



HAL
open science

Caractérisation par IRM précoce de la synergie tPA - inhibiteur du TAFI dans un modèle d'ischémie focale thromboembolique murin

Anne Durand

► **To cite this version:**

Anne Durand. Caractérisation par IRM précoce de la synergie tPA - inhibiteur du TAFI dans un modèle d'ischémie focale thromboembolique murin. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10320 . tel-01161552

HAL Id: tel-01161552

<https://theses.hal.science/tel-01161552>

Submitted on 8 Jun 2015

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 Claude Bernard  Lyon 1



Numéro d'ordre

Année 2013

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 11 décembre 2013

Par **Anne DURAND**

Caractérisation par IRM précoce de la synergie tPA - inhibiteur du TAFI dans un modèle d'ischémie focale thromboembolique murin.

Directeurs de thèse : Pr Norbert NIGHOGHOSSIAN - Pr Yves BERTHEZENE

Jury

Pr Alexandre KRAINIK
Pr Denis VIVIEN Rapporteur
Pr François PROUST Rapporteur
Dr Patrick GRAILHE
Pr Norbert NIGHOGHOSSIAN
Pr Yves BERTHEZENE

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

RESUME

L'efficacité du rtPA dans le traitement de l'ischémie aiguë est bien reconnue avec des effets secondaires graves nécessitant l'évaluation d'autres stratégies. Un modèle d'ischémie cérébrale focale a été décrit, réalisé par injection in situ de thrombine. Dans notre première étude, nous avons utilisé l'imagerie par résonance magnétique multimodale pour documenter les lésions et les zones de pénombre dans ce modèle. Malgré une occlusion de l'artère reproductible et une hypoperfusion marquée chez tous les sujets, une reperfusion spontanée est constatée dans 38% des cas, rendant l'IRM incontournable dans l'évaluation de ce modèle. La deuxième étude a comparé l'efficacité d'un TAFI inhibiteur seul ou en combinaison avec le rtPA à faible dose. Nous avons montré que la combinaison du TAFI inhibiteur avec le rtPA à faible dose n'est pas aussi efficace que la dose standard de rtPA, avec une tendance positive, tandis que le TAFI inhibiteur seul n'est pas efficace du tout. Le modèle thromboembolique présente un intérêt particulier dans l'évaluation des stratégies thérapeutiques associées au rtPA pour améliorer la thrombolyse, surtout lorsqu'il est évalué par un suivi longitudinal en IRM.

SUMMARY

The benefit of recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) treatment in stroke is well known with serious side effects requiring the evaluation of alternative strategies. Injection of thrombin in the middle cerebral artery of mice has been proposed as a new model of thromboembolic stroke. In the first study, we used multiparametric Magnetic Resonance Imaging (MRI), performed immediately after thrombin injection, to document occlusion and area at risk in this model. Despite similar MCA occlusion and marked hypoperfusion, half of animals showed a cortical lesion on DWI, while the other half demonstrated no or very limited lesion. Therefore, MRI measurement of basal lesion size is required to use this animal model in therapeutic studies. The second study compared efficacy between TAFI inhibitor alone and TAFI inhibitor in combination with low-dose rtPA. In conclusion, we showed that the combination of TAFI-I with low-dose rtPA is not as effective as the standard dose of rtPA, with a positive trend, while TAFI inhibition alone is not effective at all. The present thromboembolic model is of particular interest in assessing strategies rtPA association to improve thrombolysis, especially when coupled with longitudinal MRI assessment.

DISCIPLINE

Neurosciences

MOTS-CLES

Ischémie cérébrale focale ; infarctus cérébral ; IRM ; modèle animal ; thrombolyse ; reperfusion ; rtPA ; TAFI Inhibiteur, thérapie combinée

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Creatis, CNRS UMR 5220 – INSERM U1044 – Université Lyon 1 – INSA Lyon
Bâtiment Blaise Pascal
7, avenue Jean Capelle, 69621 Villeurbanne cedex FRANCE

A la NEUROCHIRURGIE

REMERCIEMENTS

A **M. Norbert Nighoghossian**, pour son soutien indéfectible, pour son enthousiasme et sa passion pour sa spécialité

A **M. Yves Berthezène**, pour son aide modératrice dans toute la fébrilité imposée par cette recherche

A **M. Denis Vivien**, pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail et pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire de recherche, ce qui a initié le début de ma thèse

A **M. François Proust**, membre éminent de notre société neurochirurgicale, passionné de neurochirurgie vasculaire, ce qui est une des plus belles spécialités.

A **M Alexandre Krainik et M Patrick Grailhe**, pour leur disponibilité et leur soutien pour ce travail.

A **Mme Isabelle Paty**, sa précieuse collaboration nous a été tellement profitable !

A **Marlène Wiart**, pour son immense soutien, son professionnalisme, ses qualités humaines sans faille et ses grandes qualités artistiques, Merci

A **Fabien Chauveau**, pour sa grande aide au cours des ces années, sa modération qui apaise et pour toutes les soirées festives passées en votre compagnie, Merci

A **Tae Hee**, qui comprend tellement bien la jonction entre la recherche et la proximité du soin médical, avec mon amitié la plus sincère et à une longue collaboration

A **Marilena, Adrien, Laure, Hugo, Jean-Baptiste et Radu...** pour tous les travaux réalisés ensemble dans la bonne humeur.

A **Joël, Christophe, Khalid et Hélène**, qui m'ont ouvert un cadre de travail épanoui. Un immense merci pour votre amitié au quotidien, pour l'attention que nous portons à nos patients et la qualité de notre NEUROCHIRURGIE.

A **toute ma famille, mes parents Nicole et Michel qui sont mes plus fervents soutiens, André, Mami et Papi, dans la tendresse de son souvenir, Eric Agnès Maxime et Lucile, Claire et Matthieu, Marie-Lys, Théo....** Merci

A **Aline et Stéphane, à Valérie et Bruno, à Monique, Sylvie et Eric, Amélie...et les autres**, à tous mes amis, vous m'êtes tellement chers et irremplaçables !!!!

A nos passions ! A la vie !

SOMMAIRE

RESUME.....	3
REMERCIEMENTS.....	5
SOMMAIRE.....	6
INTRODUCTION: ÉLÉMENTS BIBLIOGRAPHIQUES.....	8
PREMIERE PARTIE: L'INFARCTUS CÉRÉBRAL	
I. Infarctus cérébral:	10
1/ Epidémiologie.....	10
2/ Etiologies.....	11
II. Physiopathologie de l'infarctus cérébral.....	14
1/Thrombose et fibrinolyse, notions d'hémostase.....	14
1.1 La formation du thrombus	14
1.2 La fibrinolyse.....	16
2/ Le tissu à risque : la pénombre ischémique.....	18
2.1 Définition générale.....	18
2.2 Techniques d'imagerie d'évaluation de la pénombre.....	18
2.2.1 La tomographie par émissions de positons (TEP).....	18
2.2.2 Imagerie de résonance magnétique (IRM).....	19
2.2.2.1 Généralités : IRM multimodale.....	19
2.2.2.2 Les limites.....	20
2.2.3 Scanner X.....	21
2.2.4 Marqueurs biologiques et moléculaires.....	22
3/ Les mécanismes de compensation : la circulation collatérale.....	22
3.1 Anatomie et physiopathologie.....	23
3.1.1 Le polygone de Willis.....	23
3.1.2 Les anastomoses extracérébrales.....	24
3.1.3 Anastomoses corticales leptoméningées.....	25
3.2 Imagerie.....	26
4/ Le facteur temps.....	27
DEUXIEME PARTIE : LES STRATEGIES THERAPEUTIQUES	
I. Les stratégies médicamenteuses.....	29
1/ La reperfusion : thrombolyse intra veineuse.....	29
2/ Les traitements intra artériels.....	30
3/ Autres stratégies : les inhibiteurs du TAFI.....	31
II. Les stratégies mécaniques	31
1/ Les méthodes endovasculaires.....	31
2/ La sonothrombolyse.....	32
III. Le choix de la stratégie.....	32
1/ Sélection des patients sur la base d'une imagerie.....	32
2/ Estimation du risque hémorragique.....	33
IV. Neuroprotection.....	33

V.

TROISIEME PARTIE : LES MODELES EXPERIMENTAUX

I.	Les principes généraux.....	36
II.	Modèles d'ischémie permanente et transitoire.....	37
III.	Modèles d'ischémie cérébrale focale.....	37
	1/ Modèles emboliques.....	37
	1.1 Modèles thrombo emboliques.....	37
	1.2 Emboles synthétiques.....	39
	2/ Modèles mécaniques.....	40
	2.1 Occlusion de l'artère cérébrale moyenne par un filament intraluminal.	40
	2.2 Occlusion de l'artère cérébrale moyenne par abord chirurgical direct...	42
	3/ Autres modèles.....	43
	3.1 Photothrombose.....	43
	3.2 Occlusion de l'artère cérébrale moyenne par l'endothéline 1.....	43
IV.	Paramètres physiologiques.....	44
	1/ Température.....	44
	2/ Glycémie.....	44
	3/ Gaz du sang et pression artérielle.....	45
V.	Méthodes d'anesthésie et d'analgésie.....	45
VI.	Critères d'évaluation.....	46
	1/ Mesure de l'infarctus et expression des volumes lésionnels.....	46
	2/ Evaluation neurologique.....	47
VII.	Evaluation in vivo par IRM.....	47
	1/ Imagerie de diffusion.....	48
	2/ Imagerie de perfusion.....	48
	3/ Applications expérimentales.....	49
	PROBLEMATIQUE.....	51
	OBJECTIFS.....	52
	RESULTATS.....	53
	I. ETUDE 1	54
	II. ETUDE 2.....	71
	DISCUSSION.....	89
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	91
	REFERENCES.....	92
	LISTE DES PUBLICATIONS ANNE DURAND	110

INTRODUCTION:

ÉLÉMENTS BIBLIOGRAPHIQUES

PREMIERE PARTIE:
L'INFARCTUS CÉRÉBRAL

I. Infarctus cérébral: définition, principales causes et éléments d'épidémiologie

1. Epidémiologie

L'infarctus cérébral est défini comme une nécrose ischémique survenant dans un territoire vasculaire, la nécrose étant la résultante d'une inadéquation entre l'apport sanguin et la demande métabolique du tissu cérébral. En général, elle résulte d'une obstruction vasculaire par un caillot, formé dans le vaisseau lui-même (occlusion thrombotique) ou migrant d'une autre région artérielle (thrombus embolique).

Les infarctus représentent environ 85% des accidents vasculaires cérébraux (AVC), les hématomas intracérébraux et les hémorragies sous-arachnoïdiennes correspondant respectivement à 10% et 5% des AVC, ce que nous ne détaillerons pas dans ce travail.

Les pathologies cérébrovasculaires constituent la 2ème cause de mortalité dans le monde avec 5.4 millions de décès en 2001; 85.5% de cette mortalité survient dans les pays en voie de développement [1] [figure 1]. Dans les pays à revenus élevés, elles représentent la 2ème cause d'années de vie perdues par mortalité précoce ou par handicap (DALYs: disability-adjusted life years) [1]. L'issue de l'AVC est souvent dramatique. En effet, 20% des patients décèdent dans le mois suivant, 75% ont des séquelles à vie, 25% restent dépendants et 25% souffrent de dépression.

L'incidence des AVC a augmenté de 100% au cours des 40 dernières années dans les pays à revenus faibles, tandis qu'elle a diminué de 42% dans les pays riches [2].

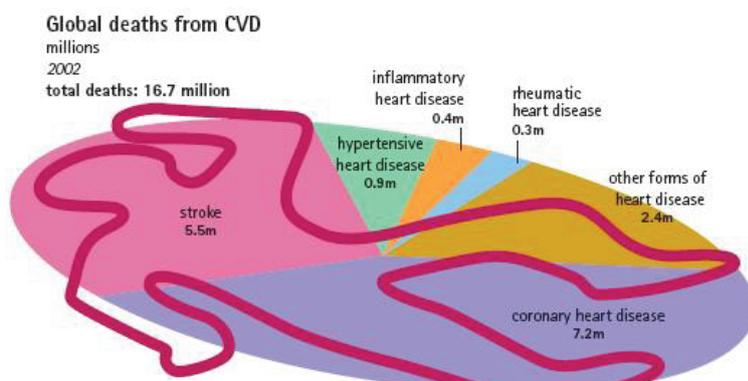


Figure 1: mortalité spécifique des pathologies vasculaires en 2002 Organisation Mondiale de la Santé : *The Atlas of Heart Disease and Stroke*, 2006).

En Europe, environ 30% des AVC surviennent avant l'âge de 65 ans, touchant la population active [3]. Le poids financier lié aux soins hospitaliers et au handicap est considérable, estimé à 3-5% des dépenses totales de santé dans les pays occidentaux, soit environ 8.3 milliards d'euros en 2008 en France [4]; [5]; [6].

2/ Etiologies

Dans la majorité des cas, l'infarctus cérébral résulte d'une occlusion artérielle aiguë.

L'embolie (artério-artérielle ou d'origine cardiaque) est le mécanisme d'occlusion artérielle le plus fréquent (75%) (figure 2).

L'embolie artério-artérielle est en général liée à l'athérosclérose à l'origine de 40% des AVC ischémiques. Cette pathologie est liée aux remaniements de la paroi vasculaire au niveau de la média et de l'intima où se forment des plaques d'athérome riches en cellules dérivées (monocytes, macrophages) et en lipides. Lors de l'instabilité des plaques d'athérome, une exposition du facteur tissulaire (FT) et du collagène sous endothélial conduit à l'activation de la cascade de coagulation (cf chapitre coagulation) et favorise l'adhésion puis l'agrégation des plaquettes sanguines, d'où la formation d'un caillot (athérothrombose) à la fois fibrineux et plaquettaire [7].

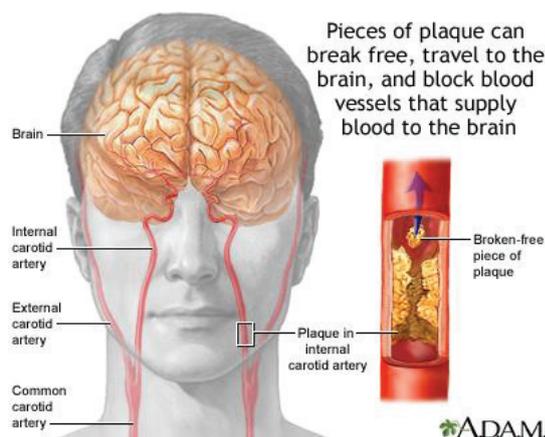


figure 2 : mécanisme thrombo embolique

Chez les patients de moins de 70-80 ans, l'athérothrombose constitue la principale étiologie des infarctus cérébraux, et se caractérise par la fréquence de l'atteinte polyvasculaire : environ 40% des patients avec une atteinte cérébrovasculaire présentent aussi une

coronaropathie et/ou une artériopathie oblitérante des membres inférieurs symptomatique [8].

L'embolie d'origine cardiaque (20% des AVC) résulte d'une fibrillation auriculaire, d'une pathologie valvulaire mitrale ou d'un thrombus dans le ventricule gauche. Dans la population de plus de 80 ans, la prévalence de la fibrillation atriale est de 9% [9], et cette pathologie représente au moins 35-45% des causes d'infarctus cérébral [10].

La microangiopathie avec lipohyalinose et thrombose artériolaire in situ survient dans environ 20% des cas. Les infarctus hémodynamiques en rapport avec une sténose artérielle de haut grade sont rares (moins de 5%) [11,12].

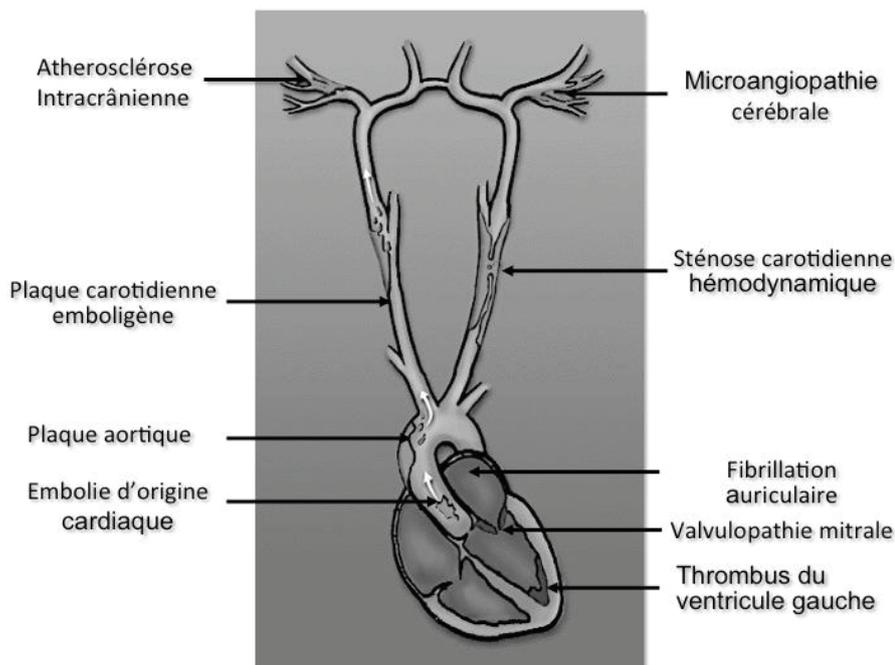


Figure 3 : vaisseaux encéphaliques et sièges d'athérome.

Toutefois, 30-40% des infarctus cérébraux demeurent de cause indéterminée [13]. L'étiologie des infarctus cérébraux s'avère plus hétérogène que celle des infarctus du myocarde, et impose ainsi un bilan diagnostique plus complexe (**figure 4**). L'étiologie varie selon l'âge, la région du monde et le groupe ethnique considérés ou encore de la qualité des méthodes d'investigation clinique utilisées.

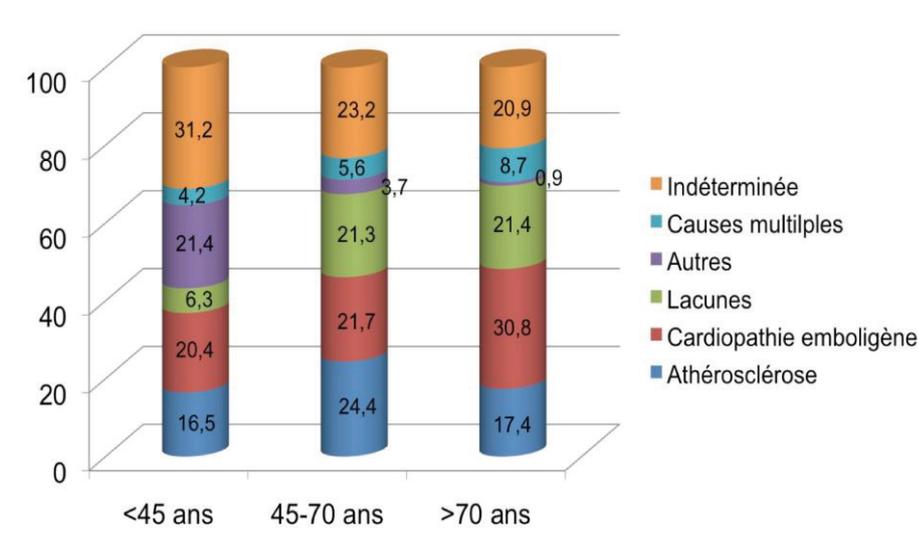


Figure 4: étiologies des infarctus cérébraux selon l'âge [14].

Les lésions ischémiques cérébrales par hypoxie-anoxie globale relèvent d'une physiopathologie et de situations cliniques distinctes (défaillances cardio-respiratoires, asphyxie, intoxication au monoxyde de carbone) et ne seront pas spécifiquement abordées dans ce travail. La distinction entre ischémie focale et généralisée est cruciale en conditions expérimentales pour le choix du modèle animal.

II. Physiopathologie de l'accident vasculaire cérébral.

1/ Thrombose et fibrinolyse, notions d'hémostase

1.1. Formation du thrombus

La formation du thrombus repose sur deux systèmes : la mise en route du système de la coagulation d'une part, l'activation plaquettaire d'autre part [15].

L'activation de l'un ou l'autre des systèmes se fait selon des conditions environnementales différentes. Les flux sanguins lents favorisent la coagulation plasmatique, alors que les flux rapides favorisent la participation des plaquettes et leur activation. Au cours de l'athérothrombose, c'est l'activation du système plaquettaire qui prédomine. La coagulation vient ensuite renforcer le thrombus formé :

1. Le premier système impliqué repose sur des mécanismes d'activation cellulaire et aboutit à l'agrégation plaquettaire (3-5 mn) (Flux rapide) [16,17].
2. Le second système est un système moléculaire qui aboutit à la transformation du fibrinogène en fibrine (10-15 mn) (Flux lent) [18,19].

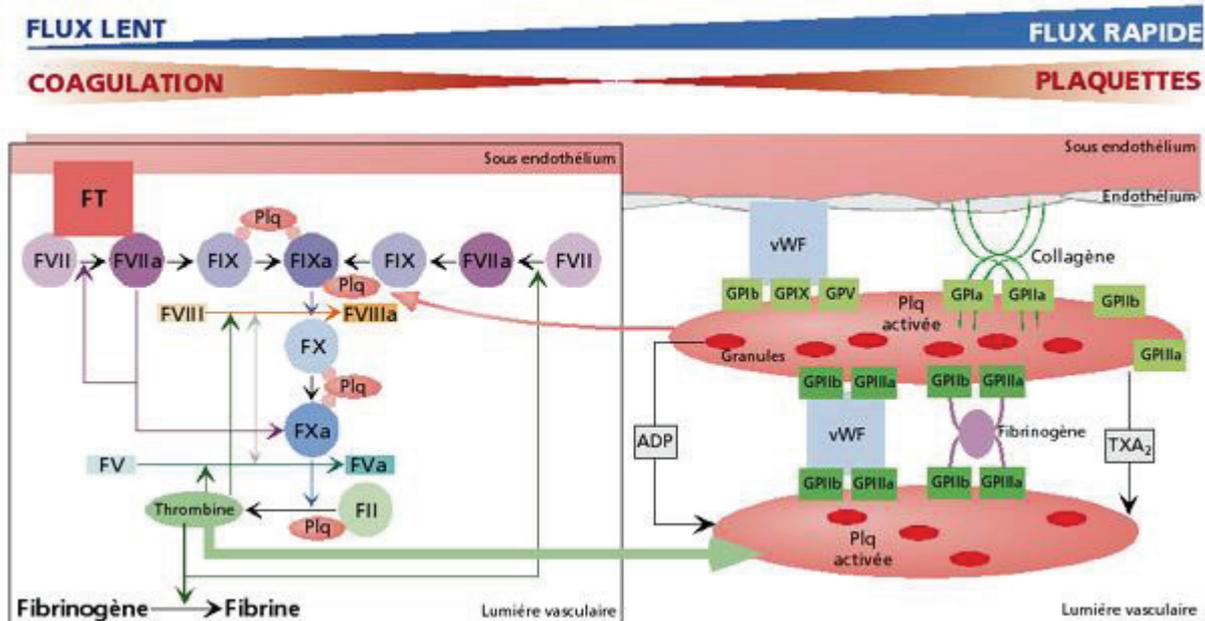


Figure 5 : Coagulation et activation plaquettaire. ADP : Adénosine Diphosphate ; FII à FX : Facteurs II à X de la coagulation ; FIIa à FXa : Facteurs II à X activés de la coagulation ; FT : Facteur tissulaire ; GP : Glycoprotéine ; Plq : Plaquettes ; TXA₂ : Thromboxane A₂ ; vWF : von Willebrandt Factor [19].

Le phénomène initiateur de la thrombose est la mise à nu du tissu conjonctif de la paroi. A la suite de la rupture de la plaque, l'activation des plaquettes et de la coagulation se fait par l'exposition des éléments thrombogènes de la paroi, notamment du facteur tissulaire contenu en forte concentration à l'intérieur de la plaque. Ensuite, la progression de la thrombose va se faire suivant les variations des conditions d'écoulement sanguin au cours de son évolution.

Lors d'une rupture de plaque, il y a dans un premier temps, au niveau de la brèche de la paroi, une réponse qui se fait essentiellement par la voie de la coagulation. L'écoulement à ce niveau est, en effet, très lent, voire nul. On assiste ainsi à la formation d'un premier réseau fibrineux à l'intérieur de la paroi [15].

Lorsque la réaction thrombotique gagne la lumière vasculaire, où le flux sanguin est rapide, le thrombus qui se forme est essentiellement composé de plaquettes.

Ensuite, si le thrombus formé atteint une taille suffisante pour perturber significativement l'écoulement, la coagulation reprend et stabilise le thrombus [19].

L'activation des plaquettes se déroule en plusieurs phases [20]:

1. Reconnaissance des surfaces thrombogènes par la plaquette, et adhésion, en particulier par adhésion au collagène par l'intermédiaire des glycoprotéines membranaires GP Ia et IIb et adhésion au facteur de Willebrandt par l'intermédiaire du groupe GP Ib-IX-V.
2. La plaquette s'active. Elle s'étale et sécrète des granules de réserve contenant de l'ADP (Adénosine Diphosphate) et du thromboxane A_2 qu'elle synthétise. Ces produits de sécrétion vont recruter et activer d'autres plaquettes circulantes.
3. Les plaquettes activées se déforment et subissent une modification conformationnelle de leurs glycoprotéines GP IIb/IIIa qui deviennent aptes à fixer des ligands moléculaires : facteur de Willebrand, fibrinogène et fibronectine.

Ces ligands vont permettre la formation de ponts moléculaires qui fixent les plaquettes circulantes aux plaquettes déjà déposées [20].

C'est ainsi que se construit un thrombus qui pourra s'incorporer à la plaque, provoquer une occlusion ou aboutir à une embolie.

1.2. La Fibrinolyse

La fibrinolyse tend à empêcher l'installation mais surtout l'extension du caillot en détruisant les polymères de fibrine. Lorsque le caillot est formé, la fibrinolyse physiologique permet de le reperméabiliser. La fibrinolyse fait intervenir une substance circulant sous forme inactive dans le plasma: le plasminogène, synthétisé par le foie (Figure 6).

Sous l'influence d'activateurs, le plasminogène se transforme en plasmine qui est une enzyme protéolytique très puissante, capable de dégrader le caillot de fibrine mais aussi de détruire le fibrinogène, voire d'autres facteurs de coagulation. L'activation du plasminogène en plasmine se fait grâce à des activateurs de deux types :

- la voie de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA). Cette substance est synthétisée de façon quasi exclusive par la cellule endothéliale qui la libère sur le site du caillot lors de tout phénomène d'agression [21].

- la voie de la pro-urokinase-urokinase (U-PA). La forme circulante est la pro-urokinase synthétisée par les cellules rénales et d'autres cellules parenchymateuses. La pro urokinase s'active en urokinase essentiellement au contact du caillot de fibrine [22].

Le système fibrinolytique est régulé par deux types d'inhibiteurs :

- *les inhibiteurs de la plasmine* : alpha 2 antiplasmine, alpha 2 macroglobuline

- *les inhibiteurs des activateurs du plasminogène* : le PAI-1 est l'inhibiteur surtout du t-PA et le PAI-2, présent essentiellement chez la femme enceinte, est inhibiteur de l'urokinase.

