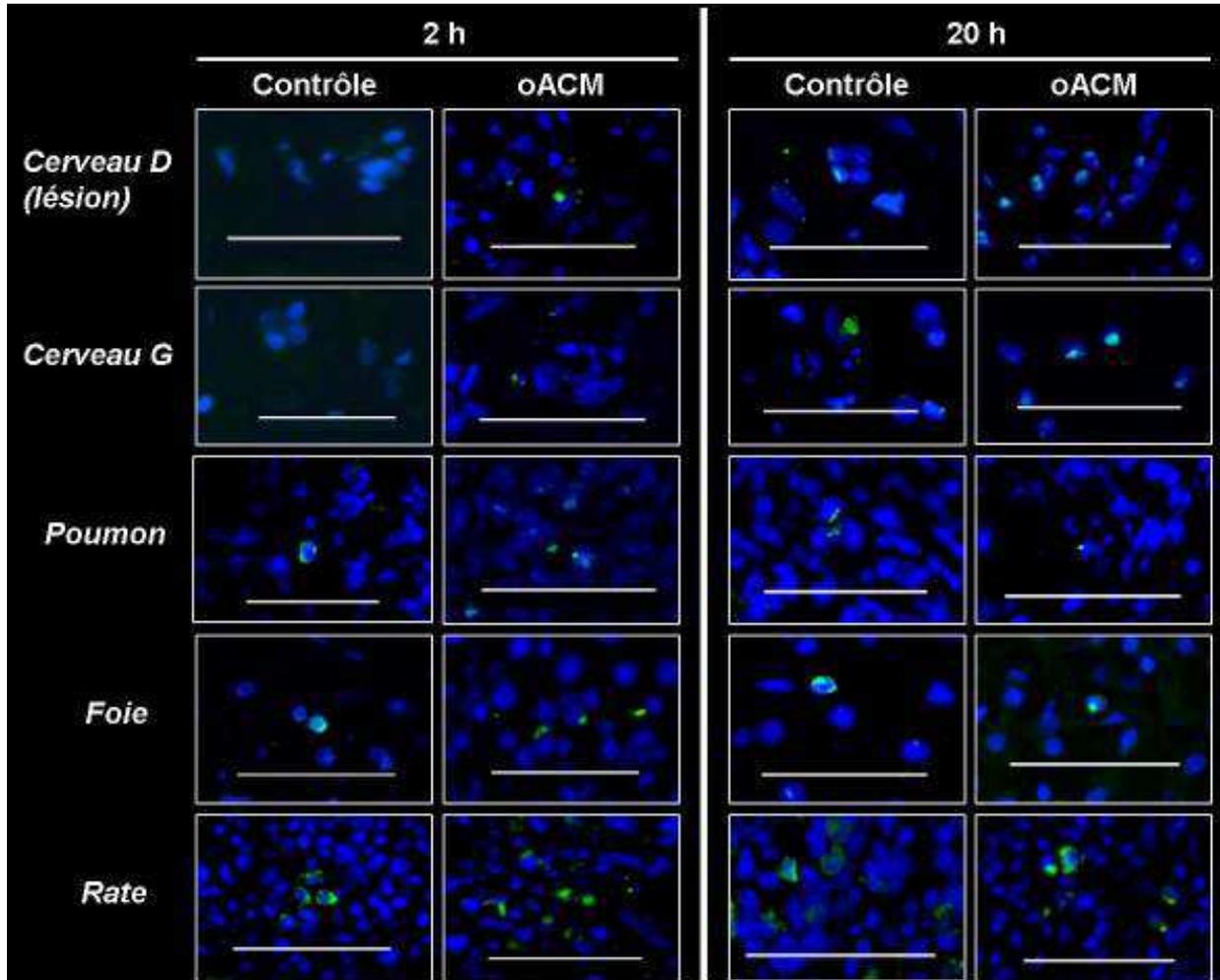
Figure 46. Distribution cérébrale des CSMh-^{99m}Tc injectées par voie intraveineuse après un infarctus cérébral droit (comptage gamma). Une comparaison intra-groupe (t-test pour échantillons appariés, groupe oACM) montre une activité plus élevée dans l'hémisphère droit (D) lésé que dans le gauche (G) ($p=0,024$ à 2 heures ; $p=0,070$ à 20 heures post-injection). L'activité du traceur est exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme de cerveau (10^{-3} %DI/g) : moyenne \pm écart-type.



V.2.5. Histologie

Les images obtenues en microscopie suggèrent la présence de cellules humaines dans les poumons, le foie, la rate, le cerveau lésé par ischémie (hémisphère droit lésé et hémisphère controlatéral, groupe oACM), le cerveau non lésé (groupe contrôle) uniquement 20 heures après l'injection. Aucune cellule humaine n'a été observée dans les cerveaux du groupe contrôle 2 heures après l'injection (**Figure 47**). Les difficultés techniques pour obtenir des données à partir de tissus fragiles comme le poumon ou le cerveau lésé ne nous ont pas permis d'effectuer une quantification cellulaire par microscopie.

Figure 47. Histologie. Les CSMh sont identifiées par un marquage spécifique des noyaux humains (HuNu, MAB1281) (vert). Tous les noyaux cellulaires sont marqués par la coloration de Hoechst. Les images de microscopie à fluorescence confirment la présence de cellules humaines dans le poumon, le foie, la rate, le cerveau lésé par ischémie (hémisphère droit lésé et hémisphère controlatéral), le cerveau non lésé (groupe contrôle) uniquement 20 heures après l'injection. Aucune cellule humaine n'a été observée dans les cerveaux du groupe contrôle 2 heures après l'injection. *Barre d'échelle = 50 μ m. D : droit ; G : gauche ; oACM : occlusion de l'artère cérébrale moyenne.*



VI.3. Discussion

Notre but a été d'évaluer la biodistribution « corps-entier » des CSMh injectées par voie IV après une ischémie cérébrale. Nos résultats montrent que : 1) des CSMh sont capables de migrer vers la lésion cérébrale après une injection systémique malgré un piégeage transitoire dans les poumons, 2) après 20 heures, plus de CSMh sont retrouvées dans la lésion que dans le tissu non lésé, 3) des CSMh peuvent être séquestrées dans la rate et sont éliminées principalement par voie rénale, 4) le comptage gamma sur organes isolés est plus sensible que l'imagerie nucléaire planaire pour étudier la biodistribution de CSMh marquées au ^{99m}Tc -HMPAO.

VI.3.1. Radiomarquage cellulaire et viabilité

Le marquage à l'Indium ^{111}In des CSMh à la dose de 30 Bq par cellule n'induit pas d'effets cellulaires indésirables (Bindslev *et al.*, 2006) alors que des dégâts cellulaires radio-induits ont été observés sur des CSH après un marquage à l' ^{111}In (Brenner *et al.*, 2004). Dans notre étude, le marquage par ^{99m}Tc -HMPAO (5 Bq par cellule) induit une perte de la capacité des CSMh à former des colonies. *In vitro*, aucun effet délétère sur la prolifération cellulaire n'a été observé avec le HMPAO seul et donc la perte de la capacité de prolifération serait due à l'agent radioactif (^{99m}Tc). Cependant, nos résultats de cytométrie de flux au 7-AAD démontrent une bonne viabilité des CSMh marquées durant la période expérimentale (2 jours). L'altération de la prolifération des CSMh radiomarquées doit être prise en compte dans les essais car elle pourrait altérer leur effet thérapeutique sur de plus longues périodes. Pour les études futures, notamment pour des suivis à long terme possibles avec l'utilisation de l' ^{111}In , seulement une petite fraction de cellules greffées doit être radiomarquée et utilisée comme traceur de l'ensemble de la population cellulaire greffée (Correa *et al.*, 2007).

VI.3.2. Les CSMh injectées par voie IV sont attirées vers la lésion ischémique cérébrale

La biodistribution apparente des CSMh au sein du cerveau après une injection systémique pourrait être due au relargage et à la biodistribution du traceur ^{99m}Tc -HMPAO. Pour contrôler ce point, nous avons injecté du ^{99m}Tc -HMPAO seul à des rats dans les mêmes conditions (une semaine après une ischémie cérébrale focale). Malgré une perméabilité augmentée de la barrière hémato-encéphalique au sein de la lésion (authentifiée en IRM), nous avons observé une radioactivité plus importante dans l'hémisphère gauche sain que dans le droit lésé, deux

heures et 20 heures après l'injection (activité moyenne hémisphère droit / hémisphère gauche = $0,93 \pm 0,02$ et $0,89 \pm 0,10$ respectivement). Un rapport inverse avait été observé après l'injection des CSMh marquées (groupe oACM : $1,18 \pm 0,09$ et $1,16 \pm 0,10$) (**Figure 46**). Ces résultats suggèrent que le relargage de ^{99m}Tc -HMPAO devrait entraîner une sous-estimation du nombre de CSMh au sein de l'hémisphère lésé.

Nos résultats de comptage sur cerveau isolé et d'histologie suggèrent que les deux hémisphères cérébraux, principalement celui lésé, peuvent attirer des CSMh viables après une ischémie cérébrale focale. Les données obtenues sur la biodistribution des CSMh sont en accord avec les autres études déjà publiées montrant le bénéfice de l'injection IV de CSM et la survie des cellules greffées dans l'infarctus observée par microscopie (Chen *et al.*, 2001^b ; Chen *et al.*, 2003^a, 2003^b ; Wu *et al.*, 2007). Cependant, nous avons montré que peu de CSMh injectées sont retrouvées dans le cerveau (1 / 10 000 dans l'hémisphère lésé correspondant à 300 cellules pour 3×10^6 CSMh injectées). Cette proportion correspond aux résultats histologiques précédents qui montrent une faible survie des cellules greffées au sein d'un infarctus cérébral (1 à 4 / 10 000) 4 jours après une injection IV de cellules CD133+ de moelle osseuse (Borlongan *et al.*, 2005). En histologie, Li *et al.* (Li *et al.*, 2002) ont observé que 4% des 3×10^6 CSMh injectées par voie IV (24 heures après une ischémie cérébrale) migraient dans le cerveau. Dans notre étude, les CSMh ont été administrées une semaine après l'ischémie et une fraction plus faible de CSMh a été retrouvée au niveau du cerveau. Le délai optimal d'injection pourrait dépendre de l'effet thérapeutique désiré : une neuroprotection à la phase aiguë ou une régénération du tissu cérébral plus tardivement (Guzman *et al.*, 2008). L'injection de CSMh à la phase aiguë d'un AVC pourrait induire la migration d'un plus grand nombre de cellules vers la lésion. En effet, la plupart des taux d'agents chimioattractifs (tels que les cytokines, chemokines, et molécules d'adhésion) sont élevés durant les premiers jours post-AVC et retournent à la normale en une semaine (Yan *et al.*, 2007 ; Guzman *et al.*, 2008). Cependant, cette injection précoce de CSMh n'est pas possible en pratique clinique en condition autologue en raison du délai d'amplification nécessaire en culture (Bang *et al.*, 2005). Nos résultats suggèrent que, même après une injection à la phase subaiguë, les CSMh sont capables de migrer de manière préférentielle vers l'infarctus cérébral.

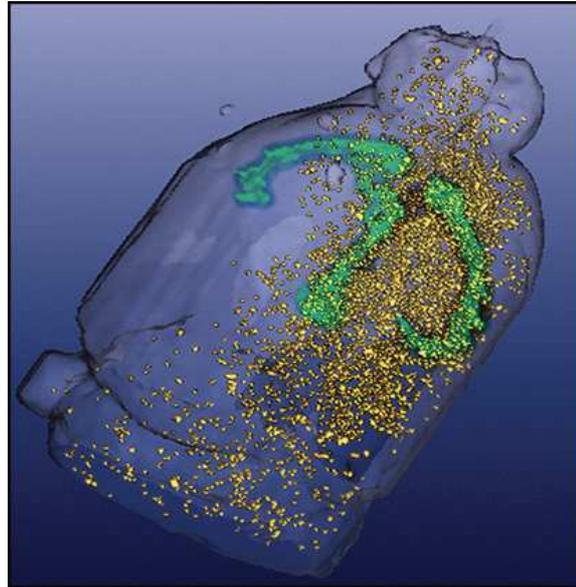
En ce qui concerne la biodistribution dans le reste de l'organisme, les CSMh vont vers des organes non ciblés comme la rate, ce qui avait été déjà observé dans d'autres études que ce soit après une injection IV (Gao *et al.*, 2001 ; Allers *et al.*, 2004 ; Kraitchman *et al.*, 2005) ou IA (Correa *et al.*, 2007).

VI.3.3. Quelle voie d'injection des CSMh ?

Après une injection IV de CSMh, un piégeage transitoire dans les poumons a été observé sans signe fonctionnel respiratoire constaté. L'activité pulmonaire qui décroît de manière importante de 2 à 20 heures suggère un passage des cellules à travers le réseau capillaire pulmonaire. Ce phénomène a déjà été rapporté chez des rats normaux après une injection IV de CSMh marquées à l'¹¹¹In qui étaient détectées initialement dans les poumons puis plus tard dans le foie et les autres organes (Gao *et al.*, 2001). Cette clairance pulmonaire des CSM augmente avec l'utilisation concomitante d'un vasodilatateur (Gao *et al.*, 2001). La redistribution des CSM des poumons vers les organes non ciblés (foie, rein, rate) et vers un infarctus du myocarde a également été observée après une injection IV chez le chien (Kraitchman *et al.*, 2005). Tous ces résultats suggèrent qu'il existe plus un passage lent des CSM dans les capillaires pulmonaires qu'une migration spécifique des CSM au sein du tissu pulmonaire. Ainsi, l'administration IV de CSMh peut être utilisée malgré cette accumulation transitoire dans les poumons qui peut être réduite par l'utilisation d'un vasodilatateur.

Les autres voies d'administration, IA (Shen *et al.*, 2007^a) ou IC, peuvent éviter ce piégeage pulmonaire et permettre une augmentation du nombre de cellules au sein du tissu visé. La transplantation IC chez le rat de cellules humaines CD133+ de moelle osseuse, une heure et 3 jours après une ischémie, entraîne une bonne survie de la greffe (7%) au site de transplantation corélée à un bénéfice fonctionnel (Borlongan *et al.*, 2005). Cependant, l'injection IV de ces cellules n'entraîne qu'une faible survie de la greffe (1 à 4 / 10 000) (Borlongan *et al.*, 2005). Lappalainen *et al.* (Lappalainen *et al.*, 2008) ont aussi montré que des progéniteurs neuraux marqués à l'¹¹¹In pouvaient être détectés dans l'hémisphère ischémique par imagerie nucléaire après une injection IA mais pas après une injection IV. Cela est cohérent avec les études d'IRM *in vivo* montrant une localisation cérébrale des CSM après une injection IA mais pas après une IV (Walczak *et al.*, 2008) (**Figure 48**). Cependant, dans cette étude, les auteurs rapportent un risque important d'occlusion artérielle après une injection IA selon leurs données de Doppler. Concernant l'infarctus du myocarde, l'administration intracoronaire de cellules souches semble plus efficace que l'injection IV (Barbash *et al.*, 2003 ; Hofmann *et al.*, 2005).

Figure 48. IRM cellulaire. Reconstruction en 3 dimensions de la distribution cérébrale des CSM 24 h après leur injection intra-arterielle (carotide interne droite). Les CSM se distribuent dans tout l'hémisphère droit et particulièrement dans le territoire irrigué par la carotide interne. Très peu de cellules sont détectées dans l'hémisphère controlatéral suggérant que les CSM ne passent pas dans la circulation générale avant d'arriver à leur destination (Walczak et al., 2008).



Bien que l'injection IA par l'artère carotide (Correa *et al.*, 2007) ou les greffes IC (Kondziolka *et al.*, 2000 ; Savitz *et al.*, 2005) soit faisable après un AVC chez l'homme, l'administration IV est moins invasive et techniquement plus facile qu'une procédure chirurgicale ou IA dans le cadre des premiers essais cliniques (Bang *et al.*, 2005). Les essais cliniques s'intéressant aux greffes IC après un AVC rapportent des résultats limités (Kondziolka *et al.*, 2000 ; Kondziolka *et al.*, 2005 ; Savitz *et al.*, 2005). De plus, l'injection IV permet une distribution des cellules dans les régions vascularisées et viables de la lésion et pas seulement dans un site de greffe localisé.

A l'avenir, de nouvelles études sont nécessaires pour optimiser la voie et le délai d'administration de la thérapie cellulaire et pour expliquer les mécanismes de migration des cellules vers la lésion.

VII. EFFETS MICROVASCULAIRES DE L'INJECTION INTRACEREBRALE DE CSMh APRES ISCHEMIE

Pour préciser les mécanismes d'action des CSMh, nous avons étudié les effets microvasculaires par IRM *in vivo* de l'injection locale de CSMh.

L'ischémie cérébrale qui fait suite à l'interruption locale du flux artériel entraîne une vasodilatation d'aval et stimule l'angiogenèse maintenant un débit sanguin cérébral (DSC) local suffisant au niveau de la lésion (voir *I.1.4. Physiopathologie de l'ischémie cérébrale*) (Dirnagl *et al.*, 1999 ; Plate, 1999). Krupinski *et al.* ont montré que, chez l'homme, l'angiogenèse (prédominant dans la zone de pénombre ischémique) était corrélée à une meilleure survie (Krupinski *et al.*, 1994).

Comme nous l'avons vu précédemment, le remodelage microvasculaire joue un rôle prépondérant pour favoriser la neurogenèse endogène, la migration des neuroblastes (Thored *et al.*, 2007) et la formation de « niches » neurovasculaires propices à la récupération (Ohab *et al.*, 2006). Les CSM semblent avoir un effet sur cette angiogenèse (Navaratna *et al.*, 2009). L'injection IV de CSMh augmente la production de VEGF, bénéfique sur le remodelage tissulaire (Hermann & Zechariah, 2009 ; Wang *et al.*, 2005), et du récepteur 2 au VEGF avec l'induction d'une angiogenèse dans la périphérie de l'infarctus corrélée à une réduction du volume de celui-ci (Chen *et al.*, 2002^b ; Chen *et al.*, 2003^a ; Liu *et al.*, 2006). L'injection IV (précoce) de CSMh surexprimant Ang-1 semble plus efficace sur la néovascularisation et le débit sanguin en périphérie de l'infarctus que l'injection de CSMh « natives » (Onda *et al.*, 2008). Cet effet est encore majoré par l'injection IV (6h après l'ischémie) de CSM surexprimant à la fois Ang-1 et VEGF (Toyama *et al.*, 2009). Cependant, les mécanismes par lesquels les CSMh induisent cette angiogenèse restent controversés. Par la sécrétion de facteurs trophiques « pro-angiogéniques », les CSMh pourraient augmenter la prolifération des cellules endothéliales et/ou la migration de progéniteurs vers la zone lésée et améliorer ainsi la formation d'une vascularisation collatérale (Shyu *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2002).

Bien qu'une augmentation du volume sanguin cérébral (VSC) ait été observée après une ischémie, peu d'études se sont portées sur le suivi *in vivo* de la microvascularisation pour mieux comprendre ce mécanisme physiopathologique (Lin *et al.*, 2002 ; Lin *et al.*, 2008). L'IRM est une méthode non invasive qui peut être utilisée pour suivre *in vivo* les modifications du volume sanguin capillaire, de la taille des vaisseaux et de la densité microvasculaire après une ischémie expérimentale chez le rat (Lin *et al.*, 2002 ; Lin *et al.*, 2008).

A notre connaissance, aucune étude par IRM *in vivo* n'a été réalisée pour évaluer les effets de l'administration de CSMh sur la microvascularisation cérébrale après ischémie. Ainsi, l'objectif de l'étude présentée ici a été de suivre l'évolution du VSC et de la taille des microvaisseaux durant 3 semaines après une ischémie focale traitée par une greffe IC de CSMh. Pour cette première étude sur les effets microvasculaires des CSMh, nous avons choisi l'administration IC directement au sein de la lésion pour s'affranchir du problème de la biodistribution générale après une injection systémique.

VII.1. Matériel et méthodes

Cet essai a été conduit selon le schéma expérimental suivant sur 3 semaines :

J0	J1	J7	J8	J9	J15	J21
oACM			Grefe IC			
	IRM 1	IRM 2		IRM 3	IRM 4	IRM 5
						Histologie

oACM : occlusion de l'artère cérébrale moyenne ; *IC* : intracérébrale.

* Transplantation intracérébrale et groupes expérimentaux :

Vingt rats ont été randomisés en 4 groupes :

- 1) un groupe a reçu une injection IC de $4 \cdot 10^5$ CSMh (suspendues dans 10 μ L de PBS-glutamine), 8 jours après une oACM (oACM CSMh, n=5),
- 2) un groupe a reçu une injection IC de 10 μ L de PBS-glutamine, 8 jours après une oACM (oACM PBS, n=4),

3) un groupe contrôle, sans lésion cérébrale, a reçu une injection IC de 10 μ L de PBS-glutamine (contrôle PBS, n=6),

4) un groupe contrôle, sans lésion cérébrale, a reçu une injection IC de $4 \cdot 10^5$ CSMh (suspendues dans 10 μ L de PBS-glutamine) (contrôle CSMh, n=5).

Pour l'injection IC, les rats anesthésiés ont été fixés dans un cadre stéréotaxique. Avec une seringue de Hamilton de 25G et selon les coordonnées de l'atlas de Paxinos-Watson (Paxinos George & Watson Charles, 1998), 5 μ L de la solution (CSMh ou PBS-glutamine) ont été injectés au sein de la lésion, dans le striatum droit (0 mm antéro-postérieur ; 3 mm latéral ; 6 mm de profondeur par rapport au bregma) puis 5 μ L dans le cortex droit (0/3/2 mm) au débit de 2 μ L/min au pousse-seringue électrique.

* IRM :

Tous les rats ont été suivis par IRM (aimant horizontal 7 T Bruker Avance III) durant 21 jours. Un cathéter a été mis en place dans la veine de la queue pour permettre l'injection du produit de contraste. Le rat a alors été placé dans l'aimant. Pour chaque rat, la durée de la procédure d'IRM fut d'environ 45 minutes.

- Une séquence T_1 SE a été utilisée pour positionner le rat de manière reproductible dans l'aimant.

- Des images T_2 SE (TR/TE = 2500/60 ms, taille de voxel = 234 x 234 x 1000 μ m, 2 moyennages) ont été acquises à J1, J7, J9, J14, et J21 après l'oACM. Pour suivre le volume de l'infarctus, l'ensemble de la lésion a été délimité manuellement sur toutes les coupes (17 coupes par cerveau). Le volume lésionnel a été calculé en multipliant le nombre de pixels par la surface unitaire d'un pixel et par l'épaisseur de coupe.

- Une cartographie du coefficient apparent de diffusion (CAD) a été effectuée (TR/TE = 3000/29 ms, b=900 s/mm²) à J1, J7, J9, J14 et J21 et mesuré dans chaque région d'intérêt (ROI) (7 coupes par cerveau centrées sur la lésion).

- Le VSC et l'index de taille des vaisseaux (ITV) ont été mesurés à J7 (prégreffe), J9, J14 et J21 après l'oACM. Les valeurs de VSC et d'ITV ont été obtenues par la méthode de mesure à l'équilibre décrite précédemment (Tropres *et al.*, 2001). Brièvement, une séquence multi-EG- T_2^* (TR = 4000 ms, 7 échos de gradient = 2,3 à 15,6 ms, taille de voxel = 234 x 234 x 1000 μ m, 2 moyennages, 7 coupes centrées sur la lésion) a été effectuée avant et deux minutes après l'injection IV (veine de la queue) d'un agent de contraste USPIO intravasculaire (AMI-227, Sinerem[®], Guerbet, France ; 200 μ mol de Fe /kg). Cet agent de contraste de 20 nm de diamètre a une demi-vie plasmatique de 4,5 heures.

