



HAL
open science

Potentiel thérapeutique d'un agent de la matrice extracellulaire après une ischémie cérébrale : quels effets sur la protection du tissus et la récupération fonctionnelle ? : étude chez le rat et le marmouset commun

Rozenn Le Gal

► **To cite this version:**

Rozenn Le Gal. Potentiel thérapeutique d'un agent de la matrice extracellulaire après une ischémie cérébrale : quels effets sur la protection du tissus et la récupération fonctionnelle ? : étude chez le rat et le marmouset commun. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMC431 . tel-03469012

HAL Id: tel-03469012

<https://theses.hal.science/tel-03469012>

Submitted on 7 Dec 2021

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Potentiel thérapeutique d'un agent de la matrice extracellulaire après une ischémie cérébrale : quels effets sur la protection du tissu et la récupération fonctionnelle? étude chez le rat et le marmouset commun.

**Présentée et soutenue par
Rozenn LE GAL**

**Thèse soutenue publiquement le 29/11/2019
devant le jury composé de**

Mme ISABELLE LOUBINOUX	Directeur de recherche, Université Toulouse 3 Paul Sabatier	Rapporteur du jury
Mme ISABELLE MARGAILL	Professeur des universités, Université Paris 5 Descartes	Rapporteur du jury
M. DENIS BARRITAUULT	Professeur émérite, Université Paris-Est Créteil (UPEC)	Membre du jury
Mme CATHERINE BLOIS-HEULIN	Professeur des universités, Université Rennes 1	Membre du jury
M. THOMAS FRERET	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury

Thèse dirigée par OMAR TOUZANI et MYRIAM BERNAUDIN, Imagerie et Stratégie Thérapeutiques de Pathologies Cérébrales et Tumorales



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



IMAGERIE & STRATÉGIES
THÉRAPEUTIQUES DES PATHOLOGIES
CÉRÉBRALES & TUMORALES

REMERCIEMENTS

Comme on dit : toutes les bonnes choses ont une fin, et l'aboutissement de ce travail est désormais l'occasion pour moi d'exprimer toute la reconnaissance que j'éprouve pour les personnes qui m'ont permis, de près ou de loin, d'en arriver là. Cette partie du manuscrit est très certainement celle qui a été la plus difficile à écrire, tant j'ai peur d'oublier quelqu'un. Et comme je suis plutôt de nature très introvertie, elle me donne également l'opportunité de communiquer certaines choses qui me sont difficiles à exprimer de vive voix.

Tout d'abord, je tiens à exprimer toute ma gratitude envers tous les membres du jury.

Je remercie particulièrement Madame Isabelle Margail, et Madame Isabelle Loubinoux pour l'honneur qu'elles m'ont fait en acceptant d'évaluer ce manuscrit, et pour toute l'attention dont elles ont fait preuve dans l'examen de celui-ci. Un grand merci pour vos remarques pertinentes qui m'ont permis d'améliorer la qualité de ce travail.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements à Monsieur Thomas Fréret pour l'honneur qu'il me fait en participant à ce jury, ainsi que pour les conseils qu'il a pu me fournir au début de mes travaux chez le marmouset.

Je remercie également Madame Catherine Blois-Heulin, tout d'abord pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ces travaux de thèse, mais également pour m'avoir accompagnée durant ces 3 années au sein de mon comité de suivi de thèse. Nos échanges à ces occasions ont toujours été pour moi réconfortants et encourageants.

Un grand merci à Monsieur Denis Barritault de me faire l'honneur de participer à ce jury. Merci pour vos remarques constructives au cours de nos quelques réunions, et la grande réactivité dont vous avez toujours fait preuve durant ces 3 années.

Mes remerciements s'adressent aussi bien évidemment à mes directeurs de thèse, Myriam Bernaudin et Omar Touzani, sans qui je ne serais même pas là à écrire ces quelques mots. Un grand merci à tous les deux pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe, et m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse.

Myriam, je te suis très reconnaissante de m'avoir fait bénéficier de ta franchise, de tes conseils avisés ainsi que de ta rigueur scientifique qui a su guider ce travail jusqu'au bout.

Omar, merci pour ton encadrement toujours ponctué d'une grande patience (et il en fallait !). Merci de m'avoir transmis tes connaissances, et pour la confiance que tu m'as accordée tout au long de ce travail. Tu as toujours su être pédagogue, compréhensif, à l'écoute et disponible et je t'en remercie. Merci également pour le partage de toutes tes jolies photos de voyage, ainsi que pour tes anecdotes et ton humour qui ont permis de faire passer le temps beaucoup plus vite les jours de longues manip avec les marmousets.