- *le TAFI* (pour thrombin activable fibrinolysis inhibitor) qui est la carboxypeptidase U appelée arginine carboxypeptidase ou carboxypeptidase plasmatique, une métallo carboxypeptidase décrite chez l'homme en 2004 [23]. Son rôle physiologique est orienté sur l'inhibition de l'activité antifibrinolytique de la plasmine. En effet, la carboxypeptidase U

coupe le résidu lysine C terminal de la fibrine, qui est indispensable à l'activité de l'activateur t-plasminogène chargé de la transformation du plasminogène en plasmine. Son activation conduit à une activité antifibrinolytique sur le caillot [24].

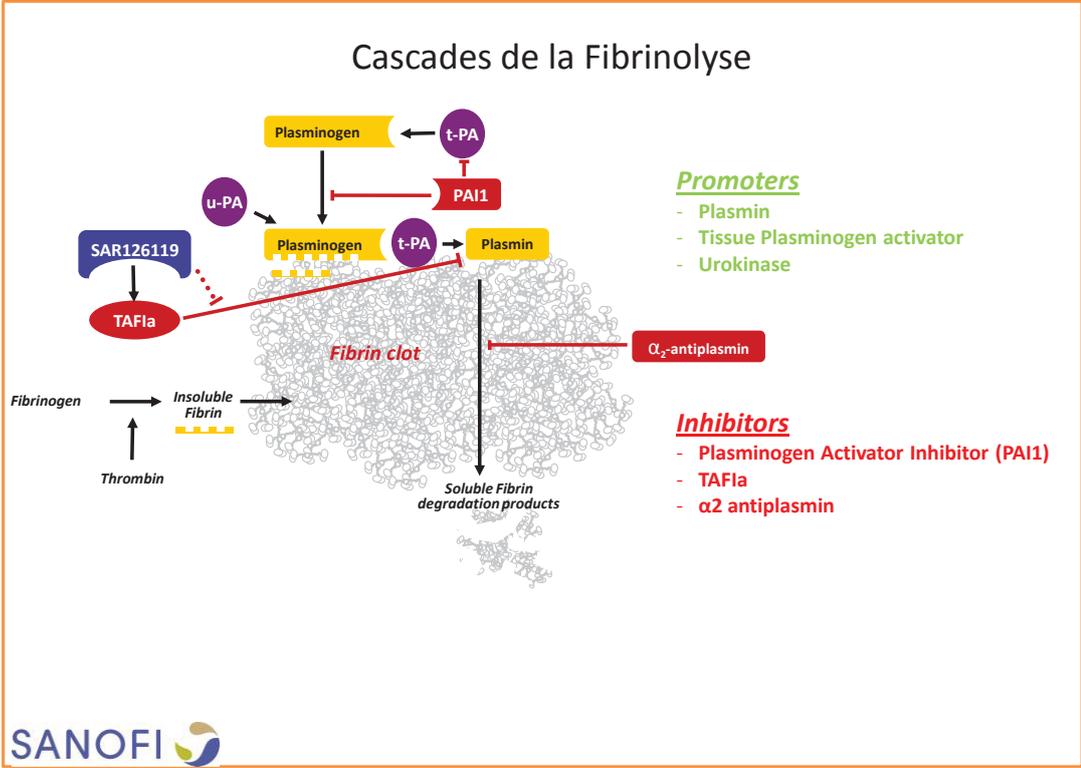


Figure 6 : schéma explicatif de la cascade de la fibrinolyse (SANOFI).

2/ Le tissu à risque: la pénombre ischémique

Après l'occlusion artérielle, le devenir du tissu ischémique n'est pas uniforme. Au contact de zones à la perfusion sévèrement réduite et rapidement nécrosées, il persiste un tissu présentant une perfusion résiduelle grâce à la circulation collatérale, et à l'intégrité structurelle encore préservée, constituant l'enjeu des traitements de l'infarctus cérébral aigu [25] : la pénombre ischémique.

2.1. Définition générale

Le concept de pénombre est défini comme du tissu cérébral lésé par une lésion ischémique pouvant évoluer vers une lésion cérébrale irréversible au fil du temps. La souffrance du tissu est potentiellement réversible avec une thérapeutique adaptée. En l'absence d'une reperfusion précoce, la pénombre ischémique est progressivement transformée en zone de nécrose, qui s'étend jusqu'à atteindre l'ensemble du tissu à risque [26].

L'évolution de la pénombre est particulièrement liée à la sévérité de la diminution du débit sanguin cérébral (DSC). Initialement, la pénombre ischémique a été définie comme la région présentant un débit sanguin cérébral diminué avec absence de potentiels électriques spontanés ou induits qui maintiennent l'homéostasie ionique et les potentiels électriques transmembranaires. Une réduction du débit sanguin cérébral entre 10 – 15 ml/100g/mn et environ 25ml/100g/mn définit la pénombre [27]. Toutefois dans cette région, le DSC est suffisant pour conserver l'homéostasie ionique, les potentiels membranaires et le métabolisme de l'ATP [25]. Le maintien de l'apport en oxygène est assuré par la circulation collatérale et l'augmentation du taux d'extraction d'oxygène lors de la thrombose [28].

2.2. Techniques radiologiques d'évaluation de la pénombre

L'identification de ce tissu à risque de nécrose est tout le challenge pour la prise en charge thérapeutique des patients, utilisant les différentes techniques radiologiques disponibles (TEP, IRM, scanner X).

2.2.1 Tomographie par émissions de positons (TEP)

La TEP du débit sanguin cérébral régional et du métabolisme énergétique a été la première technique d'imagerie utilisée pour détecter la zone de pénombre, définie comme la région présentant une augmentation de la fraction d'extraction d'oxygène [29].

L'étude séquentielle de Furlan et al. [30] a validé l'identification de la pénombre en TEP. Le volume total de la pénombre était corrélé au déficit neurologique initial; le volume de la pénombre échappant à l'infarctus final à 2 mois montrait également une corrélation étroite avec la récupération neurologique finale. Ainsi, la pénombre se caractérise par [31]:

- un débit sanguin cérébral entre 7-8.5 ml/100g/min et 17-22 ml/100g/min
- une préservation relative de la consommation d'oxygène (CMRO₂)
- une augmentation de la fraction d'extraction de l'oxygène (>70%).

La TEP est toujours l'examen de référence pour la détection de la pénombre et des tissus irrémédiablement lésés mais sa disponibilité dans les centres médicaux n'est pas évidente et limitée par la logistique nécessaire.

Plusieurs marqueurs peuvent être utilisés pour la réalisation de la TEP dont le 11C-flumazénil [32] pouvant visualiser le récepteur central aux benzodiazépines, localisé exclusivement sur les neurones et permettant une valeur prédictive d'une évolution vers l'infarctus [33].

Un autre marqueur est le 18F-fluoromisonidazole capté par les cellules hypoxiques et qui a été validé comme un marqueur de la pénombre [34], mais demeure peu adapté à une utilisation clinique (latence de 2 heures avant d'atteindre l'état d'équilibre).

De plus, une augmentation du FDG [18]F-2-fluoro-2-deoxy-d-glucose) dans la zone péri-ischémique est régulièrement observé durant l'ischémie cérébrale aiguë. Cette région présentant une absorption plus élevée du FDG reflète probablement les tissus viables qui peuvent être récupérés à la reperfusion. Par conséquent, l'imagerie par tomographie par émission de positons avec le FDG comme marqueur à la phase aigue pourrait intervenir dans la sélection des patients [35].

2.2.2 IRM

2.2.2.1. Généralités : IRM multimodale

L'utilisation de l'IRM à la phase aiguë de l'infarctus cérébral s'est considérablement développée depuis les années 1990 [36]. Les progrès de l'imagerie par résonance magnétique « multimodale » permettent d'estimer le tissu cérébral susceptible d'être sauvé par la recanalisation de l'artère occluse, et inversement, l'étendue de l'infarctus définitif en l'absence de recanalisation. La séquence de diffusion (DWI) permet de mesurer le coefficient de diffusion (ADC) dont la baisse en deçà d'un certain seuil traduit la nécrose irréversible des cellules cérébrales. L'IRM de perfusion (PWI) donne une estimation du DSC. Plusieurs

modalités de mesure ont été proposées et testées : temps moyen de transit (MTT), DSC (CBF), Tmax. De façon simplifiée, le Tmax correspond au délai d'atteinte du pic de concentration de gadolinium pour chaque région par rapport à l'arrivée du gadolinium dans les artères cérébrales (arterial input function) [37]. Actuellement, le Tmax semble être la modalité qui offre les résultats les plus robustes dans les essais thérapeutiques publiés [37,38]. La zone correspondant à une baisse de la perfusion cérébrale sans signe de nécrose en DWI est appelée **mismatch**. Elle est considérée comme un substitut de la pénombre ischémique [39]. Par ailleurs, les séquences en écho de gradient (GRE) permettent d'exclure, avec une sensibilité identique à celle du scanner cérébral, le diagnostic d'hémorragie [40]. Enfin, l'angiographie IRM permet de visualiser l'occlusion artérielle. Ainsi, l'IRM cérébrale permet donc :

- de confirmer le diagnostic d'infarctus cérébral avec une sensibilité de 83 % vs 26 % pour le scanner cérébral [40], et d'exclure le diagnostic d'hémorragie cérébrale avec une sensibilité proche de 100 % ;
- de préciser l'étendue du territoire cérébral définitivement détruit. En pratique, l'étendue de la lésion ischémique en DWI est un des critères majeurs pour définir l'indication d'une hémicraniectomie urgente en cas d'infarctus sylvien malin [41] ;
- d'estimer l'étendue de la pénombre ischémique susceptible d'être sauvée par la recanalisation de l'artère occluse révélée par l'angiographie IRM. Cette dernière propriété a ouvert la voie à plusieurs essais évaluant l'indication d'un traitement thrombolytique sur la base de la présence d'un mismatch au-delà du délai limite d'installation des symptômes recommandé pour ce traitement.

2.2.2.2. Limites

Si l'IRM a indéniablement introduit l'évaluation de la pénombre ischémique dans la pratique clinique, ce modèle présente des limites [42]. Le principal écueil concerne l'exploitation de l'IRM de perfusion. Il n'existe pas de consensus quant aux critères optimaux pour définir la zone de pénombre par rapport à la zone d'oligémie. Malgré leur intérêt théorique, les cartographies déconvoluées n'ont pas démontré leur supériorité pour prédire l'infarctus

final [43]. Le choix du paramètre hémodynamique idéal ainsi que son seuil optimal demeurent controversés;

Ensuite, les volumes d'hypoperfusion présentent en conséquence d'importantes variations en fonction de la méthode de calcul et du paramètre hémodynamique choisi [44]. D'autre part, la lésion aiguë en IRM de diffusion n'est pas strictement équivalente à la zone de nécrose. En effet, les observations expérimentales et cliniques ont démontré que les anomalies de diffusion pouvaient être réversibles avec une reperfusion précoce [45]; [46].

L'analyse des résultats de l'étude DEFUSE et EPITHET a démontré qu'une lésion mesurée en IRM de perfusion par un Tmax > 2 s surestimait la pénombre ischémique. À l'inverse, un seuil de 6 secondes donnait une meilleure estimation de l'étendue du volume final en l'absence de reperfusion et donc de l'étendue de la pénombre ischémique [8].

Les études DEFUSE et EPITHET, bien que n'ayant pas directement évalué la place de l'IRM dans la décision thérapeutique, ont précisé les *profils IRM* de réponse à la thrombolyse intraveineuse [38] [37] [47].

Parallèlement, plusieurs équipes ont développé des logiciels capables de générer en quelques minutes une mesure quantitative des caractéristiques de la lésion en DWI (taille, ADC...) et PWI (Tmax, MTT, CBF, en fonction de différents seuils). Actuellement, deux études (DEFUSE2 et MR-RESCUE) sélectionnent les patients susceptibles de bénéficier d'une revascularisation mécanique du vaisseau occlus sur la base d'algorithmes générés par le traitement automatique des images en DWI et PWI [48,49].

2.2.3. Scanner X

Le scanner multimodal est désormais devenu une alternative réelle à l'IRM, avec plusieurs points forts. Le scanner de perfusion fournit des données hémodynamiques quantitatives d'interprétation plus simple qu'en IRM, et demeure plus accessible dans la plupart des centres. Wintermark et al. ont défini la zone d'infarctus par un volume sanguin cérébral inférieur à 2,0 ml/100 g et le tissu à risque par un MTT (mean transit time) supérieur à 145 % des valeurs de l'hémisphère sain, la différence entre ces deux compartiments correspondant ainsi à la pénombre [50] [51]. Le TTP (Time to Peak) avec un seuil approprié est un très bon élément prédictif de l'infarctus chez les patients victimes d'AVC. Le mismatch MTT / TTP

montre la corrélation entre la suppléance vasculaire collatérale et le tissu à risque d'infarctus [52]. L'acquisition plus rapide des images facilite l'examen de patients souvent agités. L'analyse combinée du scanner de perfusion et de l'angioscanner permet de préciser la zone à risque, l'infarctus constitué, le site d'occlusion, ainsi que l'état de la circulation collatérale. En revanche l'irradiation et l'injection d'un produit de contraste iodé restent les points faibles de la technique. Les avantages et les faiblesses respectives de l'IRM et du scanner multimodal invitent ainsi à privilégier une vision complémentaire de leur utilisation clinique.

2.2.4. Marqueurs biochimiques et moléculaires

La recherche expérimentale a permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la progression des lésions ischémiques [53,54]. Le concept de pénombre « moléculaire » désigne les modifications génomiques et protéiques survenant autour de la zone de nécrose [55]. Une diminution de la synthèse protéique a ainsi été observée à partir d'une baisse du CBF d'au moins 50% de la normale (50 ml/100 g/min chez les rongeurs; 25 ml/100 g/min pour les primates). La synthèse protéique demeurait diminuée dans les zones cérébrales évoluant vers la nécrose, alors qu'elle se normalisait dans celles échappant à l'infarctus [25]. Ces modifications de la synthèse protéique présentaient en outre une corrélation topographique avec les niveaux d'adénosine triphosphate (ATP), permettant une compartimentalisation du tissu ischémique : tissu normal (niveaux normaux d'ATP et de la synthèse protéique) ; pénombre ischémique (diminution de la synthèse protéique mais ATP préservé) ; nécrose (diminution de la synthèse protéique et de l'ATP) [56]. La zone de pénombre ainsi définie se caractérise aussi par l'activation de la transcription du gène de « stress » Hsp70 [56]. Toutefois, d'autres gènes activés lors d'une ischémie cérébrale ne présentent pas de co-localisation précise avec la pénombre ischémique. Par exemple, c-fos est exprimé dans des zones cérébrales non ischémiques de rats soumis à une occlusion de l'artère cérébrale moyenne [57]. Le facteur de transcription HIF (Hypoxia-Inducible Factor), composante essentielle de la réponse à l'hypoxie et l'ischémie, est transcrit aussi bien au sein de la zone ischémique qu'en dehors [58]. Ainsi, il existe plusieurs « pénombres moléculaires», qui ne recoupent que partiellement la zone à risque définie par les critères hémodynamiques et cliniques.

3. Mécanisme de compensation vasculaire : la circulation collatérale

La circulation collatérale constitue vraisemblablement le principal facteur de variabilité expliquant l'hétérogénéité des vitesses d'extension de l'infarctus observée chez les patients. La visibilité de la circulation collatérale en artériographie, angio MR ou en angioscanner est un paramètre prédictif indépendant de la croissance de l'infarctus et de l'évolution clinique [59,60,61,62].

Les patients disposant d'une circulation collatérale efficace auront ainsi une pénombre ischémique plus prolongée et un infarctus final moins étendu, en comparaison de ceux ayant une collatéralité déficiente.

3.1. Anatomie et physiopathologie

La circulation collatérale peut se décrire à plusieurs niveaux.

3.1.1. Le polygone de Willis

Le cercle artériel du cerveau ou polygone de Willis est un système vasculaire intra cérébral permettant la communication directe des circulations antérieures et postérieures. Il permet de maintenir un équilibre hémodynamique au sein de la vascularisation cérébrale. En cas d'occlusion brutale ou progressive d'un des quatre piliers artériels, il permet de rediriger le sang artériel vers le territoire distal concerné et ainsi d'éviter la survenue d'une ischémie cérébrale dans cette même région.

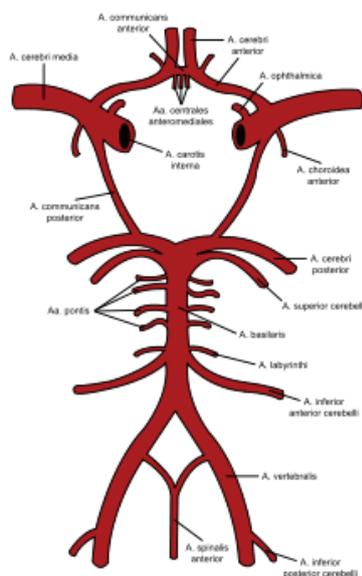


figure 7 : polygone artériel de Willis

La valeur fonctionnelle de ces anastomoses est très variable ; les variantes anatomiques sont fréquentes : la communicante postérieure est hypoplasique ou absente pour 30% de la

population, le segment A1 est hypoplasique dans 10% des cas et la communicante antérieure peut être absente pour 1% des sujets [63].

Les variations des différents segments artériels intracrâniens concernent les variations de naissance, de trajet, de calibre (hypoplasie ou variation de nombres (duplication, fenestration)).

Parmi les variations de l'axe cérébral antérieur, il faut citer : l'artère médiane du corps calleux, l'artère azygos, l'artère bihémisphérique. Les variations de l'artère cérébrale moyenne portent essentiellement sur son mode de division. L'artère communicante postérieure présente, outre les variations habituelles des autres segments, une variation de la forme de son origine (infundibulum). Enfin parmi la persistance d'artères embryonnaires réalisant des anastomoses inhabituelles, nous ne citerons que l'artère trigéminée, la plus fréquente, qui fait communiquer l'artère carotide interne (origine en C4-C5) et la partie moyenne du tronc basilaire et qui représente un danger potentiel pour la chirurgie sellaire et du nerf trijumeau [64].

3.1.2. Anastomoses extra-intracrâniennes (figure 8)

Trois principales régions fonctionnelles sont décrites [65]:

- **région orbitaire** : l'artère ophtalmique constitue l'interface entre la carotide interne (ACI) et les branches de la carotide externe (surtout l'artère maxillaire interne avec l'artère méningée moyenne et l'artère sphéno-palatine, mais aussi avec l'artère faciale et temporale superficielle).
- **région caverneuse et pétro-clivale** : le tronc inférolatéral, le tronc méningohypophysaire et les branches pétreuses de l'ACI sont à l'interface avec la vascularisation durale de cette région, émanant des branches de la maxillaire interne et de la pharyngienne ascendante.
- **région cervicale haute**: l'artère vertébrale présente des anastomoses avec l'artère occipitale, l'artère pharyngienne ascendante, l'artère cervicale ascendante et profonde.

Ces anastomoses sont des voies potentielles de suppléance en cas d'occlusion proximale des troncs supra-aortiques, mais représentent aussi des sources de complications lors de

procédures d'embolisation. Plus rarement, on peut aussi observer des anastomoses entre des branches dures et les artères corticales cérébrales (**figure 10**).

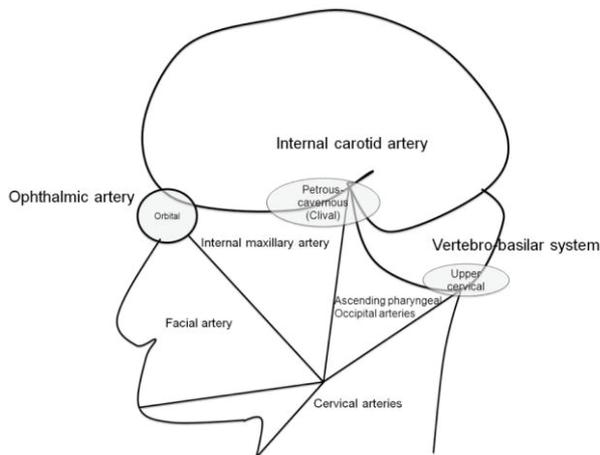


Figure 8: anatomie fonctionnelle des anastomoses extra-intracrâniennes [65].

3.1.3. Anastomoses corticales leptoméningées (figure 11)

La qualité variable de ces suppléances corticales est probablement un facteur déterminant de l'hétérogénéité clinique en terme de tolérance à l'occlusion d'une artère intracrânienne proximale. Le nombre et la taille de ces anastomoses sont variables d'un sujet à un autre, et demeurent aujourd'hui difficilement prévisibles. Ces anastomoses semblent les plus riches entre l'artère cérébrale antérieure et moyenne, et en général, moins développées entre la cérébrale moyenne et la cérébrale postérieure. Elles ne sont que rarement fonctionnelles entre l'artère cérébrale antérieure et postérieure. Les branches distales des artères cérébelleuses sont souvent bien anastomosées les unes aux autres, et peuvent parfois compenser une occlusion vertébrobasilaire. A l'inverse, les artères perforantes lenticulostriées ne disposent pas en général de suppléance efficace [66]. La mise en jeu très variable de ces suppléances au cours de l'ischémie cérébrale aiguë demeure mal comprise. Il est probable que l'âge, l'étiologie et le mode de l'occlusion artérielle (occlusion embolique brutale vs occlusion plus progressive sur une sténose athéromateuse), la durée de l'ischémie et les comorbidités associées (notamment le diabète et l'hypertension artérielle) influent sur l'efficacité de la circulation collatérale [67].

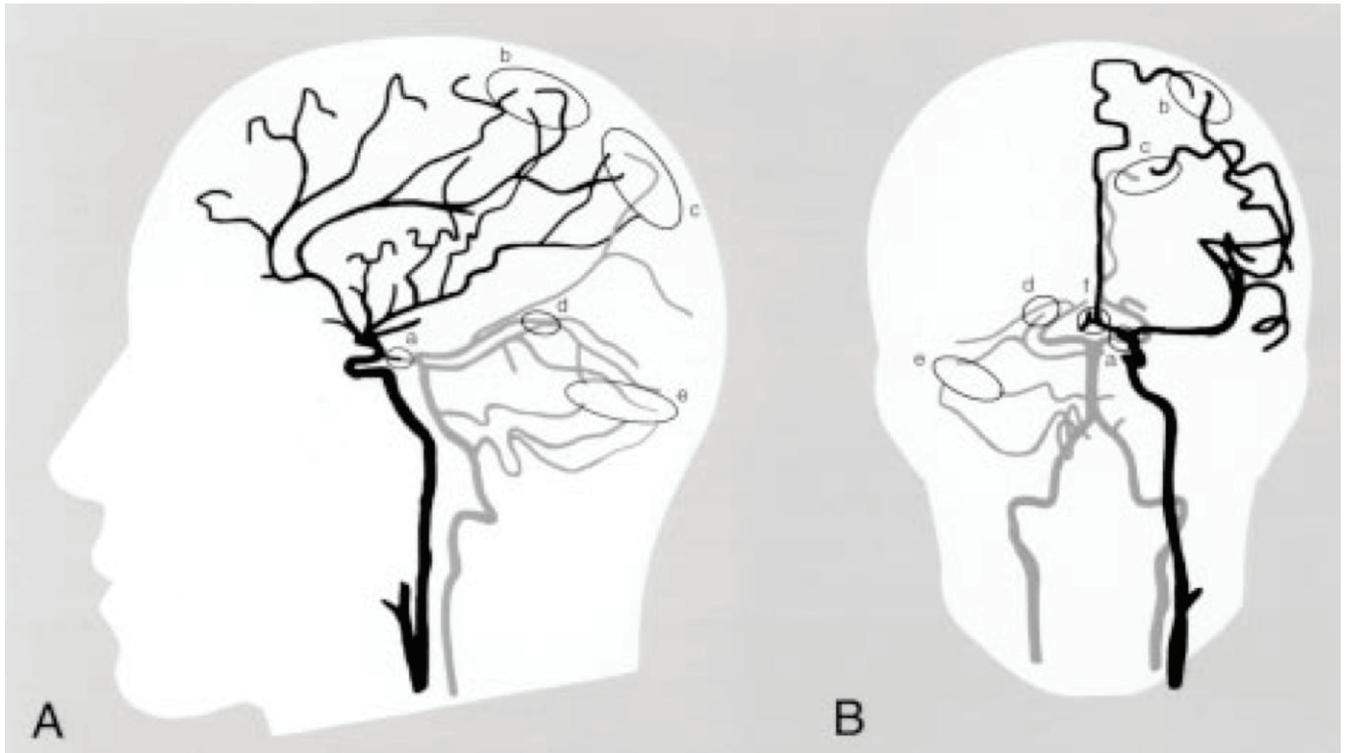


Figure 9 : Anastomoses intracrâniennes (A : profil ; B : face); a: artère communicante postérieure; b: entre les branches corticales de la cérébrale moyenne (ACM) et antérieure ; c: entre l'ACM et la cérébrale postérieure (ACP); d: plexus tectal entre l'ACP et l'artère cérébelleuse supérieure; e: entre les branches distales des artères cérébelleuses [66]

3.2. Imagerie

L'évaluation en imagerie de la circulation collatérale demeure complexe.

L'artériographie cérébrale est considérée comme étant la méthode de référence, mais cet examen reste soumis à des variations inter-observateurs notables. De plus, il n'existe pas encore de score d'évaluation ayant fait consensus [68,69]. Ces données angiographiques trouvent une application directe lors de certaines procédures endovasculaires (tests d'occlusion avant sacrifice d'une artère intracrânienne proximale), mais leur utilisation pratique dans l'infarctus cérébral aigu reste à préciser.

L'angioscanner ou l'IRM (séquences en temps de vol après injection de chélates de gadolinium) peuvent être informatives pour les occlusions proximales de la carotide intracrânienne ou de l'ACM, mais restent peu utiles pour des occlusions plus distales. Certains aspects sémiologiques en IRM indiquent la présence de branches collatérales

(hypersignal vasculaire en FLAIR, visibilité anormale des artères leptoméningées en T2*, analyse visuelle des images dynamiques natives de la séquence de perfusion), mais ne permettent pas une quantification aisée [70]; [71]).

4. Le facteur temps : durée de la pénombre ischémique

La durée de l'ischémie est un des principaux facteurs déterminant le recrutement de la pénombre dans l'infarctus, la taille de la lésion finale et la sévérité du handicap neurologique. Des interactions complexes entre le temps, l'hémodynamique locale (sévérité de l'ischémie; compensation par la circulation collatérale), les facteurs tissulaires (susceptibilité locale à l'ischémie, dépendant de facteurs métaboliques, vasculaires, génétiques) et d'éventuelles thérapeutiques (reperfusion, traitements neuroprotecteurs), conditionnent la viabilité tissulaire au sein de la pénombre [72]. Quelque soit le marqueur considéré, tout seuil de viabilité est nécessairement temps-dépendant. Deux principales approches permettent d'évaluer l'influence du temps sur l'évolution de la pénombre ischémique: (i) les études thérapeutiques, qui mettent en relation l'impact de divers traitements et le délai entre leur administration et l'induction de l'ischémie ; (ii) l'imagerie *in vivo*, qui permet le suivi longitudinal des marqueurs de la pénombre.