Toutes les cartes obtenues ont été analysées à l'aide d'un logiciel (Uvasc) développé au sein de notre équipe dans Matlab (The MathWorks, Inc., USA). Le CAD a été analysé comme la moyenne des CAD observés dans les 3 directions principales du système de gradient. Les mesures des variations de relaxation transverse dues au Sinerem[®] (ΔR_2^* et ΔR_2) ont été obtenues à partir des signaux d'écho de gradient et d'écho de spin acquis avant et après l'injection de Sinerem[®]. L'augmentation de la différence de susceptibilité $\Delta\chi$ entre le sang et le tissu a été préalablement déterminée, dans notre laboratoire, à 0,191 ppm (Valable *et al.*, 2008). Le VSC et ITV ont été calculés à partir des équations rapportées précédemment (Tropres *et al.*, 2001 ; Valable *et al.*, 2008).

*** Immunohistologie :**

Les rats ont été euthanasiés sous anesthésie à l'issue du suivi (J21). Les cerveaux ont été prélevés et conservés à - 80°C. Des coupes coronales de 10 μm d'épaisseur ont été effectuées (18 coupes par rat, centrées sur la lésion).

- La quantification des vaisseaux (tailles et surfaces) a été réalisée en utilisant un anticorps primaire dirigé contre RecA (rodent endothelial cell antigen) (Serotec Ltd, Oxford, UK ; 1/200^{ème}). Ce marquage permet l'identification des cellules endothéliales murines.

Quatre ROI (cortex et striatum lésés et controlatéraux) ont été délimitées sur 6 coupes par cerveau centrées sur la lésion. L'analyse quantitative de la densité vasculaire et de la surface individuelle des vaisseaux a été effectuée à partir d'images binarisées en utilisant le logiciel Image J1.4 WCIF Java. Les surfaces vasculaires ont été estimées en pourcentage de la ROI occupée par les cellules RecA positives. Les surfaces individuelles des vaisseaux ont été mesurées en μm^2 .

Toutes les photographies ont été prises de manière systématique, au « hasard », dans les 4 mêmes régions d'intérêt pour chaque lame. Elles ne correspondent donc pas forcément aux zones de plus grande densité vasculaire observable.

- Pour préciser la colocalisation éventuelle de cellules humaines et de cellules endothéliales, un double marquage a été utilisé associant les anticorps primaires anti-noyau humain (MAB1281 / HuNu ; 1/1000^{ème}) et anti-facteur VIII de von Willebrand (DakoCytomation, Danemark ; 1/500^{ème}). Un anticorps secondaire fluorescent (Alexa 488, vert) anti-IgG de souris (Invitrogen, USA; 1/500^{ème}) et un anticorps secondaire fluorescent (Rhodamine, rouge) anti-IgG de lapin (Jackson Immunoresearch Laboratories, USA, 1/200^{ème}) ont été utilisés.

VII.2. Résultats

VII.2.1. Suivi IRM du volume lésionnel et de l'oedème

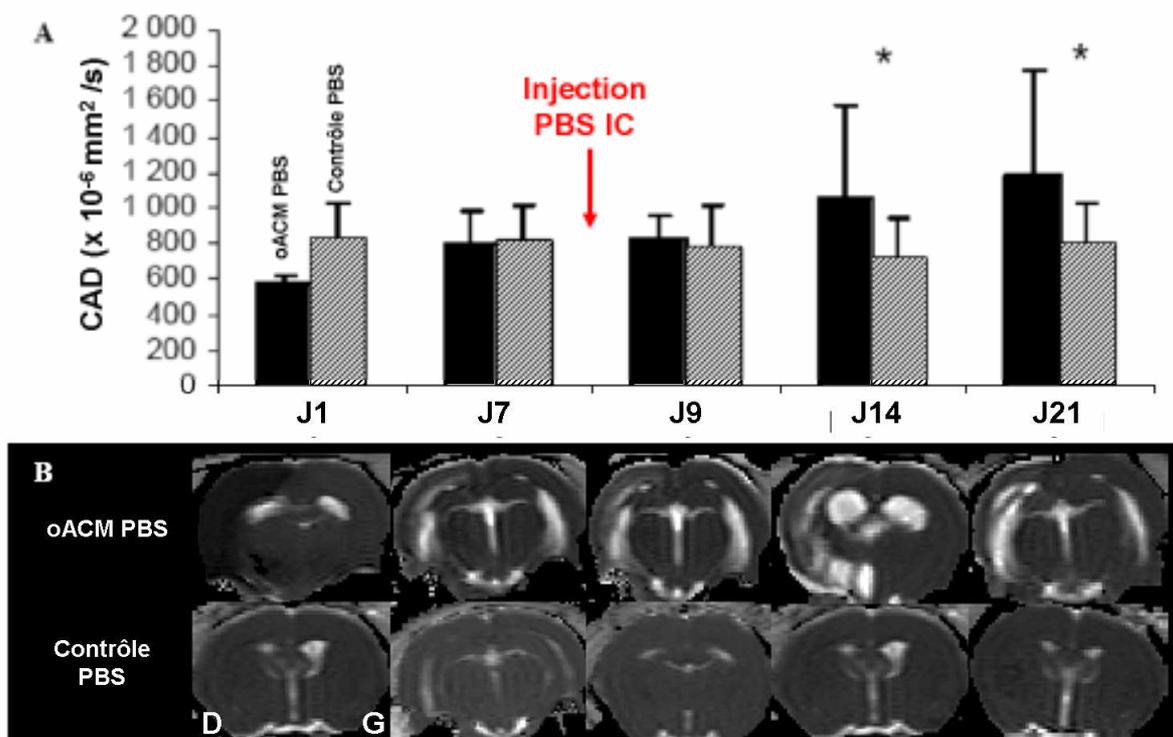
Les deux groupes ayant subi une oACM (groupes oACM PBS et oACM CSMh) ont eu une lésion ischémique initiale de volume équivalent à J1 ($187 \pm 195 \text{ mm}^3$ vs $189 \pm 199 \text{ mm}^3$, respectivement). Aucun effet significatif de l'injection IC de CSMh sur le volume lésionnel n'a été identifié durant les 3 semaines de suivi.

Concernant l'évolution de l'oedème cytotoxique, l'ischémie cérébrale a entraîné initialement une réduction du CAD. Ensuite, à J14 et J21, le CAD devenait plus important dans la lésion du groupe oACM PBS comparé au groupe contrôle PBS (à J14 : $1059 \pm 23 \times 10^6 \cdot \text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ vs $724 \pm 63 \times 10^6 \cdot \text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $p = 0,014$, à J21 : $1182 \pm 221 \times 10^6 \cdot \text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ vs $80 \pm 6 \times 10^6 \cdot \text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $p = 0,008$) (**Figure 49**).

Figure 49. Effet de l'ischémie focale transitoire sur le coefficient apparent de diffusion (CAD) durant 3 semaines.

A. Analyse quantitative du CAD au sein de la lésion du groupe oACM PBS (noir) et au sein de l'hémisphère droit du groupe contrôle PBS (hachuré). Moyenne \pm écart-type, * $p < 0.05$.

B. Cartographies représentatives du CAD après une ischémie focale (oACM PBS) et dans le groupe contrôle sans ischémie (contrôle PBS) de J1 à J21 après oACM. Dans les 2 groupes une injection intracérébrale (IC) de PBS-glutamine a été effectuée à J8 dans l'hémisphère droit. D : droit, G : gauche.



L'injection IC de CSMh n'induit pas de modification du CAD après l'ischémie cérébrale. En effet, aucune différence de CAD n'a été observée entre le groupe oACM PBS et oACM CSMh à J9 ($824 \pm 233 \times 10^6 \text{.mm}^2 \text{.s}^{-1}$ vs $763 \pm 130 \times 10^6 \text{.mm}^2 \text{.s}^{-1}$), J14 ($1059 \pm 223 \times 10^6 \text{.mm}^2 \text{.s}^{-1}$ vs $1188 \pm 522 \times 10^6 \text{.mm}^2 \text{.s}^{-1}$) ou J21 ($1182 \pm 221 \times 10^6 \text{.mm}^2 \text{.s}^{-1}$ vs $1336 \pm 593 \times 10^6 \text{.mm}^2 \text{.s}^{-1}$).

Sur le cerveau sain, l'injection IC de CSMh n'induit pas non plus de modification du CAD. En effet, il n'a pas été observé de différence significative du CAD au cours du temps entre les groupes contrôle PBS et contrôle CSMh (données non montrées).

L'injection IC de PBS-Gln n'induit pas de modification du CAD. Dans le groupe contrôle PBS, sans lésion ischémique, nous n'avons pas observé de différence du CAD entre l'hémisphère droit (siège de l'injection IC de PBS-Gln) et l'hémisphère controlatéral durant le suivi.

VII.2.2. Evolution des paramètres microvasculaires en IRM

* Volume sanguin cérébral (VSC) (Figure 50) :

Dans le groupe oACM PBS, les valeurs de VSC étaient plus élevées dans la lésion que dans l'hémisphère controlatéral à J7, J9 et J14 avec un pic observé à J9 ($6,3 \pm 0,7 \%$ vs $4,0 \pm 0,6 \%$, $p < 0,001$) et une décroissance ultérieure. Dans le groupe oACM CSMh, les valeurs de VSC étaient également plus élevées dans la lésion que dans l'hémisphère controlatérale à J7, J9 et J14. Aucun pic n'a été observé à J9 ($4,7 \pm 0,1 \%$ vs $2,8 \pm 0,7 \%$, $p = 0,003$).

A J9 (soit un jour après l'injection IC), le VSC au sein de lésion était significativement plus élevé dans le groupe oACM PBS que dans le groupe traité par CSMh (oACM CSMh) ($p = 0,002$). La même différence a été observée au sein de l'hémisphère controlatéral ($p = 0,025$). Ces résultats suggèrent que les CSMh limitent l'augmentation à J9 du VSC tant au niveau de l'hémisphère lésé que dans l'hémisphère sain.

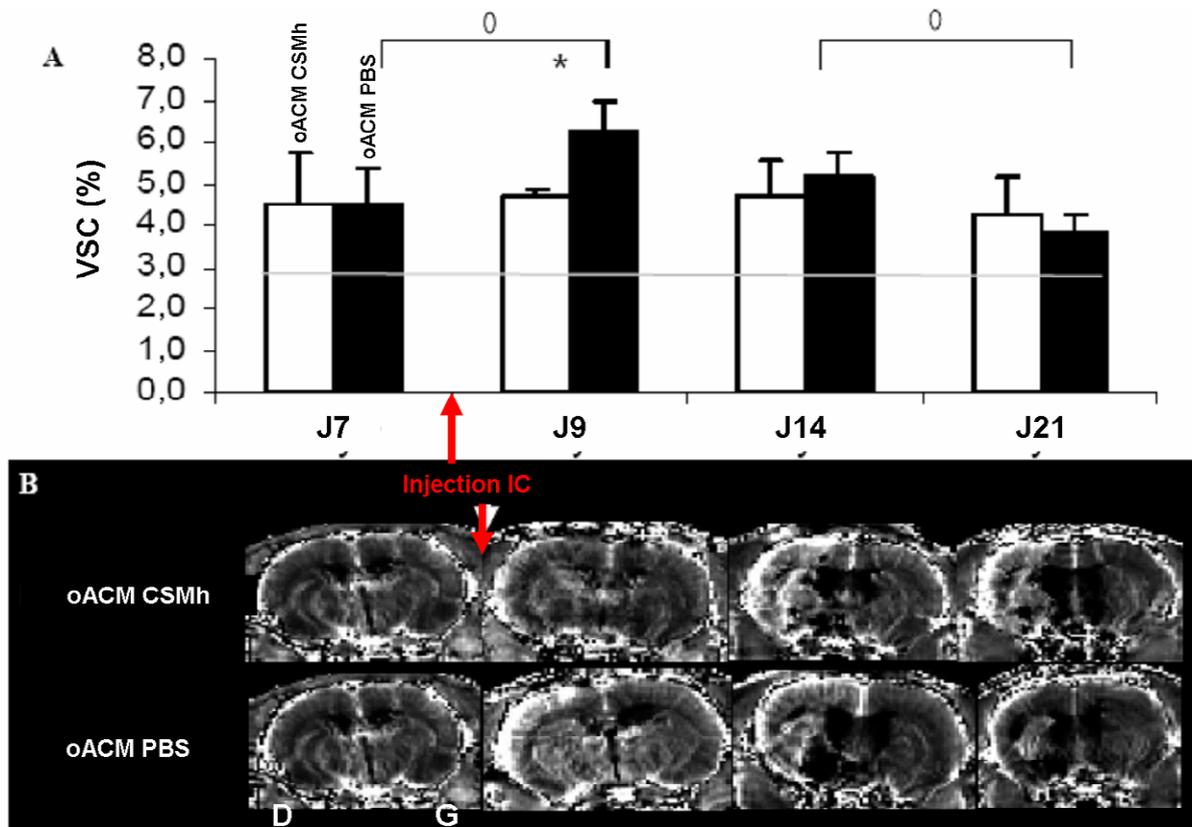
Sur le cerveau sain, l'injection IC de CSMh n'induit pas de modification du VSC. En effet, il n'a pas été observé de différence significative du VSC entre les groupes contrôle PBS et contrôle CSMh (données non montrées).

L'injection IC de PBS-Gln n'induit pas de modification du VSC. Dans le groupe contrôle PBS, sans lésion ischémique, nous n'avons pas observé de différence du VSC entre l'hémisphère droit (siège de l'injection IC de PBS-Gln) et l'hémisphère controlatéral.

Figure 50. Effets de l'injection intracérébrale (IC) de PBS-Gln ou de CSMh sur le volume sanguin cérébral (VSC) après une ischémie focale transitoire.

A. Analyse quantitative du VSC ($\Delta R2^*$) pour les groupes traité (oACM CSMh, blanc) et oACM PBS (noir) au sein de la lésion ischémique. La moyenne du VSC controlatéral est montrée à titre indicatif (ligne grise). Moyenne \pm écart-type, * $p < 0.05$; ⁰ $p < 0.05$.

B. Cartographies représentatives de VSC ($\Delta R2^*$) pour les groupes traité (oACM CSMh) et oACM PBS.



*** Index de taille des vaisseaux (ITV) (Figure 51) :**

Dans le groupe oACM PBS, l'ITV était plus élevé dans la lésion que dans l'hémisphère controlatéral à J7, J9, et J14 et J21 avec un pic observé à J9 ($16,3 \pm 1,0 \mu\text{m}$ vs $8,9 \pm 2,3 \mu\text{m}$, $p = 0,005$). Dans le groupe oACM CSMh, l'ITV était également plus élevé dans la lésion que dans l'hémisphère controlatéral à J9, J14 et J21 avec des valeurs maximales à J14 ($17,3 \pm 4,7 \mu\text{m}$ vs $6,9 \pm 2,3 \mu\text{m}$, $p = 0,007$) et à J21 ($18,1 \pm 2,5 \mu\text{m}$ vs $8,0 \pm 1,0 \mu\text{m}$, $p < 0,001$).

A J9 (soit un jour après l'injection IC), l'ITV au sein de lésion était significativement plus élevé dans le groupe oACM PBS que dans le groupe traité par CSMh (oACM CSMh) ($16,3 \pm 1,0 \mu\text{m}$ vs $11,5 \pm 1,4 \mu\text{m}$, $p = 0,001$). La même différence a été observée au sein de l'hémisphère controlatéral ($8,9 \pm 2,3 \mu\text{m}$ vs $5,5 \pm 2,0 \mu\text{m}$, $p = 0,045$). A l'inverse, à J14, le VSI ipsilatéral semble moins élevé chez le groupe oACM PBS que le groupe oACM CSMh ($15,8 \pm 2,2 \mu\text{m}$ vs $17,3 \pm 4,7 \mu\text{m}$, $p = \text{ns}$).

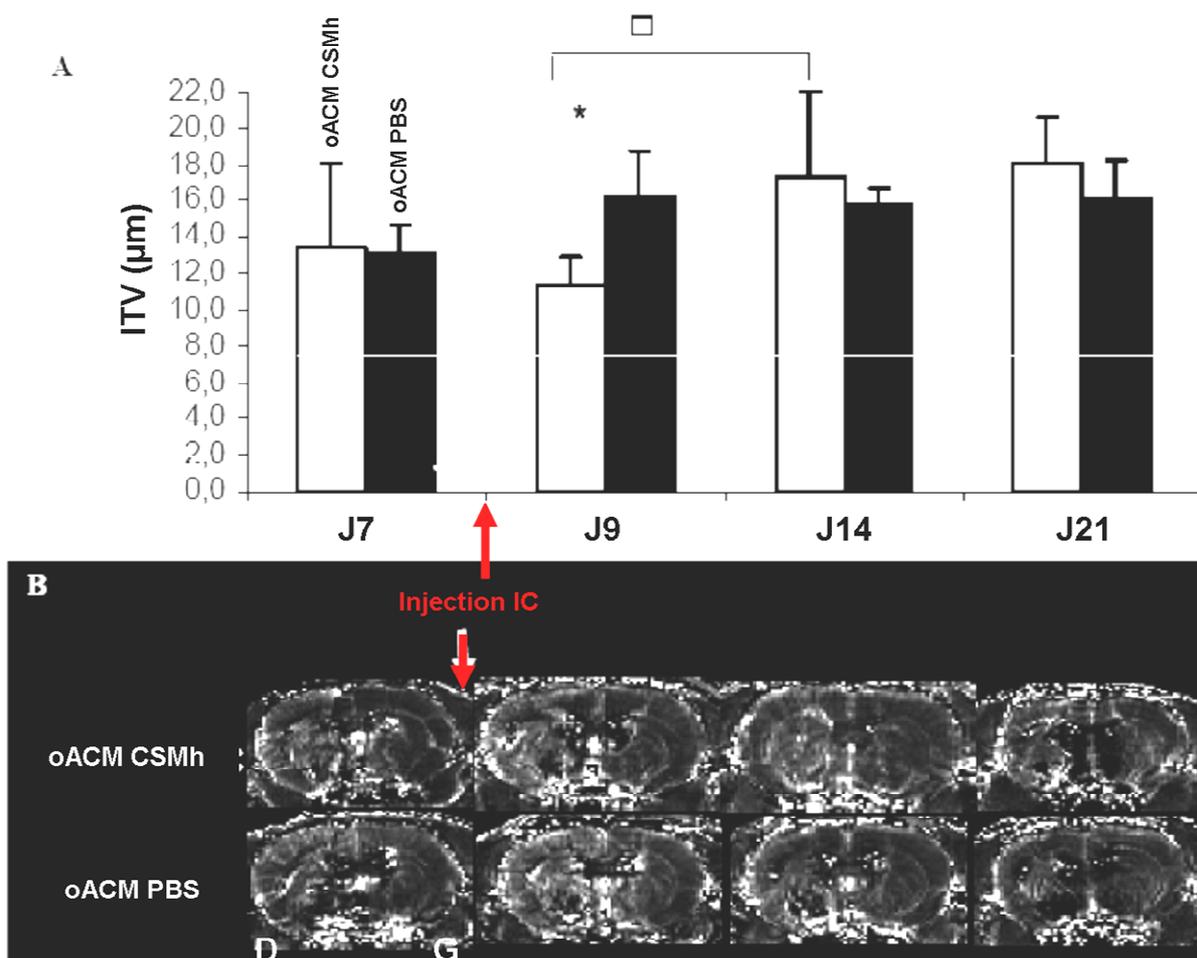
Sur le cerveau sain, l'injection IC de CSMh n'induit pas de modification de l'ITV. En effet, il n'a pas été observé de différence significative de l'ITV entre les groupes contrôle PBS et contrôle CSMh (données non montrées).

L'injection IC de PBS-Gln n'induit pas de modification de l'ITV. Dans le groupe contrôle PBS, sans lésion ischémique, nous n'avons pas observé de différence de l'ITV entre l'hémisphère droit (siège de l'injection IC de PBS-Gln) et l'hémisphère controlatéral.

Figure 51. Effets de l'injection intracérébrale (IC) de PBS-Gln ou de CSMh sur l'index de taille des vaisseaux (ITV) après une ischémie focale transitoire.

A. Analyse quantitative de l'ITV pour les groupes traité (oACM CSMh, blanc) et oACM PBS (noir) au sein de la lésion ischémique. La moyenne de l'ITV controlatéral est montrée à titre indicatif (ligne grise). Moyenne \pm écart-type, * $p < 0.05$; $\square p < 0.05$.

B. Cartographies représentatives de l'ITV pour les groupes traité (oACM CSMh) et oACM PBS.



VII.2.3. Paramètres microvasculaires histologiques

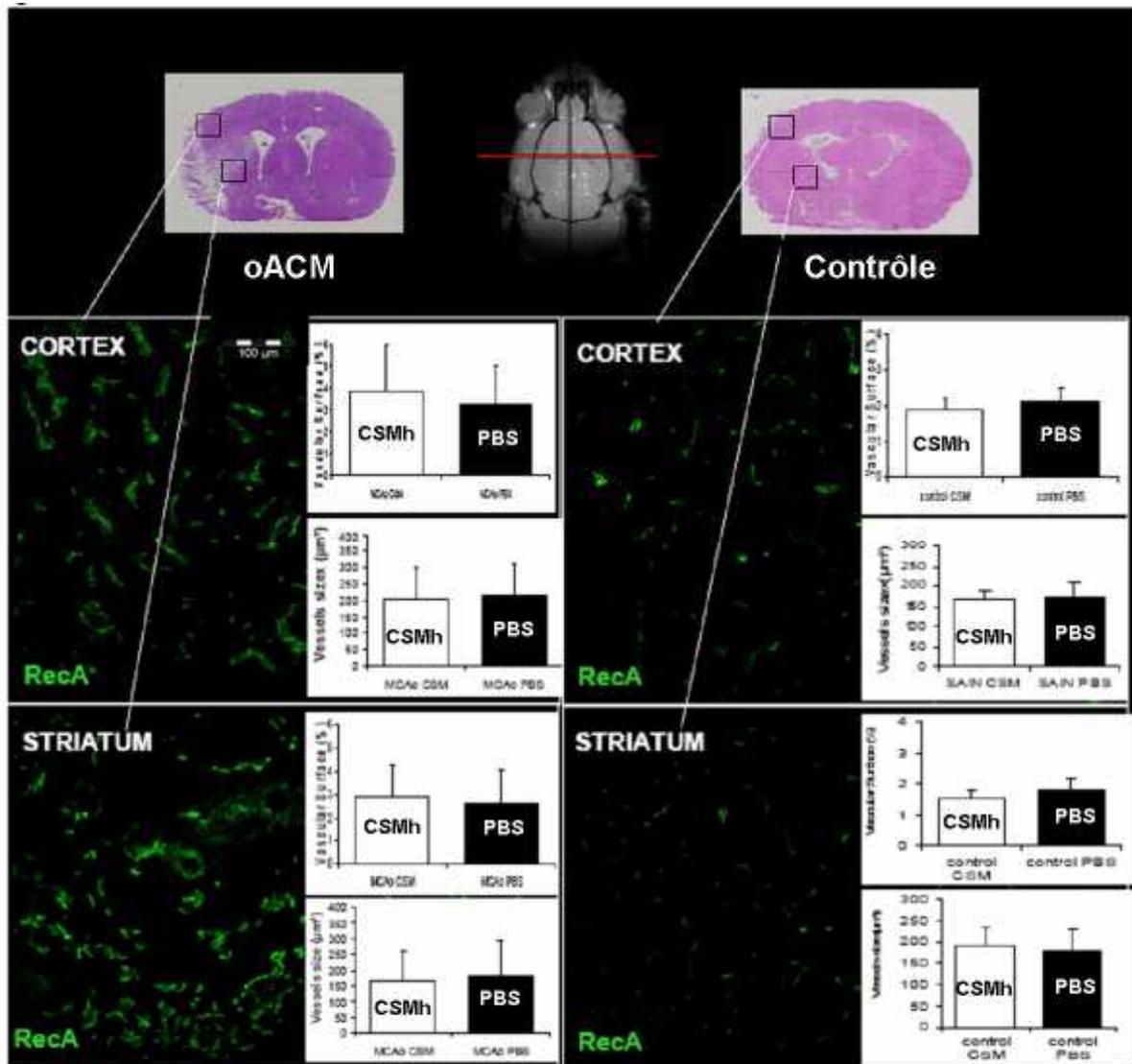
En histologie, à l'issue du suivi (à J21), dans les deux groupes ayant subi une ischémie cérébrale (oACM PBS et oACM CSMh), la surface vasculaire était plus importante dans le cortex et le striatum lésés comparés au cortex et au striatum controlatéral (respectivement, pour le groupe oACM PBS : $3,2 \pm 1,2$ % vs $2,1 \pm 0,6$ %, $p = 0,034$ et $2,6 \pm 0,6$ % vs $1,8 \pm 0,4$ %, $p < 0,001$; pour le groupe oACM CSMh : $3,8 \pm 2,1$ % vs $2,4 \pm 0,7$ %, $p = 0,022$ et $2,9 \pm 1,3$ % vs $1,6 \pm 0,5$ %, $p < 0,001$).