Merci à nos ingénieurs de choc Jérôme et Laurent, ainsi qu'à leurs doigts de fée qui ont permis de venir à bout de toutes ces longues journées de chirurgie ! Un grand merci pour votre bonne humeur qui a su rendre ces journées agréables, ainsi que pour votre grande efficacité.

Je souhaite également remercier chaleureusement Carole et Florence, pour leur bienveillance, leur réactivité et toute l'aide qu'elles nous apportent. Merci pour tout, sans vous on serait perdu !

Merci beaucoup à Séverine, Romaric et Claudine, qui ont su prendre soin des « titis » et être toujours accommodants pour que mon travail puisse se passer dans les meilleures conditions possibles.

Une grosse pensée pour les anciens, partis trop tôt mais à jamais dans nos cœurs : Elisa, Gaëlle, Bertille et Yacine.

Elisa, merci pour tous tes moments de folie, tes fous rires, ton esprit pétillant. Sache que j'ai plein de bons souvenirs que je garde précieusement dans mon téléphone ☺. Tu as toujours été là quand ça n'allait pas, tu as toujours su trouver les bons mots pour redonner le sourire. Merci d'être là, merci d'être toi, et merci d'être mon amie.

Gaëlle, parmi les étudiants tu as toujours été comme une seconde maman. Toujours prête à aider, à accorder du temps aux autres lorsque toi-même tu courais après. Tu es l'une des personnes les plus gentilles que je connaisse ! Merci pour ton aide, et merci pour toutes les recommandations de jeux-vidéo, j'ai hâte de pouvoir m'y mettre !

Bertille, j'espère qu'on aura l'occasion de se reprogrammer un Cidre et Dragons ou encore une sortie bateau ! Merci pour tous les bons moments qu'on a pu passer ensemble, et merci énormément pour toutes les fois où tu as babysitté ma boule de poils.

Yacine, *comment pourrais-je t'oublier ?* (J'espère que tu notes bien l'italique pour accentuer !) On a partagé tellement de choses durant ces années : les manips, les potins, les vacances à Porquerolles (mais chut hein), les desserts du Ganil ! Merci pour toute l'aide que tu m'as

apportée, merci de m'avoir épaulée et guidée du début à la fin. Merci pour ta joie de vivre, ton flegme, ton humour et toutes tes « Yacines » qui nous ont bien fait rire. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi ! Oh, et merci d'avoir mis le doigt sur mes « absences » régulières, promis je vais essayer de travailler dessus.

Je remercie également tous les étudiants et copains de bureau à qui il reste encore un peu de temps ou qui viennent de commencer leur thèse : Aurélie, Charly, Ines, Elizabeth, Fatima, Jade et Charlène.

Aurélie et Charly, défoncez tout pendant le temps qu'il vous reste, mais soyez sages surtout ! Merci pour nos discussions, votre dynamisme et tous les petits potins.

Aux petites nouvelles : Fatima, Jade, et Charlène, merci pour votre bonne humeur et la bonne odeur de thé qui régnait dans le bureau. Merci aussi pour le soin contre le rhume qui m'a sauvé la vie plus d'une fois !

Gwenn, on en aura passé des heures enfermées dans le « placard » de comportement toutes les deux ! Que ce soit celui des rats ou des marmousets. Merci pour toutes nos discussions à ces occasions qui ont permis de rendre ces journées plus agréables. C'était un plaisir de pouvoir travailler avec toi ! Une belle amitié s'est formée et je te remercie énormément pour toute l'aide et le soutien que tu m'as apporté. Le moral n'aurait probablement pas été le même si tu n'avais pas été là. J'espère que je serai également en mesure de t'apporter le même soutien jusqu'à la fin de ta thèse ☺.

Je remercie bien évidemment tous les membres de l'équipe CERVOxy que je n'ai pas déjà cités pour l'accueil dont ils ont fait part ces 3 dernières années : Hayriye, Kelly, Fatéméh, Nolwenn, Mégane, Nathalie, Elodie, Karim, Carole, Edwige, Sam, Laurent, Guénaëlle et Jérôme (j'espère que je n'oublie personne !).

Je tiens également à remercier mes copains de Rennes et de Tours. J'ai la chance de m'être entourée d'amis en or au cours de mes années universitaires, et sans eux celles-ci ne se seraient peut-être pas déroulées de la même façon. Ils ont su m'apporter la confiance et l'écoute dont j'avais besoin. Un gros merci donc à Coralie, Justine, Nicolas, Marion, Emeline, Barbara et Eva.