Peu d'études thérapeutiques permettent d'estimer l'évolution de la pénombre chez les patients victimes d'un infarctus cérébral. La recanalisation artérielle n'a pas été évaluée dans les principaux essais cliniques de thrombolyse intraveineuse ; de ce fait, la durée de l'ischémie n'est pas précisable dans ces études. Cependant, le caractère temps-dépendant de la réponse clinique à la thrombolyse intraveineuse a été clairement démontré, le bénéfice du traitement devenant non significatif pour une administration au-delà de 4h30 après le début des symptômes [73].

DEUXIEME PARTIE:
STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES

I. Stratégies médicamenteuses.

1/ La reperfusion : Thrombolyse intraveineuse

Le seul traitement aigu autorisé de l'AVC ischémique est la thrombolyse par l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA). Le t-PA est une sérine protéase sécrétée de manière physiologique par les cellules endothéliales et cérébrales (neurones, oligodendrocytes).

En 1996, l'activateur du plasminogène tissulaire (rt-PA) a été approuvé comme traitement de l'infarctus cérébral dans les trois heures suivant le début des symptômes par la Food and Drug Administration américaine, s'appuyant sur les résultats de l'étude princeps du **NINDS** (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). En terme d'amplitude de l'effet, 8-9 patients doivent être traités pour obtenir un score de Rankin modifié entre 0-1 à 3 mois d'évolution (guérison) ; pour une amélioration ≥ 1 point sur la même échelle, 3 patients doivent être traités [74]. Plus récemment, l'étude **ECASS 3** a démontré un effet bénéfique du rt-PA jusqu'à 4h30 après le début des symptômes [75].

Même si ces études confirment l'intérêt de la thrombolyse intraveineuse dans le traitement de l'accident vasculaire cérébral, l'accès à ce traitement reste limité. Ce traitement est actuellement limité aux patients de moins de 80 ans, dont le début des symptômes est apparu moins de 3h avant la prise en charge. Une méta-analyse de 11 études traitant de la thrombolyse (3977 patients) a montré que le traitement est associé à une augmentation significative de la survie sans handicap, malgré une augmentation des hémorragies intra-cérébrales précoces et fatales de 3%. Cette revue a également suggéré l'intérêt du traitement dans les 6h suivants le début des symptômes [76].

Une étude randomisée **IST-3** (The third International Stroke Trial), publiée en 2012 dans The Lancet, confirme l'intérêt sur le résultat fonctionnel à 6 mois chez les patients ayant bénéficié du traitement administré dans les 6h après le début de l'ischémie, même chez les patients âgés de plus de 80 ans [77]. Ce résultat est constaté même si l'administration du traitement thrombolytique occasionne un risque de décès précoce plus important ($P < 0.001$). Wardlaw et al suggèrent les mêmes résultats [78], repoussant les limites du traitements notamment chez les patients âgés de plus de 80 ans.

Les limites de ce traitement concernent :

- ✓ *Faible éligibilité au traitement*

Actuellement, seulement 2-5% des patients reçoivent ce traitement [79,80]. Les facteurs contribuant à ce faible usage sont multiples : niveau d'information insuffisant de la population et des médecins, insuffisance de moyens (structures spécialisées, système de transport rapide), crainte excessive des complications liées au traitement [81]. Tous ces facteurs expliquent que la grande majorité des patients ne parvient pas à temps dans une structure spécialisée. De plus, on estime que 25% des patients ont un horaire de début inconnu (déficit constaté au réveil, aphasie), et sont donc habituellement exclus de la thrombolyse [82].

✓ *Faible efficacité sur les occlusions proximales*

Le rt-PA intraveineux est le plus souvent mis en échec pour les occlusions des gros troncs intracrâniens [83,84,85]. Les études angiographiques ont montré qu'une heure après le bolus de rt-PA, moins de 10% des occlusions de l'artère carotide interne intracrânienne, moins du tiers des occlusions du segment M1 de l'artère cérébrale moyenne et moins de 45% des occlusions M2 présentaient une recanalisation [83,84]. Ces localisations sont pourtant responsables de la majorité du handicap lourd lié aux infarctus cérébraux.

✓ *Hématome cérébral*

La thrombolyse intraveineuse comporte un risque d'hématome intracérébral grave d'environ 6-7% (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995 [86,87]). La crainte de cette complication est un des principaux facteurs limitant la prescription du rt-PA [88].

2/ Traitements intra artériels

Des agents thrombolytiques plus spécifiques de la fibrine, tels que la desmoteplase ou la ténecteplase, pourraient avoir un moindre risque d'hémorragie cérébrale [89,90].

La faible efficacité de la thrombolyse intraveineuse pour les occlusions proximales a relancé le développement des stratégies intra-artérielles. Toutefois, à ce jour, une seule étude de phase III est disponible: PROACT 2 a inclus 180 patients avec une occlusion du segment M1 ou M2 de l'artère cérébrale moyenne, dans les 6 heures suivant le début des symptômes [91]. La pro-urokinase *in situ* a permis une recanalisation dans 66% des cas (vs 18% dans le groupe héparine IV, $p < 0.001$), avec une amélioration clinique significative à 3 mois (6-7

patients à traiter pour obtenir un score de Rankin modifié entre 0-2). Aucune étude similaire de thrombolyse *in situ* avec le rt-PA ou un autre thrombolytique n'a vu le jour.

3/ Autres stratégies : les inhibiteurs du TAFI

Les stratégies inhibitant l'activation du TAFI apparaissent comme des possibilités thérapeutiques potentialisant la fibrinolyse et ouvrent de nouvelles voies thérapeutiques. Cette approche thérapeutique est uniquement expérimentale. Plusieurs études, en particulier pharmacologiques, étudient les possibilités de préparer un agent inhibiteur du TAFI, potentialisant la lyse des caillots *in vitro* [92,93]. Peu d'études ont été publiées sur des modèles animaux et à notre connaissance, et une seule publication démontre l'effet significatif pro fibrinolytique d'un anticorps monoclonal inhibiteur du TAFI au niveau pulmonaire dans un modèle murin thrombo embolique [94].

Certaines métalloprotéinases (MMPs) participant à l'inhibition du TAFI semblent montrer une potentialisation de la réduction de la taille des lésions ischémiques et de la reperfusion cérébrale, dans un modèle thrombo embolique murin [24] et confirmer leurs effets profibrinolytiques.

II. Stratégies mécaniques

1/ Méthodes endovasculaires

Cette dernière décennie a connu le développement de plusieurs dispositifs de thrombectomie, avalisés par la FDA ainsi que la Communauté Européenne sur la base d'études de phase II [95,96,97]. Bien que ces séries ouvertes, non contrôlées, ne permettent pas de conclure sur l'intérêt ou les indications de ces techniques, elles apportent quelques éléments descriptifs. Ces dispositifs semblent plus efficaces que la thrombolyse intraveineuse pour recanaliser les occlusions proximales (50 à 90% des cas); les complications hémorragiques semblent plus fréquentes (10%). Ces approches endovasculaires occasionnent un délai intra-hospitalier bien plus long que pour la thrombolyse intraveineuse. Des stratégies de "bridging", où la thrombolyse IV est immédiatement suivie d'une procédure intra-artérielle (thrombolyse *in situ* ou thrombectomie) en cas d'occlusion persistante, ont ainsi été explorées dans des essais de

phase II [98,99], et sont en cours d'évaluation dans des essais de phase III [100]. Leur mise en place requiert une interaction pluridisciplinaire très organisée, qu'une minorité de centres peut proposer à l'heure actuelle.

2/ La sonothrombolyse

La sonothrombolyse pourrait être une méthode simple d'augmenter le taux de recanalisation [101].

III. Choix de la stratégie

L'imagerie multimodale, en particulier l'IRM, en permettant de mieux comprendre la physiopathologie propre à chaque patient, est susceptible d'améliorer l'éligibilité et la sécurité des traitements de reperfusion.

1/ Sélection des patients sur la base d'une imagerie de la pénombre

Les patients pouvant bénéficier d'une reperfusion sont ceux disposant encore d'une pénombre ischémique. Fonder les décisions thérapeutiques sur l'imagerie de la pénombre permettrait de s'affranchir d'une fenêtre horaire rigide.

Certains patients peuvent bénéficier d'une reperfusion après 4h30 d'évolution; d'autres, nombreux, ont déjà consommé leur tissu à risque au cours des 3 premières heures. L'étude DEFUSE, ouverte et non contrôlée, a inclus 74 patients thrombolysés entre 3 et 6 heures [38]. L'intérêt principal de cette étude était de contrôler précocement la reperfusion en IRM (2ème IRM réalisée avec un délai médian de 4h15 après le bolus de tPA). La réponse clinique au rt-PA était corrélée au profil IRM: seuls les patients présentant un mismatch de diffusion-perfusion tiraient un bénéfice d'une reperfusion précoce. Un profil IRM "malin" a été identifié *post hoc*: une lésion de diffusion ou de perfusion ($T_{max} > 8s$) de plus de 100 mL était constamment associé à une évolution défavorable. L'étude EPITHET visait à évaluer, *versus* placebo et en double aveugle, l'impact du tPA IV débuté entre 3-6 heures sur la croissance de la lésion ischémique entre l'admission et J90, chez les patients présentant un mismatch [37]. Ce critère n'atteignit pas la significativité statistique lors de l'analyse initiale. Cependant, une nouvelle analyse utilisant le volume de mismatch après coregistration de la diffusion et de la perfusion, au lieu du mismatch volumétrique, obtint des résultats positifs [47]. Le même groupe a montré que la réponse clinique à la thrombolyse était fortement

dépendante des volumes lésionnels en diffusion et perfusion, davantage qu'au volume de mismatch [102]. Le bénéfice du rt-PA (pour obtenir un score de Rankin modifié de 0-1 à 3 mois) n'était plus significatif pour une lésion >25 mL en diffusion.

Ces résultats suggèrent que l'IRM pourrait guider les indications de reperfusion, non seulement pour traiter des patients habituellement exclus de la thrombolyse (horaire inconnu), mais aussi pour identifier les patients n'ayant qu'une faible probabilité de répondre à la thrombolyse.

2/ Estimation du risque hémorragique

Les variables cliniques associées au risque d'hématome cérébral post-thrombolyse sont bien connues: âge, sévérité neurologique initiale (score NIHSS), pression artérielle élevée, hyperglycémie [103]. Plusieurs paramètres d'imagerie sont corrélés au risque hémorragique. Celui-ci augmente avec la taille des lésions en diffusion [104], ainsi qu'avec la diminution du coefficient apparent de diffusion [105]. L'effondrement du volume sanguin cérébral pourrait être le marqueur le plus prédictif de la transformation hémorragique post-thrombolyse, en particulier après la survenue d'une reperfusion [106,107,108].

IV. Neuroprotection

Le terme de "neuroprotection" peut désigner des composés ou des stratégies thérapeutiques avec des mécanismes d'action présumés très différents (**tableau 1**). Les traitements de reperfusion ont pour objectif final de préserver le tissu cérébral en rétablissant une perfusion adéquate, et font partie à ce titre des "neuroprotecteurs".

Sur le versant clinique, les essais disponibles ont largement sous-estimé l'importance de la reperfusion et des délais de traitement [109]. Les résultats uniformément défavorables de ces essais montrent qu'il est illusoire d'attendre une neuroprotection efficace en l'absence d'une reperfusion précoce, sans laquelle la pénombre ischémique est perdue. Les données expérimentales ont régulièrement montré une protection plus marquée dans les modèles d'occlusion transitoire que permanente. Outre la raison évidente qu'un neuroprotecteur, pour être actif, doit atteindre le tissu lésé, nombre de composés ciblent des processus intervenant essentiellement lors de la reperfusion. La qualité insuffisante de la majorité des études expérimentales est reconnue. Une part cruciale de ces limites relève des problèmes

intrinsèques aux différents modèles animaux disponibles. La variabilité des volumes d'infarctus constitue une des principales difficultés. D'autre part, la méthodologie des travaux expérimentaux, notamment au niveau statistique, reste en deçà de la qualité attendue dans les essais thérapeutiques cliniques [110].

TROISIÈME PARTIE:
MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

I. Principes généraux

Comprendre la physiopathologie des lésions ischémiques et promouvoir les thérapies en cours de développement sont un challenge important. Les modèles animaux reproduisant les différents mécanismes de l'accident vasculaire cérébral apparaissent comme incontournables pour évaluer les stratégies thérapeutiques. Un grand nombre de modèles animaux d'AVC ont été élaborés et sont actuellement utilisés dans les laboratoires du monde entier. Ces modèles sont largement étudiés et reproductibles, de même que les approches pour mesurer la taille de l'infarctus et le résultat fonctionnel.

La simplification est le premier principe d'un modèle animal. En pratique clinique, l'ischémie cérébrale présente une grande hétérogénéité. Cette variabilité considérable constitue un frein à l'évaluation statistique au cours des essais cliniques thérapeutiques, qui demeurent coûteuses en effectifs, longues et difficiles à réaliser. Un modèle animal unique ne saurait donc convenir à toutes les situations cliniques; 80% des accidents vasculaires cérébraux humains sont d'origine ischémique [111]. Les modèles sont utilisés pour étudier les mécanismes impliqués dans l'évolution de la lésion ischémique qui, à son tour, peut conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les accidents vasculaires cérébraux. Ces mêmes modèles animaux peuvent ensuite être utilisés pour tester l'innocuité et l'efficacité de ces traitements in vivo.

La plupart des accidents ischémiques cérébraux humains sont causés par l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCA) [83] et ainsi des modèles animaux ont été développés pour induire l'ischémie dans ce territoire artériel. Ces modèles visent à satisfaire les critères suivants: (1) imiter les modifications physiopathologiques observés dans l'AVC humain, (2) créer des lésions reproductibles, (3) utiliser des procédures qui sont relativement simples et non invasives, (4) être de faible coût financier, et (5) permettre la surveillance des paramètres physiologiques et l'analyse du tissu cérébral [112].

De nombreuses espèces animales évoluées remplissent les critères de modélisation de l'ischémie cérébrale suscités, mais les rongeurs sont les animaux les plus couramment utilisés pour plusieurs raisons, notamment: (1) leur ressemblance avec les humains dans leur anatomie cérébrale et la physiologie, (2) leur petite taille qui permet une analyse facile de la physiologie et du tissu cérébral, (3) leur faible coût, (4) la remarquable homogénéité

génétique au sein des souches, et (5) l'acceptabilité éthique de leur utilisation par rapport aux grands animaux [113,114].

II. Modèles d'ischémie permanente et transitoire

Les modèles d'ischémie cérébrales focales peuvent être classés en deux groupes: modèles d'ischémie permanents et transitoires. L'ischémie permanente provoque une lésion ischémique sévère entourée par une zone de tissu moins endommagée. La reperfusion cérébrale ne réduit pas la taille des lésions [114].

L'ischémie focale transitoire produit des tailles variables de lésion ischémique en fonction de la durée de l'ischémie. Chez le rat, seulement 8 minutes d'ischémie provoquent une nécrose neuronale sélective et l'ischémie pendant plus de 30 minutes est toujours associée à un infarctus constitué [115]. De plus, après une ischémie transitoire, les lésions cérébrales finales résultent à la fois de l'ischémie et des effets de la reperfusion. Par rapport à une occlusion permanente, qui est un mécanisme peu fréquent chez l'homme, les modèles transitoires permettent une meilleure approche pour l'étude de la thrombolyse induite par une thérapie, la thrombolyse spontanée ou l'accident ischémique transitoire [116,117].

III. Modèles d'ischémie cérébrale focale

Cette revue a été rédigée d'après Durukan et Tatlisumak [116,118,119], Liu et al. [120] et Sicard et al [114].

1/ Modèles emboliques

1.1. Modèles thrombo-emboliques

Bien que l'ischémie thromboembolique puisse être induite par une approche photochimique, le modèle thromboembolique le plus couramment utilisé est celui réalisé par l'injection d'un caillot de sang, d'abord décrit chez le chien par Hill et al., et appliqué plus tard chez le rat [121,122,123]. Ce modèle est d'un grand intérêt pour les chercheurs en raison de sa ressemblance avec l'AVC ischémique humain et son utilité dans l'évaluation des thérapies thrombolytiques et/ ou neuroprotectrices [124,125].

C'est d'ailleurs dans un modèle embolique chez le lapin que l'efficacité de la thrombolyse intraveineuse par l'activateur tissulaire du plasminogène a été établie [126]. Ce type d'approche pourrait aussi constituer un modèle de transformation hémorragique après thrombolyse [127].

En pratique, les modèles thrombo-emboliques impliquent l'injection de thrombi, en général autologues, dans les vaisseaux extracrâniens à destinée encéphalique. Il s'agissait dans les premiers travaux de caillots humains ou de caillots autologues préparés *en suspension*.

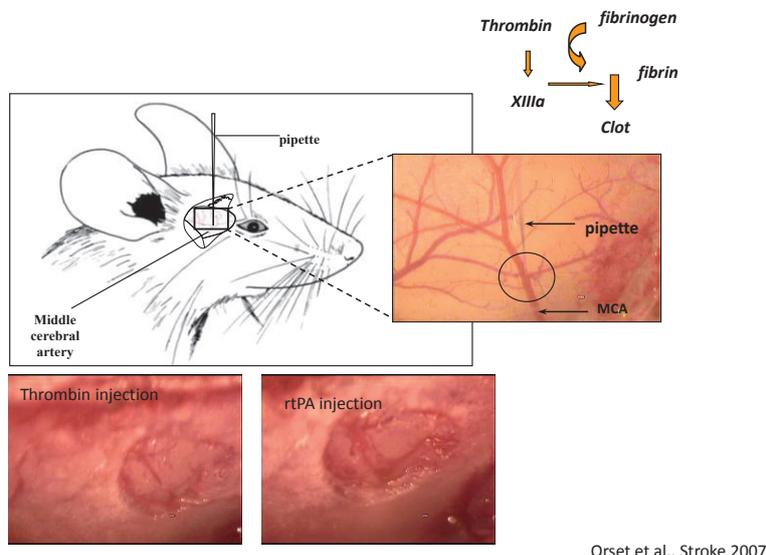
Plusieurs inconvénients sont communs aux modèles thromboemboliques, telles que l'infarctus diffus et non homogène dans le territoire de l'artère cérébrale moyenne avec une « pluie » d'embolies dans les branches périphériques [123]. En outre, une recanalisation spontanée est fréquemment constatée, ce qui rend difficile l'étude des thérapies thrombolytiques [128]. La taille des infarctus est variable, avec une souffrance parfois controlatérale et l'ischémie provoquée par de multiples petits caillots n'imitent pas parfaitement l'AVC ischémique clinique typique. Plus tard, il a été déterminé que la taille (longueur et diamètre) et les caractéristiques biologiques du caillot (riche en fibrine) sont cruciaux pour la pertinence et la reproductibilité de ce modèle [128].

Busch et al ont développé un modèle de rat qui surmonte les problèmes cités ci dessus dans lequel un seul caillot autologue riche en fibrine a été injecté pour produire une occlusion fiable de l'artère cérébrale moyenne proximale, avec une réduction constante du débit sanguin cérébral (CBF) et des dommages histologiques sur le territoire de l'artère cérébrale moyenne constatés [129]. Dans ce modèle, aucune reperfusion spontanée n'a été observée et, dans des expériences séparées, des thérapies thrombolytiques avec le rt-PA ou la prourokinase ont pu être testées [129,130]. Récemment, Henninger et al ont caractérisé ce modèle embolique en association avec l'IRM multimodale [131].

Toutefois, ces modèles semblent présenter une plus grande variabilité des volumes d'infarctus par rapport aux méthodes d'OACM par filament intraluminal [132].

Nous avons choisi de réaliser notre étude à partir d'un modèle thrombo embolique murin, décrit récemment par Orset et al en 2007 [133]. Une microinjection *in situ* de thrombine purifiée est utilisée pour induire la formation d'un caillot local dans la bifurcation de l'artère cérébrale moyenne chez une souris anesthésiée.

Mice stroke model



1

Figure : 10

Très peu d'études ont été réalisées à partir de ce modèle [127,134,135,136]. Celui-ci suggère un taux important de reperfusion spontanée [135] à près de 38%, confirmée par une IRM multimodale.

Ce modèle permet également d'étudier la transformation hémorragique après le traitement thrombolytique classique [127].

1.2. Emboles synthétiques

De nombreux matériaux ont été utilisés pour produire des embolies artificielles qui sont généralement injectés dans l'artère carotide interne, le plus souvent chez le rat [137]. L'embolisation par des microsphères est le modèle le plus utilisé, avec la sévérité des lésions ischémiques liée au nombre d'embolies utilisé [138]. Les lésions nécessitent plus de temps à se développer (24 heures en moyenne) que dans les modèles intraluminaux, permettant une fenêtre thérapeutique plus large pour l'étude des drogues thérapeutiques. Toutefois, la permanence de l'ischémie ne simule pas la plupart des situations cliniques qui limite l'applicabilité de ces modèles. En outre, les lésions sont multifocales et ont une faible reproductibilité, même si les modèles utilisant des macrosphères ont donné lieu à des

infarctus plus reproductibles en augmentant le diamètre des sphères et en diminuant leur nombre [139].

2/ Modèles mécaniques

De nombreuses techniques ont été développées pour aborder chirurgicalement et obstruer l'artère cérébrale moyenne, le rat étant l'espèce la plus largement utilisée [118]. L'abord chirurgical trans orbital est le moins traumatisant et, par rapport aux procédures nécessitant une craniotomie, entraîne moins de perte de sang et d'artéfacts [114]. L'électrocoagulation donne des occlusions permanentes de l'artère cérébrale moyenne, tandis que les clippings ou les ligatures permettent une reperfusion [140]. L'occlusion de l'artère cérébrale moyenne peut survenir également suite à une hypotension transitoire [141].

2.1. Occlusion de l'artère cérébrale moyenne (OACM) par un monofilament intraluminal

Ce modèle, initialement décrit par Koizumi et al. chez le rat [142], demeure l'un des plus utilisés. Il consiste à introduire un monofilament de nylon via la carotide commune [142] ou externe [143], pour occlure l'artère cérébrale moyenne (ACM) à sa naissance (**figure 11**). L'OACM peut être permanente ou transitoire, par retrait du fil. Un infarctus cortico-striatal est typiquement obtenu pour des durées d'occlusion de 60 minutes ou plus: il s'agit bien d'un modèle d'infarctus étendu de l'ACM (**figure 12**). Ces modèles intravasculaires n'impliquent pas de traumatisme crânien direct, et s'avèrent relativement aisés à mettre en oeuvre. Ils ont par la suite été adaptés chez la souris [144] et le lapin [145].

Bien que considéré comme un des modèles les plus reproductibles, la *variabilité des volumes d'infarctus* demeure une importante limitation, en particulier pour les études thérapeutiques. Le principal facteur de variabilité concerne les caractéristiques physiques du monofilament, qui conditionnent les taux d'occlusion incomplète et de complication (perforation artérielle et hémorragie sous-arachnoïdienne). Plusieurs types de finition ont ainsi été proposés pour les filaments: extrémité arrondie par une flamme, *coating* de l'extrémité par divers composés (poly-L-lysine, méthyl méthacrylate, résine, vernis à ongles, "caoutchouc" de silicone). Actuellement, le traitement par caoutchouc de silicone semble fournir la meilleure reproductibilité pour la taille de l'infarctus (déviations standard: 5-30% de la moyenne), tout en minimisant le risque d'hémorragie sous-arachnoïdienne [146,147]. Le

doppler laser transcrânien, détectant la microcirculation corticale, permet de vérifier en temps réel la qualité de l'occlusion sylvienne (baisse d'au moins 50-75% du signal de base) ainsi que la reperfusion [147,148].

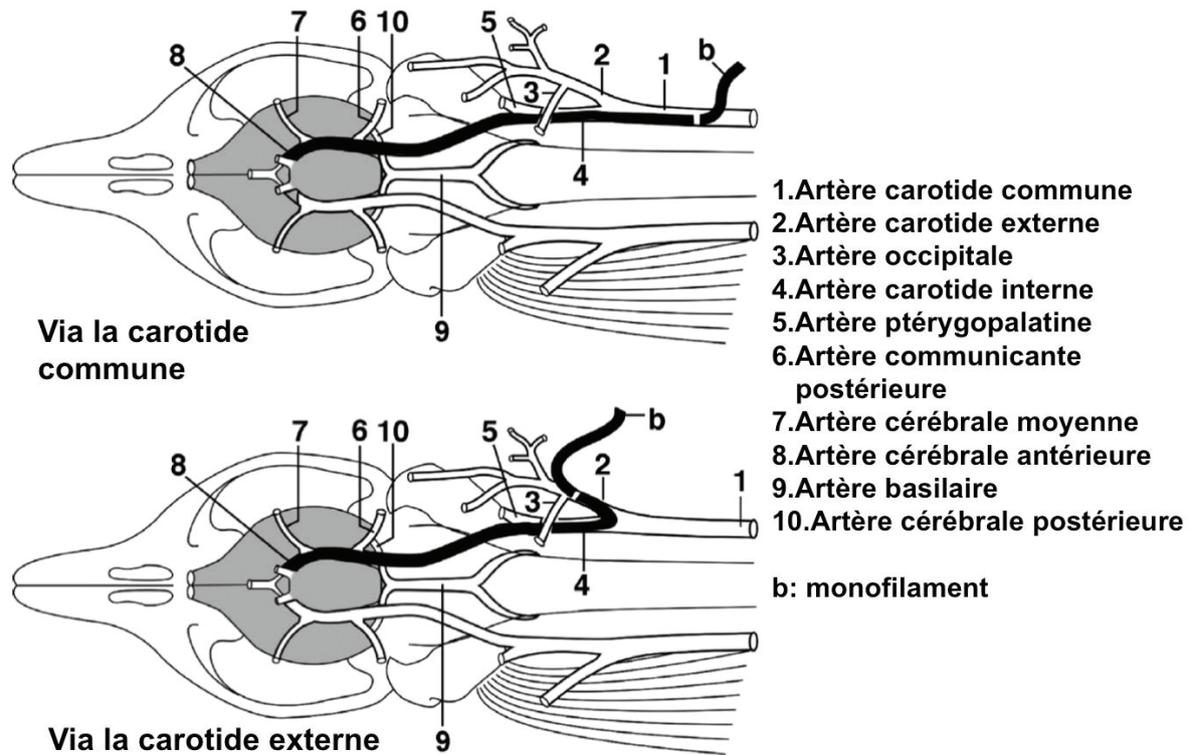


Figure 11: modèle d'OACM par monofilament intraluminal (d'après Durukan, 2009).