La surface individuelle des vaisseaux était également plus importante dans le cortex lésé que dans le cortex controlatéral pour ces deux groupes (oACM PBS : $213,1 \pm 27,8$ μm^2 vs $174,1 \pm 44,6$ μm^2 , $p = 0,048$; et oACM CSMh : $204,0 \pm 96,1$ μm^2 vs $144,9 \pm 63,4$ μm^2 , $p = 0,018$). Aucune différence n'a été observée entre les striatum lésé et controlatéral (oACM PBS : $182,0 \pm 28,7$ μm^2 vs $203,2 \pm 46,3$ μm^2 ; et oACM CSMh : $168,2 \pm 92,8$ μm^2 vs $145,5 \pm 59,6$ μm^2).

Nous n'avons pas observé d'effets de l'injection IC de CSMh après l'ischémie cérébrale (pas de différence de surface vasculaire ou de surface individuelle des vaisseaux entre les groupes oACM PBS et oACM CSMh) (**Figure 52**).

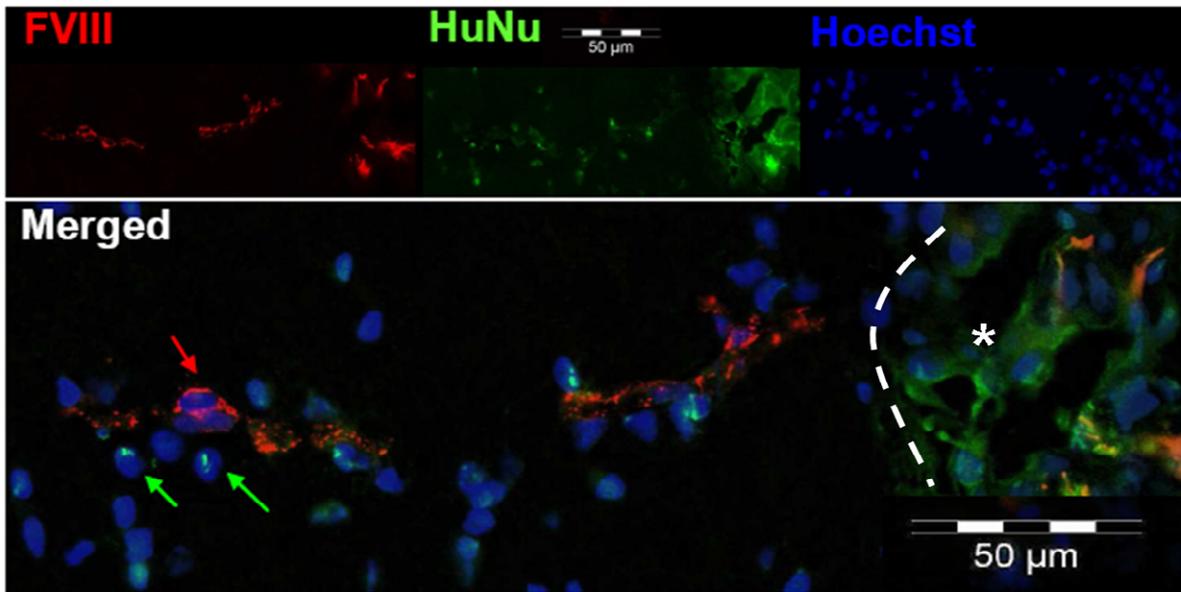
Aucune modification vasculaire histologique n'a été observée après l'injection IC de PBS ou de CSMh dans un cerveau sain (groupes contrôle PBS et groupes contrôle CSMh) (**Figure 52**).

Figure 52. Histologie effectuée après 3 semaines de suivi. Aucun effet de l'injection intracérébrale de CSMh n'a été observé sur le cerveau sain (groupes contrôles CSMh et PBS) ou après une ischémie cérébrale (groupes oACM CSMh et PBS). On note au sein de la lésion (oACM) des microvaisseaux nombreux et dilatés. Marquage des cellules endothéliales par l'anticorps anti-RecA. Les histogrammes rapportent l'analyse quantitative des surfaces vasculaires (% de surface occupé par le marquage RecA) et la surface individuelle moyenne des vaisseaux (μm^2).



Nous avons observé la présence de cellules humaines dans l'hémisphère lésé et en moindre quantité dans l'hémisphère controlatéral (groupe oACM CSMh). Ces cellules humaines (CSMh ou cellules dérivées) semblaient se localiser préférentiellement le long des ventricules et autour des vaisseaux (**Figure 53**). Nous avons identifié de rares colocalisations du marquage du facteur VIII et du marquage HuNu suggérant une différenciation de quelques CSMh en cellules endothéliales.

Figure 53. Double marquage des cellules endothéliales (facteur VIII, en rouge) et des cellules humaines (HuNu, en vert). Les cellules humaines ont été visualisées particulièrement le long des ventricules (* : zone périventriculaire) et autour des vaisseaux (flèches).



VII.3. Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que : 1) l'IRM est une méthode utilisable pour évaluer et suivre les paramètres microvasculaires *in vivo*, 2) par cette méthode, nous avons pu confirmer l'évolution de ces paramètres après une ischémie cérébrale focale à savoir une augmentation progressive du VSC et de l'ITV au sein de la lésion avec un maximum 9 jours après l'ischémie, 3) nous avons pu identifier les effets de l'injection IC de CSMh à la phase subaiguë (8 jours après l'ischémie) : absence d'augmentation du VSC et de l'ITV au sein de l'infarctus et de l'hémisphère sain à J9 (soit le lendemain de la greffe) avec une augmentation retardée de l'ITV de J9 à J14, absence de décroissance ultérieure du VSC, 4) l'histologie à l'issue du suivi de 3 semaines n'a pas permis d'identifier un effet microvasculaire de la greffe de CSMh, soulignant la nécessité d'effectuer des études histologiques plus précoces et tout au long du suivi.

Nos résultats sur l'évolution de la microvascularisation après l'ischémie cérébrale focale sont conformes à ceux rapportés dans la littérature. Il a été montré que le VSC augmente du 3^{ème} au 14^{ème} jour post-ischémie et que la taille des vaisseaux augmente du 1^{er} au 3^{ème} jour, suggérant la mise en jeu initiale d'une circulation collatérale suivie d'une angiogenèse active

(Lin *et al.*, 2008). Nos résultats confirment ces données sur l'augmentation du VSC dans la lésion jusqu'au 9^{ème} jour. Nous n'avons pas étudié ici la phase précoce (premiers jours).

Les modifications de VSC et de l'ITV induites précocément par l'injection IC de CSMh à la phase subaiguë suggèrent une limitation de la vasodilatation et/ou de l'angiogenèse post-ischémique à J9. Cela pourrait participer à l'effet bénéfique des CSMh puisque la vasodilatation et l'œdème secondaire peuvent aggraver la lésion ischémique (Dirnagl *et al.*, 1999). Cette vasodilatation réactionnelle après l'ischémie serait corrélée à l'afflux de macrophages dès les premiers jours aggravant les lésions nécrotiques. L'injection de CSMh, en limitant l'augmentation de VSC local, pourrait diminuer l'afflux de macrophages et de leucocytes et ainsi limiter la nécrose. Cet effet serait additionnel à l'effet immunomodulateur propre des CSMh (Aggarwal & Pittenger, 2005 ; Chamberlain *et al.*, 2007).

Après cet effet très précoce (24 heures après l'injection) « protecteur », et malgré le fait que peu de CSMh greffées survivent au sein du parenchyme, celles-ci pourraient avoir un effet plus prolongé sur la microvascularisation par la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques. Comme nous l'avons discuté précédemment, les CSMh sécrètent ou favorisent la sécrétion endogène de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, Ang-1...) (Chen *et al.*, 2003^a ; Onda *et al.*, 2008). Peu d'études ont quantifié ces facteurs et aucune étude n'a été menée au-delà de 14 jours de suivi. Cet effet « pro-angiogénique » pourrait expliquer le maintien du VSC durant au moins 3 semaines (sans la diminution de VSC observée dans le groupe non traité) par le biais d'une angiogenèse efficace et prolongée.

Soulignant l'importance probable d'une niche « neuro-vasculaire », nous avons observé une localisation préférentielle des cellules greffées dans la zone sous-ventriculaire connue pour être le lieu privilégié du couplage entre angiogenèse et neurogenèse (Ohab *et al.*, 2006). De plus, les cellules humaines (CSMh greffées ou cellules dérivées) semblent regroupées autour des vaisseaux suggérant un lien actif avec ceux-ci.

Pour préciser la chronologie de ces mécanismes (vasodilatation puis angiogenèse), il conviendrait de compléter notre étude d'IRM *in vivo* par un suivi histologique (notamment pour les temps précoces après la greffe) et par la quantification répétée des facteurs pro-angiogéniques.

VII.4. Conclusion

Nous avons montré ici que l'IRM est une méthode utilisable et reproductible pour suivre les paramètres microvasculaires *in vivo*. Nous avons observé un effet précoce de l'injection IC de CSMh à la phase subaiguë de l'ischémie cérébrale limitant la vasodilatation post-ischémique habituelle. Cet effet initial pourrait être suivi par un effet pro-angiogénique bénéfique plus prolongé. Un suivi histologique ainsi que le dosage des facteurs angiogéniques (notamment aux temps précoces après la greffe) devront être effectués pour préciser ces mécanismes microvasculaires et leur couplage probable à la neurogenèse endogène.

VIII. MISE EN PLACE D'UN ESSAI CLINIQUE DE THERAPIE CELLULAIRE APRES AVC

Comme nous l'avons décrit, la thérapie cellulaire par CSMh entraîne un bénéfice sur la récupération fonctionnelle dans des modèles d'ischémie cérébrale expérimentale. Cependant, la transposition de ce traitement à l'homme est restée à ce jour limitée à des études pilotes avec de faibles effectifs et des limitations méthodologiques importantes (Bang *et al.*, 2005 ; Mendonca *et al.*, 2006). Ainsi, le délai, la voie optimale d'administration de la greffe ainsi que la source cellulaire à utiliser restent encore très controversés. Parmi les différentes sources cellulaires, les CSMh issues de moelle osseuse ont l'avantage d'être ni tumorales ni immunogènes, et peuvent être utilisées en condition autologue après un AVC. Les nombreuses études expérimentales menées chez l'animal n'ont pas rapporté d'effet indésirable des CSMh quelle que soient la voie d'administration choisie ou la pathologie étudiées. L'ensemble de notre travail expérimental et l'expertise locale ont permis de mettre en place un essai clinique innovant de tolérance et de faisabilité de l'injection IV de CSM autologues après un infarctus cérébral chez l'homme.

Le protocole ISIS « Thérapie cellulaire par injection intraveineuse de cellules souches mésoenchymateuses autologues après accident vasculaire cérébral » mis en place au CHU de Grenoble sera mené en situation de greffe autologue ce qui permet d'éviter un rejet potentiel et de ne pas utiliser de traitement immunosuppresseur. Il n'existe pas, dans ces conditions autologues, de risque de transmission d'agent pathogène lié au produit cellulaire de départ.

En l'absence d'études cliniques suffisantes et bien que cette thérapie cellulaire soit réalisée dans des conditions strictes et réglementées, elle peut présenter des risques :

- liés au prélèvement de moelle osseuse : le risque d'hématome au point de ponction est minimisé par une compression manuelle immédiate et la mise en place d'un pansement compressif.

- liés à la réalisation de l'injection des cellules : accidents thromboemboliques veineux, oedème pulmonaire, accident thromboembolique artériel, sepsis, cancer, hémopathie, syndrome dysimmunitaire.

Ces risques potentiels sont l'objet de l'essai de faisabilité et de tolérance (phase II) décrit ici. L'hypothèse principale sous tendant cet essai est que la thérapie cellulaire par CSMh autologues puisse avoir un effet bénéfique sur la récupération fonctionnelle et sur le handicap après un AVC récent.

Cet essai clinique a obtenu un financement partiel dans le cadre de la campagne PHRC 2007 et de l'appel d'offre INSERM/DHOS « Recherche clinique translationnelle » 2007.

Il a été autorisé par l'Afssaps (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) le 28/09/2009 et par le Comité de Protection des Personnes (CPP Sud-Est V) le 7/10/2009. Il est répertorié sur *clinicaltrials.gov* (n° NCT00875654). Cet essai débutera en 2010 pour une durée d'inclusion de deux ans avec une durée totale de 4 ans. Nous en rapportons ici uniquement un résumé général.

VIII.1. Objectifs et critères de jugement

VIII.1.1. Objectif principal

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la faisabilité et la tolérance de l'injection IV de CSM autologues chez des patients ayant présenté un infarctus carotidien récent et qui gardent un déficit neurologique sévère. Les critères de jugement de cet objectif principal sont :

- La faisabilité de la procédure de thérapie cellulaire sera évaluée par l'inclusion et le suivi de 30 patients (20 greffés *vs* 10 contrôles), la réalisation du prélèvement de moelle osseuse, la production de CSMh, la réalisation dans les délais de l'injection IV des CSM autologues dans l'UNV.

- La tolérance de la procédure de thérapie cellulaire sera évaluée par les complications liées au prélèvement de moelle, les données de l'examen clinique général au cours du suivi de chaque patient, l'aggravation du déficit neurologique lié à l'AVC initial, la survenue d'un nouvel AVC (sachant qu'il existe 5% de récurrences par an dans l'histoire naturelle des AVC), les complications neurologiques non-vasculaires cliniques ou IRM, les complications non neurologiques, la mortalité.

VIII.1.1. Objectifs secondaires

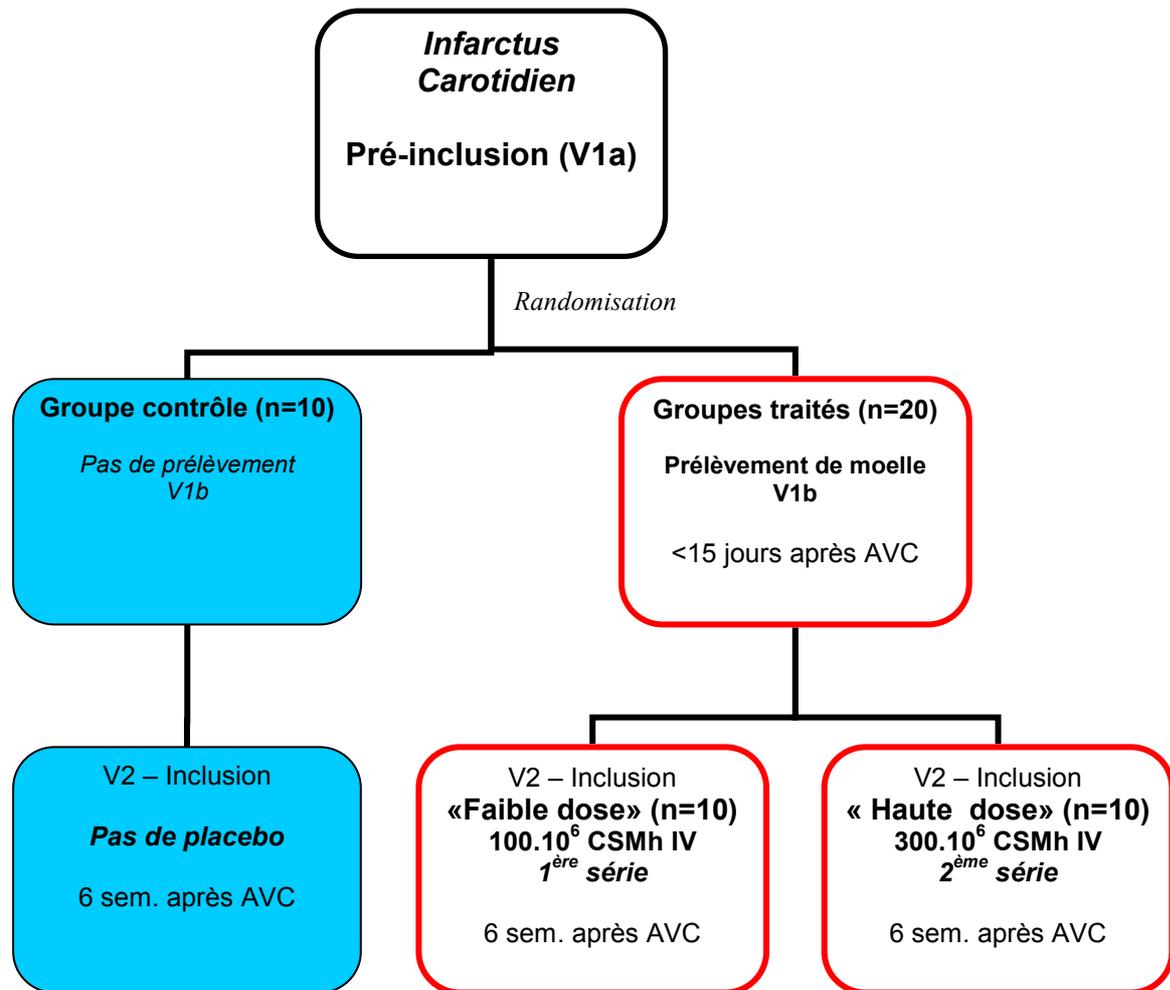
Les objectifs secondaires sont de rechercher un effet dose et définir la dose de CSM la plus efficace, et d'évaluer l'efficacité de la thérapie cellulaire : amélioration du déficit et du handicap secondaire à l'AVC (scores neurologiques évaluant la sévérité du déficit : NIHSS, National Institute of Health Stroke Scale ; l'autonomie : index de Barthel ; le handicap : score de Rankin modifié ; échelle d'anxiété et de dépression ; score de Fugl-Meyer coté par un kinésithérapeute ; évaluation neuropsychologique ; volume lésionnel mesuré par IRM ; IRM fonctionnelle pour identifier les schémas d'activation associés à la récupération). Ces objectifs secondaires permettront de définir les meilleurs critères intermédiaires d'efficacité pour un futur essai de phase 2b ou 3 et la meilleure population cible.

VIII.2. Méthodologie

- Etude thérapeutique pilote, multicentrique (CHU de Grenoble, CH de Chambéry, CH d'Annecy) de faisabilité et de tolérance (phase IIa).
- Essai contrôlé, ouvert, en aveugle sur les critères d'efficacité.
- Essai en 3 groupes parallèles avec recherche de dose ($100 \cdot 10^6$ ou $300 \cdot 10^6$ CSM autologues vs contrôle), randomisé.

Trente patients, de 18 à 65 ans, seront inclus dans les 14 jours suivant un infarctus cérébral avec un déficit persistant. Le prélèvement de moelle osseuse sera alors effectué et l'injection des CSM autologues sera réalisée 6 semaines après l'AVC (soit après environ 4 semaines de culture cellulaire).

Le schéma expérimental est le suivant :



Visites de suivi (V3, V4, V5)
Clinique / Examens biologiques simples / IRM à V3 (15j après la greffe)

Visite « principale » (V6) : 6 mois après la greffe
Examineur « aveugle »
Clinique / Bilan kinésithérapique / Bilan neuropsychologique
IRM / Examens biologiques complets (avec immunologie)

Visite de suivi (V7) 1 an après la greffe (*idem V4, V5*)

Visite « principale » (V8) : 2 ans après la greffe
Examineur « aveugle »
Clinique / Bilan kinésithérapique / Bilan neuropsychologique
IRM / Examens biologiques complets (avec immunologie)

* **Choix de la voie d'administration :**

Comme nous l'avons vu précédemment dans les études de thérapie cellulaire chez l'animal après ischémie cérébrale, des effets fonctionnels bénéfiques ont été observés que l'administration des cellules se fasse par voie IC, IV ou intra-artérielle. En terme de bénéfice attendu, il n'existe aucun argument aujourd'hui pour privilégier l'une de ces voies (Jin *et al.*, 2005). Dans nos essais précliniques de biodistribution (voir 4.2.2. *Pharmacocinétique*), nous avons montré que les CSM injectées par voie IV migrent vers la lésion cérébrale. De plus, l'administration IC, très invasive pour un essai clinique pilote, pourrait induire des lésions cérébrales dysplasiques avec des zones de neurogenèse ectopique (notamment hippocampique) à l'origine de crises d'épilepsie. Il semble donc logique de choisir, pour cette étude, la voie d'injection la moins invasive c'est-à-dire la voie IV sur veine périphérique.

* **Choix des doses étudiées :**

Dans l'étude sur la greffe IV de CSM après ischémie cérébrale chez le rat, Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2001^b) ont montré un effet dose avec un bénéfice fonctionnel non significatif après l'injection de 1.10^6 CSM devenant significatif avec 3.10^6 CSM. Ces résultats nous conduisent, dans ce premier essai chez l'homme, à proposer deux doses de cellules greffées : 100.10^6 et 300.10^6 CSM afin d'évaluer la tolérance et l'efficacité potentielle en fonction de la dose. La dose « faible » de 100.10^6 CSM a été choisie en référence à la seule étude chez l'homme après un infarctus cérébral où la dose utilisée était de 100.10^6 CSM administrées par voie IV (Bang *et al.*, 2005). Devant la bonne tolérance de la thérapie cellulaire dans cet essai pilote, il a été choisi une « haute dose » trois fois plus élevée (300.10^6 CSM) dans les mêmes proportions (environ 4.10^6 CSM /kg) que celles suggérées par les travaux de Chen *et al.* rapportant l'effet dose (Chen *et al.*, 2001^b). Il est cependant difficile de transposer directement en clinique les doses utilisées chez le rat. En effet, les rapports masse de cerveau / masse corporelle totale sont plus élevées chez le rat (rat : $2/300$ g = 0,67% vs homme : $1,4/70$ kg = 0,2%), et la densité neuronale du cerveau du rat est supérieure à celle du cerveau humain (73000 vs 20000 /mm³). C'est pourquoi nous nous sommes référés à la littérature chez l'homme pour choisir la posologie évaluée dans cet essai.