Un immense merci à ma famille sans qui rien n'aurait été possible.

A mes parents, pour m'avoir permis d'atteindre ce niveau, et pour être toujours présents à mes côtés. Merci pour votre soutien sans faille, vos encouragements, votre écoute, vos conseils et

toute l'aide que vous m'apportez régulièrement. Je ne le dis sûrement pas assez souvent, mais sachez que vous êtes de loin les meilleurs parents du monde !

A mes grands-parents, affectueusement surnommés les « G.Ps ». Merci d'être là pour partager ce grand moment avec moi, pour vos attentions et pour tout le soutien que vous m'apportez au quotidien. Merci de vous soucier de mon avenir (Mamimo, ne t'inquiète pas, je vais gérer la recherche d'emploi !). J'espère que je vous serez fiers de moi, et du chemin que j'ai parcouru. Promis je vais faire des efforts pour vous appeler plus souvent !

A mes petites sœurs, Liza et Klervi, qui ont eu le droit, et le *privilège* de me supporter pendant plus de 20 ans. Merci d'être à mes côtés, je sais que dans toutes les situations je peux compter sur vous et ça fait du bien ! J'espère qu'à l'avenir on continuera à passer plein de bons moments ensemble. Je ne le dis pas beaucoup mais je suis fière de vous les frangines.

Un petit mot également pour Melfie, ma grosse boule de poils qui, fidèle à son poste, est collée contre moi en ce moment même.

Enfin, je remercie de tout mon cœur Thibaud. Thibaud, merci de partager ma vie et pour tout l'amour que tu me portes chaque jour. Merci de croire en moi et de toujours me tirer vers le haut. C'est grâce à toi que je peux désormais donner le meilleur de moi-même (même s'il y a encore des progrès à faire). Merci pour ton soutien inébranlable malgré mes sautes d'humeurs. Merci de m'avoir facilité la vie au maximum en prenant soin de moi durant ces derniers mois de travail. Tu m'as tellement apporté que quelque part ce travail est aussi un peu le tien. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu fais pour moi. Tu es de loin la plus belle chose qui me soit arrivée ces dernières années (bon, et peut-être Melfie aussi...). Je t'aime, et j'ai hâte que tous nos futurs projets fleurissent.

Merci à tous de m'avoir accompagné dans cette belle aventure.

SOMMAIRE

TABLE DES ABREVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES TABLEAUX	9
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	10
INTRODUCTION.....	12
1 L'Accident Vasculaire Cérébral chez l'Homme.....	12
1.1 Définition de l'AVC	12
1.2 Facteurs de risque	14
1.3 Symptômes cliniques et séquelles.....	18
2 Physiopathologie de l'ischémie cérébrale.....	21
2.1 Physiologie de la circulation cérébrale	21
2.2 Mécanismes impliqués dans le développement de la lésion ischémique.....	24
2.3 Récupération et régénération post-ischémique	29
2.4 L'apport de l'IRM dans le diagnostic et le suivi de la lésion ischémique	36
3 Approches thérapeutiques de l'ischémie cérébrale.....	43
3.1 Les traitements préventifs	43
3.2 La thrombolyse	44
3.3 La thrombectomie	44
3.4 La rééducation.....	45
4 Nouvelles stratégies thérapeutiques pour l'ischémie.....	46
4.1 Les enjeux de la recherche actuelle : exemple de la thérapie cellulaire	46
4.2 Intérêt de la thérapie matricielle dans l'ischémie cérébrale.....	50
4.3 La thérapie matricielle ou RGTA (ReGeneraTing Agent).....	57
4.4 Le RGTA dans le traitement de l'ischémie cérébrale	60