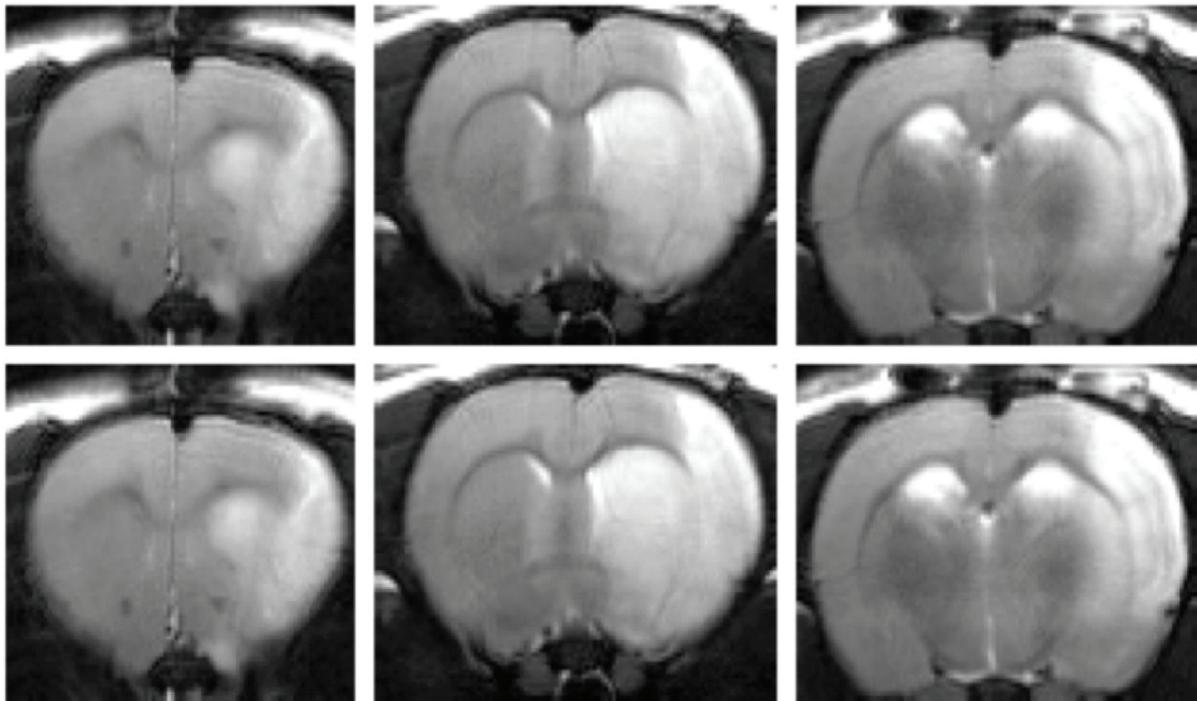


Figure 12: modèle d'OACM par filament intraluminal; IRM: séquence T2 [149].

Ce modèle induit dans environ 12% des cas une *hémorragie sous-arachnoïdienne*, responsable d'une réduction bilatérale du débit sanguin cérébral [147]. En outre, l'occlusion des branches de l'artère carotide externe, nécessaire dans ce modèle, provoque des *troubles de la mastication* et un amaigrissement. Bien que sans influence directe sur le volume de l'infarctus, l'ischémie des muscles du territoire carotide externe est associée à une dégradation des performances motrices [150]. Enfin, l'*hyperthermie spontanée* par lésion hypothalamique est un autre inconvénient de ces modèles, pouvant aggraver l'extension des lésions ischémiques et biaiser l'interprétation des études thérapeutiques [151]. La longueur du *coating* du filament et la durée de l'ischémie influencent la survenue de cette complication.

2.2 OACM par un abord chirurgical direct

L'abord chirurgical direct a été l'une des premières méthodes d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne, et a été utilisé dans plusieurs espèces animales: primates [152,153], chat [154], chien [155], lapin [156] et rongeurs [113]. Différentes voies d'abord sont disponibles (transcrânienne, transorbitaire ou rétro-orbitaire), ainsi que plusieurs techniques d'occlusion artérielle (électrocoagulation avec ou sans traction de l'artère, ligature, *clipping*, ces deux dernières méthodes autorisant des occlusions transitoires). Le rat demeure l'espèce la plus fréquemment employée pour des raisons évidentes de coût et d'acceptabilité éthique [157,158]. Le modèle de Tamura et ses variantes représentent la méthode la plus fréquemment utilisée [158]. L'abord sous-temporal permet une occlusion proximale de l'ACM et l'obtention d'un infarctus cortico-striatal, à condition que l'OACM soit proximale au tractus olfactif et étendue jusqu'à la veine cérébrale interne [159].

Tout comme les modèles d'OACM par filament intraluminal, celui de Tamura présente une variabilité des volumes lésionnels et un taux d'échec non négligeables. Plusieurs variantes méthodologiques ont été proposées afin d'améliorer la reproductibilité des lésions: hypotension concomitante, occlusion bilatérale transitoire des carotides communes [141]. Malgré les adaptations techniques, toutes ces méthodes impliquent un traumatisme crânien

et cérébral de sévérité variable (lésions mécaniques et thermiques lors de la craniectomie et de l'électrocoagulation). La maîtrise chirurgicale de ces modèles demeure plus complexe que celle du filament intraluminal, en particulier pour l'obtention d'une ischémie transitoire.

3/ Autres modèles

3.1. Photothrombose

Ce modèle induit un infarctus cortical par injection systémique d'un colorant photo-actif en combinaison avec l'irradiation par un faisceau lumineux transmis à travers le crâne [160]. Les dommages oxydatifs à l'endothélium causés par le colorant modifié conduit à l'agrégation des plaquettes dans la zone irradiée [161]. Ce modèle est utilisé principalement chez les rats spontanément hypertendus [162]. Un inconvénient de ce modèle est que l'œdème vasogénique et la rupture de la barrière hémato-encéphalique survient dans les minutes suivant le début de la lésion et ne permettent pas le passage par une phase de pénombre - donc, ce modèle a été considéré par beaucoup comme inapproprié pour les études pharmacologiques précliniques [162]. Toutefois, un nouveau modèle permet de s'affranchir de cette limitation et induit une ischémie avec un passage par un temps de pénombre [163]. Ceci, combiné avec la capacité d'induire de façon non invasive et reproductible un infarctus dans n'importe quel territoire cortical, sont des avantages évidents du modèle d'infarctus photochimique. Un inconvénient majeur est les caractéristiques atypiques de la lésion (lésion vasculaire importante et œdème vasogénique précoce) qui sont peu typiques dans l'AVC humain [118].

3.2. OACM par l'endothéline 1

L'endothéline-1 (ET-1) est un peptide naturel qui provoque une vasoconstriction et plusieurs modèles l'utilisent comme un agent pour induire une ischémie sylvienne [118]. Les approches invasives ont été largement remplacées par l'injection intracérébrale en conditions stéréotaxiques d'ET-1 au contact de l'artère cérébrale moyenne, ce qui permet d'éviter les complications de la chirurgie [164]. Lorsque l'ET-1 est appliqué sur l'artère cérébrale moyenne, il ya une diminution significative du débit sanguin cérébral (CBF) sur son territoire, ce qui propose un modèle de lésion ischémique similaire à celui d'une occlusion de l'artère cérébrale moyenne chirurgicale directe [165]. Ce modèle peut être utile dans les

études de certains axes thérapeutiques. Notamment, après une période d'environ 20 minutes de réduction du CBF de façon sévère, il y a un retour lent et progressif de la circulation sanguine à la normale [165].

IV. Paramètres physiologiques

1/ Température

L'hypothermie comme l'hyperthermie sont susceptibles d'affecter la taille lésionnelle. L'effet neuroprotecteur d'une hypothermie modérée (33°C) a été démontré dans des modèles d'ischémie focale [166,167]. Cette neuroprotection semble secondaire à une réduction de l'activité métabolique [168] et à une diminution de la transmission glutamatergique [169]. Au contraire, une hyperthermie, même modérée, aggrave les lésions ischémiques [170]. Au delà de 60 minutes, les occlusions de l'ACM induisent chez le rat des lésions hypothalamiques [171,172], responsables d'une hyperthermie persistant au moins 24 heures. Cet effet initialement méconnu a faussé l'interprétation de certaines études de neuroprotection. Ainsi, il est désormais établi que l'effet neuroprotecteur du MK-801 repose sur ses propriétés hypothermiantes et non sur l'antagonisme de l'excitotoxicité médiée par les récepteurs NMDA [173]. Chez la souris, au contraire, l'occlusion de l'ACM provoque une hypothermie [174]. Une atteinte hypothalamique est observée comme chez le rat, mais le rapport surface/volume corporel élevé de la souris induit une hypothermie après la chirurgie. Il est donc crucial de maintenir une température stable durant toute la durée de l'expérimentation afin de disposer de données interprétables. Les tapis chauffants avec rétrocontrôle via une sonde rectale représentent une solution simple, fréquemment employée durant la chirurgie. Le contrôle thermique en période post-opératoire est tout aussi crucial, et repose habituellement sur un incubateur thermorégulé entre 28-32°C.

2/ Glycémie

Bien que l'hyperglycémie soit associée avec une évolution défavorable dans nombre d'études cliniques [175,176,177,178], les données expérimentales demeurent discordantes. L'hyperglycémie pourrait être délétère [144,179], protectrice [180] ou sans impact sur le volume lésionnel [181]. Une revue récente a souligné la méthodologie critiquable des études expérimentales disponibles, qui ont pour la plupart utilisé un modèle de diabète induit à la

streptozotocine ou des doses supraphysiologiques de glucose [182]. Toutefois, la plupart des équipes utilisent des animaux à jeun et surveillent la glycémie afin de limiter cette source potentielle de variabilité.

3/ Gaz du sang et pression artérielle

En condition normale, lorsque la pression artérielle systémique moyenne chute sous 70- 80 mmHg chez le rat (50-60 mmHg chez l'humain), la pression de perfusion cérébrale ne peut plus être maintenue. La perte de l'autorégulation cérébrale en condition ischémique rend cet équilibre d'autant plus précaire, et impose un strict contrôle de la pression partielle en O₂ et CO₂ ainsi que de la pression artérielle systémique.

V. Méthodes d'anesthésie et d'analgésie

L'anesthésie et l'analgésie sont des étapes indispensables pour la majorité des modèles d'ischémie cérébrale. La plupart des anesthésiques couramment utilisés en expérimentation animale ont des propriétés neuroprotectrices [183]: isoflurane, sévoflurane, desflurane, halothane, xénon, protoxyde d'azote, barbituriques, propofol, kétamine et lidocaïne. L'utilisation d'animaux témoins permet de contrôler d'éventuels biais liés à l'anesthésie. Cependant, certaines situations spécifiques sont à connaître. La plupart des anesthésiques potentialisent la transmission GABAergique (récepteurs à l'acide α -aminobutyrique de type A). Les agents volatils sont des antagonistes des récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et à l'acide amino-3- hydroxy-5-méthyl-4-isoxazol-propionique (AMPA). Il conviendra donc d'adapter la méthode d'anesthésie pour les études ciblant la neurotransmission. La xylazine, souvent associée à la kétamine, est un agoniste α 2-adrénergique induisant une hyperglycémie pouvant atteindre 15.9 mM à l'induction [184]. L'isoflurane et l'halothane, deux anesthésiques gazeux d'utilisation courante, peuvent aussi induire une hyperglycémie. Cette interaction sera à prendre en compte pour les protocoles impliquant une manipulation de la glycémie. En général, les anesthésies gazeuses sont réalisées en respiration spontanée, par l'inhalation d'un mélange d'oxygène et d'halogénés (isoflurane ou halothane). Le pourcentage d'anesthésiant gazeux du mélange inhalé par masque est en général adapté à la fréquence respiratoire de l'animal ou à la mesure de pression partielle artérielle en O₂. L'anesthésie gazeuse sur animal intubé et ventilé est la procédure permettant le meilleur contrôle des paramètres hémodynamiques, une

diminution de la variabilité lésionnelle ainsi que de la mortalité post-ischémie [185]. Il s'agit néanmoins d'une procédure expérimentale lourde et coûteuse, finalement peu utilisée, y compris dans les modèles d'ischémie focale chez le rat [186].

VI. Critères d'évaluation

Deux principaux types de mesures sont utilisés afin d'évaluer l'impact d'une ischémie cérébrale expérimentale: le volume de l'infarctus et les tests fonctionnels.

1/ Mesure de l'infarctus et expression des volumes lésionnels

Dans les modèles d'ischémie focale, le principal critère pour mesurer l'impact d'une ischémie cérébrale expérimentale a été la mesure du volume de l'infarctus, traditionnellement mesurée par l'histologie quantitative. Parmi un certain nombre de méthodes histopathologiques, le chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (TTC) et la coloration par hématoxyline-éosine (H & E) sont les deux plus couramment employées. Le TTC peut être utilisé pour colorer les tissus beaucoup plus rapidement, facilement et à moindre coût que l'H & E [187]. Le TTC est un composé chimique incolore qui est intégré par les enzymes mitochondriales en un composé qui tache les régions cérébrales normales en rouge foncé, tandis que les régions lésées restent blanches. Des études montrent que la coloration par le TTC est fiable entre 6 et 72 heures après l'ischémie [118]. Avant 6 heures, le nombre de mitochondries endommagées est insuffisant pour créer un contraste entre le tissu normal et un infarctus, et après 72 heures la réponse inflammatoire physiopathologique obscurcit souvent la ligne de démarcation entre la périphérie et la zone endommagée [118].

Malgré ces techniques de coloration, les infarctus ont parfois des formes complexes avec des limites parfois indistinctes, ce qui rend difficile la mesure des volumes. De nombreuses méthodes ont été développées pour faire face à ces complexités, chacune avec leurs propres avantages et inconvénients. Peut-être l'une des considérations les plus importantes à tenir en compte dans le volume de l'infarctus est l'effet de l'œdème vasogénique. L'œdème, dans le modèle d'ischémie MCAO chez le rat, représente généralement 20-30% du volume de l'infarctus apparent [188]. Une évaluation séparée du volume de l'infarctus entre le volume «corrigé» (qui représente l'œdème) et le volume "non corrigé" (qui ne tient pas compte de

l'œdème) est importante en raison de la possibilité que certaines interventions puissent réduire l'œdème mais pas sauver le tissu cérébral et vice-versa [118].

2/ Evaluation neurologique

Beaucoup de déficits neurologiques sont difficiles à évaluer chez les animaux. Les déficits moteurs sont peut-être les plus faciles à quantifier et de simples tests de la fonction motrice sont disponibles pour les modèles de rongeurs [159]. Les tests neurologiques qui permettent d'évaluer la fonction sensori-motrice comprennent le placement du membre, la marche en équilibre, le test de l'étiquette autocollant, la marche sur la grille [189]. Un certain nombre de tests cognitifs examinant l'apprentissage et la mémoire à court terme sont disponibles pour les rats, y compris le labyrinthe d'eau de Morris [190]. L'évaluation neurologique associée à des volumes histologiques est de plus en plus exigée dans l'étude de l'impact des thérapeutiques neuroprotectrices, dont l'efficacité peut être traduite par des changements structurels et chimiques subtils plutôt que des changements dans le volume de l'infarctus du brut [191]. Cette affirmation est corroborée par le fait que les données animales suggèrent une faible corrélation entre la réduction de la taille de l'infarctus avec les déficits neurologiques ou comportementaux [118]. Il est aussi important de prolonger la période des tests neurologiques pendant au moins 1 mois après l'ischémie dans les études animales, conformément aux recommandations du Comité de STAIR [117]. Toutefois, cela peut être difficile à mettre en œuvre étant donné que le temps de survie est limité à environ 48 heures dans de nombreux modèles animaux [192].

VII. L'évaluation in vivo par IRM

Malgré l'homogénéisation recherchée dans les modèles d'ischémie focale, une variabilité significative des volumes lésionnels est observée. L'imagerie par résonance magnétique rend possible le suivi longitudinal, in vivo, d'animaux individuels, et pourrait ainsi permettre de réduire les effectifs requis pour une étude thérapeutique. Ce concept, impliquant une sélection des sujets étudiés, a d'ores et déjà été introduit dans des essais cliniques [193]. La plupart des techniques IRM utilisées en pratique clinique ont été développées, et sont disponibles, en IRM expérimentale du petit animal [194,195]. Par ailleurs, l'IRM a

récemment connu des développements majeurs en imagerie moléculaire et cellulaire, qui ont été abordés ailleurs [196].

1/ Imagerie de diffusion

Les principes de l'IRM de diffusion ont été exposés précédemment (cf première partie, chapitre II.3.2). Les lésions visualisées en IRM de diffusion ont une topographie et une taille étroitement corrélées avec leur corrélât histopathologique [197,198]. L'apport essentiel de cette technique est de permettre une détection précoce, dès les premières minutes d'une occlusion artérielle, et ensuite un suivi longitudinal, des lésions ischémiques en cours de constitution. Les lésions visibles en IRM diffusion peuvent être réversibles de manière permanente ou seulement transitoire, en fonction de la durée et de la sévérité de l'ischémie. Plusieurs études ont illustré ce phénomène dans des modèles d'OACM transitoire chez le rat; la lésion de diffusion visible après 30 minutes d'ischémie disparaissait transitoirement, avant l'apparition secondaire d'un infarctus. Cette réversibilité transitoire n'était plus observée pour des durées d'ischémie excédant 30-60 minutes [115,199]. Dans le même modèle, l'analyse histopathologique a révélé des lésions échappant à l'IRM après une OACM transitoire de 10 minutes [200].

2/ Imagerie de perfusion

Deux principales techniques sont disponibles pour évaluer la perfusion cérébrale: le contraste dynamique de susceptibilité magnétique (Dynamic Susceptibility Contrast, DSC) et le marquage de spins artériels (Arterial Spin Labeling, ASL) [201]. Le DSC repose sur l'analyse de la cinétique du 1er passage d'un bolus intraveineux d'un agent de contraste (chélate de gadolinium ou particules d'oxyde de fer recouvertes de dextran). Une séquence T2* en écho-planar est typiquement utilisée pour l'acquisition rapide des images. Le post-traitement de ces données dynamiques peut fournir des valeurs relatives, en utilisant une fonction gamma pour obtenir un "fit" de la courbe expérimentale: Equation (1): où A représente l'amplitude du pic de signal, α et β décrivant la forme de la courbe.

L'obtention de valeurs quantitatives, pouvant permettre des comparaisons interindividuelles ou intraindividuelles (sur des examens réalisés à des temps différents), nécessite la prise en compte d'une fonction d'entrée artérielle, qui sera déconvoluée avec la courbe tissulaire pour calculer le débit sanguin cérébral [202].

Cette méthode implique plusieurs approximations qui peuvent s'avérer erronées, et donc induire une erreur sur l'estimation du débit sanguin cérébral. La fonction d'entrée artérielle doit théoriquement être mesurée au plus près du volume d'intérêt; en pratique, un voxel unique (ou la moyenne de plusieurs voxels) est choisi sur un gros tronc artériel (e.g. sur le segment M1 de l'ACM) afin de limiter le phénomène de volume partiel. La dispersion et les éventuels retards circulatoires peuvent induire une erreur sur le calcul du CBF: un retard de 1-2 secondes peut ainsi sous-estimer le CBF de 40% et surestimer le MTT de 60% [202]. Contrairement au scanner X, la relation entre l'intensité du signal en IRM et la concentration en agent de contraste n'est pas nécessairement linéaire, et dépend des caractéristiques du tissu cérébral [203]. Enfin, comme le montre l'équation (2), la détermination absolue du CBF implique la connaissance de la constante k , et donc de l'hématocrite local et de la densité locale du tissu cérébral. Bien que ces paramètres puissent varier, une valeur *a priori* est le plus souvent appliquée. En dépit de ces limitations, le DSC demeure la technique la plus employée en pratique clinique. L'ASL procède au marquage magnétique des spins du sang artériel, qui sont ainsi utilisés comme des traceurs endogènes. L'ASL a pour principal avantage son caractère non invasif, autorisant des mesures répétées sur une période prolongée [204].

Cette technique a confirmé une bonne corrélation avec d'autres techniques de mesure du CBF au cours de travaux cliniques [205] et expérimentaux [206]. L'ASL présente toutefois un rapport signal/bruit moindre par rapport à l'IRM de perfusion par DSC. D'autre part, la quantification du CBF s'avère problématique en conditions d'ischémie sévère, lorsqu'il existe un allongement important du MTT par rapport à la relaxation T1: la disparition de l'aimantation longitudinale peut être responsable d'une sous-estimation du CBF dans ces zones.

3/ Applications expérimentales

L'IRM de diffusion et de perfusion offre la possibilité d'un suivi longitudinal du même animal, et d'évaluer la dynamique de phénomènes temps-dépendant: la croissance des lésions ischémiques et l'évolution de la zone à risque, la survenue d'une reperfusion. Le mismatch de diffusion-perfusion a ainsi été documenté dans le modèle d'OACM par filament intraluminal chez le rat, et semble persister jusqu'à 60 minutes d'ischémie dans ce modèle [207]. Dans le modèle d'OACM embolique chez le rat, la thrombolyse initiée 90 minutes

après l'induction de l'ischémie a permis de limiter l'extension de l'infarctus, alors qu'un traitement plus tardif n'avait pas d'effet [208].

Des composés candidats en neuroprotection ont aussi été évalués en IRM. Le diméthyl sulfoxyde (DMSO), administré par voie intraveineuse à 60 minutes d'ischémie dans un modèle d'OACM permanente par monofilament chez le rat, a permis de "geler" la progression de l'ischémie au sein du mismatch de diffusion-perfusion [209]. En revanche, une injection plus tardive après 2 heures d'ischémie n'avait pas permis d'arrêter l'extension des dommages ischémiques. L'effet protecteur de l'hyperoxie normobarique (HNB), en combinaison avec une thrombolyse intraveineuse, a été évalué par le même groupe. Dans un modèle d'OACM embolique chez le rat, l'HNB a permis de préserver la zone de mismatch de diffusion-perfusion pouvant être récupérée par la thrombolyse intraveineuse, débutée 3 heures après le début de l'ischémie: la taille finale de l'infarctus présentait une réduction significative de 30% pour les rats thrombolysés en HNB, par rapport aux rats traités en air ambiant [210].

Ainsi, le développement de thérapeutiques innovantes visant à stabiliser la pénombre ischémique, et à élargir la fenêtre horaire des traitements de reperfusion, pourrait bénéficier d'une évaluation pilote en IRM. Ces techniques d'imagerie non invasive peuvent laisser espérer une meilleure maîtrise de la variabilité et de l'hétérogénéité des lésions ischémiques [211].

Problématique

La thrombolyse est le traitement de référence de l'ischémie cérébrale aigüe. Cependant, plus de la moitié des patients traités par le rt-PA (Actilyse®) restent handicapés à 3 mois et les effets de cette thérapeutique restent insatisfaisants : majoration du risque hémorragique, taux de recanalisation de l'ordre de 30 à 40%, ré-occlusion précoce (20-30%). Potentialiser la thrombolyse par des combinaisons de traitements apparaît comme l'étape suivante logique, le but étant de diminuer les effets secondaires du rt-PA et d'améliorer la reperfusion cérébrale.

De façon récente, les stratégies de reperfusion précoces combinant un agent antithrombotique et un fibrinolytique sont proposées, augmentant les taux de recanalisation. Le problème sera celui de diminuer le risque hémorragique secondaire.

L'IRM multimodale de diffusion et de perfusion est utilisée de manière longitudinale permettant un suivi de chaque sujet qui devient aussi son propre contrôle.

Un modèle thromboembolique murin a été choisi en raison de sa pertinence en regard de la situation clinique et en raison de sa physiopathologie proche de la cause principale d'AVC humain.

OBJECTIFS

Dans ce contexte, notre travail s'est réalisé en deux étapes :

Le premier objectif a été de caractériser le modèle thrombo embolique, décrit par Orset et al en 2007 par une imagerie multimodale. Cette étude préliminaire a permis de caractériser la reperfusion cérébrale dans ce modèle, de façon dynamique et longitudinale, de déterminer les tailles de lésions et leur évolution. Le principe est celui de l'injection dans l'artère cérébrale moyenne de la thrombine, occasionnant un caillot. Ce modèle s'approche des mécanismes physiopathologiques les plus fréquents constatés dans l'AVC humain.

Le deuxième objectif a été d'utiliser ce modèle pour tester une molécule inhibiteur du TAFI, étudiée par SANOFI research, seule et en combinaison avec des doses de rt-PA plus faibles que celles utilisées habituellement par rapport au traitement de référence et à des groupes contrôles, au cours d'un partenariat avec SANOFI.

RÉSULTATS

La partie Résultats est présentée sous forme d'articles publiés ou soumis

L'étude 1 est publiée dans PLOS ONE:

Durand A*, Chauveau F*, Cho TH, Bolbos R, Langlois JB, Hermitte L, Wiart M, Berthezène Y, Nighoghossian N. *Spontaneous reperfusion after in situ thromboembolic stroke in mice*. PLoS One. 2012;7(11):e50083. doi: 10.1371/journal.pone.0050083. Epub 2012 Nov 16

*co-premiers auteurs

L'étude 2 est soumise dans PLOS ONE (octobre 2013):

Anne Durand, Fabien Chauveau, Tae-Hee Cho, Christopher Kallus, Michael Wagner, Florent Boutitie, Delphine Maucort-Boulch, Marlène Wiart, Yves Berthezène, Norbert Nighoghossian. Effects of a TAFI-Inhibitor combined with sub-optimal dose of rtPA in a murine thromboembolic model of stroke

Etude 1

Reperfusion spontanée après une ischémie focale d'origine thromboembolique chez la souris.

Contexte et état de la question

Le traitement de référence de l'ischémie cérébrale aigüe est le rt-PA qui permet une reperfusion précoce prouvée chez les patients. Cependant ce traitement n'agit pas sans complications ou recanalisations précoces et/ou reperfusions partielles. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc évaluées à la fois sur la potentialisation de la thrombolyse, la neuroprotection et la fibrinolyse. Toutefois, malgré des résultats intéressants sur certains modèles d'animaux, la réponse est souvent décevante chez l'homme. Orset et al [133] ont proposé un modèle murin thromboembolique dont la physiopathologie s'approche du mécanisme humain d'AVC le plus fréquent. Le principe est simple : celui de l'injection in situ dans la bifurcation de l'artère cérébrale moyenne de thrombine qui occasionne un caillot et des embolies dans la circulation distale du territoire vasculaire.

Ce modèle a parfaitement été décrit et la reperfusion constatée en électrophysiologie et histologie.

Dans ce sens, le principe de ce modèle nous semblant particulièrement intéressant pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques, nous avons souhaité caractériser le modèle par une imagerie par résonance magnétique multiparamétrique incluant une angiographie

(Angiographie par Résonance Magnétique), une séquence de diffusion et une de perfusion. Cette étude radiologique a été initiée après l'injection de la thrombine pour documenter l'occlusion et la zone à risque dans ce modèle. L'intérêt de cette étude est de pouvoir répéter les séquences dans le temps et donc de pouvoir évaluer la cinétique de l'occlusion.

Principaux résultats.

Nous avons montré que malgré une occlusion similaire et reproductible chez tous les animaux et une hypoperfusion intense dans le territoire vasculaire de l'artère cérébrale moyenne, la moitié seulement des animaux ont présenté une lésion corticale sur les séquences de diffusion, pendant que l'autre moitié montrait aucune ou une très petite lésion.