En dehors du cadre de la neurologie, des essais cliniques ont été effectués avec des doses comparables. Utilisant le potentiel immunomodulateur des CSM (Le Blanc & Ringdén, 2007 ; Plumas *et al.*, 2005 ; Sudres *et al.*, 2006), des essais cliniques de cotransplantation de CSM et de cellules souches hématopoïétiques allogéniques ont montré une bonne tolérance de la procédure et une limitation de la réaction du greffon contre l'hôte (Le Blanc *et al.*, 2007).

Dans une étude de phase 2 récente sur l'utilisation des CSM pour le traitement de la réaction du greffon contre l'hôte (Le Blanc *et al.*, 2008), 55 patients ont été traités par injection de $1,4 \cdot 10^6$ CSM/kg ($0,4$ à $9 \cdot 10^6$). Ces doses de CSM injectées par voie systémique correspondent aux doses proposées dans notre protocole. Aucun effet indésirable n'a été rapporté lors du suivi et plus de la moitié des patients ont répondu favorablement au traitement que le donneur soit ou non HLA compatible.

Dans toutes nos études expérimentales présentées ici, comme dans les études publiées, la tolérance locale et générale a été bonne. Il n'a jamais été rapporté d'infection, de zone inflammatoire, ou de tumeur. Il n'a pas été observé non plus de douleur particulière lors des injections.

VIII.3. Critères d'inclusion

Seront proposés pour l'étude les sujets répondant à chacun des critères suivants :

- Patients âgés de 18 à 65 ans.
- Infarctus du territoire carotidien droit ou gauche survenu dans les 14 jours confirmé par IRM.
- Déficit neurologique modéré à sévère (NIHSS ≥ 11) persistant à la visite d'inclusion définitive et d'injection de CSM pour le groupe traité (6 semaines post-AVC).
- Traitement médical optimal.
- Etat général compatible avec le suivi d'un programme de rééducation fonctionnelle.

VIII.4. Critères de non inclusion

Ne pourront pas être inclus les sujets répondant à au moins un des critères suivants :

- AVC étendu mettant en jeu le pronostic vital.
- Déficit neurologique très sévère persistant (NIHSS > 24).
- Antécédent de pathologie neurologique avec déficit séquellaire.
- Maladie psychiatrique grave.
- Infarctus du myocarde datant de moins de 3 mois.
- Maladie thrombo-embolique récidivante ou datant de moins de 6 mois.
- Patient transplanté d'organe.
- Antécédent d'infection par le VIH, HTLV, d'hépatites B ou C.

- Traitement immunosuppresseur / immunomodulateur en cours.
- Antécédent de cancer et/ou de chimiothérapie.
- Insuffisance rénale chronique avérée.
- Insuffisance hépatique avérée.
- Toute pathologie mettant en jeu le pronostic vital dans les 3 mois suivant.
- Femme enceinte, parturiente, mère qui allaite.

VIII.5. Données sur le produit de santé testé

Toutes les étapes conduisant à la préparation des CSM se dérouleront telles que décrites dans le dossier technique approuvé par l’Afssaps. L’ensemble du procédé répondra aux règles de bonne pratique. Chacune des étapes du procédé sera tracé dans le système qualité du laboratoire. Les renseignements relatifs au laboratoire de préparation du produit de thérapie cellulaire ont déjà été fournis pour les dossiers de demande d’autorisation (Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, EFS Rhône-Alpes, MJ. Richard).

* Description du matériel cellulaire de départ :

Aucune transformation du matériel de départ n’est envisagée. Les cellules seront mises en culture directement. Les cellules médullaires nucléées totales seront numérées par méthode manuelle en hémocytomètre après lyse des globules rouges. La viabilité des cellules sera estimée après coloration au bleu trypan.

* Renseignements pharmaceutiques et biologiques :

Les cellules injectées sont des CSM autologues amplifiées par culture *in vitro*. Les CSM obtenues par adhérence puis amplification des cellules progénitrices contenues dans le stroma médullaire, ont pour caractéristiques :

- Absence de marqueurs hématopoïétiques (CD45, CD34...).
- Expression des marqueurs spécifiques des CSM : CD90, CD73, CD105 (CD49a, CD147, CD164, CD166).
- Capacité à former des colonies lorsque les cellules sont cultivées à faible densité.
- Capacité à se différencier sous l’action d’inducteurs spécifiques en ostéoblastes, en chondrocytes, en adipocytes.

La durée totale de culture n'excède pas 28 jours (14 à 17 jours pour le passage 0 ou P0, 9 à 11 pour le passage 1 ou P1).

Concernant la carcinogénicité des cellules, les CSM produites n'expriment pas la télomérase. L'expression de cette enzyme sera étudiée par RT-PCR sur chaque lot. Nous avons vérifié la longueur des télomères sur les cellules produites selon le procédé de la SFGM-TC. Les tailles des télomères, observées pour les CSM obtenues vont de 10 à 13 Kb et sont inférieures à celles observées pour les cellules tumorales (20 Kb). Notons que l'âge du donneur influe sur la taille des télomères des CSM obtenues. De plus, dans nos expériences, aucun clone n'a été mis en évidence par le test agar.

In vivo, dans nos études expérimentales présentées ici, il n'a jamais été observé de formation tumorale lors des autopsies, notamment au niveau cérébral après une greffe de CSMh. Dans un essai de carcinogénicité, nous avons réalisés des injections uniques de CSMh à des rats Nude (immunodéprimés) : 3 par voie sous-cutanée (10^6 CSMh), 3 par voie IC ($4 \cdot 10^5$ CSMh). Ces animaux greffés ont été comparés à 3 rats Nude non-traités, sur une période de 7 semaines. Lors du suivi par IRM cérébrale et lors des autopsies complètes, il n'a jamais été retrouvé de tumeur notamment au niveau des sites d'injections. Nous n'avons pas observé de surmortalité ou d'effet indésirable liés à ces administrations uniques de CSMh. Ces résultats bien qu'encourageants restent à confirmer sur des effectifs plus importants avec un suivi plus prolongé.

VIII.6. Analyse statistique

* Calcul du nombre de sujets :

C'est une étude pilote de faisabilité et tolérance pour lequel le taux d'échec de l'ensemble de la procédure évaluée par le critère de jugement principal n'est pas connu. Il n'est donc pas possible d'effectuer a priori un calcul d'effectif. Pour ce premier essai, nous avons choisi de comparer 3 groupes de 10 patients (n=30).

* Stratégie d'analyse des données :

En collaboration avec le Centre d'Investigation Clinique (CIC-INSERM 003) du CHU de Grenoble, nous conduirons l'analyse en intention de traiter et si nécessaire en post-hoc. Les données de suivi seront analysées sans imputation de données manquantes (perdus de vue, décès...). L'analyse statistique comprendra des statistiques descriptives des groupes et des comparaisons de groupe (contrôle vs traités, puis de recherche de relation dose-effet). Les

tests utilisés seront les tests classiques de comparaison de proportions et de moyenne adaptés à la répartition des populations (Fisher exact, Qui 2, Student, Mann Whitney, Friedman, ANOVA à mesure répétée...).

VIII.8. Faisabilité de l'étude

Le projet proposé s'intègre parfaitement au projet médical d'établissement du CHU de Grenoble et est en accord avec le SROS 2006-2010 dans lequel les AVC sont une des priorités sanitaires. Il est aujourd'hui indispensable de proposer des projets d'innovation thérapeutique dans cette maladie. Le projet que nous souhaitons mener est réalisable au CHU de Grenoble et dans les formations INSERM associées. En effet, sur le même site hospitalier se regroupent toutes les formations compétentes pour un essai de thérapie cellulaire dans l'AVC, de manière parallèle expérimentalement chez l'animal et cliniquement chez l'homme. Cette spécificité du CHU de Grenoble est tout à fait exceptionnelle en France et conforte la faisabilité de cet essai en collaboration avec le CIC du CHU de Grenoble.

* **L'UNV** aura en charge la coordination de l'essai. Les neurologues de cette équipe assureront le recrutement et le suivi des sujets. Avec 250 patients jeunes hospitalisés par an (sur un total de 1200 AVC par an hospitalisés au CHU dont 500 dans l'UNV), l'inclusion de 30 sujets pour cette étude est faisable. Un recrutement sur l'ensemble de la région Rhône-Alpes sera effectué par les UNV des CH de Chambéry et d'Annecy. La centralisation de la prise en charge spécialisée dans l'UNV assure une homogénéité du suivi et des traitements pour les différents groupes étudiés.

L'insertion de l'unité neurovasculaire dans l'INSERM et la conduite de travaux communs remonte à 1996 (U 438 M. Décorps) alors que le modèle d'ischémie expérimental murin et son suivi multiparamétrique en IRM existaient déjà. La thèse présentée ici et la continuité de travaux sur cette thématique au sein du Grenoble Institut des Neurosciences (INSERM U836 UJF-CEA-CHU) assurent une cohésion entre le développement de l'essai clinique ISIS et la recherche locale en neurologie vasculaire expérimentale.

* **Le service d'Onco-Hématologie** (CE. Bulabois, JY. Cahn) effectuera les prélèvements de moelle osseuse selon les procédures couramment utilisées.

* **L'UMTCT** (EFS Rhône-Alpes, MJ. Richard) assure les cultures cellulaires selon les procédures réglementaires. Tous les procédés de production décrits ci-dessus sont déjà opérationnels.

* **L'unité IRM / Neuroradiologie** (JF. Le Bas, S. Grand) assure actuellement des examens par IRM pour 90% des patients hospitalisés dans l'UNV. L'unité d'IRM est associée à l'IFR 1 (JF. Le Bas).

* **Le service de Médecine Physique et Réadaptation neurologique** (D. Perennou) assurera la rééducation des sujets de cette étude. Ce service est en lien logique avec l'UNV au sein d'une filière bien identifiée.

VIII.9. Perspectives et retombées attendues

*** Bénéfice pour les patients de l'étude :**

Les patients inclus dans cette étude bénéficieront d'un suivi neurologique, neuropsychologique et d'imagerie particulièrement poussé. En outre, dans l'hypothèse d'un effet bénéfique de l'administration de CSM, on peut espérer réduire le handicap et améliorer l'autonomie des patients traités dans cette étude.

*** Améliorer les connaissances scientifiques :**

La thérapie cellulaire émerge comme une innovation thérapeutique majeure en médecine. L'évaluation des différentes techniques de greffe cellulaire par des essais cliniques fiables est indispensable. Le projet proposé, en parallèle des travaux expérimentaux chez l'animal, est tout à fait original. Par l'aller-retour entre le laboratoire et la clinique, nous différons des plans de développement habituels qui sont linéaires (expérimentation en laboratoire puis essai clinique) et espérons aller plus rapidement dans le développement des connaissances (doses, modalité d'injection, délai, modes d'action...) et permettre de préparer de futurs essais cliniques sur des bases solides. Sous réserve des résultats de cette étude, un essai plus large de phase 3 multicentrique sera envisagé en collaboration avec d'autres centres. Au niveau de la population générale, la thérapie cellulaire pourrait être très prometteuse pour limiter le handicap et améliorer l'autonomie des patients ayant présenté un AVC. Elle pourrait ainsi permettre de limiter le coût important de cette pathologie, justifiant ainsi le surcoût de ce traitement et de son évaluation.

IX. DISCUSSION GENERALE

Dans nos travaux présentés ici, nous avons montré, après un infarctus cérébral, une bonne tolérance et un bénéfice fonctionnel de l'injection IC (à la phase aiguë) et IV (à la phase subaiguë) de CSMh de grade clinique, source cellulaire bien caractérisée. L'utilisation de CSMh chez le rat a déjà été effectuée avec succès que ce soit par voie IC, IV ou IA. A notre connaissance, seules des injections précoces à la phase aiguë de l'ischémie ont été effectuées, exceptée une étude qui a montré le bénéfice de l'injection IV de CSM murines à la phase subaiguë soit 7 jours après une ischémie cérébrale (Chen *et al.*, 2001^b). Nous avons principalement axé nos travaux précliniques sur l'injection IV de CSMh à la phase subaiguë. Le choix de la voie IV et de l'injection à la phase subaiguë a été fait en tenant compte des contraintes inhérentes à l'utilisation clinique en condition autologue des CSMh : une voie d'injection la moins invasive possible et un délai de culture « *ex vivo* » incompressible. Dans ces conditions (injection IV à la phase subaiguë), nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans les études de thérapie cellulaire à la phase aiguë. De manière générale, il semble que les CSMh, administrées à la phase aiguë ou subaiguë, soient bénéfiques, sans effet (ou un effet mineur) sur le volume lésionnel macroscopique, avec une survie des cellules greffées et une différenciation très faibles ne pouvant expliquer à elles seules le bénéfice observé.

En raison de faibles effectifs dans les essais expérimentaux, dus à des protocoles complexes multiparamétriques (modèle d'ischémie, suivi comportemental, suivi IRM...), les résultats rapportés, bien qu'encourageants, manquent de puissance statistique. Dans nos travaux, nous nous sommes de plus limités à un seul modèle d'ischémie sur une même souche de rat, ce qui est une approche encore trop partielle dans un essai préclinique. L'expérimentation sur des animaux plus gros tels que le chien (Chung *et al.*, 2009), le miniporc ou encore le singe semble intéressante. Le tissu cérébral de ces animaux contient, en effet, plus de substance blanche que celui des rongeurs et, selon les espèces, le cortex présente une gyrocéphalie plus proche de celle de l'homme. Cependant ce type d'essai, lourd à mettre en place, avec de petits effectifs (donc des résultats statistiques peu significatifs), pose des problèmes éthiques plus importants que les essais chez le rongeur.

Au-delà de l'effet fonctionnel des CSM décrit ci-dessus, nous avons également montré l'innocuité du marquage des CSMh par M-SPIO pour l'IRM cellulaire et la microscopie. Ce marquage cellulaire est utile pour détecter et suivre au long cours par IRM des cellules

greffées au sein du cerveau (durant au moins 15 jours), mais il nous a paru insuffisant dans le cadre d'une injection IV. L'imagerie nucléaire, plus sensible que l'IRM, semble une bonne méthode de suivi cellulaire après une injection systémique mais reste limitée dans le temps en raison de la décroissance radioactive des radiomarqueurs. Notre étude de biodistribution par imagerie nucléaire a permis d'identifier l'attraction rapide (< 24 heures) des CSMh vers l'infarctus cérébral et ce après une injection IV à la phase subaiguë. Cependant, nous avons observé que, en dépit de cette « attraction » active, peu de CSMh injectées sont retrouvées dans le cerveau (1 / 10 000 dans l'hémisphère lésé correspondant à 300 cellules pour 3×10^6 CSMh injectées).

Concernant les mécanismes d'action des CSMh, nous avons observé *in vivo* un effet microvasculaire précoce de l'injection IC de CSMh effectuée à la phase subaiguë. De plus, nous avons débuté une étude par IRM *in vivo* pour caractériser les effets des CSMh sur l'inflammation post-ischémique en collaboration avec M. Wiart (CREATIS, Lyon) (Wiart *et al.*, 2007).

En histologie, nous avons pu identifier la survie prolongée, durant plusieurs semaines, de CSMh (et/ou cellules dérivées) tant après une injection IC qu'IV. Malgré nos conditions expérimentales de xéno greffe (homme sur rat) et sans immunosuppresseur, nous n'avons pas observé de réaction inflammatoire de rejet notamment aux sites d'injection. Cela est en accord avec l'idée générale du potentiel immunomodulateur des CSM (cellules n'exprimant pas le complexe HLA). Cependant, ce point reste encore controversé avec des études rapportant des réactions immunitaires à l'injection de CSM allogéniques (Zangi *et al.*, 2009). Les travaux en cours, dont notre étude sur les effets des CSMh sur l'inflammation post-ischémique, devraient permettre de préciser ces points essentiels pour le développement clinique ultérieur de thérapies cellulaires allogéniques voire xénogéniques.

Certaines des cellules survivantes observées en histologie (CSM ou cellules dérivées) semblent capables de se différencier en astrocytes, en cellules endothéliales et en neurones. Cependant leur taux de différenciation est très faible et ne peut à lui seul expliquer le bénéfice fonctionnel observé. Comprendre les autres mécanismes d'action sur le tissu cérébral de cellules greffées, entre autres des CSM, permettra à l'avenir d'optimiser la thérapie cellulaire comme traitement de l'AVC.

IX.1. Comprendre les mécanismes d'action de la thérapie cellulaire

Comme nous l'avons vu tout au long de ce travail, les effets des CSM sur le tissu cérébral lésé par une ischémie sont loin d'être limités à la seule différenciation directe de cellules souches exogènes en cellules d'intérêt comme les neurones. La restauration cellulaire par les CSM inclut une restauration neurale mais également gliale et endothéliale. Dans le cadre de l'ischémie cérébrale, l'interaction des progéniteurs neuraux avec les cellules gliales et le remodelage microvasculaire (Liu *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2009), la formation de « niches » neurovasculaires comme lieux privilégiés de restauration tissulaire, la genèse d'interneurones permettant des connexions locales, la restructuration de la substance blanche (myéline et axones) (Zhang & Chopp, 2009), l'activation ciblée de la microglie et l'immunomodulation, sont autant de phénomènes « naturels » sur lesquels la thérapie cellulaire pourrait avoir un effet bénéfique. Favoriser ces mécanismes de restauration ne passe pas forcément par la persistance, à long terme, de cellules greffées au sein de la lésion. Un effet « trophique » initial, tel que nous l'avons observé sur la microvascularisation le lendemain de la greffe IC de CSMh, pourrait déclencher une cascade d'évènements conduisant à une neurogenèse endogène efficace et prolongée.

Un autre mécanisme d'action, qui méritera de l'attention à l'avenir, est la fusion cellulaire possible des CSM greffées avec des neurones. Un tel phénomène de fusion cellulaire spontanée (sans transdifférenciation) a été rapporté entre des cellules de moelle osseuse exogènes et des progéniteurs neuraux ou des neurones de Purkinje (Alvarez-Dolado *et al.*, 2003 ; Alvarez-Dolado, 2007). Cela n'a pas encore été exploré dans le cadre de l'ischémie cérébrale.

La compréhension de l'ensemble de ces mécanismes devrait permettre d'optimiser à l'avenir la thérapie cellulaire après un AVC en précisant la cible du traitement. Ainsi, des cogreffes de cellules souches avec des facteurs de croissance tels que le GCSF (Granulocyte colony stimulating factor) (Todo *et al.*, 2008 ; Toth *et al.*, 2008), des facteurs proangiogéniques (VEGF, Ang-1...), de l'érythropoïétine (Esneault *et al.*, 2008 ; Minnerup *et al.*, 2009) pourraient avoir un intérêt thérapeutique. L'utilisation de cellules génétiquement modifiées, comme les CSM surexprimant le VEGF, l'Ang-1 ou le BDNF pose aujourd'hui un problème de sécurité du produit cellulaire après une transfection virale, pour le transfert clinique.

En parallèle, la compréhension des mécanismes d'action et du devenir au long cours des cellules greffées permettra d'identifier certains risques de la thérapie cellulaire comme la

localisation ectopique d'une greffe, le développement induit d'une plasticité anormale comme cela a pu être identifié dans la moelle épinière (Hofstetter *et al.*, 2005), voire la formation de lésions tumorales insidieuses à partir de rares cellules souches quiescentes.

Malgré ces questions fondamentales en suspens, il semble tout à fait possible aujourd'hui de débiter des essais cliniques de tolérance et de faisabilité de la thérapie cellulaire dans le cadre de l'AVC (Borlongan, 2009). Cependant ceux-ci devront absolument être menés en parallèle d'études expérimentales chez l'animal pour optimiser le traitement et répondre aux interrogations soulevées ci-dessus.

IX.2. Optimiser la thérapie cellulaire après un AVC

Le délai, la voie optimale d'administration des cellules ainsi que la source cellulaire à utiliser restent encore très controversés dans le cadre du traitement des AVC (Modo *et al.*, 2002 ; Wechsler, 2009).

Concernant le délai, il semble que l'administration de CSM soit aussi bénéfique à la phase aiguë que subaiguë notamment par voie IV (Chen *et al.*, 2001^b). L'effet de l'injection IV à un temps plus tardif (1 mois) reste controversé avec une étude montrant un bénéfice fonctionnel (Shen *et al.*, 2007^b) et une autre étude récente ne montrant aucun effet (contrairement à l'injection IV au premier jour) (De Vasconcelos Dos Santos *et al.*, 2010). Il semble que la phase aiguë ou subaiguë de l'infarctus constitue une fenêtre thérapeutique rationnelle dans laquelle il existe encore des phénomènes actifs de plasticité cérébrale.

Concernant la voie d'administration, il n'existe pas actuellement d'argument formel sur la meilleure voie d'administration à utiliser. L'injection IV est moins invasive et doit probablement être privilégiée pour les premiers essais cliniques. Elle permet la distribution des cellules dans des zones irriguées potentiellement intéressantes en terme de plasticité post-ischémique. L'injection IA peut procurer une distribution cérébrale plus directe des cellules mais présente un risque authentifié d'occlusion artérielle (Walczak *et al.*, 2008) voire de surmortalité (Li *et al.*, 2009) chez l'animal. L'injection IC nécessite une procédure chirurgicale invasive qui limite pour l'instant son application clinique (Suárez-Monteagudo *et al.*, 2009). Cette voie reste cependant intéressante, comme nous l'avons vu dans nos travaux, pour des essais expérimentaux puisqu'elle permet de s'affranchir de la biodistribution générale des cellules.

Concernant les sources cellulaires, au-delà des cogreffes et des cellules souches modifiées non applicables en clinique pour l'instant, les cellules candidates à une application de médecine régénérative doivent aujourd'hui répondre aux pré-requis suivants :

- une source cellulaire fiable et reproductible,
- une prolifération *ex vivo* compatible avec une amplification dans des délais acceptables, permettant d'éviter (dans le cas de CSM) une diminution d'efficacité sur la neurogenèse après des cultures trop longues (Li *et al.*, 2008).
- une différenciation possible en différents types de cellules d'intérêt (pas de différenciation unique) avec des cellules « filles » restant indifférenciées et assurant un autorenouvellement de la population « mère »,
- la migration possible vers le site de lésion,
- une viabilité *in vivo* prolongée sans rejet immunitaire,
- l'absence de carcinogénicité.

Comme nous l'avons montré dans l'ensemble de ce travail, ces différents pré-requis sont remplis par les CSM qui semblent aujourd'hui une source cellulaire fiable pour débiter des essais cliniques. Nous n'avons étudié ici que les CSMh issues de la moelle osseuse (source fréquemment utilisée en thérapie cellulaire). D'autres tissus, accessibles chez l'adulte, pourraient également permettre l'obtention de CSM : le tissu adipeux (Kubis *et al.*, 2007), le sang périphérique, ou encore le sang menstruel (Borlongan *et al.*, 2009). Ces « tissus » en tant que source de CSM doivent être encore évalués sur leur capacité à fournir des CSM de qualité en quantité suffisante. A l'avenir, les CSM pourraient être différenciées *ex vivo*, pendant la culture, en progéniteurs neuraux qui semblent avoir une efficacité prometteuse après une ischémie cérébrale (Hayase *et al.*, 2009).

D'autres sources que les CSM ont déjà été utilisées dans les études expérimentales et dans les premiers essais cliniques (voir I.3. *Thérapie cellulaire et accident vasculaire cérébral*). Parmi celles-ci, les neurones hNT qui ont été utilisés chez l'homme pourraient avoir un potentiel tumorigène (Newman *et al.*, 2005). Les CMN issues de la moelle osseuse présentent l'intérêt de ne pas nécessiter une amplification *ex vivo* et donc de pouvoir être injectées immédiatement après leur prélèvement. Les essais cliniques débutants utilisant cette source vont ainsi pouvoir évaluer cette thérapie cellulaire à la phase aiguë de l'AVC (Barbosa da Fonseca *et al.*, 2009).