Cette caractérisation radiologique a permis de montrer une reperfusion spontanée chez 38% des animaux dans ce modèle, souvent associée à l'absence de lésion de diffusion précoce. Ces constatations permettent une meilleure compréhension du modèle et nous incitera à sélectionner les animaux susceptibles d'être inclus dans des études thérapeutiques, sur le concept d'un mismatch >110%, selon les critères évoqués dans l'étude DEFUSE.

Spontaneous reperfusion after *in situ* thromboembolic stroke in mice

Anne Durand^{1*}, MD, Fabien Chauveau^{1*}, PhD, Tae-Hee Cho¹, MD, PhD, Radu Bolbos², PhD, Jean-Baptiste Langlois², MSc, Laure Hermitte¹, MD, Marlène Wiart¹, PhD, Yves Berthezène¹, MD, PhD, Norbert Nighoghossian¹, MD, PhD.

¹Université de Lyon, CREATIS; CNRS UMR5220; INSERM U1044; INSA-Lyon; Université Lyon 1; Hospices Civils de Lyon, France.

²CERMEP-Imagerie du Vivant, Animage, Lyon, France.

*These authors contributed equally to this work.

Corresponding author

Pr. Norbert Nighoghossian

Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, Service de Neurologie B

28, Avenue du Doyen Lepine

F-69677, Bron cedex, France

Tel.: 33 4 72 35 78 10 Fax 33 4 72 68 49 16

E-mail: norbert.nighoghossian@chu-lyon.fr

Injection of thrombin into the middle cerebral artery (MCA) of mice has been proposed as a new model of thromboembolic stroke. The present study used sequential multiparametric Magnetic Resonance Imaging (MRI), including Magnetic Resonance Angiography (MRA), Diffusion-Weighted Imaging (DWI) and Perfusion-Weighted Imaging (PWI), to document MCA occlusion, PWI-DWI mismatch, and lesion development. In the first experiment, complete MCA occlusion and reproducible hypoperfusion were obtained in 85% of animals during the first hour after stroke onset. In the second experiment, 80% of animals showed partial to complete reperfusion during a three-hour follow-up. Spontaneous reperfusion thus contributed to the variability in ischemic volume in this model. The study confirmed the value of the model for evaluating new thrombolytic treatments, but calls for extended MRI follow-up at the acute stage in therapeutic studies.

Keywords

Animal models, Cerebral ischemia, Diffusion-Weighted Imaging, Perfusion-Weighted Imaging, Middle Cerebral Artery, Thromboembolic stroke

Introduction

A new rodent model of stroke was recently proposed by Orset *et al.* [1], in which thromboembolic middle cerebral artery occlusion (MCAo) was achieved by *in situ* microinjection of thrombin. Intravenous injection of tissue-type plasminogen activator induced reperfusion, mimicking clinical thrombolysis. Thus, this animal model appears very attractive for evaluating new thrombolytic agents or combined thrombolytic/neuroprotective strategies, as described in recent histopathologic studies [2], [3].

MRI plays a pivotal role in stroke management [4], and is increasingly used for treatment assessment in animal models [5], [6], [7], [8]. The present study sought to characterize acute development of ischemic infarct using MRI to assess the adequacy of the model.

Materials and methods

All procedures were conducted after approval (n°0237) by our institutional review board (*Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale* (CREEA Rhône-Alpes) of the CNRS), in compliance with European law and policies (EEC Council Directive 86/609, OJ L 358, 1, Dec. 12, 1987), and in accordance with the ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) guidelines (<http://www.nc3rs.org/ARRIVE>). Animals were housed in a colony room with a 12/12h light/dark cycle.

Animal model

Twenty-six Swiss mice (Charles River, l'Arbresle, France), weighing 25-30g, were studied. A catheter was inserted into the tail vein. To minimize suffering, buprenorphine (0.05mg/kg s.c.) was administered shortly after induction of anesthesia with 2% isoflurane in ambient air. Body temperature was continuously maintained at $37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Surgery was performed as originally described [1]. Briefly, subtemporal craniectomy exposed the right MCA, and one microliter of murine α -thrombin (0.75 U, Sigma-Aldrich) was pneumatically injected into the lumen of the MCA. *In situ* clot formation was monitored visually. Animals were sutured and immediately placed in the MRI cradle.

Magnetic resonance imaging

Mice were placed in a cradle equipped with a stereotaxic holder, an integrated heating system to maintain body temperature at $37\pm 1^\circ\text{C}$, and a pressure probe to monitor respiration. MRI experiments were performed on a BioSpec-70/20 7T system (Bruker, Ettlingen, Germany) using a birdcage head-coil of 72 mm inner diameter for RF transmission and a 15 mm diameter surface coil for reception. A whole-brain imaging protocol (T2-weighted imaging (T2-WI), diffusion-weighted imaging (DWI) and perfusion-weighted imaging (PWI)) was adapted from a previous study [6], and performed during the first hour following stroke onset. Time of flight (TOF) MRA was performed using a 2D multislice gradient-echo sequence with matrix=256×128, field of view (FOV)=3.7×2.5 cm², 80 non-contiguous slices (slice thickness 1 mm and interslice overlap 0.15 mm), echo-time/repetition-time (TE/TR)=5/25 ms and 2 averages. T2-WI sequences were acquired using a RARE sequence with matrix=256×256, FOV=3×3 cm², TE/TR=75/3000 ms, and 2 averages. DWI was performed using an echo planar imaging spin-echo (EPI-SE) sequence with the same FOV, matrix 128×128, TE/TR=25/2000 ms and 3 b-values of 0, 1,500, and 3,000 s/mm². PWI was performed either i) with multislice dynamic susceptibility contrast-enhanced MRI (DSC-MRI, Experiment 1) or ii) with a single-slice pulsed arterial spin labeling method (PASL, Experiment 2). DSC-MRI consisted in an echo planar imaging gradient-echo (EPI-GE) sequence with the same FOV, matrix 96×96, zero-filled to 128×128, TE/TR=4.84/100 ms, and 100 consecutive images per slice with a temporal resolution of 0.6 s, under an intravenous bolus of gadolinium (Dotarem, Guerbet, Aulnay-sous-Bois, France). PASL was performed using a flow-sensitive alternating inversion-recovery echo planar imaging (FAIR-EPI) sequence with matrix 96×48, FOV=2×1 cm², inversion recovery time (TIR)=40 to 2,500, number of TIR values=22, recovery time=10,000 ms, TE/TR=10/18,000 ms. T2-WI, DWI and DSC-PWI were performed using the same set of 7 non-contiguous slices (slice thickness 0.7 mm and interslice gap 0.3 mm), covering the entire MCA territory, while PASL was performed using the central slice only.

Image analysis

MRI analysis was performed by an investigator blind to surgery, using MIPAV software (Medical Image Processing and Visualization, NIH, Bethesda, MD, USA;

<http://mipav.cit.nih.gov/>). Source images and maximum intensity projection for MRA were used to assess MCA occlusion. Apparent diffusion coefficient maps (ADC, in mm^2/s) were calculated from native DWI by fitting MR signal curves to a mono-exponential model function on a pixel-by-pixel basis, using in-house software written in Matlab 2009 (MathWorks, Natick, MA, USA). Contrast-agent-induced signal intensity changes from DSC-MRI images were converted into changes in the transverse relaxation rate $1/T2^*$ (i.e., $\Delta R2^*$) according to: $\Delta R2^* = -1/TE \cdot \ln[S(t)/S_0]$, where S_0 is the pre-contrast MR signal intensity and $S(t)$ the MR signal intensity at time t . Time-to-peak maps are commonly used in clinical settings to assess the hypoperfused area [9]; however, their low temporal resolution compared to bolus first-pass duration hampered their use in the present rodent study. Therefore, perfusion maps were generated with Matlab 2009 (MathWorks, Natick, MA, USA) using the peak of $\Delta R2^*$ -time curves, or maximum peak concentration (MPC, in a. u.) [10]. PASL images were analyzed with the ASL_Perfusion_Processing macro from the Paravision 5.1 software platform (Bruker, Ettlingen, Germany), using a 7T blood $T1$ value of 2,200ms [11]: cerebral blood flow (CBF, in $\text{ml}/[\text{min} \times 100\text{g}]$) was derived from the non-selective and selective $T1$ maps according to $\text{CBF} = \lambda \cdot T1_{\text{non-selective}} / T1_{\text{blood}} \cdot (1/T1_{\text{selective}} - 1/T1_{\text{non-selective}})$, where λ is the blood-brain partition coefficient: i.e., the ratio between water concentration per gram of brain tissue and per ml of blood, estimated at 90 ml/100g [12]. Whole-brain tissue, ipsilateral and contralateral hemispheres were manually drawn on $T2$ -weighted images and reported on computed maps. ADC maps were thresholded at the previously reported value of $0.53 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ [13]. MPC and CBF maps were thresholded at the 10th percentile value of perfusion in the contralateral hemisphere [14]. ADC, MPC and CBF defect volumes were calculated as the threshold volume in the ipsilateral hemisphere minus the threshold in the contralateral hemisphere. All lesion volumes were expressed as a percentage of the ipsilateral hemisphere volume.

Study design

Experiment 1: Acute characterization. Twenty mice underwent a single whole-brain imaging protocol ($T2$ -WI, DWI and DSC-PWI with gadolinium injection) immediately after stroke onset. They were euthanized 24 hours after ischemia induction. Coronal brain sections (20 μm) from snap-frozen brain tissue were stained with cresyl violet. Seven sections taken at equally spaced 1 mm intervals, corresponding to MRI slices, were selected and digitized.

Histological infarct volumes were manually delineated by an investigator blind to surgery and MRI analysis, and were expressed as a percentage of the ipsilateral hemisphere volume. Normalization to the entire ipsilateral hemisphere coped with tissue deformation of various sources (edema, fixation, histological processing) and enabled comparison between *in vivo* and *post mortem* data.

Experiment 2: Extended follow-up. Six mice underwent a 3-session MRI protocol to determine lesion evolution. The first session (T2-WI, DWI and PASL-PWI) was performed immediately after stroke onset and repeated after 3 hours. PASL-PWI was preferred to DSC-PWI so as not to repeat gadolinium injection. The third session (T2-WI) was performed after 24 hours, and animals were then sacrificed.

Statistical analysis

Data analysis was performed using SPSS software (Version 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), with the statistical significance threshold set at $P < 0.05$. All lesion volumes are reported as mean \pm standard deviation. Comparisons were performed with non-parametric Kruskal-Wallis tests. Mann–Whitney tests were used for *post hoc* paired comparisons. Correlations were determined by Spearman's rho.

Results

Experiment 1: Acute characterization

Twenty mice were operated. None of the animals displayed hemorrhagic signs on early MRI or on histology. MRA revealed no or incomplete occlusion in 2 animals, with visible signal in distal MCA branches. Minor perfusion defect (<10% of ipsilateral hemisphere) was present on MPC maps in 3 animals, including the 2 above-cited mice. These 3 animals showed no ADC-abnormal area and no histological infarct, and were excluded from subsequent volumetric analysis.

The remaining 17 mice demonstrated complete MCA occlusion (Fig. 1A), and extensive cortico-striatal hypoperfusion on MPC maps (Fig. 1B). Well-defined focal ADC lesions were observed in the cortex and the dorsal part of the striatum (Fig. 1D) in 13 animals, while ADC

lesions were virtually absent or restricted to the surgical site (<5% of ipsilateral hemisphere, Fig. 1C) in 4 animals. Figure 2 (full circles) shows the evolution of ischemic infarct between 0 hour (ADC map) and 24 hours (histology) for the 13 mice with significant initial lesion (>5% of ipsilateral hemisphere): 2 animals died within 2 hours of ischemia, 6 animals showed cortical ischemic infarct after 24 hours, and 5 animals showed virtually no lesion.

The 15 animals that completed the protocol can therefore be classified among 3 groups depending on the presence of a significant ischemic area at H0 and H24:

- i) 6 animals had both an ADC lesion at H0 and a histological lesion at H24 (group A);
- ii) 5 animals had an ADC lesion at H0 without a histological lesion at H24 (group B);
- iii) 4 animals had no ADC lesion at H0 and no histological lesion at H24 (group C).

Figure 3 summarizes initial MRI parameters in these groups. Regardless of initial or final ischemic area, the 3 groups shared similar MPC lesion volumes ($P=0.49$). Of those animals displaying initial infarct on ADC, group B tended to have lower ADC lesion volumes and higher mismatch volumes than group A, but these differences did not reach significance ($P=0.18$ and $P=0.06$ respectively).

Experiment 2: Extended follow-up

Six mice were operated. At 0 hour, all exhibited a significant perfusion defect visualized on CBF maps (Fig. 4A, 4C and Fig. 5). Four animals exhibited an ADC lesion at 0 hour. In 3 out of 4 cases, this lesion strongly regressed after 3 hours (mean \pm SD=-83 \pm 23% of H0 area), but extended between 3 and 24 hours (mean \pm SD=-35 \pm 25% of H0 area). At 24 hours, T2-WI highlighted an intra-cerebral hemorrhagic area around the surgical site in 1 animal. Two animals had no ischemic lesions at any time point. Hence, in accordance with the results of Experiment 1, T2-WI infarction volumes after 24 hours were smaller than initial ADC lesion volumes (Figure 2, open circles), with the notable exception of the case of hemorrhagic transformation.

The evolution of the CBF defect during the first 3 hours following stroke onset is represented in Figure 5. Five animals showed spontaneous decrease in hypoperfusion area during the 3 hours (mean \pm SD=-68 \pm 11% of initial hypoperfused area), as illustrated in Fig. 4A-B. Only one animal exhibited sustained hypoperfusion (-1%, Fig. 4C-D) during the 3 hours. This evolution

was not correlated with the development of infarction over time (Spearman correlation coefficients: between 0 and 3 hours, $P=0.20$; between 0 and 24 hours, $P=0.80$).

Discussion

We report the first MRI characterization of a mouse model of *in situ* MCA occlusion [1]. MRA and PWI confirmed successful clot formation in 85% of animals, a rate similar to previous reports [2]. No intra-cranial hemorrhage was detected on MRI or histology, except in 1 animal. Likewise, previous studies reported no [1] or only mild [2] hemorrhage in untreated animals.

The first experiment, with single acute MRI examination, identified 3 groups of animals (Fig. 3): one with the expected early MRI and late histological lesion (group A), one with an MRI lesion without histological lesion (group B), and one without significant MRI or histological lesion (group C). In group C, no ischemic lesion developed despite a hypoperfusion volume similar to the other groups. One possible interpretation is that hypoperfusion in these animals may lie just below the penumbra threshold, preventing ADC lesion development. This hypothesis is difficult to confirm in rodents, as it would require an arterial input function for absolute quantification of perfusion. Even in patients, there is no widely accepted perfusion-derived threshold identifying penumbral tissue [4]. Similarly, the differential outcome between groups A and B could not be explained by initial MRI parameters (diffusion, hypoperfusion and mismatch volumes), despite a tendency for smaller ADC lesion volumes and higher mismatch volumes (Fig. 3). Spontaneous reperfusion occurring after MRI follow-up (>60 min) in group B is the likely explanation.

To confirm this hypothesis, a second experiment was conducted, with a sequential MRI protocol involving PASL-PWI and DWI repeated at 0 and 3 hours. One third of the animals did not develop a lesion, a proportion in the same range as in the first experiment. Drastic decrease in hypoperfusion volume ($-68\pm 11\%$ of initial hypoperfusion) occurred during the first 3 hours following stroke onset in 80% of animals. This was accompanied by a transient regression of the ADC lesion. Spontaneous reperfusion thus contributed to the variability of ischemic lesion size in this model. Ischemia induction was performed according to the

original description by Orset et al. [1], by injection of 0.75 U murine α -thrombin. Future studies could include higher doses of thrombin so as to induce more stable occlusion and, hopefully, a more reproducible infarct. Interestingly, implementation of the thrombin injection technique in macaques also resulted in frequently delayed reperfusion, despite a higher dose (800 U for 10kg) [15].

Initial angiography was performed to determine surgical success. The angiographic signal was disturbed by extra-cranial micro-hemorrhages at the surgical site; however detection of unsuccessful occlusion relies on the visualization of small distal MCA branches, and is therefore very sensitive to image quality. Consequently, angiography proved to be of limited interest for identifying unsuccessful occlusion in this model. In contrast, PWI highlighted major and reproducible hemodynamic alterations in MCA territory which objectified successful occlusion (Fig. 1B and Fig. 3).

In conclusion, our main finding was a significant rate of spontaneous reperfusion in the first hours after the formation of a stable clot and subsequent MCA occlusion. This suggests, as in human stroke, differential evolution of the clot. This model appears invaluable for the evaluation of alternative thrombolytic therapies or neuroprotective drugs, provided that extended monitoring of reperfusion is performed to minimize variability.

Acknowledgments

Imaging experiments were performed on the “Animage” platform of CERMEP-Imagerie du Vivant, Lyon, France. The authors wish to thank Chantal Watrin (Lyon Neuroscience Research Center, ONCOFLAM team) for help with histology.

Disclosure

All authors report no disclosure.

References

1. Orset C, Macrez R, Young AR, Panthou D, Angles-Cano E, et al. (2007) Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 38: 2771–2778.
2. Garcia-Yebenes I, Sobrado M, Zarruk JG, Castellanos M, Perez de la Ossa N, et al. (2011) A mouse model of hemorrhagic transformation by delayed tissue plasminogen activator administration after in situ thromboembolic stroke. *Stroke* 42: 196–203.
3. Macrez R, Obiang P, Gauberti M, Roussel B, Baron A, et al. (2011) Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-d-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke* 42: 2315–2322.
4. Donnan GA, Baron JC, Ma H, Davis SM (2009) Penumbra selection of patients for trials of acute stroke therapy. *Lancet Neurol* 8: 261–269.
5. Legos JJ, Lenhard SC, Haimbach RE, Schaeffer TR, Bentley RG, et al. (2008) SB 234551 selective ET(A) receptor antagonism: perfusion/diffusion MRI used to define treatable stroke model, time to treatment and mechanism of protection. *Exp Neurol* 212: 53–62.
6. Chauveau F, Cho T-H, Perez M, Guichardant M, Riou A, et al. (2011) Brain-targeting form of docosahexaenoic acid for experimental stroke treatment: MRI evaluation and anti-oxidant impact. *Curr Neurovasc Res* 8: 95–102.
7. Cho T-H, Aguetaz P, Campuzano Larrea O, Charriaut-Marlangue C, Riou A, et al. (2012) Pre- and post-treatment with cyclosporine A in a rat model of transient focal cerebral ischaemia with multimodal MRI screening. *Int J Stroke*. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22882746>. Accessed 22 August 2012.
8. Marinescu M, Chauveau F, Durand A, Riou A, Cho T-H, et al. (2012) Monitoring therapeutic effects in experimental stroke by serial USPIO-enhanced MRI. *Eur Radiol* Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22833303>. Accessed 22 August 2012.

9. Zaro-Weber O, Moeller-Hartmann W, Heis WD, Sobesky J (2010) MRI Perfusion Maps in Acute Stroke Validated With ¹⁵O-Water Positron Emission Tomography. *Stroke* 41: 443–449.
10. Calamante F, Ganesan V, Kirkham FJ, Jan W, Chong WK, et al. (2001) MR perfusion imaging in Moyamoya Syndrome: potential implications for clinical evaluation of occlusive cerebrovascular disease. *Stroke* 32: 2810–2816.
11. Dobre MC, Uğurbil K, Marjanska M (2007) Determination of blood longitudinal relaxation time (T₁) at high magnetic field strengths. *Magn Reson Imaging* 25: 733–735.
12. Herscovitch P, Raichle ME (1985) What is the correct value for the brain--blood partition coefficient for water? *J Cereb Blood Flow Metab* 5: 65–69.
13. Meng X, Fisher M, Shen Q, Sotak CH, Duong TQ (2004) Characterizing the diffusion/perfusion mismatch in experimental focal cerebral ischemia. *Ann Neurol* 55: 207–212.
14. Campbell BC, Christensen S, Butcher KS, Gordon I, Parsons MW, et al. (n.d.) Regional very low cerebral blood volume predicts hemorrhagic transformation better than diffusion-weighted imaging volume and thresholded apparent diffusion coefficient in acute ischemic stroke. *Stroke* 41: 82–88.
15. Gauberti M, Obiang P, Guedin P, Balossier A, Gakuba C, et al. (2012) Thrombotic Stroke in the Anesthetized Monkey (*Macaca mulatta*): Characterization by MRI - A Pilot Study. *Cerebrovasc Dis* 33: 329–339.

Figure 1

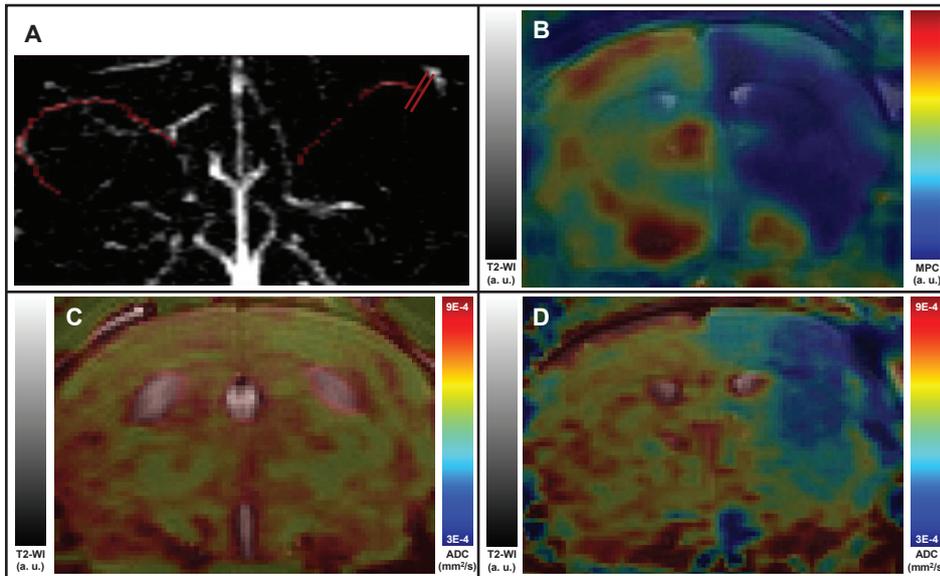


Figure 1. Acute multi-slice, multiparametric MRI of thromboembolic stroke in mice. **(A)** MR Angiography (maximum intensity projection). MCA signals were manually overlaid in red for clarity. Note the distally interrupted flow in the right MCA (bars). **(B)** Perfusion (MPC) map overlaid on corresponding T2-WI. Note the large perfusion defect in the right MCA territory (arrow) **(C, D)** Diffusion (ADC) maps overlaid on corresponding T2-WI. Note the cortico-striatal decrease in **D** (same animal as **B**), in contrast with **C**.

Figure 2

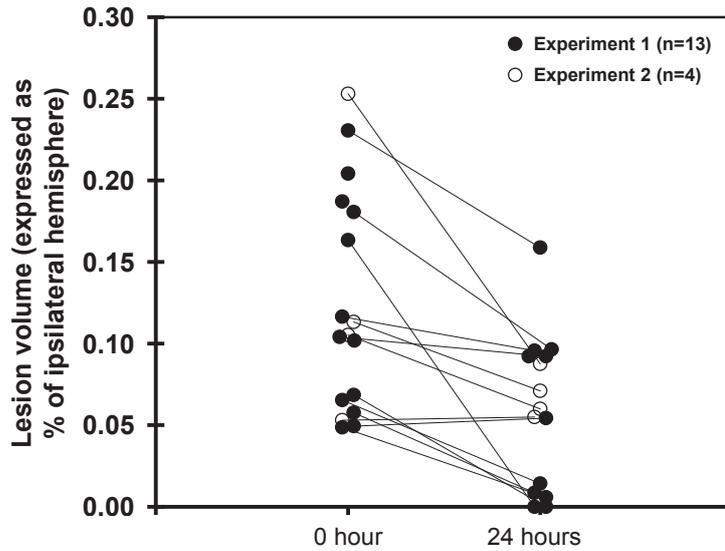


Figure 2. Pooled data from Experiment 1 (n=13, full circles) and Experiment 2 (n=4, open circles). Evolution of lesion volume (expressed as % of ipsilateral hemisphere) between 0 hour (ADC map) and 24 hours (histology in Experiment 1; T2-WI in Experiment 2). Only animals displaying a significant basal lesion beyond surgical site on ADC (i.e., lesion >5% of ipsilateral hemisphere) were considered. Two animals from Experiment 1 died shortly after MRI completion (no histological staining).

Figure 3

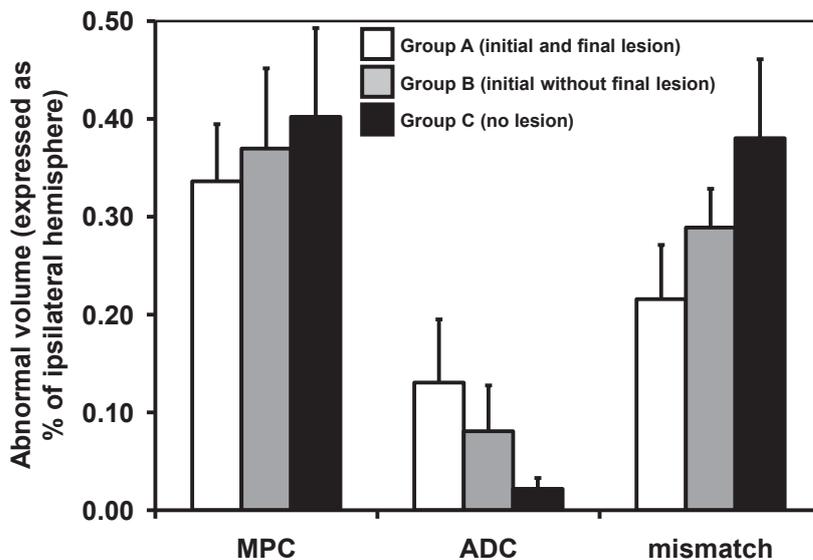


Figure 3. Quantification (mean±standard deviation) of initial MRI defects in Experiment 1 (n=15): diffusion (ADC map), perfusion (MPC map) and perfusion-diffusion mismatch volumes, expressed as % of ipsilateral hemisphere. Mice were grouped according to presence/absence of ischemic lesion on initial DWI and final histology. Group A (white bars, n=6) = initial and final lesion; group B (gray bars, n=5) = initial without final lesion; group C (black bars, n=4) = neither initial nor final lesion (i.e., lesion <5% of ipsilateral hemisphere, confined to the surgical site).

Figure 4

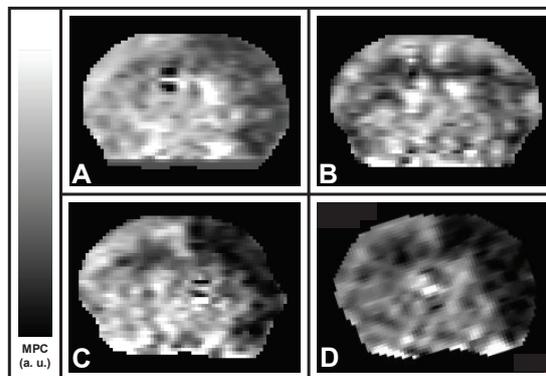


Figure 4. Single-slice perfusion (PASL) follow-up between 0 and 3 hours of thromboembolic stroke in mice. (A) CBF at 0 hour and (B) CBF after 3 hours in an animal with spontaneous reperfusion. (C) CBF at 0 hour and (D) CBF after 3 hours in an animal without reperfusion.

Figure 5

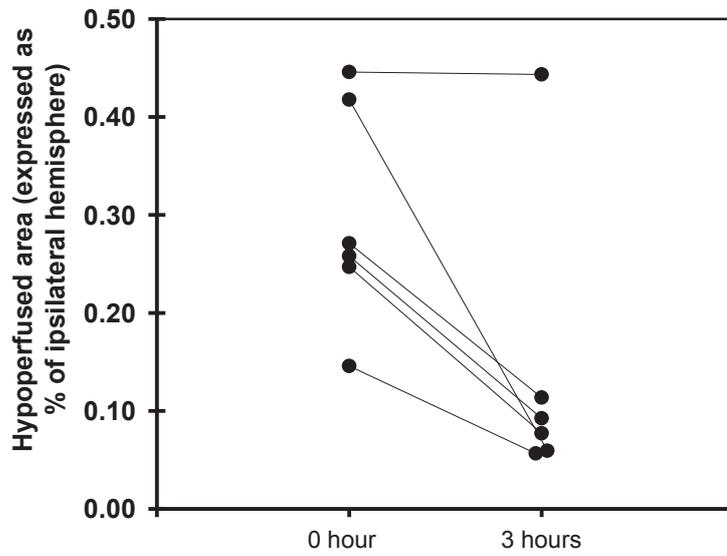


Figure 5. Evolution of hypoperfusion areas (expressed as % of ipsilateral hemisphere) between 0 and 3 hours in Experiment 2 (n=6). CBF maps were thresholded at the 10th percentile value of perfusion in the contralateral hemisphere.

Etude 2 : Effet d'un inhibiteur du TAFI sélectif combiné à des doses plus faibles de rt-PA dans un modèle murin thromboembolique.

Contexte et état de la question

Lors de la première étude, nous avons caractérisé le modèle thromboembolique murin décrit par Orset permettant une étude thérapeutique sur un modèle proche de la physiopathologie humaine d'ischémie cérébrale [133].

L'inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine (TAFI), également désigné procarboxypeptidase B2 ou U procarboxypeptidase, est une enzyme sécrétée par le foie qui régule négativement la fibrinolyse lorsqu'elle est activée par la thrombine. Synthétisé dans le foie, il circule dans le plasma dans sa forme proenzyme. Lorsqu'il est activé, le TAFI clive les résidus lysine de la fibrine, ce qui empêche l'activation du plasminogène et retarde la lyse d'un caillot de fibrine. Le TAFI-inhibiteur agit donc comme un fibrinolytique.

Au cours d'un partenariat avec SANOFI research, nous avons proposé une étude permettant de tester l'efficacité d'un TAFI inhibiteur, seul, ou en association avec des doses plus faibles de rt-PA.

Les objectifs de cette étude sont :

- de tester l'efficacité fibrinolytique du TAFI inhibiteur seul ou en combinaison à la phase précoce de l'ischémie cérébrale dans le but d'obtenir un résultat thérapeutique au moins aussi efficace que le traitement de référence, en limitant les risques de complication notamment l'hémorragie cérébrale.

- d'évaluer la reperfusion cérébrale par IRM

Les différents endpoints de cette étude sont l'efficacité de la reperfusion à 3H post occlusion et l'évolution des volumes lésionnels pendant 24 heures d'une part et les événements hémorragiques à 3H et 24H d'autre part.

Cinq groupes de traitements ont été comparés : NaCl, rt-PA 5mg/kg (faible dose), rt-PA 10mg/kg (dose de référence), TAFI inhibiteur seul, TAFI inhibiteur + rt-PA 5mg/kg.

Principaux résultats :

Cette étude permet de confirmer l'efficacité du traitement de référence rt-PA 10mg/kg en comparaison des groupes contrôles en terme de régression de la taille lésionnelle finale. Le traitement par des doses plus faibles de rt-PA seul, et le traitement avec le TAFI I seul n'améliore pas la régression des lésions.

L'association du TAFI inhibiteur avec des doses plus faibles de rt-PA tend vers la même efficacité sur la régression des lésions que le rt-PA à 10mg/kg, même si les résultats ne sont pas significativement positifs.

Aucune conclusion n'a pu être effectuée sur la reperfusion cérébrale en fonction des différents traitements.

La survenue des évènements hémorragique est indépendante des groupes de traitements.

Le modèle thromboembolique que nous avons étudié présente un intérêt particulier pour évaluer les stratégies thérapeutiques de combinaison avec le rt-PA pour améliorer la thrombolyse, surtout lorsqu'il est évalué longitudinalement avec l'imagerie de résonance magnétique (IRM).

Effects of a TAFI-Inhibitor combined with sub-optimal dose of rtPA in a murine thromboembolic model of stroke

Anne Durand (1), Fabien Chauveau (1), Tae-Hee Cho (1), Christopher Kallus (2), Michael Wagner (2), Florent Boutitie (3), Delphine Maucort-Boulch (3) , Marlène Wiart (1), Yves Berthezène (1), Norbert Nighoghossian (1)

(1) CREATIS, CNRS UMR5220, INSERM U1044, INSA de Lyon, Université de Lyon, Lyon 1, (2) Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Industriepark Höchst, Building G838, Frankfurt, Germany, (3) Service de Biostatistiques des Hospices Civils de Lyon, UMR CNRS 5558, Biométrie et Biologie Evolutive, Centre Hospitalier Lyon Sud.

Corresponding author: Norbert NIGHOGHOSSIAN

Hôpital Neuro-Cardiologique, Service de Neurologie B
28 Avenue de Doyen Lepine
69677 Bron Cedex France
Tel 33 4 72 35 78 10
Fax 33 4 72 68 49 16
E-mail norbert.nighoghossian@chu-lyon.fr

Article type: Research Article

Abstract

The present study compared efficacy between TAFI inhibition alone and TAFI inhibition in combination with low-dose rtPA, in a murine model of thromboembolic stroke. Animals were randomly assigned to 1 of 5 treatment groups: saline, rtPA at the standard dose for this model (10 mg/kg), rtPA at sub-optimal dose (5 mg/kg), TAFI-Inhibitor (TAFI-I) alone, or TAFI-I combined with low-dose rtPA. Early reperfusion and final infarct size were longitudinally assessed by magnetic resonance imaging (perfusion-, diffusion- and T2-weighted MRI) immediately (H0), 3 hours (H3) and 24 hours after surgery (H24). All investigators were blinded to treatment allocation. As expected, standard-dose rtPA treatment (tPA¹⁰) significantly improved lesion regression between H0 and H24 compared to saline (-57±18% vs. -36±21%, p=0.03), which treatment with low-dose rtPA or TAFI-I alone did not. On the other hand, combined treatment with tPA⁵ + TAFI-I showed a trend toward lesion regression (-56±15%), similarly to tPA¹⁰, but without the difference to saline reaching significance. In conclusion, the present study showed that the combination of TAFI-I with low-dose rtPA is not as effective as the standard dose of rtPA, while TAFI inhibition alone is not effective at all. The present thromboembolic model is of particular interest in assessing strategies rtPA association to improve thrombolysis, especially when coupled with longitudinal MRI assessment.

Word count: 211

Key words: embolic stroke, thrombin, recombinant tissue plasminogen activator (rtPA), thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), combined therapy, magnetic resonance imaging (MRI)

Introduction

Several randomized controlled trials (NINDS, ECASSII, ECASSIII) [75,212,213] have demonstrated the benefit of recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) treatment in stroke. However, intracerebral hemorrhage is an especially feared side-effect of rtPA [103], and dose-finding studies have suggested that the higher the dose, the greater the risk of hemorrhage [214,215]. In this context, the search for thrombolytic therapies providing the same efficacy with lower risk is a critical issue for therapeutic strategy.

Endogenous resistance to tissue-type plasminogen activator (tPA) may decrease the benefit of thrombolysis-induced recanalization [216]. This resistance may be due in part to thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI). TAFI removes residues from partially degraded fibrin, which eliminates plasminogen binding sites and thus inhibits plasminogen activation. Enhancement of fibrinolysis is a promising approach in thrombotic disease [217], and a combination of a sub-optimal dose of rtPA and TAFI-Inhibitor has been shown to increase fibrinolytic activity in a lung model [94].

A new rodent model of thromboembolic stroke, consisting in *in situ* microinjection of thrombin in the middle cerebral artery (MCA), has recently been described [133]. The natural evolution of this model (without intervention) has been characterized on MRI, with the main finding that a significant rate of spontaneous reperfusion occurred in the first hours after the formation of a stable clot [135]. In this model, intravenous injection of rtPA at a dose of 10 mg/kg 20 to 30 minutes after surgery mimics thrombolysis treatment in the clinical setting, with cerebral blood flow (as measured by laser Doppler flowmetry) returning to baseline 30 to 60 minutes after the beginning of treatment [127,133,134,136].

The present study sought to evaluate the efficacy of TAFI inhibition alone (using the TAFI inhibitor FFC.HTZ4.059 from Sanofi (Germany)) and of TAFI inhibition combined with a

sub-optimal dose of rtPA (5 mg/kg), in this murine model of thromboembolic stroke. The lack of translational success in stroke treatment trials has led the community to develop a framework to improve the quality of preclinical stroke studies [218]. The present experiments were therefore conducted in compliance with the STAIR guidelines, using non-invasive MRI follow-up. Control groups comprised treatment with saline, with low-dose rtPA (5 mg/kg) and with standard-dose rtPA (10 mg/kg).

Materials and Methods

Animals

Animal investigations were conducted in conformity with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the European Union (EEC Council Directive 86/609) and the French regulation (D2001-486) regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Protocol approval was granted by our University ethics review board (CeLyne: *Comité d'Ethique Lyonnais pour les Neurosciences Expérimentales*). Adult male Swiss mice (25-30g, Janvier, France) were used. Animals were housed under standard conditions with a 12h light/dark cycle and allowed access to food and water *ad libitum*.

Overall protocol

In brief, focal ischemia was induced using the thromboembolic model by *in situ* thrombin injection. Successfully operated animals were randomly assigned to 1 of 5 treatment groups: saline, rtPA 5 mg/kg (tPA⁵: sub-optimal or low dose), rtPA 10 mg/kg (tPA¹⁰: standard dose), TAFI-I 100 mg/kg (TAFI-I), and rtPA 5mg/kg + TAFI-I 100 mg/kg (tPA⁵+ TAFI-I). Animals were placed in the magnet immediately after surgery for baseline MRI (H0). MRI examination comprised diffusion-weighted imaging (DWI) and perfusion-weighted imaging (PWI) and T2-weighted imaging (T2-WI) (total examination time: 30 minutes).

Exclusion criteria were:

- No DWI and/or PWI lesion on H0 MRI;

- No PWI/DWI mismatch on H0 MRI, with mismatch defined as a lesion volume ratio $PWI/DWI > 110\%$ [38];
- Animal death within 30 minutes of stroke onset;
- Animals with incomplete longitudinal data sets.

Treatments were given inside the magnet, via a catheter placed in the tail vein, using a power injector, as 10% bolus and 90% infusion over a period of 20 minutes. MRI examination was repeated at 3 hours (H3) and 24 hours (H24) after surgery. Therapeutic benefit was evaluated by: 1) improvement of reperfusion and 2) reduction in final lesion size. Micro-hemorrhages were assessed as black spots on T2-WI at H24. Animals were sacrificed after the last MR examination. The surgeon and all investigators were blinded to treatment allocation.

Induction of focal cerebral ischemia

Mice were anesthetized with 1-2% isoflurane in ambient air. A catheter was inserted into the tail vein for intravenous administration. Rectal temperature was kept at $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ throughout the surgical procedure, using a feedback-regulated heating pad. Surgery was conducted as previously described [133]. Briefly, craniotomy was performed between the right eye and right ear to expose the MCA. After excision of the dura, one microliter of purified murine alpha-thrombin (0.75 IU) was pneumatically injected into the MCA lumen. *In situ* clot formation was monitored visually.

Treatment

The TAFI-Inhibitor FFC.HTZ4.059 was synthesized by Sanofi (*Germany*). FFC.HTZ4.059 is a highly potent TAFI inhibitor (TAFI-I) displaying an IC_{50} of 2nM as well as diluted human or murine plasma. It is selective against many other proteases including some major players in the coagulation cascade (-5% to 5% inhibition at $100\mu\text{M}$ for tPA, urokinase, plasmin, tryptase, trypsin, h-chymotrypsin, (plasma) kallikrein, C1s, APC, FXa, FVIIa, FIIa, FIXa,

FXIa and FXIIa) and against 108 targets in a large selectivity panel (CEREP, no hits at 10 μ M). It does not affect platelet aggregation up to 100 μ M in human platelet-rich plasma.

TAFI-I and rtPA (Actilyse, Boehringer Ingelheim, Germany) were stored desiccated in amber vials in a refrigerator. Treatments were solubilized in saline (pH 8). Solutions were freshly made for each experiment. The FFC.HTZ4.059 dose (100 mg/kg) was defined by the sponsor based on data obtained from *in vitro* clot lysis assays in mice and human plasma in presence of different rtPA concentrations, conducted with a TAFI-I with comparable pharmacological profile, in order to determine the optimal ratio between rtPA and TAFI-I doses to be used in murine models (unpublished data). Two rtPA doses were tested: the standard dose for this model (10 mg/kg [11]) and a sub-optimal dose (5 mg/kg), alone or in combination with TAFI-I.

MR imaging

MRI experiments were performed using a Bruker Biospec 7T/12 cm horizontal magnet equipped with Paravision 5.1. A birdcage head-coil of 72-mm inner diameter was used for RF transmission and a 15-mm diameter surface coil for reception. The animal was placed in a non-magnetic holder equipped with a nose-cone for administration of anesthetic gas (1.5% isoflurane), stereotaxic ear bars, an integrated water-heating system to maintain body temperature at 37 \pm 1 $^{\circ}$ C, and a pressure probe to monitor respiration. MR examination comprised:

- T2-weighted images (T2-WI), acquired using a RARE sequence with matrix=256 \times 128, FOV=2 \times 1 cm², TE/TR=20/3500 ms, and RARE factor 4;
- Diffusion-Weighted echo-planar spin-echo images (DWI), acquired using the same FOV, with matrix=128 \times 64, TE/TR=19/5000 ms and 7 b-values of 0, 100, 200, 300, 500, 800 and 1,000 s/mm²;

- Perfusion-weighted imaging (PWI), using single-slice pulsed arterial spin labeling (PASL) as an alternative perfusion method not requiring injection of contrast agent. PASL was performed using a flow-sensitive alternating inversion-recovery echo-planar imaging (FAIR-EPI) sequence with matrix=96x48, FOV=2×1 cm², inversion recovery time (TIR)=40 to 2,500, number of TIR values=22, recovery time=10,000 ms, and TE/TR=10/18,000 ms. T2-WI and DWI acquisitions were performed using the same set of 15 contiguous slices (slice thickness, 0.8 mm), covering the entire MCA territory, while PASL was performed using the central slice only, for technical reasons.

MR image analysis

Apparent diffusion coefficient maps (ADC, in mm²/s) were calculated by fitting MR signal curves to a monoexponential model function on a pixel-by-pixel basis, using in-house software written in Matlab 2009 (MathWorks, Natick, MA, USA).

PASL images were analyzed with the ASL_Perfusion_Processing macro from the Paravision 5.1 software platform (Bruker, Ettlingen, Germany), using a blood T1 value of 2,200 ms [11]. Cerebral blood flow (CBF, in ml/min/100 g) was derived from the non-selective and selective T1 maps according to:

$$CBF = \lambda \cdot T1_{\text{non-selective}} / T1_{\text{blood}} \cdot (1/T1_{\text{selective}} - 1/T1_{\text{non-selective}})$$
, where λ is the blood-brain coefficient, estimated at 90 ml/100 g.

DWI, PWI and final lesions were outlined manually on ADC and CBF maps respectively, and T2-WI with MIPAV software (Medical Image Processing and Visualization, NIH, Bethesda, MD, USA; <http://mipav.cit.nih.gov/>). Perfusion lesion regression between H0 and H3 was evaluated as: $\Delta V_{\text{CBF}}(\%) = [PWI(H3) - PWI(H0)] / PWI(H0)$. Reperfusion was defined as a 50% reduction in perfusion lesion volume between H0 and H3 [219]. Ischemic lesion regression between H0 and H24 was evaluated as:

$$\Delta V_{\text{T2-ADC}}(\%) = [T2(H24) - DWI(H0)] / DWI(H0)$$
.

Statistical analysis

Analyses were performed on SAS software 9.2 for Windows. The number of animals to be included in each group was based on a power analysis assuming an effect size of 1.5 (difference of 1.5 standard deviations between the negative and positive control groups) and setting α at 5% and $1-\beta$ at 80% (statistical power), for the non-parametric Wilcoxon test. Lesion volumes were collected as continuous variables. For each arm, data were described using means, standard deviations, medians, quartiles and ranges. Baseline DWI and PWI lesions in the 5 arms were compared using the non-parametric Kruskal-Wallis test (one-way analysis of variance). The non-parametric Wilcoxon test was used for all other comparisons.

Results

A total of 104 mice were successfully operated on between January and July 2013. Of these, 44 were excluded: 26 did not show a ADC lesion, 1 did not show a CBF lesion, 11 died within 30 minutes of stroke onset, and 6 had technical failure (catheter problems). A total of 60 mice (12 per treatment group) were thus included. Of these, 27 were excluded from analysis because they did not have a complete longitudinal data set (N=5) or did not fulfill the mismatch criteria (PWI/DWI>110% [38]) (N=22). Analysis was therefore performed on the following samples: saline (n=6), tPA⁵ (n=8), tPA¹⁰ (n=7), TAFI-I (n=7), and TAFI-I+tPA⁵ (n=5).

Figure 1 shows a longitudinal multiparametric MR exam for one animal. Well-defined focal DWI and PWI lesions were observed in the cortex and the dorsal part of the striatum. Final infarct appeared as hyperintense areas on follow-up (H24) T2-weighted images.

There were no significant differences in baseline DWI and PWI volumes between treatment groups (Table 1).

Figure 2 shows perfusion lesion regression between H0 and H3 in each treatment group. All animals showed regression. Reperfusion (defined as >50% lesion regression) was observed in

30% of animals treated with saline and in 28% of animals treated with either TAFI-I or tPA⁵. In contrast, 57% of animals treated with tPA¹⁰ and 60% of animals treated with TAFI-I + tPA⁵ showed reperfusion. Despite a trend toward greater lesion regression in the groups treated with tPA¹⁰ (-56±32%) and with tPA⁵ + TAFI-I (-51±29%), no significant difference to the group treated with saline (-37±24%) was demonstrated.

Figure 3 shows ischemic lesion regression between H0 (DWI lesion) and H24 (T2-WI lesion) in each treatment group. As expected, treatment with standard-dose rtPA (tPA¹⁰) significantly improved lesion regression between H0 and H24 compared to treatment with saline (p=0.03), and also to low-dose rtPA (tPA⁵) (p=0.02), which, in turn, did not differ from the saline group. Treatment with TAFI-I alone did not improve lesion regression compared to saline (p=0.56). On the other hand, treatment with tPA⁵ + TAFI-I showed a trend toward lesion regression (-56±15%) similarly to treatment with tPA¹⁰ (-57±18%), without the difference to treatment with saline (-36±21%) reaching significance (p=0.46).

Nine animals showed microhemorrhage on T2-WI at H24. These animals were evenly distributed between groups (saline, n=3; tPA⁵, n=2; tPA¹⁰, n=0; TAFI-I, n=1; tPA⁵+ TAFI-I, n=3).

Discussion

Since thrombolysis remains the only approved intervention for ischemic stroke, improving its efficacy and safety is a therapeutic aim of considerable interest. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) was discovered two decades ago, following the identification of an unstable carboxypeptidase formed upon thrombin activation of its proenzyme. The antifibrinolytic effects of the activated form are linked with its capacity to remove C-terminal lysine from the surface of the fibrin clot. Inhibition of TAFI might thus favor recanalization. The present study shows that inhibition of TAFI alone by FFC.HTZ4.059 was not sufficient to reduce final lesion size compared to treatment with saline, in a murine thromboembolic

model of stroke. Combination of TAFI inhibitor with a sub-optimal dose of rtPA appeared more effective than TAFI inhibitor alone or sub-optimal dose rtPA alone, suggesting a possible synergistic effect between the two drugs. However, the heterogeneity of responses to the drug combination prevented a significant improvement in outcome being demonstrated. This was not due to the protocol design, as treatment with the standard dose of rtPA (10 mg/kg) had the expected clear impact on lesion size reduction compared to treatment with saline.

As DWI/PWI mismatch is increasingly used to define the eligibility of stroke patients for thrombolysis, MRI measures are becoming an important component of translational research. Performing MRI during occlusion allowed rigorous selection of animals showing penumbra, thus ensuring that ischemic lesion regression at H24 was due to treatment and not to failure of the animal model. The rate of spontaneous reperfusion at H3 was elevated (one third of animals), in agreement with previous findings [135]. To our knowledge, the present study is the first to report early reperfusion following thrombolytic therapy in this mouse model. Although an overall impression emerged that tPA¹⁰ actually improved reperfusion (in terms of both rate and lesion regression), we were not able to demonstrate a significant difference compared to saline. This might be explained in part by the fact that the perfusion deficit was assessed from a single slice, due to the technical limitations of PASL. This slice was positioned at the center of the lesion; however, global evaluation of perfusion lesion regression might prove more sensitive. Refinement of MR sequences will help overcome this limitation in the future.

Limitations

The present study had several limitations. Firstly, the thrombin used for generating emboli is known to activate TAFI, platelets and PAI-1 in circulation. Thus this thrombin-clot model might not closely mimic the clinical situation. However, since all animals received the same

alpha thrombin concentration, this can be considered as a bias of the study, and should in fact have favored the group that received TAFI-I (alone or in combination with rtPA), which was obviously not the case. Nevertheless, a clot injection model might be an interesting alternative for testing TAFI inhibition, although it shows high variability and mortality [220].

Secondly, we did not evaluate functional outcome, although this represents one desirable endpoint in complement to final lesion size, according to the STAIR criteria. The thromboembolic model used in the current study is based on distal MCA occlusion and therefore produces cortical injury with small infarction volume, which does not induce consistent functional deficits. Therefore this model should be reserved for clot-related mechanisms which other stroke models cannot address [120]. In the literature, various strategies for assessing neurological deficit have been described (use of an activity box to monitor locomotor activity [133] or extended behavioral testing [134,136]), and we intended to perform functional testing in a second experiment, including only groups with positive findings versus the saline group. Since the effects on final lesion size were modest, we finally did not pursue this objective.

Thirdly, our results with the sub-optimal dose of rtPA are in contradiction with those reported by El Amki et al., who reported a dose as low as 0.9 mg/kg, when administered early, to be as effective in terms of infarct volume reduction as the standard “rodent” dose of 10 mg/kg [134]. However, neither the extent of the initial perfusion defect, nor the initial size of the lesion was measured in their study. The variability of the model, as well as differences in experimental procedure can account for these conflicting results. Further investigations should be conducted in order to better understand the dose-effect relationship in this model.

Conclusion

Improving thrombolysis therapy by recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) in acute ischemic stroke remains a challenge. Adjunctive antithrombotic agents, such as inhibitors of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), may enhance the efficacy of rtPA. In the present study, combination of TAFI-I in combination with a low dose of rtPA was not as effective as the standard dose of rtPA in terms of final lesion size reduction, while TAFI inhibition alone was not effective at all. Despite its limitations, the murine model of thromboembolic stroke based on *in situ* thrombin injection is of particular interest for assessing rtPA association strategies to improve thrombolysis, especially when coupled with longitudinal MRI assessment.

Acknowledgments

We thank Isabelle Paty from Sanofi for her confidence, fruitful scientific discussions and excellent technical support. We would like to thank Radu Bolbos and Jean-Baptiste Langlois for MRI support at the “Animage” platform of the *Centre d’Exploration et de Recherche Médicale par Emission de Positons (CERMEP) - Imagerie du Vivant*, Lyon, France.

REFERENCES

1. (1995) National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 333: 1581–1587.
2. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, et al. (1998) Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet* 352: 1245-1251.
3. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, et al. (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359: 1317-1329.
4. Derex L, Nighoghossian N (2008) Intracerebral haemorrhage after thrombolysis for acute ischaemic stroke: an update. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79: 1093-1099.
5. Toyoda K, Koga M, Naganuma M, Shiokawa Y, Nakagawara J, et al. (2009) Routine use of intravenous low-dose recombinant tissue plasminogen activator in Japanese patients: general outcomes and prognostic factors from the SAMURAI register. *Stroke* 40: 3591-3595.
6. Levy DE, Brott TG, Haley EC, Jr., Marler JR, Sheppard GL, et al. (1994) Factors related to intracranial hematoma formation in patients receiving tissue-type plasminogen activator for acute ischemic stroke. *Stroke* 25: 291-297.
7. Fernandez-Cadenas I, Alvarez-Sabin J, Ribo M, Rubiera M, Mendioroz M, et al. (2007) Influence of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms on tissue-type plasminogen activator-induced recanalization in ischemic stroke patients. *J Thromb Haemost* 5: 1862-1868.
8. Khatri P, Mono ML (2013) Combining antithrombotic and fibrinolytic agents: can it be done? *Stroke* 44: 1489-1491.
9. Vercauteren E, Emmerechts J, Peeters M, Hoylaerts MF, Declerck PJ, et al. (2013) Evaluation of the profibrinolytic properties of an anti-TAFI monoclonal antibody in a mouse thromboembolism model. *Blood* 117: 4615-4622.
10. Orset C, Macrez R, Young AR, Panthou D, Angles-Cano E, et al. (2007) Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 38: 2771-2778.
11. Durand A, Chauveau F, Cho TH, Bolbos R, Langlois JB, et al. (2012) Spontaneous reperfusion after in situ thromboembolic stroke in mice. *PLoS One* 7: e50083.
12. Garcia-Yebenes I, Sobrado M, Zarruk JG, Castellanos M, Perez de la Ossa N, et al. (2011) A mouse model of hemorrhagic transformation by delayed tissue plasminogen activator administration after in situ thromboembolic stroke. *Stroke* 42: 196-203.
13. El Amki M, Lerouet D, Coqueran B, Curis E, Orset C, et al. (2012) Experimental modeling of recombinant tissue plasminogen activator effects after ischemic stroke. *Exp Neurol* 238: 138-144.
14. Campos F, Qin T, Castillo J, Seo JH, Arai K, et al. (2013) Fingolimod reduces hemorrhagic transformation associated with delayed tissue plasminogen activator treatment in a mouse thromboembolic model. *Stroke* 44: 505-511.
15. Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, et al. (2009) Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke* 40: 2244-2250.
16. Albers GW, Thijs VN, Wechsler L, Kemp S, Schlaug G, et al. (2006) Magnetic resonance imaging profiles predict clinical response to early reperfusion: the diffusion and perfusion imaging evaluation for understanding stroke evolution (DEFUSE) study. *Ann Neurol* 60: 508-517.
17. Hermitte L, Cho TH, Ozenne B, Nighoghossian N, Mikkelsen IK, et al. (2013) Very low cerebral blood volume predicts parenchymal hematoma in acute ischemic stroke. *Stroke* 44: 2318-2320.
18. Carmichael ST (2005) Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2: 396-409.