L'utilisation clinique des cellules souches embryonnaires (Seminatore *et al.*, 2010) ou des cellules souches pluripotentes induites (Takahashi *et al.*, 2007) reste pour l'instant impossible dans le cadre de l'AVC en raison d'une tumorigénicité inhérente à leur immortalité. La maîtrise du développement de ces cellules et de leur interaction avec le tissu hôte (Seminatore

et al., 2010) pourrait permettre à l'avenir d'utiliser leur important potentiel régénératif (lié à leur pluripotence) dans des conditions de sécurité acceptables.

Enfin, un développement biotechnologique qui pourrait avoir un intérêt en thérapie cellulaire est la greffe de cellules souches avec une matrice biocompatible. De telles matrices permettent la différenciation de CSM (Wang *et al.*, 2009) et semblent améliorer la restauration tissulaire après un infarctus cérébral (Jin *et al.*, 2009). Ce type de traitement novateur nécessite encore des évaluations expérimentales chez l'animal avant d'envisager une application clinique.

IX.3. Améliorer les essais précliniques de thérapie cellulaire

Pour conclure ce travail, il convient de garder à l'esprit les échecs de la recherche sur les traitements neuroprotecteurs dans le cadre de l'AVC. De nombreuses réflexions se sont engagées pour améliorer la qualité des études précliniques et ainsi assurer le maximum de chance de succès à l'application clinique. La complexité de la thérapie cellulaire après un AVC (Savitz, 2009) nécessite une collaboration étroite entre chercheurs et cliniciens pour développer en parallèle des études expérimentales de qualité et les premiers essais cliniques (Borlongan *et al.*, 2008 ; Borlongan, 2009). Certaines règles ont été proposées (STEPS, 2009) pour améliorer les études précliniques de thérapie cellulaire après un AVC :

- L'hétérogénéité des AVC chez l'homme nécessite l'utilisation d'au moins deux modèles d'ischémie focale sur différentes souches de rats, de sexe et d'âge différents. La modélisation *in vivo* des lésions de la substance blanche et de l'unité neuro-vasculaire pourrait nécessiter des études chez le primate.
- Comme nous l'avons évoqué précédemment, la source cellulaire doit être bien caractérisée et répondre aux pré-requis cités, surtout pour l'utilisation de cellules modifiées génétiquement.
- L'évaluation et le suivi comportemental doivent être effectués à l'aide de tests multiples sensori-moteurs et cognitifs, sur des périodes d'au moins un mois. Ces tests doivent être fiables et reproductibles entre différentes équipes.
- Les objectifs précliniques doivent être réalistes en terme d'application clinique : ne pas utiliser des doses trop élevées de cellules ou des voies invasives (IC) à la phase aiguë.
- Dans le cadre de l'utilisation de cellules modifiées génétiquement, le suivi des animaux devrait se faire à vie (sans euthanasie programmée).

- Les études d'effet/dose doivent être privilégiées pour démontrer l'effet de la thérapie cellulaire.
- La qualité méthodologique du protocole expérimental doit être le plus proche possible de celle des essais cliniques (Dirnagl, 2006) : utilisation d'une randomisation, d'une évaluation et d'un suivi « aveugles », la mise en place de contrôle qualité ainsi que la publication des résultats négatifs et des biais.

Dans ces conditions, on peut espérer un transfert réussi des résultats expérimentaux encourageants vers l'application clinique de la thérapie cellulaire après un AVC. L'approche expérimentale, qui doit continuer en parallèle des premiers essais cliniques, devra répondre à de futures interrogations pouvant émerger lors de ces essais, et permettre le développement et l'optimisation de ce traitement prometteur en neurologie vasculaire.

X. ANNEXES

Annexe 1 : Etudes publiées sur la thérapie cellulaire après ischémie cérébrale focale chez les rongeurs (avec suivi fonctionnel)

Selon Hicks *et al.* (Hicks *et al.*, 2009).

Recherche *PubMed* (de 2001 à février 2009) avec comme mots-clés : bone marrow OR cord blood OR mesenchymal OR hematopoietic OR stem cell AND transplantation OR infusion OR graft OR cell-based therapy AND focal cerebral ischemia OR middle cerebral artery OR MCA OR MCAO NOT hemorrhage AND behavior OR behavioral test OR functional recovery AND animal OR rat OR mouse.

pMCAO : occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne.

tMCAO : occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne.

UCB (umbilical cord blood) : sang de cordon ombilical.

Les références citées dans ces tableaux sont celles de l'article de Hicks et al. (Hicks et al., 2009).

Cell type	Injury model	Administration of stem cells, time after stroke	Survival time	Surviving cells	Differentiation	Effect on infarct volume	Behavioral outcome	Reference
Human MSCs	Rat, tMCAO	Intracarotid, 24 hrs	14 days	21%	MAP-2 (1%), GFAP (10%)	No effect	+ mNSS + adhesive tape removal	Li et al., 2001
Human UCBs	Rat tMCAO	Intravenous, 24 hrs or 7 days	14 and 35 days	3.2% and 2.7 %	Neurons (2%), astrocytes (7%)	No effect	+ rotarod + NSS in 24hrs + NSS in 7 d	Chen et al., 2001a
Rat MSCs	Rat tMCAO	Intravenous, 24 hrs	14 and 35 days	3.2 % and 1.6 %	Neurons (1-2%), astrocytes (5%)	No effect	+ adhesive tape removal + NSS - rotarod test	Chen et al., 2001b
Rat MSCs+ NGF	Rat tMCAO	Intracerebral ipsilateral penumbra, 24 hrs	14 days	14 %	NeuN (1%), MAP-2 (1%), GFAP (5%)	No effect	+ adhesive tape removal + NSS + rotarod test (NGF+MSCs)	Chen et al., 2001c
MHP36	Rat tMCAO	Intracerebral contralateral cortex and striatum, 2-3 weeks	12 weeks	ND	ND	Reduced hemispheric infarct volume	+ bilateral asymmetry test + rotation tests - water maze test	Veizovic et al., 2001

Human MSCs	Rat pMCAO	Intracerebral ipsilateral cortex, 7 days	14 days and 6 weeks	ND	Neurons, astrocytes oligodendroglia, no integration	No effect	+ limb-placement + adhesive tape removal	Zhao et al., 2002
MHP36	Rat tMCAO	Intracerebral, ipsilateral or contralateral striatum or i.c.v., 2-3 weeks	19 weeks	Variable cell numbers	Neurons (30-35%)	No effect	+ water-maze performance (i.c.v.) + adhesive tape removal test (i.c.)	Modo et al., 2002
Human UCBs	Rat pMCAO	Intravenous or intracerebral, ipsilateral striatum, 24 hrs	2 months	ND	ND	ND	+ spontaneous activity, step test, elevated body swing, and passive avoidance	Willing et al., 2003a
Human mobilized PBSCs or UCBs	Rat pMCAO	Intravenous, 24 hrs	28 days	ND	ND	ND	Reduction in hyperactivity and motor asymmetry by cell treatment	Willing et al., 2003b
Rat MSCs	Rat tMCAO	Intravenous, 24 hrs	14 days	115 cells/section in ipsilateral hemisphere	vWF (4.1%), GFAP (2.3%), NeuN (2.5%),	No effect	+ Rotarod + adhesive tape removal	Chen et al., 2003

Human ATSCs	Rat tMCAO	I.c.v., 24 hrs	14 and 30 days	Approx 1%	Neurons (4%), astrocytes (9%)	No effect	+ NSS + adhesive tape removal tests	Kang et al., 2003
Human MSC+ BDNF	Rat tMCAO	Intracerebral ipsilateral striatum, 24 hrs	7 and 14 days	ND	Neurons astrocytes	Reduced hemispheric infarct volume	+ limb placement + treadmill test	Kurozumi et al., 2004
Human MSCs+ NoNo	Rat tMCAO	Intravenous, 24 hrs	14 days	ND	ND	No difference between groups	+ mNSS + adhesive tape removal (MSCs<MSC+NO NO)	Chen et al., 2004
Rat MSCs	Rat tMCAO (45 min)	Intravenous, 3-72 hrs	14 days	ND	Neuronal and glial markers	Early intervention neuro-protective	+ treadmill + Morris water-maze	Iihoshi et al., 2004
Human NSC	Rat tMCAO	Intravenous, 24 hrs	1 day-540 days	< 1 %	Neurons (20%), astrocytes (50%)	At day 56 less hemispheric atrophy	+ rotarod, modified limb placement and turning in an alley tests up to 28 days	Chu et al., 2004
Human UCBs	Rat tMCAO	Intravenous, 24 hrs	28 days	ND	ND	Reduced hemispheric infarct volume	+ spontaneous activity, elevated body swing and step tests	Vendrame et al., 2004

Human UCBs	Rat tMCAO	Intravenous, 1 hr	3 days	No cells found	No cells found	Reduced cerebral infarcts	+ body swing + passive avoidance test	Borlongan et al., 2004
Human MSC	Rat pMCAO	Intravenous, 24 hrs	30 days	ND	ND	ND	+ mNSS	Zhang et al., 2004
Rat MSCs	Rat pMCAO	Intravenous, 7 days	4 months	ND	ND	Decrease in cavitation volume	+ adhesive tape removal + mNSS	Li et al., 2005
Mouse ES+Bcl-2	Rat tMCAO	Intracerebral ipsilateral injury core and penumbra, 7 days	1-8 weeks	ND	Neurons (34-58%), astrocytes, oligodendrocytes, endothelial cells	ND	+ NSS	Wei et al., 2005
Human bone marrow CD133+	Rat tMCAO	Intracerebral 1 hr, 3 days or intravenous 1 hr, 3 days	7 days	i.c. 7%, i.v. 0.01-0.04%	ND	Neuroprotection only after i.c.	+ motor test + NSS i.c. + NSS i.v.	Borlongan et al., 2005
Rat NSC+ VEGF	Rat tMCAO	Intracerebral, ipsilateral striatum, 3 days	12 weeks	ND	Neurofilament positive cells	ND	+ NSS (NSC+VEGF)	Zhu et al., 2005
Human NSC+ VEGF	Rat tMCAO	Intravenous, 24 hrs	35 days	1778-1800 β gal ⁺ cells/mm ² in the cortex	ND	Reduction in infarct volumes	+ limb placing + Rotarod (NSC+VEGF)	Chu et al., 2005

Rat MSCs+ FGF-2	Rat tMCAO	Intracerebral, ipsilateral striatum, 24 hrs	21 days	ND	ND	Neuroprotection (MSCs+FGF-2)	+ mNSS (MSCs+FGF-2)	Ikeda et al., 2005
Rat neural MSCs	Rat tMCAO	Intracerebral, ipsilateral hemisphere, 7 days	41 days	30-45% N-MSA 10-20% MSC	N-MSA: MAP2 (84%), GFAP (1%) MSCs: MAP2 (1.4%), GFAP (4.8%)	No effect	+ beam-balance test, limb-placing and water-maze (N-MSA) + limb-placing (MSCs)	Minura et al., 2005
NH-UCBs or RN33B NSCs	Rat tMCAO or pMCAO	Intravenous, 48 hrs or intracerebral ipsilateral cortex, 7 days	28 days	Very few MAB1281 positive cells	Neu-N	Neuro-protection (NH-UCBs>RN33b)	+ mNSS + stepping test	Xiao et al., 2005
Human MSCs	Rat tMCAO	Intravenous, 12 hrs	7 days	ND	NeuN (9%), GFAP (8%)	Dose-dependent decrease in infarct size	+ treadmill test + Morris water-maze	Honma et al., 2006
Rat MSC+HGF	Rat tMCAO	Intracerebral, ipsilateral striatum, 2 or 24 hrs	up to 35 days	ND	ND	Neuroprotection (MSCs<MSC+HGF)	+ mNSS (MSCs<MSC+HGF)	Zhao et al., 2006

Rat MSCs	Rat tMCAO	Intra-arterial, 24 hrs	28 days	ND	NG2	No effect	+ mNSS, adhesive tape removal and corner tests	Sben et al., 2006
Rat MSCs	Rat tMCAO	Intravenous, 24 hrs	28 days	16.5-20.8 cells/section	ND	No effect	+ mNSS, adhesive tape removal and corner tests	Li et al., 2006
Human NSCs CTX0E03 line	Rat tMCAO	Intracerebral, both ipsilateral and contralateral striatum, 3-4 weeks	12 weeks	Excellent survival	Neurofilaments	No effect	+ adhesive tape removal + rotarod	Pollock et al., 2006
Human NT	Rat pMCAO	Intracerebral ipsilateral cortex, 7 days	28 days	39.6 %	Neuronal, neurites	No effect	+ beam - cylinder, adhesive tape removal or postural asymmetry tests	Bliss et al., 2006
Rat MSC	Rat tMCAO	Intra-arterial, 24 hrs	28 days	ND	NG2	No effect	+ mNSS, adhesive tape removal and corner tests	Sben et al., 2006
Human UCBs	Rat pMCAO	Intravenous, 48 hrs	1 month	ND	ND	Neuroprotection	+ step test + rotarod	Newcomb et al., 2006
Human NPCs	Rat tMCAO	Carotid artery, 48 hrs	5-7 weeks	ND	ND	ND	+ adhesive tape removal + foot-fault test	Jiang et al., 2006

Mouse ES or neuron-like ES	Rats tMCAO	Intracerebral, ipsilateral striatum, 7 days	15 weeks	ND	ND	ND	+ rotarod	Yanagisawa et al., 2006
Human MSCs+ GDNF	Rat pMCAO	Intravenous, 3 hrs	28 days	422.5 LacZ positive cells/mm ²	ND	Reduction in infarct volumes, (MSC<GDNF+ MSC)	+ treadmill stress test (MSC<GDNF+ MSC)	Horita et al., 2006
Human UCBs	Rat pMCAO	Intravenous, 24 hrs	29 days	ND	ND	Reduction in infarct volumes	+ mNSS, Rotarod and stairway test	Boltze et al., 2006
Human UCBs	Rat tMCAO	Intravenous, 24 hrs	25 days	Only few cells	ND	No effect	- water maze, limb-placement, beam walking or cylinder tests	Mäkinen et al., 2006
Human UCBs CD34+	Rat tMCAO or pMCAO	Intravenous, 24 hrs	25 days	Only few cells	ND	No effect	+ cylinder and water-maze tests (non-significant)	Nystedt et al., 2006
Rat MSCs +TIMP1 and 2+L-arginine/ vitE	Rat tMCAO	Intra-arterial, 6 hrs	14 days	ND	Neu-N (33.28%), GFAP (19.22%)	Reduction of infarct volumes by (MSC<MSC+TIMP1/2<MSC+TIMP1/2+L-arginine/vitE)	+ rotarod by MSCs	Baker et al., 2007
Rat MSCs	Rat pMCAO	Intravenous, 24 hrs	28 days	ND	ND	ND	+ adhesive tape removal	Liu et al., 2007

Human NPC (ES derived)	Rat tMCAO	Intracerebral, ipsilateral basal ganglia, 7 days	28 days	Variable, from few cells to numerable	Neural, astrocytes, oligodendrocytes	Reduction of hemispheric lesion volume	+ motor behavior index	Kim et al., 2007
Rat MSCs	Rat tMCAO	Internal carotid artery, 24 hrs	Up to one year	38 cells per section	Neurons (17%), astrocytes (22%), microglia (6%), endothelial cells (<1%)	No effect	+ NSS + adhesive tape removal test	Shen et al., 2007
Mouse AFSC or ESC	Mouse tMCAO	I.c.v., 3 days	7 days	ND	ND	ND	+NSS, elevated plus maze and adhesive tape removal	Rehmi et al., 2007
Rat NSPCs + GDNF	Rats tMCAO	Intracerebral ipsilateral ischemic boundary zone, 3 hrs	7 days	ND	Nestin (41.1%), GFAP (22.0%)	Reduction in infarct area (NSPCs + GDNF)	+ limb placement test +cylinder test (NSPCs + GDNF)	Kameda et al., 2007
Mouse SVZ	Rat tMCAO	Intracerebral ipsilateral cortex and striatum, 7 days	7-28 days	1-5 %	Neural progenitors, astrocytes	No effect	+ cylinder test 1 st week	Hicks et al., 2007

Rat MSCs+ VEGF	Rat tMCAO	Intracerebral, ipsilateral striatum, 24 hrs	14 days	ND	ND	Neuroprotection	+ mNSS (MSC<MSC+VEGF)	Miki et al., 2007
Mouse MSCs, wildtype+ CXCR4-KO	Mouse pMCAO	Intracerebral, ipsilateral striatum, 7 days	28 days	WT 4.54x10 ³ /mm ² KO 1.09x10 ³ /mm ²	MAP2 (49.6%), GFAP (1.1%)	ND	+ rotarod in wildtype mice	Skichinohe et al., 2007
Human MSCs+ Angiotensin-1	Rat pMCAO	Intravenous, 6 hrs	7 days	ND	Endothelial lineage, 4-8 cells/mm ²	Decrease in lesion size (hMSC and Ang-hMSC)	+ treadmill stress test (hMSC and Ang-hMSC)	Ouda et al., 2008
Mouse SVZ	Rat tMCAO	Intracerebral ipsilateral cortex and striatum, 7 days	1-3 months	1 %	Neural progenitors, astrocytes	No effect	- cylinder test	Hicks et al., 2008
Rat MSCs	Rat tMCAO	Intravenous, 3 hrs	7 days	ND	ND	ND	+ mNSS + rotarod	Okazaki et al., 2008
Rat MSCs	Rat pMCAO	Intravenous, 24 hrs	28 days	ND	ND	ND	+ mNNS	Wang et al., 2008
Rat MSCs	Rat tMCAO	Intravenous, 24 hrs	7 days	ND	NeuN	Reduced scar size	+ NSS	Wu et al., 2008
Rat MSCs+ EPO	Rat tMCAO	Intravenous, 24 hrs	51 days	11.8 cells/cm ² ipsilateral hemisphere	NeuN (36%), GFAP (17%)	No effect	- limb placing - NSS + passive avoidance (MSC+EPO)	Esneault et al., 2008

Rat MSCs	Rat pMCAO	Intravenous, 24 hrs	42 days	ND	ND	No effect	+ adhesive tape removal	Liu et al., 2008
MHP36 cells	Rat tMCAO	Intracerebral contralateral striatum, 14 days	1 year	ND	Neurons and astrocytes	Decrease in lesion size by 35%	+ adhesive tape removal	Modo et al., 2008
Rat MSCs	Rat tMCAO	Intracerebral ipsilateral striatum, immediately after MCAO	14 days	ND	Astrocytes (9.3%), oligodendrocytes (2.0%), microglia (4.3%)	Reduction in cortical tissue loss	+ body swing test and forelimb footprint analysis, minor effect in adhesive tape removal	Chen et al., 2008
Rat MSCs	Rat pMCAO	Intravenous, on the day of MCAO or 3 days later	6 weeks	ND	ND	No effect	+ water-maze	Pavlichenko et al., 2008
Rat adult and embryonic NSC	Rat tMCAO	Intracerebral ipsilateral cortex, 1 hr	28 days	267±20 cells/12 sections ENSC, 16±0.5/12 sections adult NSC	Astrocytes over 90%, neurons <5%	Reduction in infarct size at day 1 and day 28	+ limb placing, rotarod and cylinder test, ENSC>adult NSC	Takahashi et al., 2008
Rat NSCs+ hNT3	Rats tMCAO	Intracerebral ipsilateral striatum, 7 days	14 days	25-35%	ND	ND	+ NSS (NSCs and NSC+hNT-3)	Zhang et al., 2008

Human MSCs	Rats tMCAO	Intracerebral ipsilateral cortex and striatum, 3 days	28 days	ND	ND	Reduction in infarct size by MSCs at 28 days	+ rotarod + adhesive tape removal	Yoo et al., 2008
Human MNCs, ECs and MCs derived from human ES cells	Mouse tMCAO	Intra-arterial, immediately after reperfusion	28 days	0.05-0.85 % density area	Incorporation into host capillaries	Reduction in infarct size (hES-ECs+MCs)	+ rota-rod by hES-ECs+MCs	Oyamada et al., 2008
Human amniotic MSC	Rat pMCAO	Intravenous	3 months	ND	Neurons and glial cells	No effect	+ mNSS, increase in motor activity	Skvortsova et al., 2008
Human MSCs+ VEGF+ angiopoietin-1	Rat pMCAO	Intravenous, 6 hrs	14 days	ND	ND	Neuroprotection (hMSCs<angiopoietin-1<ang+VEGF)	+ treadmill test	Toyama et al., 2009
Human NPC (ES derived)	Rat pMCAO	Intracerebral ipsilateral cortex, 7 days	2 months	1 %	Neurons, neural progenitors, astrocytes	No effect	+ cylinder test - reaching task	Hicks et al., 2009

Human UCBs	Rat tMCAO	Intracerebral, 24 hrs	31 days	Preferential distribution in IBZ	NSE (1%), MAP2 (3%) GFAP (2%)	Neuroprotection 2 weeks after MCAO	+ mNSS + Morris water-maze	Liao et al., 2009
------------	-----------	-----------------------	---------	----------------------------------	-------------------------------	------------------------------------	----------------------------	-------------------

**Annexe 2 : Fiche de suivi comportemental complet utilisée pour
les rats après ischémie cérébrale focale**

Annexe 3 : Publications et communications réalisées durant la thèse

* Publications :

1. **O. Detante**, A. Moisan, J. Dimastromatteo, MJ. Richard, L. Riou, E. Grillon, E. Barbier, MD. Desruet, F. De Fraipont, C. Segebarth, A. Jaillard, M. Hommel, C. Ghezzi, C. Rémy. Intravenous administration of ^{99m}Tc-HMPAO-labeled human mesenchymal stem cells after stroke: *in vivo* imaging and biodistribution. *Cell Transplantation* 2009, epub.
2. **O. Detante**, S. Valable, F. De Fraipont, E. Grillon, E. Barbier, A. Moisan, J. Arnaud, C. Moriscot, C. Segebarth, M. Hommel, C. Rémy, MJ. Richard. Labeling of clinical grade mesenchymal stem cell for MRI with no impact on cell phenotype: *in vitro* and *in vivo* study in a stroke model. *Neuroimage* 2010 ; *soumis*.
3. **O. Detante**, C. Rémy, M. Hommel, MJ. Richard. Thérapie cellulaire et accidents vasculaires cérébraux. *Sang Thrombose Vaisseaux* 2010 ; *accepté*.
4. **O. Detante**, E. Barbier, V. Mayan, B. Naegele, A. Moisan, MJ. Richard, E. Grillon, H. Mathieu, F. De Fraipont, A. Jaillard, M. Hommel, C. Remy. Intravenous injection of clinical grade mesenchymal stem cells after experimental stroke. *Stroke* 2010 ; *en cours*.
5. A. Moisan, **O. Detante**, E. Grillon, E. Barbier, MJ. Richard, C. Rémy. Effect of the intracerebral graft of human mesenchymal stem cells on the microvascularisation in a rat model of stroke: MRI study. *Stroke* 2010 ; *en cours*.