19. Liu S, Zhen G, Meloni BP, Campbell K, Winn HR (2009) Rodent Stroke Model Guidelines for Preclinical Stroke Trials (1st Edition). J Exp Stroke Transl Med 2: 2-27.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Multiparametric MRI exam. A, B and C (Hour 0 (H0)), and D, E, F (Hour 3) (H3)): Multiparametric MRI of thromboembolic stroke in a mouse. A, B, C correspond to MRI at H0 (A: DWI, B: PWI ASL, C: T2 WI). D, E and F correspond to MRI at H3 (D: DWI, E: PWI ASL, F: T2 WI), (same slice).

Figure 2. Regression of perfusion lesion between H0 and H3 according to treatment group. Boxes represent the interquartile range (horizontal line = median; diamond = mean), and whiskers extend to extreme values.

Figure 3. Regression of ischemic lesion between H0 and H24 according to treatment group. Boxes represent the interquartile range (horizontal line = median; diamond = mean), and whiskers extend to extreme values. Statistical differences are found for tPA¹⁰ compared to saline (p=0.03) and tPA⁵ (p=0.02) (* representing statistical difference between tPA¹⁰ and saline, tPA⁵).

Table 1- Baseline MRI data (lesion volumes in mm³)

Treatment group	DWI (all slices)	DWI (central slice)	PWI (central slice)
Saline	24±10	7±2	10±1
tPA ⁵	26±10	6±1	9±2
tPA ¹⁰	28±9	6±2	12±2
TAFI-I	25±11	6±1	10±3
tPA ⁵ + TAFI-I	30±9	6±1	11±2

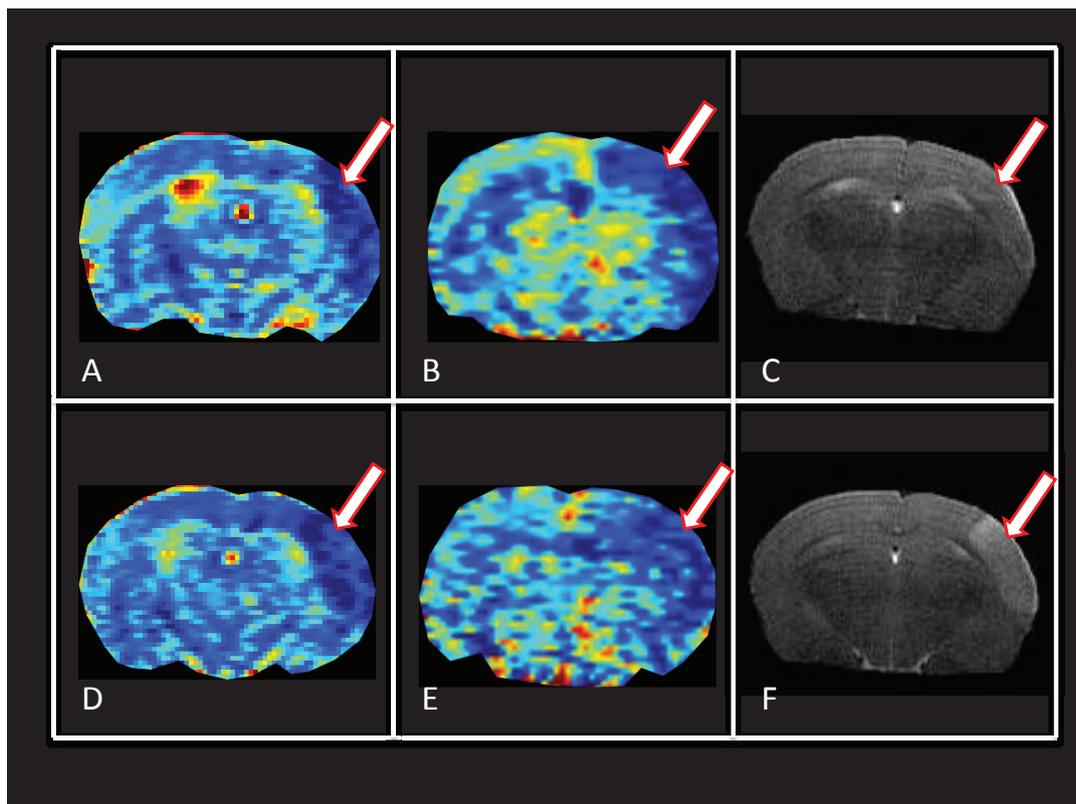


Figure 1

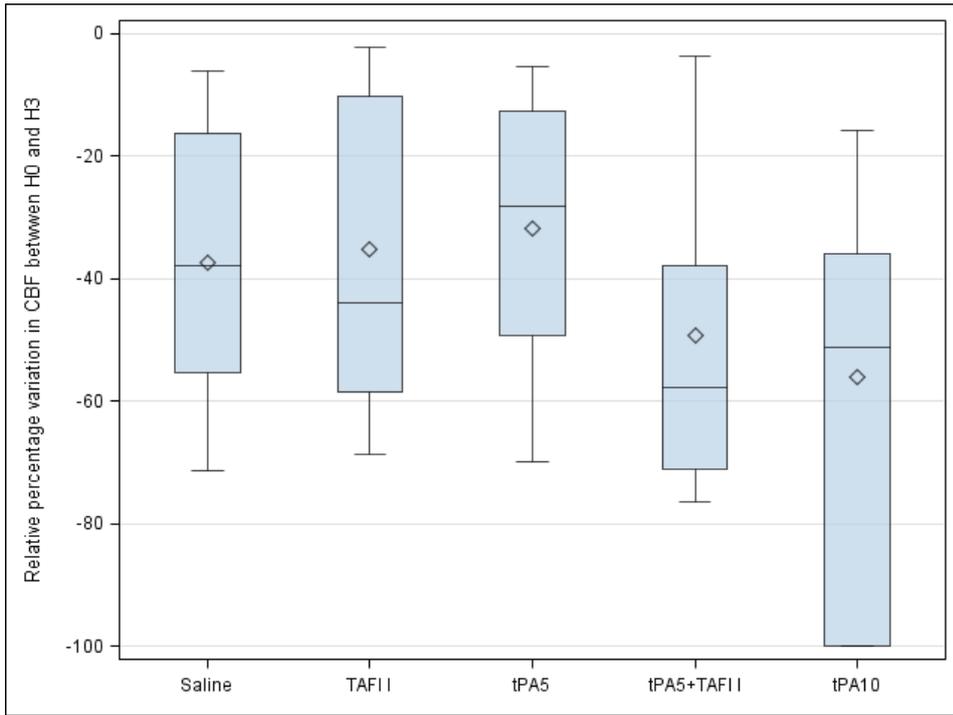


Figure 2

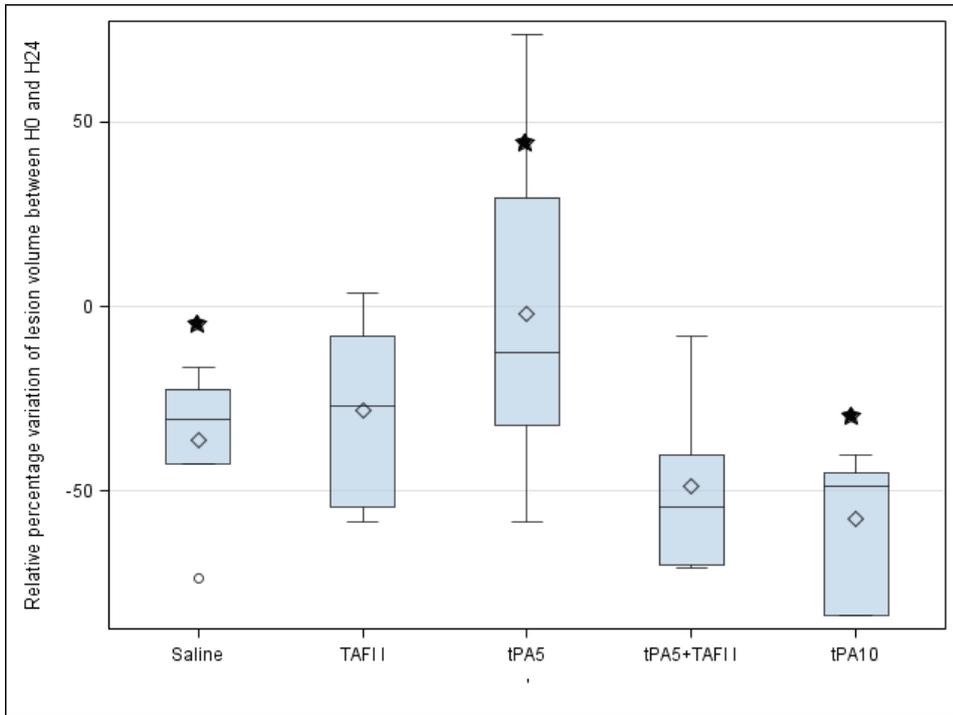


Figure 3

DISCUSSION

Etude 1

Nous avons publié la première étude caractérisant le modèle thromboembolique décrit par Orset et al [133] à l'aide d'une IRM multimodale.

Cette étude longitudinale confirme l'occlusion artérielle assez reproductible (85%) mais souligne l'absence de lésion à 24H chez 38% des animaux bien que présentant des lésions de perfusion et de diffusion initiales. L'explication la plus plausible est probablement une reperfusion spontanée, qui survient dans les 60 minutes après le début de l'ischémie.

Ce travail nous permet de comprendre la physiopathologie de ce modèle murin, qui est proche du mécanisme humain d'ischémie cérébrale le plus fréquent. Elle nous ouvre aussi des possibilités pré thérapeutiques pour tester des solutions thromboemboliques alternatives ou des médicaments neuro protecteurs.

Cette étude, qui souligne la proportion importante d'animaux présentant une reperfusion spontanée, montre la nécessité de poursuivre le suivi longitudinal des animaux au-delà de la première heure d'ischémie cérébrale en cas d'étude thérapeutique. Devant cette constatation, nous avons optimisé la séquence IRM de perfusion en utilisant l'ASL (arterial spin labeling) ne nécessitant pas l'injection de produit de contraste et pouvant donc être répétée.

Etude 2

Au cours d'un partenariat avec SANOFI - AVENTIS recherche et développement, nous avons testé l'efficacité d'une molécule appartenant à la classe thérapeutique des Inhibiteurs du TAFI, nommée FFC.HTZ4.059.

Cinq bras de traitements, administrés après randomisation et en double aveugle, ont permis de comparer l'évolution de la reperfusion cérébrale et les tailles de lésions finales.

Nous retrouvons l'efficacité du rt-PA à la dose 10mg/kg (dose de référence) en terme de diminution de taille de lésion. Il existe également une tendance nette de l'association de l'inhibiteur du TAFI avec des doses moins importantes de rt-PA, dans le même sens que le rt-PA 10mg/kg, sans que cette différence soit significative.

Plusieurs limites ont été soulignées dans cette étude. La plus importante est liée au fait que la thrombine utilisée pour générer des embolies est connue pour activer le TAFI, les plaquettes et PAI-1. Ainsi, ce modèle générant un caillot via la thrombine peut biaiser les résultats sur cette molécule. Cependant, comme tous les animaux ont reçu la même concentration de thrombine, ce qui peut être considéré comme un biais de l'étude, le groupe ayant reçu TAFI-I (seul ou en combinaison avec rtPA) devrait être favorisé, ce qui n'est évidemment pas le cas ici. Néanmoins, le modèle d'injection d'un caillot autologue de fibrine pourrait être une alternative intéressante pour tester l'inhibiteur du TAFI, bien que ce modèle affiche un haut degré de variabilité et de mortalité.

Malgré ses limites, le modèle murin thromboembolique basé sur l'injection de thrombine in situ présente un intérêt particulier pour évaluer les stratégies de combinaison avec le rt-PA.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail permet d'envisager l'étude d'autres molécules thromboemboliques, d'autres associations thérapeutiques ou neuro protectrices avec un modèle animal qui reste délicat à manipuler mais dont la physiopathologie reste proche de la celle constatée chez l'humain.

Cette étude souligne l'importance de l'évaluation des paramètres de l'hémostase et de leurs intrications, et la complexité du choix du modèle devant être adapté à l'objectif des études.

REFERENCES

1. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ (2006) Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 367: 1747-1757.
2. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V (2009) Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol* 8: 355-369.
3. Heuschmann PU, Di Carlo A, Bejot Y, Rastenyte D, Ryglewicz D, et al. (2009) Incidence of stroke in Europe at the beginning of the 21st century. *Stroke* 40: 1557-1563.
4. Evers SM, Struijs JN, Ament AJ, van Genugten ML, Jager JH, et al. (2004) International comparison of stroke cost studies. *Stroke* 35: 1209-1215.
5. Fery-Lemonnier (juin 2009) La prévention et la prise en charge des accidents vasculaires cérébraux en France: rapport au ministère de la santé. ISRN SANDHOS/ RE-09-2-FR.
6. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, et al. Heart disease and stroke statistics--(2011) update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 123: e18-e209.
7. Ogata J, Yutani C, Otsubo R, Yamanishi H, Naritomi H, et al. (2008) Heart and vessel pathology underlying brain infarction in 142 stroke patients. *Ann Neurol* 63: 770-781.
8. Bhatt DL, Steg PG, Ohman EM, Hirsch AT, Ikeda Y, et al. (2006) International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. *Jama* 295: 180-189.
9. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, et al. (2001) Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *Jama* 285: 2370-2375.
10. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB (1987) Atrial fibrillation: a major contributor to stroke in the elderly. The Framingham Study. *Arch Intern Med* 147: 1561-1564.
11. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, et al. (1993) Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 24: 35-41.
12. Caplan (2000) Caplan's stroke: A clinical Approach. Butterworth-Heinemann, Boston.

13. Guercini F, Acciarresi M, Agnelli G, Paciaroni M (2008) Cryptogenic stroke: time to determine aetiology. *J Thromb Haemost* 6: 549-554.
14. Grau AJ, Weimar C, Buggle F, Heinrich A, Goertler M, et al. (2001) Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke* 32: 2559-2566.
15. Furie B (2009) Pathogenesis of thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 255-258.
16. Jackson SP, Nesbitt WS, Westein E (2009) Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost* 7 Suppl 1: 17-20.
17. Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, Mokhtari-Nejad R, Rackebrandt K, et al. (2001) Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med* 193: 459-469.
18. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D (1989) Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2839-2843.
19. Drouet L (1999) Thrombose et ses cibles thérapeutiques. *Rev Prat* 49 : 1617-23.
20. Weisel JW, Veklich Y, Gorkun O (1993) The sequence of cleavage of fibrinopeptides from fibrinogen is important for protofibril formation and enhancement of lateral aggregation in fibrin clots. *J Mol Biol* 232: 285-297.
21. Levin EG, del Zoppo GJ (1994) Localization of tissue plasminogen activator in the endothelium of a limited number of vessels. *Am J Pathol* 144: 855-861.
22. Rijken DC, Sakharov DV (2001) Basic principles in thrombolysis: regulatory role of plasminogen. *Thromb Res* 103 Suppl 1: S41-49.
23. Leurs J, Nerme V, Sim Y, Hendriks D (2004) Carboxypeptidase U (TAFIa) prevents lysis from proceeding into the propagation phase through a threshold-dependent mechanism. *J Thromb Haemost* 2: 416-423.
24. Orbe J, Barrenetxe J, Rodriguez JA, Vivien D, Orset C, et al. Matrix metalloproteinase-10 effectively reduces infarct size in experimental stroke by enhancing fibrinolysis via a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-mediated mechanism. *Circulation* 124: 2909-2919.
25. Hossmann KA (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36: 557-565.
26. Donnan GA BJ, Davis SM, Sharp FR (editors), editor (2007) *The ischemic penumbra: pathophysiology, imaging and therapy.*

27. Fisher M, Bastan B Identifying and utilizing the ischemic penumbra. *Neurology* 79: S79-85.
28. Heiss WD, Huber M, Fink GR, Herholz K, Pietrzyk U, et al. (1992) Progressive derangement of periinfarct viable tissue in ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 193-203.
29. Baron JC, Bousser MG, Rey A, Guillard A, Comar D, et al. (1981) Reversal of focal "miser-perfusion syndrome" by extra-intracranial arterial bypass in hemodynamic cerebral ischemia. A case study with ¹⁵O positron emission tomography. *Stroke* 12: 454-459.
30. Furlan M, Marchal G, Viader F, Derlon JM, Baron JC (1996) Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra. *Ann Neurol* 40: 216-226.
31. Baron JC (2001) Perfusion thresholds in human cerebral ischemia: historical perspective and therapeutic implications. *Cerebrovasc Dis* 11 Suppl 1: 2-8.
32. Heiss WD, Graf R, Fujita T, Ohta K, Bauer B, et al. (1997) Early detection of irreversibly damaged ischemic tissue by flumazenil positron emission tomography in cats. *Stroke* 28: 2045-2051; discussion 2051-2042.
33. Heiss WD, Sobesky J, Smekal U, Kracht LW, Lehnhardt FG, et al. (2004) Probability of cortical infarction predicted by flumazenil binding and diffusion-weighted imaging signal intensity: a comparative positron emission tomography/magnetic resonance imaging study in early ischemic stroke. *Stroke* 35: 1892-1898.
34. Markus R, Reutens DC, Kazui S, Read S, Wright P, et al. (2004) Hypoxic tissue in ischaemic stroke: persistence and clinical consequences of spontaneous survival. *Brain* 127: 1427-1436.
35. Yuan H, Frank JE, Hong Y, An H, Eldeniz C, et al. Spatiotemporal uptake characteristics of [¹⁸F]-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose in a rat middle cerebral artery occlusion model. *Stroke* 44: 2292-2299.
36. Olivot JM, Mlynash M, Thijs VN, Kemp S, Lansberg MG, et al. (2009) Optimal Tmax threshold for predicting penumbral tissue in acute stroke. *Stroke* 40: 469-475.
37. Davis SM, Donnan GA, Parsons MW, Levi C, Butcher KS, et al. (2008) Effects of alteplase beyond 3 h after stroke in the Echoplanar Imaging Thrombolytic Evaluation Trial (EPITHET): a placebo-controlled randomised trial. *Lancet Neurol* 7: 299-309.
38. Albers GW, Thijs VN, Wechsler L, Kemp S, Schlaug G, et al. (2006) Magnetic resonance imaging profiles predict clinical response to early reperfusion: the diffusion and perfusion imaging evaluation for understanding stroke evolution (DEFUSE) study. *Ann Neurol* 60: 508-517.

39. Donnan GA, Baron JC, Ma H, Davis SM (2009) Penumbra selection of patients for trials of acute stroke therapy. *Lancet Neurol* 8: 261-269.
40. Chalela JA, Kidwell CS, Nentwich LM, Luby M, Butman JA, et al. (2007) Magnetic resonance imaging and computed tomography in emergency assessment of patients with suspected acute stroke: a prospective comparison. *Lancet* 369: 293-298.
41. Vahedi K, Hofmeijer J, Juettler E, Vicaut E, George B, 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: 215-222.
42. Kidwell CS, Alger JR, Saver JL (2003) Beyond mismatch: evolving paradigms in imaging the ischemic penumbra with multimodal magnetic resonance imaging. *Stroke* 34: 2729-2735.
43. Christensen S, Mouridsen K, Wu O, Hjort N, Karstoft H, et al. (2009) Comparison of 10 perfusion MRI parameters in 97 sub-6-hour stroke patients using voxel-based receiver operating characteristics analysis. *Stroke* 40: 2055-2061.
44. Kane I, Carpenter T, Chappell F, Rivers C, Armitage P, et al. (2007) Comparison of 10 different magnetic resonance perfusion imaging processing methods in acute ischemic stroke: effect on lesion size, proportion of patients with diffusion/perfusion mismatch, clinical scores, and radiologic outcomes. *Stroke* 38: 3158-3164.
45. Kidwell CS, Saver JL, Starkman S, Duckwiler G, Jahan R, et al. (2002) Late secondary ischemic injury in patients receiving intraarterial thrombolysis. *Ann Neurol* 52: 698-703.
46. Olivot JM, Mlynash M, Thijs VN, Purushotham A, Kemp S, et al. (2009) Relationships between cerebral perfusion and reversibility of acute diffusion lesions in DEFUSE: insights from RADAR. *Stroke* 40: 1692-1697.
47. Nagakane Y, Christensen S, Brekenfeld C, Ma H, Churilov L, et al. EPITHET: Positive Result After Reanalysis Using Baseline Diffusion-Weighted Imaging/Perfusion-Weighted Imaging Co-Registration. *Stroke* 42: 59-64.
48. Lansberg MG, Straka M, Kemp S, Mlynash M, Wechsler LR, et al. MRI profile and response to endovascular reperfusion after stroke (DEFUSE 2): a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 11: 860-867.
49. Kidwell CS, Jahan R, Gornbein J, Alger JR, Nenov V, et al. A trial of imaging selection and endovascular treatment for ischemic stroke. *N Engl J Med* 368: 914-923.
50. Wintermark M, Meuli R, Browaeys P, Reichhart M, Bogousslavsky J, et al. (2007) Comparison of CT perfusion and angiography and MRI in selecting stroke patients for acute treatment. *Neurology* 68: 694-697.

51. Tan JC, Dillon WP, Liu S, Adler F, Smith WS, et al. (2007) Systematic comparison of perfusion-CT and CT-angiography in acute stroke patients. *Ann Neurol* 61: 533-543.
52. Kheradmand A, Fisher M, Paydarfar D Ischemic Stroke in Evolution: Predictive Value of Perfusion Computed Tomography. *J Stroke Cerebrovasc Dis*.
53. Kidwell CS MRI biomarkers in acute ischemic stroke: a conceptual framework and historical analysis. *Stroke* 44: 570-578.
54. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22: 391-397.
55. Sharp FR, Lu A, Tang Y, Millhorn DE (2000) Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1011-1032.
56. Hata R, Maeda K, Hermann D, Mies G, Hossmann KA (2000) Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 937-946.
57. Sharp JW, Sagar SM, Hisanaga K, Jasper P, Sharp FR (1990) The NMDA receptor mediates cortical induction of fos and fos-related antigens following cortical injury. *Exp Neurol* 109: 323-332.
58. Sharp FR, Bernaudin M (2004) HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci* 5: 437-448.
59. Kucinski T, Koch C, Eckert B, Becker V, Kromer H, et al. (2003) Collateral circulation is an independent radiological predictor of outcome after thrombolysis in acute ischaemic stroke. *Neuroradiology* 45: 11-18.
60. Christoforidis GA, Mohammad Y, Kehagias D, Avutu B, Slivka AP (2005) Angiographic assessment of pial collaterals as a prognostic indicator following intra-arterial thrombolysis for acute ischemic stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* 26: 1789-1797.
61. Bang OY, Saver JL, Buck BH, Alger JR, Starkman S, et al. (2008) Impact of collateral flow on tissue fate in acute ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79: 625-629.
62. Maas MB, Lev MH, Ay H, Singhal AB, Greer DM, et al. (2009) Collateral vessels on CT angiography predict outcome in acute ischemic stroke. *Stroke* 40: 3001-3005.
63. Lippert H PR. *Arterial Variations in Man.*; 1985
64. Solvet P SM, Gerber S , Lebars F. , Dormont D, Marsault C neurochirurgie. Les explorations neuroradiologiques diagnostiques
65. Geibprasert S, Pongpech S, Armstrong D, Krings T (2009) Dangerous extracranial-intracranial anastomoses and supply to the cranial nerves: vessels the neurointerventionalist needs to know. *AJNR Am J Neuroradiol* 30: 1459-1468.

66. Liebeskind DS (2003) Collateral circulation. *Stroke* 34: 2279-2284.
67. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67: 181-198.
68. Henderson RD, Eliasziw M, Fox AJ, Rothwell PM, Barnett HJ (2000) Angiographically defined collateral circulation and risk of stroke in patients with severe carotid artery stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) Group. *Stroke* 31: 128-132.
69. Roberts HC, Dillon WP, Furlan AJ, Wechsler LR, Rowley HA, et al. (2002) Computed tomographic findings in patients undergoing intra-arterial thrombolysis for acute ischemic stroke due to middle cerebral artery occlusion: results from the PROACT II trial. *Stroke* 33: 1557-1565.
70. Hermier M, Ibrahim AS, Wiart M, Adeleine P, Cotton F, et al. (2003) The delayed perfusion sign at MRI. *J Neuroradiol* 30: 172-179.
71. Hermier M, Nighoghossian N, Derex L, Wiart M, Nemoz C, et al. (2005) Hypointense leptomeningeal vessels at T2*-weighted MRI in acute ischemic stroke. *Neurology* 65: 652-653.
72. Warach S (2001) Tissue viability thresholds in acute stroke: the 4-factor model. *Stroke* 32: 2460-2461.
73. Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, Brott TG, Toni D, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet* 375: 1695-1703.
74. Saver JL (2004) Number needed to treat estimates incorporating effects over the entire range of clinical outcomes: novel derivation method and application to thrombolytic therapy for acute stroke. *Arch Neurol* 61: 1066-1070.
75. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, et al. (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359: 1317-1329.
76. Wardlaw JM, Murray V, Berge E, Del Zoppo GJ (2009) Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*: CD000213.
77. Sandercock P, Wardlaw JM, Lindley RI, Dennis M, Cohen G, et al. The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [IST-3]): a randomised controlled trial. *Lancet* 379: 2352-2363.
78. Wardlaw JM, Murray V, Berge E, del Zoppo G, Sandercock P, et al. Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet* 379: 2364-2372.

79. Heuschmann PU, Kolominsky-Rabas PL, Misselwitz B, Hermanek P, Leffmann C, et al. (2004) Predictors of in-hospital mortality and attributable risks of death after ischemic stroke: the German Stroke Registers Study Group. *Arch Intern Med* 164: 1761-1768.
80. Kleindorfer D, Lindsell CJ, Brass L, Koroshetz W, Broderick JP (2008) National US estimates of recombinant tissue plasminogen activator use: ICD-9 codes substantially underestimate. *Stroke* 39: 924-928.
81. Bambauer KZ, Johnston SC, Bambauer DE, Zivin JA (2006) Reasons why few patients with acute stroke receive tissue plasminogen activator. *Arch Neurol* 63: 661-664.
82. Silva GS, Lima FO, Camargo EC, Smith WS, Singhal AB, et al. Wake-up stroke: clinical and neuroimaging characteristics. *Cerebrovasc Dis* 29: 336-342.
83. del Zoppo GJ, Poeck K, Pessin MS, Wolpert SM, Furlan AJ, et al. (1992) Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke. *Ann Neurol* 32: 78-86.
84. Wolpert SM, Bruckmann H, Greenlee R, Wechsler L, Pessin MS, et al. (1993) Neuroradiologic evaluation of patients with acute stroke treated with recombinant tissue plasminogen activator. The rt-PA Acute Stroke Study Group. *AJNR Am J Neuroradiol* 14: 3-13.
85. Bhatia R, Hill MD, Shobha N, Menon B, Bal S, et al. Low rates of acute recanalization with intravenous recombinant tissue plasminogen activator in ischemic stroke: real-world experience and a call for action. *Stroke* 41: 2254-2258.
86. Wahlgren N, Ahmed N, Eriksson N, Aichner F, Bluhmki E, et al. (2008) Multivariable analysis of outcome predictors and adjustment of main outcome results to baseline data profile in randomized controlled trials: Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-MOnitoring Study (SITS-MOST). *Stroke* 39: 3316-3322.
87. Goldstein JN, Marrero M, Masrur S, Pervez M, Barrocas AM, et al. Management of thrombolysis-associated symptomatic intracerebral hemorrhage. *Arch Neurol* 67: 965-969.
88. Brown DL, Barsan WG, Lisabeth LD, Gallery ME, Morgenstern LB (2005) Survey of emergency physicians about recombinant tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *Ann Emerg Med* 46: 56-60.
89. Kase CS, Furlan AJ, Wechsler LR, Higashida RT, Rowley HA, et al. (2001) Cerebral hemorrhage after intra-arterial thrombolysis for ischemic stroke: the PROACT II trial. *Neurology* 57: 1603-1610.