* Communications orales et affichées :

1. **O. Detante**, S. Valable, E. Barbier, F. De Fraipont, E. Grillon, J. Meo, C. Moriscot, K. Garambois, MJ. Richard, M. Favrot, C. Segebarth, M. Hommel, A. Jaillard, C. Rémy. Intracerebral transplantation of human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in rats: a multiparametric study. Poster: *Neuroscience SfN – Atlanta*, 10.2006
2. **O. Detante**, S. Valable, E. Barbier, F. De Fraipont, E. Grillon, J. Meo, C. Moriscot, K. Garambois, MJ. Richard, M. Favrot, C. Segebarth, M. Hommel, A. Jaillard, C. Rémy. Transplantation intracérébrale de cellules souches mésenchymateuses humaines après ischémie cérébrale chez le rat : récupération fonctionnelle, IRM *in vivo* et histologie. Poster : *Journées de la Recherche Médicale – Grenoble*, 4.2007
3. **O. Detante**, A. Moisan, J. Dimastromatteo, MJ. Richard, L. Riou, E. Grillon, E. Barbier, MD. Desruet, MC. Favrot, A. Jaillard, M. Hommel, C. Ghezzi, C. Rémy. Biodistribution des cellules souches mésenchymateuses injectées par voie intraveineuse après ischémie cérébrale chez le rat : étude par scintigraphie *in vivo*. Communication orale : *Société Française de Neurologie Vasculaire – Paris*, 11.2007
4. A. Moisan, MD. Desruet, **O. Detante**, F. De Fraipont, MJ. Richard, J. Calop. Optimisation of experimental conditions for human mesenchymal stem cell ^{99m}Tc-HMPAO labelling. Poster: *European Symposium Radiopharmacy Radiopharmaceuticals – Skopje*, 4.2008
5. **O. Detante**, A. Moisan, J. Dimastromatteo, MJ. Richard, L. Riou, E. Grillon, E. Barbier, F. De Fraipont, A. Jaillard, M. Hommel, C. Ghezzi, C. Rémy. Intravenous administration of ^{99m}Tc-HMPAO-labelled human mesenchymal stem cells after stroke: *in vivo* imaging and biodistribution. Oral presentation: *European Stroke Conference – Nice*, 5.2008
6. T. Christen, B. Lemasson, N. Pannetier, **O. Detante**, R. Farion, E. Grillon, C. Segebarth, C. Rémy, EL. Barbier. Application of a modified quantitative BOLD approach to monitor local Blood Oxygen Saturation in two glioma models and a stroke model in rat. Poster: *International Society for Magnetic Resonance in Medicine ISMRM – Honolulu*, 4.2009

7. A. Moisan, **O. Detante**, MD. Desruet, L. Riou, MJ. Richard. Etude des conditions expérimentales optimales pour le marquage de cellules souches mésenchymateuses humaines par le ^{99m}Tc -HMPAO et application préclinique. Poster : **Journées de la Recherche Médicale – Grenoble**, 4.2009
8. **O. Detante**, MJ. Richard, L. Riou, E. Grillon, E. Barbier, B. Naegele, MD. Desruet, F. De Fraipont, CE. Bulabois, JY. Cahn, A. Jaillard, M. Hommel, C. Rémy. Thérapie cellulaire par cellules souches mésenchymateuses après accident vasculaire cérébral – ISIS. Poster : 7^{ème} Journée annuelle des CIC, **Congrès P2T (Physiologie Pharmacologie et Thérapeutique) - Marseille**, 4.2009
9. A. Moisan, E. Grillon, E. Barbier, F. De Fraipont, C. Rémy, MJ. Richard, **O. Detante**. Effet des cellules souches mésenchymateuses sur la microvascularisation cérébrale après ischémie cérébrale. Communication orale : **Société Française de Bioingénierie Cellulaire et Tissulaire - Grenoble**, 9.2009
10. A. Moisan, E. Grillon, E. Barbier, F. De Fraipont, C. Rémy, MJ. Richard, **O. Detante**. Effet des cellules souches mésenchymateuses sur la microvascularisation cérébrale après ischémie cérébrale focale. Poster : **Société Française de Neurologie Vasculaire – Paris**, 11.2009

*** Communications sur invitation :**

1. Cellules souches mésenchymateuses et cerveau. **Réunion annuelle du CIC de biothérapie Rhône-Alpes – Lyon**, 25.5.2007
2. Utilisation des cellules souches mésenchymateuses dans les accidents vasculaires cérébraux. **Nouvelles Technologies pour la Santé / GRAVIT – Grenoble**, 31.10.2007
3. Actualités sur les cellules souches. **Ateliers Neuro-Vasculaires de la région Rhône-Alpes – Talloires**, 5.6.2009
4. Thérapie cellulaire par CSM et AVC. **Société Française de Biothérapie Tissulaire et Cellulaire - Grenoble**, 1.10.2009

Annexe 4 : Financements obtenus durant la thèse

- 1. Poste d'accueil INSERM 2006 – 2008** : INSERM U 594 (Neuroimagerie fonctionnelle et métabolique) puis Grenoble Institut des Neurosciences INSERM U 836 UJF-CEA-CHU (Equipe 5, C. Segebarth).
- 2. Bourse Université Joseph Fourier, Grenoble 1** : « Vivier de la Recherche Médicale », 2006.
- 3. Projet Hospitalier de Recherche Clinique - PHRC inter-régional** : « Thérapie cellulaire par injection intraveineuse de cellules souches mésenchymateuses autologues après accident vasculaire cérébral – étude ISIS », 2007.
- 4. Subvention DHOS – INSERM Recherche Clinique Translationnelle** : « Thérapie cellulaire par injection de cellules souches mésenchymateuses autologues après accident vasculaire cérébral (ISIS) », 2007-2008.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams H. P. J., del Zoppo G., Alberts M. J., Bhatt D. L., Brass L., Furlan A. et al. (2007). Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke*, 38: 1655-711.
- Aggarwal S. & Pittenger M.F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105: 1815-22.
- Allan R. A., Sladen G. E., Bassingham S., Lazarus C., Clarke S. E. & Fogelman I. (1993). Comparison of simultaneous ^{99m}Tc-HMPAO and ¹¹¹In oxine labelled white cell scans in the assessment of inflammatory bowel disease. *Eur J Nucl Med*, 20: 195-200.
- Allers C., Sierralta W. D., Neubauer S., Rivera F., Minguell J. J. & Conget P.A. (2004). Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation*, 78: 503-8.
- Alvarez-Dolado M., Pardo R., Garcia-Verdugo J. M., Fike J. R., Lee H. O., Pfeffer K. et al. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 425: 968-73.
- Alvarez-Dolado M. (2007). Cell fusion: biological perspectives and potential for regenerative medicine. *Front Biosci*, 12: 1-12.
- Appelros P., Stegmayr B. & Terént A. (2009). Sex differences in stroke epidemiology: a systematic review. *Stroke*, 40: 1082-90.
- Arai K., Jin G., Navaratna D. & Lo E.H. (2009). Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke. *FEBS J*, 276: 4644-52.
- Arbab A. S., Yocum G. T., Kalish H., Jordan E. K., Anderson S. A., Khakoo A. Y. et al. (2004). Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood*, 104: 1217-23.
- Arbab A. S., Yocum G. T., Rad A. M., Khakoo A. Y., Fellowes V., Read E. J. et al. (2005). Labeling of cells with ferumoxides-protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells. *NMR Biomed*, 18: 553-9.
- Arbab A. S., Pandit S. D., Anderson S. A., Yocum G. T., Bur M., Frenkel V. et al. (2006). Magnetic resonance imaging and confocal microscopy studies of magnetically labeled endothelial progenitor cells trafficking to sites of tumor angiogenesis. *Stem Cells*, 24: 671-8.
- Assmus B., Honold J., Schachinger V., Britten M. B., Fischer-Rasokat U., Lehmann R. et al. (2006). Transcatheter transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 355: 1222-32.
- Bachoud-Levi A. C., Remy P., Nguyen J. P., Brugieres P., Lefaucheur J. P., Bourdet C. et al. (2000). Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet*, 356: 1975-9.
- Bachoud-Levi A., Gaura V., Brugieres P., Lefaucheur J., Boisse M., Maison P. et al. (2006). Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *Lancet Neurol*, 5: 303-9.
- Bang O. Y., Lee J. S., Lee P. H. & Lee G. (2005). Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol*, 57: 874-82.
- Barbash I. M., Chouraqui P., Baron J., Feinberg M. S., Etzion S., Tessone A. et al. (2003). Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, 108: 863-8.
- Barbier E. L., Liu L., Grillon E., Payen J., Lebas J., Segebarth C. et al. (2005). Focal brain ischemia in rat: acute changes in brain tissue T1 reflect acute increase in brain tissue water content. *NMR Biomed*, 18: 499-506.
- Barbosa da Fonseca L. M., Battistella V., de Freitas G. R., Gutfilen B., Dos Santos Goldenberg R. C., Maiolino A. et al. (2009). Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after intra-arterial delivery in a patient with chronic stroke. *Circulation*, 120: 539-41.
- Barer D. H. (1990). The influence of visual and tactile inattention on predictions for recovery from acute stroke. *Q J Med*, 74: 21-32.
- Becker W., Schomann E., Fischbach W., Börner W. & Gruner K.R. (1988). Comparison of ^{99m}Tc-HMPAO and ¹¹¹In-oxine labelled granulocytes in man: first clinical results. *Nucl Med Commun*, 9: 435-47.
- Benatru I., Rouaud O., Durier J., Contegal F., Couvreur G., Bejot Y. et al. (2006). Stable stroke incidence rates but improved case-fatality in Dijon, France, from 1985 to 2004. *Stroke*, 37: 1674-9.
- Berlucchi G. & Buchtel H.A. (2009). Neuronal plasticity: historical roots and evolution of meaning. *Exp Brain Res*, 192: 307-19.
- Bey E., Duhamel P., Lataillade J., de Revel T., Carsin H. & Gourmelon P. (2007). Treatment of radiation burns with surgery and cell therapy. A report of two cases. *Bull Acad Natl Med*, 191: 971-8; discussion 979.

- **Bindslev L., Haack-Sorensen M., Bisgaard K., Kragh L., Mortensen S., Hesse B. et al.** (2006). Labelling of human mesenchymal stem cells with indium-111 for SPECT imaging: effect on cell proliferation and differentiation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 33: 1171-1177.
- **Bjorklund A., Dunnett S. B., Brundin P., Stoessl A. J., Freed C. R., Breeze R. E. et al.** (2003). Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 2: 437-45.
- **Bliss T., Guzman R., Daadi M. & Steinberg G.K.** (2007). Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke*, 38: 817-26.
- **Borlongan C. V., Saporta S., Poulos S. G., Othberg A. & Sanberg P.R.** (1998). Viability and survival of hNT neurons determine degree of functional recovery in grafted ischemic rats. *Neuroreport*, 9: 2837-42.
- **Borlongan C. V., Sanberg P. R. & Freeman T.B.** (1999). Neural transplantation for neurodegenerative disorders. *Lancet*, 353 Suppl 1: S129-30.
- **Borlongan C. V., Sumaya I., Moss D., Kumazaki M., Sakurai T., Hida H. et al.** (2003). Melatonin-secreting pineal gland: a novel tissue source for neural transplantation therapy in stroke. *Cell Transplant*, 12: 225-34.
- **Borlongan C. V., Skinner S. J. M., Geaney M., Vasconcellos A. V., Elliott R. B. & Emerich D.F.** (2004^a). Intracerebral transplantation of porcine choroid plexus provides structural and functional neuroprotection in a rodent model of stroke. *Stroke*, 35: 2206-10.
- **Borlongan C. V., Skinner S. J. M., Geaney M., Vasconcellos A. V., Elliott R. B. & Emerich D.F.** (2004^b). CNS grafts of rat choroid plexus protect against cerebral ischemia in adult rats. *Neuroreport*, 15: 1543-7.
- **Borlongan C. V., Lind J. G., Dillon-Carter O., Yu G., Hadman M., Cheng C. et al.** (2004^c). Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats. *Brain Res*, 1010: 108-16.
- **Borlongan C. V., Evans A., Yu G. & Hess D.C.** (2005). Limitations of intravenous human bone marrow CD133+ cell grafts in stroke rats. *Brain Res*, 1048: 116-22.
- **Borlongan C. V., Chopp M., Steinberg G. K., Bliss T. M., Li Y., Lu M. et al.** (2008). Potential of stem/progenitor cells in treating stroke: the missing steps in translating cell therapy from laboratory to clinic. *Regen Med*, 3: 249-50.
- **Borlongan C. V.** (2009). Cell therapy for stroke: remaining issues to address before embarking on clinical trials. *Stroke*, 40: S146-8.
- **Borlongan C. V., Kaneko Y., Maki M., Yu S., Ali M. M., Allickson J. et al.** (2009). Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem Cells Dev*, epub (oct.).
- **Boussier, M. & Mas, J.** (2009). Accidents vasculaires cérébraux. Ed.Doin.
- **Bowen A., Lincoln N. B. & Dewey M.E.** (2002). Spatial neglect: is rehabilitation effective?. *Stroke*, 33: 2728-9.
- **Bowen A. & Lincoln N.B.** (2007). Rehabilitation for Spatial Neglect Improves Test Performance but Not Disability. *Stroke*, 38: 2869-70.
- **Breckenfeld C., Schroth G., Mattle H. P., Do D., Remonda L., Mordasini P. et al.** (2009). Stent placement in acute cerebral artery occlusion: use of a self-expandable intracranial stent for acute stroke treatment. *Stroke*, 40: 847-52.
- **Brenneman M., Sharma S., Harting M., Strong R., Cox C. S. J., Aronowski J. et al.** (2010). Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30: 140-9.
- **Brenner W., Aicher A., Eckey T., Massoudi S., Zuhayra M., Koehl U. et al.** (2004). 111In-labeled CD34+ hematopoietic progenitor cells in a rat myocardial infarction model. *J Nucl Med*, 45: 512-8.
- **Brooke G., Tong H., Levesque J. & Atkinson K.** (2008). Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta. *Stem Cells Dev*, 17: 929-40.
- **Brundin P., Pogarell O., Hagell P., Piccini P., Widner H., Schrag A. et al.** (2000). Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazarooids in Parkinson's disease. *Brain*, 123 (Pt 7): 1380-90.
- **Bruno A., Kent T. A., Coull B. M., Shankar R. R., Saha C., Becker K. J. et al.** (2008). Treatment of hyperglycemia in ischemic stroke (THIS): a randomized pilot trial. *Stroke*, 39: 384-9.
- **Buccafusco, J.** (2000). Methods of behavior analysis in neuroscience. Ed.Methods & New Frontiers in Neuroscience Series.
- **Bulte J. W., Zhang S., van Gelderen P., Herynek V., Jordan E. K., Duncan I. D. et al.** (1999). Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 15256-61.
- **Bulte J. W. M., Duncan I. D. & Frank J.A.** (2002). In vivo magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22: 899-907.
- **Bulte J. W. M. & Kraitchman D.L.** (2004). Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed*, 17: 484-99.
- **Burt R. K., Loh Y., Pearce W., Beohar N., Barr W. G., Craig R. et al.** (2008). Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases. *JAMA*, 299: 925-36.
- **Caplan L. R.** (2003). Resolved: Heparin may be useful in selected patients with brain ischemia. *Stroke*, 34: 230-1.
- **Carota A., Staub F. & Bogousslavsky J.** (2002). Emotions, behaviours and mood changes in stroke. *Curr Opin Neurol*, 15: 57-69.
- **Chamberlain G., Fox J., Ashton B. & Middleton J.** (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25: 2739-49.
- **Chen H., Lee T. & Wei C.** (1992). Treatment of cerebellar infarction by decompressive suboccipital craniectomy. *Stroke*, 23: 957-61.

- **Chen J., Li Y., Wang L., Lu M., Zhang X. & Chopp M.** (2001^a). Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci*, 189: 49-57.
- **Chen J., Li Y., Wang L., Zhang Z., Lu D., Lu M. et al.** (2001^b). Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 32: 1005-11.
- **Chen J., Sanberg P. R., Li Y., Wang L., Lu M., Willing A. E. et al.** (2001^c). Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke*, 32: 2682-8.
- **Chen J., Zhang Z. G., Li Y., Wang L., Xu Y. X., Gautam S. C. et al.** (2003^a). Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res*, 92: 692-9.
- **Chen J., Li Y., Katakowski M., Chen X., Wang L., Lu D. et al.** (2003^b). Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res*, 73: 778-86.
- **Chen J., Li Y., Zhang R., Katakowski M., Gautam S. C., Xu Y. et al.** (2004). Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis. *Brain Res*, 1005: 21-8.
- **Chen J. & Chopp M.** (2006). Neurorestorative treatment of stroke: cell and pharmacological approaches. *NeuroRx*, 3: 466-73.
- **Chen R., Cohen L. G. & Hallett M.** (2002^a). Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience*, 111: 761-73.
- **Chen X., Li Y., Wang L., Katakowski M., Zhang L., Chen J. et al.** (2002^b). Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology*, 22: 275-9.
- **Chen Z. M., Sandercock P., Pan H. C., Counsell C., Collins R., Liu L. S. et al.** (2000). Indications for early aspirin use in acute ischemic stroke : A combined analysis of 40 000 randomized patients from the chinese acute stroke trial and the international stroke trial. On behalf of the CAST and IST collaborative groups. *Stroke*, 31: 1240-9.
- **Cheng Y. D., Al-Khoury L. & Zivin J.A.** (2004). Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx*, 1: 36-45.
- **Chiang Y. H., Lin S. Z., Borlongan C. V., Hoffer B. J., Morales M. & Wang Y.** (1999). Transplantation of fetal kidney tissue reduces cerebral infarction induced by middle cerebral artery ligation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19: 1329-35.
- **Choi J. H., Bateman B. T., Mangla S., Marshall R. S., Prabhakaran S., Chong J. et al.** (2006). Endovascular recanalization therapy in acute ischemic stroke. *Stroke*, 37: 419-24.
- **Choi J. W., Kim J. K., Choi B. S., Kim J. H., Hwang H. J., Kim J. S. et al.** (2009). Adjuvant revascularization of intracranial artery occlusion with angioplasty and/or stenting. *Neuroradiology*, 51: 33-43.
- **Chollet F., DiPiero V., Wise R. J., Brooks D. J., Dolan R. J. & Frackowiak R.S.** (1991). The functional anatomy of motor recovery after stroke in humans: a study with positron emission tomography. *Ann Neurol*, 29: 63-71.
- **Chopp M. & Li Y.** (2002). Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol*, 1: 92-100.
- **Chopp M., Li Y. & Zhang Z.G.** (2009). Mechanisms underlying improved recovery of neurological function after stroke in the rodent after treatment with neurorestorative cell-based therapies. *Stroke*, 40: S143-5.
- **Chung D., Choi C., Lee S., Kang E., Lee J., Hwang S. et al.** (2009). Intraarterially delivered human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in canine cerebral ischemia. *J Neurosci Res*, 87: 3554-67.
- **Clark W., Lutsep H., Barnwell S., Nesbit G., Egan R., North E. et al.** (2009). The penumbra pivotal stroke trial: safety and effectiveness of a new generation of mechanical devices for clot removal in intracranial large vessel occlusive disease. *Stroke*, 40: 2761-8.
- **Correa P. L., Mesquita C. T., Felix R. M., Azevedo J. C., Barbirato G. B., Falcão C. H. et al.** (2007). Assessment of intra-arterial injected autologous bone marrow mononuclear cell distribution by radioactive labeling in acute ischemic stroke. *Clin Nucl Med*, 32: 839-41.
- **Darsalia V., Heldmann U., Lindvall O. & Kokaia Z.** (2005). Stroke-induced neurogenesis in aged brain. *Stroke*, 36: 1790-5.
- **De Haro J., Zurita M., Ayllon L. & Vaquero J.** (2005). Detection of ¹¹¹In-oxine-labeled bone marrow stromal cells after intravenous or intralesional administration in chronic paraplegic rats. *Neurosci Lett*, 377: 7-11.
- **De Vasconcelos Dos Santos A., da Costa Reis J., Diaz Paredes B., Moraes L., Jasmin, Giraldo-Guimarães A. et al.** (2010). Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. *Brain Res*, 1306: 149-58.
- **Denes A., Vidyasagar R., Feng J., Narvainen J., McColl B. W., Kauppinen R. A. et al.** (2007). Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27: 1941-53.
- **Detante O., Moisan A., Dimastromatteo J., Richard M., Riou L., Grillon E. et al.** (2009). Intravenous administration of ^{99m}Tc-HMPAO-labeled human mesenchymal stem cells after stroke: in vivo imaging and biodistribution. *Cell Transplant*: epub (sept.).
- **Devine S. M., Cobbs C., Jennings M., Bartholomew A. & Hoffman R.** (2003). Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, 101: 2999-3001.
- **Dharmasaroja P.** (2009). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. *J Clin Neurosci*, 16: 12-20.
- **Dirnagl U., Iadecola C. & Moskowitz M.A.** (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22: 391-7.
- **Dirnagl U.** (2006). Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26: 1465-78.
- **Dirnagl U., Klehmet J., Braun J. S., Harms H., Meisel C., Ziemssen T. et al.** (2007). Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. *Stroke*, 38: 770-3.

- **Dirnagl U. & Schwab J.M.** (2009). Brain-immune interactions in acute and chronic brain disorders. *Neuroscience*, 158: 969-71.
- **Drexler H., Meyer G. P. & Wollert K.C.** (2006). Bone-marrow-derived cell transfer after ST-elevation myocardial infarction: lessons from the BOOST trial. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 3 Suppl 1: S65-8.
- **Duncan P. W., Zorowitz R., Bates B., Choi J. Y., Glasberg J. J., Graham G. D. et al.** (2005). Management of Adult Stroke Rehabilitation Care: a clinical practice guideline. *Stroke*, 36: e100-43.
- **Eriksson P. S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A. M., Nordborg C., Peterson D. A. et al.** (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4: 1313-7.
- **Esneault E., Pacary E., Eddi D., Freret T., Tixier E., Toutain J. et al.** (2008). Combined therapeutic strategy using erythropoietin and mesenchymal stem cells potentiates neurogenesis after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28: 1552-63.
- **Evans M. J. & Kaufman M.H.** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-6.
- **Farrell E., Wielopolski P., Pavljasevic P., van Tiel S., Jahr H., Verhaar J. et al.** (2008). Effects of iron oxide incorporation for long term cell tracking on MSC differentiation in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 369: 1076-81.
- **Fink J. S., Schumacher J. M., Ellias S. L., Palmer E. P., Saint-Hilaire M., Shannon K. et al.** (2000). Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant*, 9: 273-8.
- **Freed C. R., Greene P. E., Breeze R. E., Tsai W. Y., DuMouchel W., Kao R. et al.** (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 344: 710-9.
- **Fries W., Danek A., Scheidtmann K. & Hamburger C.** (1993). Motor recovery following capsular stroke. Role of descending pathways from multiple motor areas. *Brain*, 116 (Pt 2): 369-82.
- **Fuentes B., Castillo J., San José B., Leira R., Serena J., Vivancos J. et al.** (2009). The prognostic value of capillary glucose levels in acute stroke: the GLyceria in Acute Stroke (GLIAS) study. *Stroke*, 40: 562-8.
- **Furlan A., Higashida R., Wechsler L., Gent M., Rowley H., Kase C. et al.** (1999). Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled trial. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *JAMA*, 282: 2003-11.
- **Furlan A. J., Eyding D., Albers G. W., Al-Rawi Y., Lees K. R., Rowley H. A. et al.** (2006). Dose Escalation of Desmoteplase for Acute Ischemic Stroke (DEDAS): evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset. *Stroke*, 37: 1227-31.
- **Gainotti G., Antonucci G., Marra C. & Paolucci S.** (2001). Relation between depression after stroke, antidepressant therapy, and functional recovery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71: 258-61.
- **Gao J., Dennis J. E., Muzic R. F., Lundberg M. & Caplan A.I.** (2001). The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*, 169: 12-20.
- **Giaquinto S., Buzzelli S., Di Francesco L., Lottarini A., Montenero P., Tonin P. et al.** (1999). On the prognosis of outcome after stroke. *Acta Neurol Scand*, 100: 202-8.
- **Giordano A., Galderisi U. & Marino I.** (2007). From the laboratory bench to the patient's bedside: An update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*, 211: 27-35.
- **Greenberg D. A.** (2007). Stem cells and stroke recovery: introduction. *Stroke*, 38: 809.
- **Grillon E., Provent P., Montigon O., Segebarth C., Rémy C. & Barbier E.L.** (2008). Blood-brain barrier permeability to manganese and to Gd-DOTA in a rat model of transient cerebral ischaemia. *NMR Biomed*, 21: 427-36.
- **Gurbel P. A., Cummings C. C., Bell C. R., Alford A. B., Meister A. F., Serebruany V. L.** (2003). Onset and extent of platelet inhibition by clopidogrel loading in patients undergoing elective coronary stenting: the Plavix Reduction Of New Thrombus Occurrence (PRONTO) trial. *Am Heart J*, 145: 239-47.
- **Guzman R., Choi R., Gera A., De Los Angeles A., Andres R. H. & Steinberg G.K.** (2008). Intravascular cell replacement therapy for stroke. *Neurosurg Focus*, 24: E15.
- **Haas S., Weidner N. & Winkler J.** (2005). Adult stem cell therapy in stroke. *Curr Opin Neurol*, 18: 59-64.
- **Hacke W., Kaste M., Bluhmki E., Brozman M., Dávalos A., Guidetti D. et al.** (2008). Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 359: 1317-29.
- **Hacke W., Furlan A. J., Al-Rawi Y., Dávalos A., Fiebich J. B., Gruber F. et al.** (2009). Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion-diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2): a prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Neurol*, 8: 141-50.
- **Hankey G. J. & Warlow C.P.** (1999). Treatment and secondary prevention of stroke: evidence, costs, and effects on individuals and populations. *Lancet*, 354: 1457-63.
- **Harbison J., Hossain O., Jenkinson D., Davis J., Louw S. J. & Ford G.A.** (2003). Diagnostic accuracy of stroke referrals from primary care, emergency room physicians, and ambulance staff using the face arm speech test. *Stroke*, 34: 71-6.
- **Hauger O., Frost E. E., van Heeswijk R., Deminière C., Xue R., Delmas Y. et al.** (2006). MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy. *Radiology*, 238: 200-10.
- **Hayase M., Kitada M., Wakao S., Itokazu Y., Nozaki K., Hashimoto N. et al.** (2009). Committed neural progenitor cells derived from genetically modified bone marrow stromal cells ameliorate deficits in a rat model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29: 1409-20.
- **Hermann D. M. & Zechariah A.** (2009). Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29: 1620-43.

- Hicks A., Schallert T. & Jolkonen J. (2009). Cell-based therapies and functional outcome in experimental stroke. *Cell Stem Cell*, 5: 139-40.
- Hill J. M., Dick A. J., Raman V. K., Thompson R. B., Yu Z., Hinds K. A. et al. (2003). Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells. *Circulation*, 108: 1009-14.
- Hinds K. A., Hill J. M., Shapiro E. M., Laukkanen M. O., Silva A. C., Combs C. A. et al. (2003). Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *Blood*, 102: 867-72.
- Hochstenbach J., Mulder T., van Limbeek J., Donders R. & Schoonderwaldt H. (1998). Cognitive decline following stroke: a comprehensive study of cognitive decline following stroke. *J Clin Exp Neuropsychol*, 20: 503-17.
- Hoehn M., Kustermann E., Blunk J., Wiedermann D., Trapp T., Wecker S. et al. (2002). Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 16267-72.
- Hofmann M., Wollert K. C., Meyer G. P., Menke A., Arseniev L., Hertenstein B. et al. (2005). Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*, 111: 2198-202.
- Hofstetter C. P., Holmström N. A. V., Lilja J. A., Schweinhardt P., Hao J., Spenger C. et al. (2005). Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci*, 8: 346-53.
- Hommel M., Jaillard A. & Garambois K. (2002). Neurovascular units and the healthcare network: perspectives for stroke victims. *Rev Neurol (Paris)*, 158: 1153-6.
- Hommel M., Trabucco-Miguel S., Joray S., Naegele B., Gonnet N. & Jaillard A. (2009). Social dysfunctioning after mild to moderate first-ever stroke at vocational age. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80: 371-5.
- Honma T., Honmou O., Iihoshi S., Harada K., Houkin K., Hamada H. et al. (2006). Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Exp Neurol*, 199: 56-66.
- Horita Y., Honmou O., Harada K., Houkin K., Hamada H. & Kocsis J.D. (2006). Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat. *J Neurosci Res*, 84: 1495-504.
- Hossmann K. (2006). Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol*, 26: 1057-83.
- Hotchkiss R. S., Strasser A., McDunn J. E. & Swanson P.E. (2009). Cell death. *N Engl J Med*, 361: 1570-83.
- House A., Knapp P., Bamford J. & Vail A. (2001). Mortality at 12 and 24 months after stroke may be associated with depressive symptoms at 1 month. *Stroke*, 32: 696-701.
- Hsiao J., Tai M., Chu H., Chen S., Li H., Lai D. et al. (2007). Magnetic nanoparticle labeling of mesenchymal stem cells without transfection agent: cellular behavior and capability of detection with clinical 1.5 T magnetic resonance at the single cell level. *Magn Reson Med*, 58: 717-24.
- Huang Z., Huang P. L., Panahian N., Dalkara T., Fishman M. C. & Moskowitz M.A. (1994). Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science*, 265: 1883-5.
- Iadecola C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci*, 20: 132-9.
- Indredavik B., Bakke F., Slordahl S. A., Rokseth R. & Håheim L.L. (1999). Stroke unit treatment. 10-year follow-up. *Stroke*, 30: 1524-7.
- Ingles J. L., Eskes G. A. & Phillips S.J. (1999). Fatigue after stroke. *Arch Phys Med Rehabil*, 80: 173-8.
- Ittrich H., Lange C., Togel F., Zander A. R., Dahnke H., Westenfelder C. et al. (2007). In vivo magnetic resonance imaging of iron oxide-labeled, arterially-injected mesenchymal stem cells in kidneys of rats with acute ischemic kidney injury: detection and monitoring at 3T. *J Magn Reson Imaging*, 25: 1179-91.
- Jaillard A., Martin C. D., Garambois K., Lebas J. F. & Hommel M. (2005). Vicarious function within the human primary motor cortex? A longitudinal fMRI stroke study. *Brain*, 128: 1122-38.
- Jaillard A., Naegele B., Trabucco-Miguel S., LeBas J. F. & Hommel M. (2009). Hidden dysfunctioning in subacute stroke. *Stroke*, 40: 2473-9.
- Janssens S., Dubois C., Bogaert J., Theunissen K., Deroose C., Desmet W. et al. (2006). Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*, 367: 113-21.
- Jehkonen M., Ahonen J. P., Dastidar P., Koivisto A. M., Laippala P., Vilkki J. et al. (2000). Visual neglect as a predictor of functional outcome one year after stroke. *Acta Neurol Scand*, 101: 195-201.
- Jendelova P., Herynek V., DeCroos J., Glogarova K., Andersson B., Hajek M. et al. (2003). Imaging the fate of implanted bone marrow stromal cells labeled with superparamagnetic nanoparticles. *Magn Reson Med*, 50: 767-76.
- Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R. et al. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-9.
- Jin K., Sun Y., Xie L., Mao X. O., Childs J., Peel A. et al. (2005). Comparison of ischemia-directed migration of neural precursor cells after intrastriatal, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat. *Neurobiol Dis*, 18: 366-74.
- Jin K., Wang X., Xie L., Mao X. O., Zhu W., Wang Y. et al. (2006). Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 13198-202.
- Jin K., Mao X., Xie L., Galvan V., Lai B., Wang Y. et al. (2009). Transplantation of human neural precursor cells in Matrigel scaffolding improves outcome from focal cerebral ischemia after delayed postischemic treatment in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* : epub (oct.).
- Johansson B. B. (2000). Brain plasticity and stroke rehabilitation. The Willis lecture. *Stroke*, 31: 223-30.

- Jones T. A. & Schallert T. (1994). Use-dependent growth of pyramidal neurons after neocortical damage. *J Neurosci*, 14: 2140-52.
- Kapoor K., Singh B. & Dewan L.I.J. (2008). Variations in the configuration of the circle of Willis.. *Anat Sci Int*, 83: 96-106.
- Karni A., Meyer G., Jezzard P., Adams M. M., Turner R. & Ungerleider L.G. (1995). Functional MRI evidence for adult motor cortex plasticity during motor skill learning. *Nature*, 377: 155-8.
- Katz N., Hartman-Maeir A., Ring H. & Soroker N. (1999). Functional disability and rehabilitation outcome in right hemisphere damaged patients with and without unilateral spatial neglect. *Arch Phys Med Rehabil*, 80: 379-84.
- Kauhanen M., Korpelainen J. T., Hiltunen P., Brusin E., Mononen H., Maatta R. et al. (1999). Poststroke depression correlates with cognitive impairment and neurological deficits. *Stroke*, 30: 1875-80.
- Kelly S., Bliss T. M., Shah A. K., Sun G. H., Ma M., Foo W. C. et al. (2004). Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 11839-44.
- Kim D., Chun B., Kim Y., Lee Y. H., Park C., Jeon I. et al. (2007). In vivo tracking of human mesenchymal stem cells in experimental stroke. *Cell Transplant*, 16: 1007-12.
- Kolb B. (1987). Recovery from early cortical damage in rats. I. Differential behavioral and anatomical effects of frontal lesions at different ages of neural maturation. *Behav Brain Res*, 25: 205-20.
- Kolb B., Brown R., Witt-Lajeunesse A. & Gibb R. (2001). Neural compensations after lesion of the cerebral cortex. *Neural Plast*, 8: 1-16.
- Komitova M., Perfilieva E., Mattsson B., Eriksson P. S. & Johansson B.B. (2002). Effects of cortical ischemia and postischemic environmental enrichment on hippocampal cell genesis and differentiation in the adult rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22: 852-60.
- Komitova M., Mattsson B., Johansson B. B. & Eriksson P.S. (2005). Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke*, 36: 1278-82.
- Kondziolka D., Wechsler L., Goldstein S., Meltzer C., Thulborn K. R., Gebel J. et al. (2000). Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology*, 55: 565-9.
- Kondziolka D., Steinberg G. K., Wechsler L., Meltzer C. C., Elder E., Gebel J. et al. (2005). Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J Neurosurg*, 103: 38-45.
- Kostura L., Kraitchman D. L., Mackay A. M., Pittenger M. F. & Bulte J.W.M. (2004). Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomed*, 17: 513-7.
- Kotila M., Numminen H., Waltimo O. & Kaste M. (1999). Post-stroke depression and functional recovery in a population-based stroke register. The Finnstroke study. *Eur J Neurol*, 6: 309-12.
- Kraitchman D. L., Heldman A. W., Atalar E., Amado L. C., Martin B. J., Pittenger M. F. et al. (2003). In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation*, 107: 2290-3.
- Kraitchman D. L., Tatsumi M., Gilson W. D., Ishimori T., Kedziorek D., Walczak P. et al. (2005). Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation*, 112: 1451-61.
- Krampera M., Marconi S., Pasini A., Galiè M., Rigotti G., Mosna F. et al. (2007). Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone*, 40: 382-90.
- Krupinski J., Kaluza J., Kumar P., Kumar S. & Wang J.M. (1994). Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*, 25: 1794-8.
- Kubis N., Tomita Y., Tran-Dinh A., Planat-Benard V., André M., Karaszewski B. et al. (2007). Vascular fate of adipose tissue-derived adult stromal cells in the ischemic murine brain: A combined imaging-histological study. *Neuroimage*, 34: 1-11.
- Kurozumi K., Nakamura K., Tamiya T., Kawano Y., Kobune M., Hirai S. et al. (2004). BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther*, 9: 189-97.
- Kurozumi K., Nakamura K., Tamiya T., Kawano Y., Ishii K., Kobune M. et al. (2005). Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther*, 11: 96-104.
- Kwakkel G., van Peppen R., Wagenaar R. C., Wood Dauphinee S., Richards C., Ashburn A. et al. (2004). Effects of augmented exercise therapy time after stroke: a meta-analysis. *Stroke*, 35: 2529-39.
- Lappalainen R. S., Narkilahti S., Huhtala T., Liimatainen T., Suuronen T., Närvänen A. et al. (2008). The SPECT imaging shows the accumulation of neural progenitor cells into internal organs after systemic administration in middle cerebral artery occlusion rats. *Neurosci Lett*, 440: 246-50.
- Le Blanc K. & Ringdén O. (2007^a). Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*, 262: 509-25.
- Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B., Remberger M., Sundberg B., Arvidson J. et al. (2007^b). Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*, 21: 1733-8.
- Le Blanc K., Frassoni F., Ball L., Locatelli F., Roelofs H., Lewis I. et al. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, 371: 1579-86.
- Lees K. R., Zivin J. A., Ashwood T., Davalos A., Davis S. M., Diener H. et al. (2006). NXY-059 for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 354: 588-600.
- Lefaucheur J. (2006). Stroke recovery can be enhanced by using repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). *Neurophysiol Clin*, 36: 105-15.

- Leskela M., Hietanen M., Kalska H., Ylikoski R., Pohjasvaara T., Mantyla R. et al. (1999). Executive functions and speed of mental processing in elderly patients with frontal or nonfrontal ischemic stroke. *Eur J Neurol*, 6: 653-61.
- Levy E. I., Ecker R. D., Horowitz M. B., Gupta R., Hanel R. A., Sauvageau E. et al. (2006). Stent-assisted intracranial recanalization for acute stroke: early results. *Neurosurgery*, 58: 458-63; discussion 458-63.
- Lewin M., Carlesso N., Tung C. H., Tang X. W., Cory D., Scadden D. T. et al. (2000). Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol*, 18: 410-4.
- Li L., Jiang Q., Ding G., Zhang L., Zhang Z. G., Li Q. et al. (2009). Effects of administration route on migration and distribution of neural progenitor cells transplanted into rats with focal cerebral ischemia, an MRI study.. *J Cereb Blood Flow Metab*: epub (nov.).
- Li W. Y., Choi Y. J., Lee P. H., Huh K., Kang Y. M., Kim H. S. et al. (2008). Mesenchymal stem cells for ischemic stroke: changes in effects after ex vivo culturing. *Cell Transplant*, 17: 1045-59.
- Li Y., Chen J., Chen X. G., Wang L., Gautam S. C., Xu Y. X. et al. (2002). Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology*, 59: 514-23.
- Li Y., Chen J., Wang L., Lu M. & Chopp M. (2001). Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology*, 56: 1666-72.
- Li Y., Chopp M., Chen J., Wang L., Gautam S. C., Xu Y. X. et al. (2000). Intraatrial transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20: 1311-9.
- Liao W., Xie J., Zhong J., Liu Y., Du L., Zhou B. et al. (2009). Therapeutic effect of human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in a rat model of stroke. *Transplantation*, 87: 350-9.
- Lichtenwalner R. J. & Parent J.M. (2006). Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26: 1-20.
- Lin C., Chang C., Cheung W., Lin M., Chen J., Hsu C. Y. et al. (2008). Dynamic changes in vascular permeability, cerebral blood volume, vascular density, and size after transient focal cerebral ischemia in rats: evaluation with contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28: 1491-501.
- Lin T., Sun S., Cheung W., Li F. & Chang C. (2002). Dynamic changes in cerebral blood flow and angiogenesis after transient focal cerebral ischemia in rats. Evaluation with serial magnetic resonance imaging. *Stroke*, 33: 2985-91.
- Lindsberg P. J. & Mattle H.P. (2006). Therapy of basilar artery occlusion: a systematic analysis comparing intra-arterial and intravenous thrombolysis. *Stroke*, 37: 922-8.
- Lindvall O., Brundin P., Widner H., Rehnström S., Gustavii B., Frackowiak R. et al. (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*, 247: 574-7.
- Lindvall O. (2001). Parkinson disease. Stem cell transplantation. *Lancet*, 358 Suppl: S48.
- Lindvall O. (2003). Stem cells for cell therapy in Parkinson's disease. *Pharmacol Res*, 47: 279-87.
- Lindvall O. & Kokaia Z. (2004). Recovery and rehabilitation in stroke: stem cells. *Stroke*, 35: 2691-4.
- Lindvall O., Kokaia Z. & Martínez-Serrano A. (2004). Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med*, 10 Suppl: S42-50.
- Lindvall O. & Kokaia Z. (2005). Stem cell therapy for human brain disorders. *Kidney Int*, 68: 1937-9.
- Lindvall O. & Kokaia Z. (2006). Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature*, 441: 1094-6.
- Liu H., Honmou O., Harada K., Nakamura K., Houkin K., Hamada H. et al. (2006). Neuroprotection by PIGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischaemia. *Brain*, 129: 2734-45.
- Liu X. S., Chopp M., Zhang R. L., Hozeska-Solgot A., Gregg S. C., Buller B. et al. (2009). Angiopoietin 2 mediates the differentiation and migration of neural progenitor cells in the subventricular zone after stroke. *J Biol Chem*, 284: 22680-9.
- Liu Z., Li Y., Qu R., Shen L., Gao Q., Zhang X. et al. (2007). Axonal sprouting into the denervated spinal cord and synaptic and postsynaptic protein expression in the spinal cord after transplantation of bone marrow stromal cell in stroke rats. *Brain Res*, 1149: 172-80.
- Longa E. Z., Weinstein P. R., Carlson S. & Cummins R. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20: 84-91.
- Loubinoux I., Carel C., Pariente J., Dechaumont S., Albucher J., Marque P. et al. (2003). Correlation between cerebral reorganization and motor recovery after subcortical infarcts. *Neuroimage*, 20: 2166-80.
- Lunde K., Solheim S., Aakhus S., Arnesen H., Abdelnoor M., Egeland T. et al. (2006). Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 355: 1199-209.
- Macas J., Nern C., Plate K. H. & Momma S. (2006). Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *J Neurosci*, 26: 13114-9.
- Macleod M. R., van der Worp H. B., Sena E. S., Howells D. W., Dirnagl U. & Donnan G.A. (2008). Evidence for the efficacy of NXY-059 in experimental focal cerebral ischaemia is confounded by study quality. *Stroke*, 39: 2824-9.
- Marler J., Tilley B., Lu M., Brott T., Lyden P. & Grotta J. (2000). Early stroke treatment associated with better outcome. The NINDS rt-PA stroke study. *Neurology*, 55: 1649-55.
- Martin G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 7634-8.
- Mathers C. D. & Loncar D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030.. *PLoS Med*, 3: e442.
- Mazighi M., Serfaty J., Labreuche J., Laissy J., Meseguer E., Lavallée P. C. et al. (2009). Comparison of intravenous alteplase with a combined intravenous-endovascular approach in patients with stroke and confirmed arterial occlusion (RECANALISE study): a prospective cohort study.. *Lancet Neurol*, 8: 802-809.

- **Mazzini L., Mareschi K., Ferrero I., Vassallo E., Oliveri G., Boccaletti R. et al.** (2006). Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res*, 28: 523-6.
- **Meinzer M., Djundja D., Barthel G., Elbert T. & Rockstroh B.** (2005). Long-term stability of improved language functions in chronic aphasia after constraint-induced aphasia therapy. *Stroke*, 36: 1462-6.
- **Meinzer M., Flaisch T., Breitenstein C., Wienbruch C., Elbert T. & Rockstroh B.** (2008). Functional re-recruitment of dysfunctional brain areas predicts language recovery in chronic aphasia. *Neuroimage*, 39: 2038-46.
- **Mendonca M. L. F. D., Freitas G. R. D., Silva S. A. D., Manfrim A., Falcao C. H. E., Gonzales C. et al.** (2006). Safety of intra-arterial autologous bone marrow mononuclear cell transplantation for acute ischemic stroke. *Arq Bras Cardiol*, 86: 52-5.
- **Mezey E., Key S., Vogelsang G., Szalayova I., Lange G. D. & Crain B.** (2003). Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 1364-9.
- **Mimura T., Dezawa M., Kanno H. & Yamamoto I.** (2005). Behavioral and histological evaluation of a focal cerebral infarction rat model transplanted with neurons induced from bone marrow stromal cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64: 1108-17.
- **Minnerup J., Heidrich J., Rogalewski A., Schäbitz W. & Wellmann J.** (2009). The efficacy of erythropoietin and its analogues in animal stroke models: a meta-analysis. *Stroke*, 40: 3113-20.
- **Mittmann T., Luhmann H. J., Schmidt-Kastner R., Eysel U. T., Weigel H. & Heinemann U.** (1994). Lesion-induced transient suppression of inhibitory function in rat neocortex in vitro. *Neuroscience*, 60: 891-906.
- **Modo M., Stroemer R. P., Tang E., Patel S. & Hodges H.** (2002). Effects of implantation site of stem cell grafts on behavioral recovery from stroke damage. *Stroke*, 33: 2270-8.
- **Modo M., Mellodew K., Cash D., Fraser S. E., Meade T. J., Price J. et al.** (2004). Mapping transplanted stem cell migration after a stroke: a serial, in vivo magnetic resonance imaging study. *Neuroimage*, 21: 311-7.
- **Moriscot C., de Fraipont F., Richard M., Marchand M., Savatier P., Bosco D. et al.** (2005). Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. *Stem Cells*, 23: 594-603.
- **Morris P. L., Raphael B. & Robinson R.G.** (1992). Clinical depression is associated with impaired recovery from stroke. *Med J Aust*, 157: 239-42.
- **Morrison S. J. & Kimble J.** (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441: 1068-74.
- **Murray C. J. & Lopez A.D.** (1997). Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 349: 1269-76.
- **National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group** (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med*, 333: 1581-7.
- **Navaratna D., Guo S., Arai K. & Lo E.H.** (2009). Mechanisms and targets for angiogenic therapy after stroke. *Cell Adh Migr*, 3: 216-23.
- **Neirinckx R. D., Burke J. F., Harrison R. C., Forster A. M., Andersen A. R. & Lassen N.A.** (1988). The retention mechanism of technetium-99m-HM-PAO: intracellular reaction with glutathione. *J Cereb Blood Flow Metab*, 8: S4-12.
- **Nelson P. T., Kondziolka D., Wechsler L., Goldstein S., Gebel J., DeCesare S. et al.** (2002). Clonal human (hNT) neuron grafts for stroke therapy: neuropathology in a patient 27 months after implantation. *Am J Pathol*, 160: 1201-6.
- **Newman M. B., Misiuta I., Willing A. E., Zigova T., Karl R. C., Borlongan C. V. et al.** (2005). Tumorigenicity issues of embryonic carcinoma-derived stem cells: relevance to surgical trials using NT2 and hNT neural cells. *Stem Cells Dev*, 14: 29-43.
- **Nighoghossian N., Wiart M., Cakmak S., Berthezene Y., Derex L., Cho T. et al.** (2007). Inflammatory response after ischemic stroke: a USPIO-enhanced MRI study in patients. *Stroke*, 38: 303-7.
- **Nighoghossian N., Wiart M. & Berthezene Y.** (2008). Novel applications of magnetic resonance imaging to image tissue inflammation after stroke. *J Neuroimaging*, 18: 349-52.
- **Nudo R. J.** (2006). Plasticity. *NeuroRx*, 3: 420-7.
- **Nudo R. J., Wise B. M., SiFuentes F. & Milliken G.W.** (1996). Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. *Science*, 272: 1791-4.
- **Ohab J. J., Fleming S., Blesch A. & Carmichael S.T.** (2006). A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci*, 26: 13007-16.
- **Ohtaki H., Ylostalo J. H., Foraker J. E., Robinson A. P., Reger R. L., Shioda S. et al.** (2008). Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 14638-43.
- **Okita K., Ichisaka T. & Yamanaka S.** (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448: 313-7.
- **Onda T., Honmou O., Harada K., Houkin K., Hamada H. & Kocsis J.D.** (2008). Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28: 329-40.
- **Paciaroni M., Agnelli G., Micheli S. & Caso V.** (2007). Efficacy and safety of anticoagulant treatment in acute cardioembolic stroke: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Stroke*, 38: 423-30.