90. Marcos-Contreras OA, Ganguly K, Yamamoto A, Shlansky-Goldberg R, Cines DB, et al. Clot penetration and retention by plasminogen activators promote fibrinolysis. *Biochem Pharmacol* 85: 216-222.
91. Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, 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: 2003-2011.
92. Develter J, Booth NA, Declerck PJ, Gils A (2008) Bispecific targeting of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 by a heterodimer diabody. *J Thromb Haemost* 6: 1884-1891.
93. Abbenante G, Fairlie DP (2005) Protease inhibitors in the clinic. *Med Chem* 1: 71-104.
94. Vercauteren E, Emmerechts J, Peeters M, Hoylaerts MF, Declerck PJ, et al. Evaluation of the profibrinolytic properties of an anti-TAFI monoclonal antibody in a mouse thromboembolism model. *Blood* 117: 4615-4622.
95. Smith WS, Sung G, Saver J, Budzik R, Duckwiler G, et al. (2008) Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: final results of the Multi MERCI trial. *Stroke* 39: 1205-1212.
96. (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: 2761-2768.
97. Roth C, Papanagiotou P, Behnke S, Walter S, Haass A, et al. Stent-assisted mechanical recanalization for treatment of acute intracerebral artery occlusions. *Stroke* 41: 2559-2567.
98. (2007) The Interventional Management of Stroke (IMS) II Study. *Stroke* 38: 2127-2135.
99. Mazighi M, Serfaty JM, Labreuche J, Laissy JP, Meseguer E, 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.
100. Khatri P, Hill MD, Palesch YY, Spilker J, Jauch EC, et al. (2008) Methodology of the Interventional Management of Stroke III Trial. *Int J Stroke* 3: 130-137.
101. Tsivgoulis G, Eggers J, Ribo M, Perren F, Saqqur M, et al. Safety and efficacy of ultrasound-enhanced thrombolysis: a comprehensive review and meta-analysis of randomized and nonrandomized studies. *Stroke* 41: 280-287.
102. Parsons MW, Christensen S, McElduff P, Levi CR, Butcher KS, et al. Pretreatment diffusion- and perfusion-MR lesion volumes have a crucial influence on clinical response to stroke thrombolysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 1214-1225.

103. Derex L, Nighoghossian N (2008) Intracerebral haemorrhage after thrombolysis for acute ischaemic stroke: an update. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79: 1093-1099.
104. Singer OC, Humpich MC, Fiehler J, Albers GW, Lansberg MG, et al. (2008) Risk for symptomatic intracerebral hemorrhage after thrombolysis assessed by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 63: 52-60.
105. Tong DC, Adami A, Moseley ME, Marks MP (2000) Relationship between apparent diffusion coefficient and subsequent hemorrhagic transformation following acute ischemic stroke. *Stroke* 31: 2378-2384.
106. Alsop DC, Makovetskaya E, Kumar S, Selim M, Schlaug G (2005) Markedly reduced apparent blood volume on bolus contrast magnetic resonance imaging as a predictor of hemorrhage after thrombolytic therapy for acute ischemic stroke. *Stroke* 36: 746-750.
107. Fiehler J, Remmele C, Kucinski T, Rosenkranz M, Thomalla G, et al. (2005) Reperfusion after severe local perfusion deficit precedes hemorrhagic transformation: an MRI study in acute stroke patients. *Cerebrovasc Dis* 19: 117-124.
108. Campbell BC, Christensen S, Butcher KS, Gordon I, Parsons MW, et al. Regional very low cerebral blood volume predicts hemorrhagic transformation better than diffusion-weighted imaging volume and thresholded apparent diffusion coefficient in acute ischemic stroke. *Stroke* 41: 82-88.
109. Grotta J (2002) Neuroprotection is unlikely to be effective in humans using current trial designs. *Stroke* 33: 306-307.
110. Dirnagl U (2006) Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 1465-1478.
111. Sacco RL, Wolf PA, Gorelick PB (1999) Risk factors and their management for stroke prevention: outlook for 1999 and beyond. *Neurology* 53: S15-24.
112. Hsu CY (1993) Criteria for valid preclinical trials using animal stroke models. *Stroke* 24: 633-636.
113. Ginsberg MD, Busto R (1989) Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 20: 1627-1642.
114. Sicard KM, Fisher M (2009) Animal models of focal brain ischemia. *Exp Transl Stroke Med* 1: 7.
115. Li F, Han SS, Tatlisumak T, Liu KF, Garcia JH, et al. (1999) Reversal of acute apparent diffusion coefficient abnormalities and delayed neuronal death following transient focal cerebral ischemia in rats. *Ann Neurol* 46: 333-342.

116. Durukan A, Tatlisumak T (2009) Ischemic stroke in mice and rats. *Methods Mol Biol* 573: 95-114.
117. Fisher M (2003) Recommendations for advancing development of acute stroke therapies: Stroke Therapy Academic Industry Roundtable 3. *Stroke* 34: 1539-1546.
118. Durukan A, Tatlisumak T (2009) Animal models of ischemic stroke. *Handb Clin Neurol* 92: 43-66.
119. Durukan A, Strbian D, Tatlisumak T (2008) Rodent models of ischemic stroke: a useful tool for stroke drug development. *Curr Pharm Des* 14: 359-370.
120. Liu S, Zhen G, Meloni BP, Campbell K, Winn HR (2009) Rodent Stroke Model Guidelines for Preclinical Stroke Trials (1st Edition). *J Exp Stroke Transl Med* 2: 2-27.
121. Hill NC, Millikan CH, Wakim KG, Sayre GP (1955) Studies in cerebrovascular disease. VII. Experimental production of cerebral infarction by intracarotid injection of homologous blood clot; preliminary report. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 30: 625-633.
122. Futrell N, Watson BD, Dietrich WD, Prado R, Millikan C, et al. (1988) A new model of embolic stroke produced by photochemical injury to the carotid artery in the rat. *Ann Neurol* 23: 251-257.
123. Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, Fukunaga N (1982) An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke* 13: 505-508.
124. Albers GW (1995) Antithrombotic agents in cerebral ischemia. *Am J Cardiol* 75: 34B-38B.
125. Savitz SI (2007) A critical appraisal of the NXY-059 neuroprotection studies for acute stroke: a need for more rigorous testing of neuroprotective agents in animal models of stroke. *Exp Neurol* 205: 20-25.
126. Zivin JA, Fisher M, DeGirolami U, Hemenway CC, Stashak JA (1985) Tissue plasminogen activator reduces neurological damage after cerebral embolism. *Science* 230: 1289-1292.
127. Garcia-Yebenes I, Sobrado M, Zarruk JG, Castellanos M, Perez de la Ossa N, et al. A mouse model of hemorrhagic transformation by delayed tissue plasminogen activator administration after in situ thromboembolic stroke. *Stroke* 42: 196-203.
128. Li F FM (2nd ed. 2001.) *Animal modeling for developing stroke therapy.* ; Butterworth-Heinemann W, MA, editor.
129. Busch E, Kruger K, Hossmann KA (1997) Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res* 778: 16-24.

130. Takano K, Carano RA, Tatlisumak T, Meiler M, Sotak CH, et al. (1998) Efficacy of intra-arterial and intravenous prourokinase in an embolic stroke model evaluated by diffusion-perfusion magnetic resonance imaging. *Neurology* 50: 870-875.
131. Henninger N, Sicard KM, Fisher M (2007) Spectacular shrinking deficit: insights from multimodal magnetic resonance imaging after embolic middle cerebral artery occlusion in Sprague-Dawley rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 1756-1763.
132. Beech JS, Williams SC, Campbell CA, Bath PM, Parsons AA, et al. (2001) Further characterisation of a thromboembolic model of stroke in the rat. *Brain Res* 895: 18-24.
133. Orset C, Macrez R, Young AR, Panthou D, Angles-Cano E, et al. (2007) Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 38: 2771-2778.
134. El Amki M, Lerouet D, Coqueran B, Curis E, Orset C, et al. Experimental modeling of recombinant tissue plasminogen activator effects after ischemic stroke. *Exp Neurol* 238: 138-144.
135. Durand A, Chauveau F, Cho TH, Bolbos R, Langlois JB, et al. Spontaneous reperfusion after in situ thromboembolic stroke in mice. *PLoS One* 7: e50083.
136. Campos F, Qin T, Castillo J, Seo JH, Arai K, et al. Fingolimod reduces hemorrhagic transformation associated with delayed tissue plasminogen activator treatment in a mouse thromboembolic model. *Stroke* 44: 505-511.
137. Molnar L, Hegedus K, Fekete I (1988) A new model for inducing transient cerebral ischemia and subsequent reperfusion in rabbits without craniectomy. *Stroke* 19: 1262-1266.
138. Zivin JA, DeGirolami U, Kochhar A, Lyden PD, Mazzarella V, et al. (1987) A model for quantitative evaluation of embolic stroke therapy. *Brain Res* 435: 305-309.
139. Gerriets T, Li F, Silva MD, Meng X, Brevard M, et al. (2003) The macrosphere model: evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Methods* 122: 201-211.
140. Shigeno T, Teasdale GM, McCulloch J, Graham DI (1985) Recirculation model following MCA occlusion in rats. Cerebral blood flow, cerebrovascular permeability, and brain edema. *J Neurosurg* 63: 272-277.
141. Osborne KA, Shigeno T, Balarsky AM, Ford I, McCulloch J, et al. (1987) Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50: 402-410.
142. Koizumi J YY, Nakazawa T, Ooneda G. (1986) Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 8:1-8.

143. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20: 84-91.
144. Huang NC, Wei J, Quast MJ (1996) A comparison of the early development of ischemic brain damage in normoglycemic and hyperglycemic rats using magnetic resonance imaging. *Exp Brain Res* 109: 33-42.
145. Kong LQ, Xie JX, Han HB, Liu HD (2004) Improvements in the intraluminal thread technique to induce focal cerebral ischaemia in rabbits. *J Neurosci Methods* 137: 315-319.
146. Liu S, Liu W, Ding W, Miyake M, Rosenberg GA, et al. (2006) Electron paramagnetic resonance-guided normobaric hyperoxia treatment protects the brain by maintaining penumbral oxygenation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 1274-1284.
147. Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ (1998) A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke* 29: 2162-2170.
148. Henninger N, Bouley J, Bratane BT, Bastan B, Shea M, et al. (2009) Laser Doppler flowmetry predicts occlusion but not tPA-mediated reperfusion success after rat embolic stroke. *Exp Neurol* 215: 290-297.
149. Chauveau F, Cho TH, Riou A, Langlois JB, Berthezene Y, et al. Does acute behavioral testing reflect successful ischemia in rats with transient middle cerebral artery occlusion? *Int J Stroke* 7: 465-472.
150. Dittmar M, Spruss T, Schuierer G, Horn M (2003) External carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 34: 2252-2257.
151. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Muller C, Kluge A, et al. (2004) Middle cerebral artery occlusion during MR-imaging: investigation of the hyperacute phase of stroke using a new in-bore occlusion model in rats. *Brain Res Brain Res Protoc* 12: 137-143.
152. Hudgins WR, Garcia JH (1970) Transorbital approach to the middle cerebral artery of the squirrel monkey: a technique for experimental cerebral infarction applicable to ultrastructural studies. *Stroke* 1: 107-111.
153. Symon L, Pasztor E, Branston NM (1974) The distribution and density of reduced cerebral blood flow following acute middle cerebral artery occlusion: an experimental study by the technique of hydrogen clearance in baboons. *Stroke* 5: 355-364.

154. MacDonald VD, Sundt TM, Jr., Winkelmann RK (1972) Histochemical studies in the zone of ischemia following middle cerebral artery occlusion in cats. *J Neurosurg* 37: 45-54.
155. Suzuki J, Yoshimoto T, Tanaka S, Sakamoto T (1980) [Production of various cerebral infarction models in the dog by means of occlusion of intracranial trunk arteries (author's transl)]. *No To Shinkei* 32: 185-190.
156. Meyer FB, Anderson RE, Sundt TM, Jr., Yaksh TL (1986) Intracellular brain pH, indicator tissue perfusion, electroencephalography, and histology in severe and moderate focal cortical ischemia in the rabbit. *J Cereb Blood Flow Metab* 6: 71-78.
157. Robinson RG, Shoemaker WJ, Schlumpf M, Valk T, Bloom FE (1975) Effect of experimental cerebral infarction in rat brain on catecholamines and behaviour. *Nature* 255: 332-334.
158. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981) Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 53-60.
159. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, et al. (1986) Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17: 472-476.
160. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD (1985) Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 17: 497-504.
161. Dietrich WD, Busto R, Watson BD, Scheinberg P, Ginsberg MD (1987) Photochemically induced cerebral infarction. II. Edema and blood-brain barrier disruption. *Acta Neuropathol* 72: 326-334.
162. Cai H, Yao H, Ibayashi S, Uchimura H, Fujishima M (1998) Photothrombotic middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats: influence of substrain, gender, and distal middle cerebral artery patterns on infarct size. *Stroke* 29: 1982-1986; discussion 1986-1987.
163. Hilger T, Blunk JA, Hoehn M, Mies G, Wester P (2004) Characterization of a novel chronic photothrombotic ring stroke model in rats by magnetic resonance imaging, biochemical imaging, and histology. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 789-797.
164. Sharkey J, Butcher SP (1995) Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery. *J Neurosci Methods* 60: 125-131.
165. Macrae IM, Robinson MJ, Graham DI, Reid JL, McCulloch J (1993) Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 276-284.

166. Ginsberg MD, Sternau LL, Globus MY, Dietrich WD, Busto R (1992) Therapeutic modulation of brain temperature: relevance to ischemic brain injury. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 4: 189-225.
167. Barone FC, Feuerstein GZ, White RF (1997) Brain cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 31-44.
168. Lanier WL (1995) Cerebral metabolic rate and hypothermia: their relationship with ischemic neurologic injury. *J Neurosurg Anesthesiol* 7: 216-221.
169. Nakashima K, Todd MM (1996) Effects of hypothermia on the rate of excitatory amino acid release after ischemic depolarization. *Stroke* 27: 913-918.
170. Krieger DW, Yenari MA (2004) Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us? *Stroke* 35: 1482-1489.
171. Garcia SI, Dabsys SM, Martinez VN, Delorenzi A, Santajuliana D, et al. (1995) Thyrotropin-releasing hormone hyperactivity in the preoptic area of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 26: 1105-1110.
172. Li F, Omae T, Fisher M (1999) Spontaneous hyperthermia and its mechanism in the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rats. *Stroke* 30: 2464-2470; discussion 2470-2461.
173. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Kaps M, Bachmann G, et al. (2003) Neuroprotective effects of MK-801 in different rat stroke models for permanent middle cerebral artery occlusion: adverse effects of hypothalamic damage and strategies for its avoidance. *Stroke* 34: 2234-2239.
174. Barber PA, Hoyte L, Colbourne F, Buchan AM (2004) Temperature-regulated model of focal ischemia in the mouse: a study with histopathological and behavioral outcomes. *Stroke* 35: 1720-1725.
175. Bruno A, Biller J, Adams HP, Jr., Clarke WR, Woolson RF, et al. (1999) Acute blood glucose level and outcome from ischemic stroke. Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Investigators. *Neurology* 52: 280-284.
176. Baird TA, Parsons MW, Phan T, Butcher KS, Desmond PM, et al. (2003) Persistent poststroke hyperglycemia is independently associated with infarct expansion and worse clinical outcome. *Stroke* 34: 2208-2214.
177. Yong M, Kaste M (2008) Dynamic of hyperglycemia as a predictor of stroke outcome in the ECASS-II trial. *Stroke* 39: 2749-2755.
178. Fuentes B, Castillo J, San Jose B, Leira R, Serena J, et al. (2009) The prognostic value of capillary glucose levels in acute stroke: the GLyceria in Acute Stroke (GLIAS) study. *Stroke* 40: 562-568.

179. Nedergaard M (1987) Transient focal ischemia in hyperglycemic rats is associated with increased cerebral infarction. *Brain Res* 408: 79-85.
180. Ginsberg MD, Prado R, Dietrich WD, Busto R, Watson BD (1987) Hyperglycemia reduces the extent of cerebral infarction in rats. *Stroke* 18: 570-574.
181. Prado R, Ginsberg MD, Dietrich WD, Watson BD, Busto R (1988) Hyperglycemia increases infarct size in collaterally perfused but not end-arterial vascular territories. *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 186-192.
182. MacDougall NJ, Muir KW Hyperglycaemia and infarct size in animal models of middle cerebral artery occlusion: systematic review and meta-analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 31: 807-818.
183. Kirsch JR, Traystman RJ, Hurn PD (1996) Anesthetics and cerebroprotection: experimental aspects. *Int Anesthesiol Clin* 34: 73-93.
184. Saha JK, Xia J, Grondin JM, Engle SK, Jakubowski JA (2005) Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp Biol Med (Maywood)* 230: 777-784.
185. Murakami K, Kondo T, Kawase M, Chan PH (1998) The development of a new mouse model of global ischemia: focus on the relationships between ischemia duration, anesthesia, cerebral vasculature, and neuronal injury following global ischemia in mice. *Brain Res* 780: 304-310.
186. Zausinger S, Baethmann A, Schmid-Elsaesser R (2002) Anesthetic methods in rats determine outcome after experimental focal cerebral ischemia: mechanical ventilation is required to obtain controlled experimental conditions. *Brain Res Brain Res Protoc* 9: 112-121.
187. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, et al. (1986) Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17: 1304-1308.
188. Swanson RA, Sharp FR (1994) Infarct measurement methodology. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 697-698.
189. Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, Nelson P, Irving E, et al. (2000) Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology* 39: 806-816.
190. D'Hooge R, De Deyn PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 36: 60-90.

191. Roof RL, Schielke GP, Ren X, Hall ED (2001) A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. *Stroke* 32: 2648-2657.
192. DeBow SB, Clark DL, MacLellan CL, Colbourne F (2003) Incomplete assessment of experimental cytoprotectants in rodent ischemia studies. *Can J Neurol Sci* 30: 368-374.
193. Hacke W, Furlan AJ, Al-Rawi Y, Davalos A, Fiebich JB, 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: 141-150.
194. van Bruggen N, Roberts TP, Cremer JE (1994) The application of magnetic resonance imaging to the study of experimental cerebral ischaemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 6: 180-210.
195. Hoehn M, Nicolay K, Franke C, van der Sanden B (2001) Application of magnetic resonance to animal models of cerebral ischemia. *J Magn Reson Imaging* 14: 491-509.
196. Chauveau F, Cho TH, Berthezene Y, Nighoghossian N, Wiart M Imaging inflammation in stroke using magnetic resonance imaging. *Int J Clin Pharmacol Ther* 48: 718-728.
197. Allegrini PR, Sauer D (1992) Application of magnetic resonance imaging to the measurement of neurodegeneration in rat brain: MRI data correlate strongly with histology and enzymatic analysis. *Magn Reson Imaging* 10: 773-778.
198. Mack WJ, Komotar RJ, Mocco J, Coon AL, Hoh DJ, et al. (2003) Serial magnetic resonance imaging in experimental primate stroke: validation of MRI for pre-clinical cerebroprotective trials. *Neurol Res* 25: 846-852.
199. Neumann-Haefelin T, Kastrup A, de Crespigny A, Yenari MA, Ringer T, et al. (2000) Serial MRI after transient focal cerebral ischemia in rats: dynamics of tissue injury, blood-brain barrier damage, and edema formation. *Stroke* 31: 1965-1972; discussion 1972-1963.
200. Li F, Liu KF, Silva MD, Omae T, Sotak CH, et al. (2000) Transient and permanent resolution of ischemic lesions on diffusion-weighted imaging after brief periods of focal ischemia in rats : correlation with histopathology. *Stroke* 31: 946-954.
201. Calamante F, Thomas DL, Pell GS, Wiersma J, Turner R (1999) Measuring cerebral blood flow using magnetic resonance imaging techniques. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 701-735.
202. Ostergaard L, Sorensen AG, Kwong KK, Weisskoff RM, Gyldensted C, et al. (1996) High resolution measurement of cerebral blood flow using intravascular tracer bolus passages. Part II: Experimental comparison and preliminary results. *Magn Reson Med* 36: 726-736.

203. Johnson KM, Tao JZ, Kennan RP, Gore JC (2000) Intravascular susceptibility agent effects on tissue transverse relaxation rates in vivo. *Magn Reson Med* 44: 909-914.
204. Detre JA, Leigh JS, Williams DS, Koretsky AP (1992) Perfusion imaging. *Magn Reson Med* 23: 37-45.
205. Ye FQ, Berman KF, Ellmore T, Esposito G, van Horn JD, et al. (2000) H₂(15)O PET validation of steady-state arterial spin tagging cerebral blood flow measurements in humans. *Magn Reson Med* 44: 450-456.
206. Franke C, van Dorsten FA, Olah L, Schwindt W, Hoehn M (2000) Arterial spin tagging perfusion imaging of rat brain: dependency on magnetic field strength. *Magn Reson Imaging* 18: 1109-1113.
207. Meng X, Fisher M, Shen Q, Sotak CH, Duong TQ (2004) Characterizing the diffusion/perfusion mismatch in experimental focal cerebral ischemia. *Ann Neurol* 55: 207-212.
208. Brinker G, Franke C, Hoehn M, Uhlenkuken U, Hossmann KA (1999) Thrombolysis of cerebral clot embolism in rat: effect of treatment delay. *Neuroreport* 10: 3269-3272.
209. Bardutzky J, Shen Q, Henninger N, Bouley J, Duong TQ, et al. (2005) Differences in ischemic lesion evolution in different rat strains using diffusion and perfusion imaging. *Stroke* 36: 2000-2005.
210. Henninger N, Bratane BT, Bastan B, Bouley J, Fisher M (2009) Normobaric hyperoxia and delayed tPA treatment in a rat embolic stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 119-129.
211. Ostergaard L, Jonsdottir KY, Mouridsen K (2009) Predicting tissue outcome in stroke: new approaches. *Curr Opin Neurol* 22: 54-59.
212. (1995) National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. ; . *N Engl J Med* 333: 1581-1587.
213. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, et al. (1998) Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet* 352: 1245-1251.
214. Toyoda K, Koga M, Naganuma M, Shiokawa Y, Nakagawara J, et al. (2009) Routine use of intravenous low-dose recombinant tissue plasminogen activator in Japanese patients: general outcomes and prognostic factors from the SAMURAI register. *Stroke* 40: 3591-3595.

215. Levy DE, Brott TG, Haley EC, Jr., Marler JR, Sheppard GL, et al. (1994) Factors related to intracranial hematoma formation in patients receiving tissue-type plasminogen activator for acute ischemic stroke. *Stroke* 25: 291-297.
216. Fernandez-Cadenas I, Alvarez-Sabin J, Ribo M, Rubiera M, Mendioroz M, et al. (2007) Influence of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms on tissue-type plasminogen activator-induced recanalization in ischemic stroke patients. *J Thromb Haemost* 5: 1862-1868.
217. Khatri P, Mono ML Combining antithrombotic and fibrinolytic agents: can it be done? *Stroke* 44: 1489-1491.
218. Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, et al. (2009) Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke* 40: 2244-2250.
219. Hermitte L, Cho TH, Ozenne B, Nighoghossian N, Mikkelsen IK, et al. Very low cerebral blood volume predicts parenchymal hematoma in acute ischemic stroke. *Stroke* 44: 2318-2320.
220. Carmichael ST (2005) Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2: 396-409.

LISTE DES PUBLICATIONS ANNE DURAND

Publications dans des revues internationales avec comité de lecture

1/ **Durand A**, Chauveau F, Cho TH, Bolbos R, Langlois JB, Hermitte L, Wiart M, Berthezène Y, Nighoghossian N. [Spontaneous reperfusion after in situ thromboembolic stroke in mice.](#) PLoS One. 2012;7(11):e50083

2/ Marinescu M, Chauveau F, **Durand A**, Riou A, Cho TH, Dencausse A, Ballet S, Nighoghossian N, Berthezène Y, Wiart M. [Monitoring therapeutic effects in experimental stroke by serial USPIO-enhanced MRI.](#) Eur Radiol. 2013 Jan;23(1):37-47.

3/ Marinescu M, Langer M, **Durand A**, Olivier C, Chabrol A, Rositi H, Chauveau F, Cho TH, Nighoghossian N, Berthezene Y, Peyrin F, Wiart M. Synchrotron Radiation X-ray Phase Micro-Computed Tomography as a new method to detect iron oxide nanoparticles in the brain. *Molecular Imaging in Biology*, vol. (in press), 04/2013

4/ **Anne Durand**, Fabien Chauveau, Tae-Hee Cho, Christopher Kallus, Michael Wagner, Florent Boutitie, Delphine Maucort-Boulch, Marlène Wiart, Yves Berthezène, Norbert Nighoghossian. Effects of a TAFI-Inhibitor combined with sub-optimal dose of rtPA in a murine thromboembolic model of stroke. Soumis PloS One. Octobre 2013

Communications affichées

1/ **A. Durand**, F. Chauveau, L. Hermitte, T.H. Cho, Y. Berthezène, N. Nighoghossian, M. Wiart. Acute MRI characterization of in situ thromboembolic stroke in mice. Colloque RITS Renne, 6-8 avril 2011

2/ M. Marinescu, A. Riou, **A. Durand**, F. Chauveau, MG. Blanchin, N. Nighoghossian, M. Wiart, Y. Berthezène. Monitoring minocycline therapy in stroke using magnetic resonance imaging of the mouse brain. Colloque RITS Renne, 6-8 avril 2011

3/ **A. Durand**, F. Chauveau, L. Hermitte, TH Cho, M. Wiart, Y. Berthezene, N. Nighoghossian.
Acute MRI characterization of in situ thromboembolic stroke in mice. WMIC San Diego 7-10
septembre 2012

Communications orales

1/ **A. Durand**. Caractérisation par IRM précoce de la synergie
tPA-inhibiteur du TAFI dans un modèle d'ischémie focale thromboembolique murin.
Premières journées des Neurosciences de l'Hôpital Neurologique. 19 septembre 2013