- Pavlichenko N., Sokolova I., Vijde S., Shvedova E., Alexandrov G., Krouglyakov P. et al. (2008). Mesenchymal stem cells transplantation could be beneficial for treatment of experimental ischemic stroke in rats. *Brain Res*, 1233: 203-13.
- Paxinos George & Watson Charles (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. Ed.
- Pfefferkorn T., Eppinger U., Linn J., Birnbaum T., Herzog J., Straube A. et al. (2009). Long-term outcome after suboccipital decompressive craniectomy for malignant cerebellar infarction. *Stroke*, 40: 3045-50.
- Piccini P., Lindvall O., Björklund A., Brundin P., Hagell P., Ceravolo R. et al. (2000). Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Ann Neurol*, 48: 689-95.
- Piera C., Pavia A., Bassa P. & García J. (1990). Preparation of 99mTc HM-PAO. *J Nucl Med*, 31: 127-8.
- Pillai D. R., Dittmar M. S., Baldaranov D., Heidemann R. M., Henning E. C., Schuierer G. et al. (2009). Cerebral ischemia-reperfusion injury in rats--a 3 T MRI study on biphasic blood-brain barrier opening and the dynamics of edema formation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29: 1846-55.
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D. et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-7.
- Plate K. H. (1999). Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58: 313-20.
- Pluchino S., Muzio L., Imitola J., Deleidi M., Alfaro-Cervello C., Salani G. et al. (2008). Persistent inflammation alters the function of the endogenous brain stem cell compartment. *Brain*, 131: 2564-78.
- Plumas J., Chaperot L., Richard M., Molens J., Bensa J. & Favrot M. (2005). Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia*, 19: 1597-604.
- Ramas J., Courbon A., Fayolle-Minon I. & Calmels P. (2007). Training programs in stroke patients: literature review. *Ann Readapt Med Phys*, 50: 28-41.
- Rauschecker J. P. (1997). Mechanisms of compensatory plasticity in the cerebral cortex. *Adv Neurol*, 73: 137-46.
- Rha J. & Saver J.L. (2007). The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke*, 38: 967-73.
- Robertson I. H., Ridgeway V., Greenfield E. & Parr A. (1997). Motor recovery after stroke depends on intact sustained attention: a 2-year follow-up study. *Neuropsychology*, 11: 290-5.
- Roitberg B. (2004). Transplantation for stroke. *Neurol Res*, 26: 256-64.
- Roitberg B. Z., Mangubat E., Chen E., Sugaya K., Thulborn K. R., Kordower J. H. et al. (2006). Survival and early differentiation of human neural stem cells transplanted in a nonhuman primate model of stroke. *J Neurosurg*, 105: 96-102.
- Rossi D. J., Oshima T. & Attwell D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, 403: 316-21.
- Sachdev P. S., Brodaty H., Valenzuela M. J., Lorentz L. M. & Koschera A. (2004). Progression of cognitive impairment in stroke patients. *Neurology*, 63: 1618-23.
- Saini M., Saqqur M., Kamruzzaman A., Lees K. R., Shuaib A. (2009). Effect of hyperthermia on prognosis after acute ischemic stroke. *Stroke*, 40: 3051-9.
- Saver J. L. (2006). Time is brain--quantified. *Stroke*, 37: 263-6.
- Savitz S. I., Rosenbaum D. M., Dinsmore J. H., Wechsler L. R. & Caplan L.R. (2002). Cell transplantation for stroke. *Ann Neurol*, 52: 266-75.
- Savitz S. I., Dinsmore J., Wu J., Henderson G. V., Stieg P. & Caplan L.R. (2005). Neurotransplantation of fetal porcine cells in patients with basal ganglia infarcts: a preliminary safety and feasibility study. *Cerebrovasc Dis*, 20: 101-7.
- Savitz S. I. & Fisher M. (2007). Future of neuroprotection for acute stroke: in the aftermath of the SAINT trials. *Ann Neurol*, 61: 396-402.
- Savitz S. I. (2009). Introduction to cellular therapy: the next frontier for stroke therapeutics. *Stroke*, 40: S141-2.
- Schmidt W., Heuschmann P., Taeger D., Henningsen H., Buecker-Nott H. & Berger K. (2004). Determinants of IV heparin treatment in patients with ischemic stroke. *Neurology*, 63: 2407-9.
- Schonewille W. J., Wijman C. A. C., Michel P., Rueckert C. M., Weimar C., Mattle H. P. et al. (2009). Treatment and outcomes of acute basilar artery occlusion in the Basilar Artery International Cooperation Study (BASICS): a prospective registry study. *Lancet Neurol*, 8: 724-30.
- Schumacher J. M., Ellias S. A., Palmer E. P., Kott H. S., Dinsmore J., Dempsey P. K. et al. (2000). Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology*, 54: 1042-50.
- Seminatore C., Polentes J., Ellman D., Kozubenko N., Itier V., Tine S. et al. (2010). The postischemic environment differentially impacts teratoma or tumor formation after transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Stroke*, 41: 153-9.
- Shapiro E. M., Skrtic S., Sharer K., Hill J. M., Dunbar C. E. & Koretsky A.P. (2004). MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 10901-6.
- Sheikh K., Brennan P. J., Meade T. W., Smith D. S. & Goldenberg E. (1983). Predictors of mortality and disability in stroke. *J Epidemiol Community Health*, 37: 70-4.
- Shen L. H., Li Y., Chen J., Cui Y., Zhang C., Kapke A. et al. (2007^a). One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke. *Stroke*, 38: 2150-6.
- Shen L. H., Li Y., Chen J., Zacharek A., Gao Q., Kapke A. et al. (2007^b). Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27: 6-13.
- Shuaib A., Lees K. R., Lyden P., Grotta J., Davalos A., Davis S. M. et al. (2007). NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 357: 562-71.
- Shyu W., Chen C., Lin S., Lee Y. & Li H. (2007). Efficient tracking of non-iron-labeled mesenchymal stem cells with serial MRI in chronic stroke rats. *Stroke*, 38: 367-74.

- Shyu W., Lin S., Yen P., Su C., Chen D., Wang H. et al. (2008). Stromal cell-derived factor-1 alpha promotes neuroprotection, angiogenesis, and mobilization/homing of bone marrow-derived cells in stroke rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 324: 834-49.
- Silvestrelli G., Parnetti L., Paciaroni M., Caso V., Corea F., Vitali R. et al. (2006). Early admission to stroke unit influences clinical outcome. *Eur J Neurol*, 13: 250-5.
- Smith W. S., Sung G., Saver J., Budzik R., Duckwiler G., Liebeskind D. S. et al. (2008). Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: final results of the Multi MERCI trial. *Stroke*, 39: 1205-12.
- Smith W. S., Sung G., Starkman S., Saver J. L., Kidwell C. S., Gobin Y. P. et al. (2005). Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: results of the MERCI trial. *Stroke*, 36: 1432-8.
- Song M., Kim Y., Kim Y., Ryu S., Song I., Kim S. U. et al. (2009). MRI tracking of intravenously transplanted human neural stem cells in rat focal ischemia model. *Neurosci Res*, 64: 235-9.
- STAIR (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable) (1999). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke*, 30: 2752-8.
- Stanika R. I., Pivovarov N. B., Brantner C. A., Watts C. A., Winters C. A. & Andrews S.B. (2009). Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 9854-9.
- STEPS (2009). Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke (STEPS): bridging basic and clinical science for cellular and neurogenic factor therapy in treating stroke. *Stroke*, 40: 510-5.
- Stillely C. S., Ryan C. M., Kondziolka D., Bender A., DeCesare S. & Wechsler L. (2004). Changes in cognitive function after neuronal cell transplantation for basal ganglia stroke. *Neurology*, 63: 1320-2.
- Strbian D., Durukan A., Pitkonen M., Marinkovic I., Tatlisumak E., Pedrono E. et al. (2008). The blood-brain barrier is continuously open for several weeks following transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience*, 153: 175-81.
- Sudres M., Norol F., Trenado A., Grégoire S., Charlotte F., Levacher B. et al. (2006). Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol*, 176: 7761-7.
- Sunderland A., Bowers M. P., Sluman S. M., Wilcock D. J. & Ardron M.E. (1999). Impaired dexterity of the ipsilateral hand after stroke and the relationship to cognitive deficit. *Stroke*, 30: 949-55.
- Suárez-Monteaagudo C., Hernández-Ramírez P., Alvarez-González L., García-Maeso I., de la Cuétara-Bernal K., Castillo-Díaz L. et al. (2009). Autologous bone marrow stem cell neurotransplantation in stroke patients. An open study. *Restor Neurol Neurosci*, 27: 151-61.
- Takahashi K. & Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-76.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K. et al. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131: 861-72.
- Takano T., Oberheim N., Cotrina M. L. & Nedergaard M. (2009). Astrocytes and ischemic injury. *Stroke*, 40: S8-12.
- Tatu L., Moulin T., Bogousslavsky J. & Duvernoy H. (1998). Arterial territories of the human brain: cerebral hemispheres.. *Neurology*, 50: 1699-708.
- The International Stroke Trial (1997). The International Stroke Trial (IST): a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischaemic stroke. International Stroke Trial Collaborative Group. *Lancet*, 349: 1569-81.
- Thomalla G., Schwark C., Sobesky J., Bluhmki E., Fiebach J. B., Fiehler J. et al. (2006). Outcome and symptomatic bleeding complications of intravenous thrombolysis within 6 hours in MRI-selected stroke patients: comparison of a German multicenter study with the pooled data of ATLANTIS, ECASS, and NINDS tPA trials. *Stroke*, 37: 852-8.
- Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S. et al. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-7.
- Thored P., Arvidsson A., Cacci E., Ahlenius H., Kallur T., Darsalia V. et al. (2006). Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells*, 24: 739-47.
- Thored P., Heldmann U., Gomes-Leal W., Gisler R., Darsalia V., Taneera J. et al. (2009). Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia*, 57: 835-49.
- Thored P., Wood J., Arvidsson A., Cammenga J., Kokaia Z. & Lindvall O. (2007). Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke*, 38: 3032-9.
- Todo K., Kitagawa K., Sasaki T., Omura-Matsuoka E., Terasaki Y., Oyama N. et al. (2008). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances leptomeningeal collateral growth induced by common carotid artery occlusion. *Stroke*, 39: 1875-82.
- Toth Z. E., Leker R., Shahar T., Pastorino S., Szalayova I., Asemenew B. et al. (2008). The combination of granulocyte colony stimulatory factor and stem cell factor significantly increases the number of bone marrow derived endothelial cells in brains of mice following cerebral ischemia. *Blood*, 111 : 5544-52.
- Toyama K., Honmou O., Harada K., Suzuki J., Houkin K., Hamada H. et al. (2009). Therapeutic benefits of angiogenetic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Exp Neurol*, 216: 47-55.
- Tran-Dinh A., Kubis N., Tomita Y., Karaszewski B., Calando Y., Oudina K. et al. (2006). In vivo imaging with cellular resolution of bone marrow cells transplanted into the ischemic brain of a mouse. *Neuroimage*, 31: 958-67.
- Tropres I., Grimault S., Vaeth A., Grillon E., Julien C., Payen J. F. et al. (2001). Vessel size imaging. *Magn Reson Med*, 45: 397-408.

- **Vahedi K., Hofmeijer J., Juettler E., Vicaut E., George B., Algra A. et al.** (2007). Early decompressive surgery in malignant infarction of the middle cerebral artery: a pooled analysis of three randomised controlled trials. *Lancet Neurol*, 6: 215-22.
- **Valable S., Barbier E. L., Bernaudin M., Roussel S., Segebarth C., Petit E. et al.** (2007). In vivo MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma. *Neuroimage*, 37 Suppl 1: S47-58.
- **Valable S., Lemasson B., Farion R., Beaumont M., Segebarth C., Remy C. et al.** (2008). Assessment of blood volume, vessel size, and the expression of angiogenic factors in two rat glioma models: a longitudinal in vivo and ex vivo study. *NMR Biomed*, 21: 1043-56.
- **Van Peppen R. P. S., Kwakkel G., Wood-Dauphinee S., Hendriks H. J. M., Van der Wees P. J. & Dekker J.** (2004). The impact of physical therapy on functional outcomes after stroke: what's the evidence?. *Clin Rehabil*, 18: 833-62.
- **Vats A., Bielby R. C., Tolley N. S., Nerem R. & Polak J.M.** (2005). Stem cells. *Lancet*, 366: 592-602.
- **Vendrame M., Cassady J., Newcomb J., Butler T., Pennypacker K. R., Zigova T. et al.** (2004). Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke*, 35: 2390-5.
- **Wagner K. R., Kleinholz M., de Courten-Myers G. M. & Myers R.E.** (1992). Hyperglycemic versus normoglycemic stroke: topography of brain metabolites, intracellular pH, and infarct size. *J Cereb Blood Flow Metab*, 12: 213-22.
- **Wahlgren N., Ahmed N., Dávalos A., Ford G. A., Grond M., Hacke W. et al.** (2007). Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet*, 369: 275-82.
- **Wahlgren N., Ahmed N., Dávalos A., Hacke W., Millán M., Muir K. et al.** (2008). Thrombolysis with alteplase 3-4.5 h after acute ischaemic stroke (SITS-ISTR): an observational study. *Lancet*, 372: 1303-9.
- **Walczak P., Zhang J., Gilad A. A., Kedziorek D. A., Ruiz-Cabello J., Young R. G. et al.** (2008). Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke*, 39: 1569-74.
- **Wang L., Wang Z., Shen C., You M., Xiao J. & Chen G.** (2009^a). Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells grown in terpolyesters of 3-hydroxyalkanoates scaffolds into nerve cells. *Biomaterials*: epub (dec.).
- **Wang X., Mao X., Xie L., Greenberg D. A. & Jin K.** (2009^b). Involvement of Notch1 signaling in neurogenesis in the subventricular zone of normal and ischemic rat brain in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29: 1644-54.
- **Wang Y., Kilic E., Kilic U., Weber B., Bassetti C. L., Marti H. H. et al.** (2005). VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena. *Brain*, 128: 52-63.
- **Wechsler L. R.** (2009). Clinical trials of stroke therapy: which cells, which patients?. *Stroke*, 40: S149-51.
- **Weiller C., Chollet F., Friston K. J., Wise R. J. & Frackowiak R.S.** (1992). Functional reorganization of the brain in recovery from striatocapsular infarction in man. *Ann Neurol*, 31: 463-72.
- **Weiller C., Ramsay S. C., Wise R. J., Friston K. J. & Frackowiak R.S.** (1993). Individual patterns of functional reorganization in the human cerebral cortex after capsular infarction. *Ann Neurol*, 33: 181-9.
- **Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K. et al.** (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 448: 318-24.
- **Wiert M., Davoust N., Pialat J., Desestret V., Moucharrafié S., Cho T. et al.** (2007). MRI monitoring of neuroinflammation in mouse focal ischemia. *Stroke*, 38: 131-7.
- **Witte O. W. & Stoll G.** (1997). Delayed and remote effects of focal cortical infarctions: secondary damage and reactive plasticity. *Adv Neurol*, 73: 207-27.
- **Woodbury D., Schwarz E. J., Prockop D. J. & Black I.B.** (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 61: 364-70.
- **Wu J., Sun Z., Sun H., Wu J., Weisel R. D., Keating A. et al.** (2007). Intravenously administered bone marrow cells migrate to damaged brain tissue and improve neural function in ischemic rats. *Cell Transplant*, 16: 993-1005.
- **Wu J., Sun Z., Sun H., Wu J., Weisel R. D., Keating A. et al.** (2008). Intravenously administered bone marrow cells migrate to damaged brain tissue and improve neural function in ischemic rats. *Cell Transplant*, 16: 993-1005.
- **Yan Y., Sailor K. A., Lang B. T., Park S., Vemuganti R. & Dempsey R.J.** (2007). Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27: 1213-24.
- **Yonemori F., Yamada H., Yamaguchi T., Uemura A. & Tamura A.** (1996). Spatial memory disturbance after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16: 973-80.
- **Yonemori F., Yamaguchi T., Yamada H. & Tamura A.** (1999). Spatial cognitive performance after chronic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19: 483-94.
- **Yoo S., Kim S., Lee S., Lee H., Kim H., Lee Y. et al.** (2008). Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. *Exp Mol Med*, 40: 387-97.
- **Zangi L., Margalit R., Reich-Zeliger S., Bachar-Lustig E., Beilhack A., Negrin R. et al.** (2009). Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*, 27: 2865-74.
- **Zappia E., Casazza S., Pedemonte E., Benvenuto F., Bonanni I., Gerdoni E. et al.** (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, 106: 1755-61.
- **Zhang Z. G., Zhang L., Jiang Q. & Chopp M.** (2002). Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res*, 90: 284-8.
- **Zhang J., Li Y., Chen J., Yang M., Katakowski M., Lu M. et al.** (2004). Expression of insulin-like growth factor 1 and receptor in ischemic rats treated with human marrow stromal cells. *Brain Res*, 1030: 19-27.

- **Zhang R. L., Zhang Z. G. & Chopp M.** (2005). Neurogenesis in the adult ischemic brain: generation, migration, survival, and restorative therapy. *Neuroscientist*, 11: 408-16.
- **Zhang R. L., Chopp M., Gregg S. R., Toh Y., Roberts C., Letourneau Y. et al.** (2009). Patterns and dynamics of subventricular zone neuroblast migration in the ischemic striatum of the adult mouse. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29: 1240-50.
- **Zhang Z. G. & Chopp M.** (2009). Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *Lancet Neurol*, 8: 491-500.
- **Zhao L., Duan W., Reyes M., Keene C. D., Verfaillie C. M. & Low W.C.** (2002). Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*, 174: 11-20.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACI :	Artère carotide interne
ACM :	Artère cérébrale moyenne
Ang :	Angiopoiétine
AVC :	Accident vasculaire cérébral
BDNF :	Brain derived neurotrophic factor
CFU-F :	Colony forming unit - fibroblast
CMN :	Cellules mononucléées de moelle osseuse
CSH :	Cellules souches hématopoiétiques
CSM :	Cellules souches mésenchymateuses
CSMh :	Cellules souches mésenchymateuses humaines
DSC :	Débit sanguin cérébral
GDNF :	Glial cell line derived neurotrophic factor
EG-T₂* :	Echo de gradient pondéré en T ₂ *
HMPAO :	Hexamethylpropylène amine oxime
IA :	Intraartériel
IC :	Intracérébral
IGF-1 :	Insulin growth factor
IL :	Interleukine
IRM :	Imagerie par résonance magnétique
IV :	Intraveineux
MEMα :	Minimum essential medium α
NSS :	Neurological Severity Score
oACM :	Occlusion de l'artère cérébrale moyenne
HuNu :	Anticorps anti-noyaux humains
GFAP :	Glial fibrillary acidic protein
M-SPIO :	Micrometer SPIO
NF :	Neurofilament
NS :	Non significatif
NSS :	Neurological Severity Score
PBS :	Phosphate-buffered saline
ROI :	Région d'intérêt (region of interest)
SE :	Spin echo
SPIO :	Superparamagnetic iron oxides
TDM :	Tomodensitométrie
TNF :	Tumor necrosis factor
TRA :	Test de retrait d'adhésif
T₂SE :	T ₂ pondéré en echo de spin
UMTCT :	Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire
UNV :	Unité Neuro-Vasculaire
USPIO :	Ultrasmall SPIO
VEGF :	Vascular endothelial growth factor
VSC :	Volume sanguin cérébral
7-AAD :	7-amino-actinomycine D

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont la première cause de handicap de l'adulte. Favoriser la plasticité cérébrale post-lésionnelle représente un objectif thérapeutique majeur. Dans ce contexte, la thérapie cellulaire a récemment émergé. Son action, fondée sur la « réparation » du tissu cérébral, a montré un bénéfice sur la récupération fonctionnelle dans des modèles d'ischémie cérébrale. La transposition de ce traitement à l'homme reste à ce jour limitée à des études pilotes.

Dans nos travaux précliniques, nous avons montré, après un infarctus cérébral chez le rat, une bonne tolérance et un bénéfice fonctionnel de l'administration intracérébrale (à la phase aiguë) et intraveineuse (à la phase subaiguë) de cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh) de grade clinique. La survie des CSMh greffées (possible durant plusieurs semaines) et leur différenciation en cellules d'intérêt (neurones, astrocytes) sont très faibles et ne peuvent expliquer à elles seules le bénéfice observé. Parmi les mécanismes d'action possibles des CSM (effet neurotrophique, pro-angiogénique, immunomodulation...), nous avons mis en évidence par IRM un effet microvasculaire précoce. Nous avons également montré l'innocuité du marquage des CSMh par microparticules ferriques pour l'IRM cellulaire et la microscopie. Ce marquage cellulaire est utile pour détecter et suivre par IRM des cellules greffées au sein du cerveau (durant au moins 15 jours), mais nous a paru insuffisant dans le cadre d'une injection IV. Pour évaluer la biodistribution des CSMh injectées par voie IV à la phase subaiguë, nous avons effectué une étude par imagerie nucléaire qui a permis d'identifier l'attraction rapide de CSMh vers l'infarctus cérébral. En parallèle, la mise en place d'un essai clinique de phase 2 a été effectuée.

Le délai, la voie optimale d'administration ainsi que la source cellulaire à utiliser restent encore controversés. L'optimisation de la thérapie cellulaire nécessite encore le développement de projets de recherche translationnelle associant les études expérimentales et les essais cliniques. C'est dans ces conditions que la thérapie cellulaire pourrait devenir un traitement efficace après un AVC.

Mots-clefs : Ischémie cérébrale focale / Accident Vasculaire Cérébral / Rat / Cellules Souches Mésenchymateuses / Thérapie Cellulaire / Transplantation / Greffe / Plasticité / Récupération / IRM

Stroke is the leading cause of acquired adult disability. Improving brain plasticity after stroke represents an important therapeutic strategy. Cell therapy favours functional recovery after cerebral ischemia in rodent models. The pioneer clinical studies did not reproduce this benefit for patients due to a limited number of studied patients.

In our preclinical studies, we observed a good tolerance and a functional benefit of the intracerebral (at the acute phase) and intravenous (IV) (at the subacute phase) administration of clinical-grade human mesenchymal stem cells (hMSC). The hMSC survival (during several weeks) and their differentiation into neurons or astrocytes are very limited and can not explain alone the functional benefit. Among different mechanisms of action of hMSC (neurotrophic and/or proangiogenic effects, immunomodulation...), we showed by MRI an early microvascular effect. We also showed that hMSC can be labeled for MRI and microscopy by iron microparticles without altering cell properties. This cell labeling is useful to detect and follow hMSC grafted into the brain but is insufficient to follow the IV injected hMSC. To assess the biodistribution of IV injected hMSC, we conducted a nuclear imaging study. This experiment showed that the hMSC are attracted to cerebral ischemic lesion in the first hours following their injection. In parallel, we developed a phase 2 clinical trial.

We do not know yet the best route of administration, the best dose and the optimal delay of the graft. The cell therapy optimization needs the development of translational projects with experimental studies linked to clinical trials. Thus cell therapy could become an efficient treatment for stroke.

Keywords: Focal cerebral ischemia / Stroke / Rat / Mesenchymal Stem Cells / Cell Therapy / Transplantation / Grafts / Plasticity / Recovery / MRI