4.5	La recherche thérapeutique pour l'AVC : les raisons d'un échec.....	62
5	Le marmouset commun : un compromis idéal entre rongeurs et grands primates	64
5.1	Présentation de l'espèce	64
5.2	Avantages du marmouset en tant que modèle animal pour l'ischémie cérébrale ..	65
5.3	Évaluation des déficits fonctionnels chez le marmouset	67
5.4	Modèles d'induction de l'ischémie cérébrale	69
5.5	Évaluation d'agents thérapeutiques chez le marmouset	71
	REVUE : LE GAL ET AL., 2017	72
	OBJECTIFS	102
	ÉTUDE 1 - Effet d'une administration intra-artérielle de RGTA sur la neuroprotection chez le rat soumis à une ischémie cérébrale	104
1	Contexte de l'étude	104
2	Matériel et méthodes.....	105
2.1	Animaux utilisés	105
2.2	Induction de l'ischémie cérébrale	105
2.3	Administration du RGTA par voie intra-artérielle.....	107
2.4	Analyses IRM	107
2.5	Analyses statistiques	108
2.6	Protocole général de l'étude 1.....	108
3	Résultats.....	109
3.1	Données IRM	109
1.1	Mortalité.....	110
4	Discussion	111
	ÉTUDE 2 - Étude de la combinaison de CSMs et de RGTA sur la neuroprotection et la récupération fonctionnelle après ischémie cérébrale chez le rat présentant une hypertension artérielle chronique.....	114
1	Contexte de l'étude	114

2	Matériel et méthodes	115
2.1	Animaux utilisés	115
2.2	Induction de l'ischémie cérébrale	115
2.3	Extraction et culture des CSMs.....	115
2.4	Administration du RGTA seul	116
2.5	Co-administration des CSMs et du RGTA	116
2.6	Analyses IRM	117
2.7	Tests comportementaux	117
2.8	Analyses statistiques	119
2.9	Protocole général de l'étude 2.....	119
3	Résultats	120
3.1	Vérification de l'hypertension	120
3.2	Données IRM	120
3.3	Récupération fonctionnelle	121
4	Discussion	124
	ÉTUDE 3 - Effet du RGTA sur la neuroprotection et la récupération fonctionnelle après ischémie cérébrale chez le marmouset	127
1	Contexte de l'étude	127
2	Matériels et méthodes	128
2.1	Animaux utilisés	128
2.2	Induction de l'ischémie cérébrale	129
2.3	Administration du RGTA par voie intra-artérielle.....	131
2.4	Suivi des paramètres physiologiques	131
2.5	Examens IRM	131
2.6	Analyse des images IRM	134
2.7	Tests comportementaux	136

2.8	Mise à mort des animaux et prélèvements	142
2.9	Analyses statistiques	142
2.10	Protocole général de l'étude 3	143
3	Résultats	143
3.1	Paramètres physiologiques.....	143
3.2	Données IRM	147
3.3	Tests comportementaux	154
3.4	Corrélations entre les données IRM et les résultats comportementaux	159
4	Discussion	161
ÉTUDE 4 - Mise en place de tests cognitifs chez le marmouset, dans un contexte d'ischémie cérébrale		168
1	Contexte de l'étude	168
2	Matériels et Méthodes.....	169
2.1	Habituation et entraînement au CANTAB.....	169
2.2	Entraînement à l'ORD et au DMP	172
3	Résultats.....	176
3.1	Entraînement au CANTAB	176
3.2	Entraînement à l'ORD et au DMP	178
4	Discussion.....	179
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES		185
RÉFÉRENCES		191
ANNEXES		218

TABLE DES ABREVIATIONS

ACA : artère cérébrale antérieure	HSPG : héparane sulfate protéoglycane
ACC : artère carotide commune	HTA : hypertension artérielle
ACE : artère carotide externe	IRM : imagerie par résonance magnétique
ACI : artère carotide interne	MEC : matrice extracellulaire
ACM : artère cérébrale moyenne	MMP : métalloprotéinase
ACP : artère cérébrale postérieure	OACM : occlusion de l'ACM
ADC : coefficient de diffusion apparent	ORD : <i>object retrieval with detour</i>
Ang-1 et -2 : angiopoïétines-1 et -2	PA : pression artérielle
ATP : adénosine triphosphate	PBS : <i>phosphate buffer saline</i>
AVC : accident vasculaire cérébral	PFA : paraformaldéhyde
BDNF : <i>brain-derived neurotrophic factor</i>	PWI : <i>perfusion-weighted imaging</i>
BHE : barrière hémato-encéphalique	RGTA : <i>ReGeneraTing Agent</i>
CANTAB : <i>Cambridge neuropsychological test automated battery</i>	ROS : espèces réactives de l'oxygène
CSM : cellule souche mésenchymateuse	rt-PA : <i>recombinant tissue plasminogen activator</i>
DMP : <i>delayed matching to position</i>	SD : Sprague Dawley
DSC : débit sanguin cérébral	SDF : <i>stromal cell-derived factor</i>
DTI : <i>diffusion-tensor imaging</i>	SHR : <i>spontaneously hypertensive rats</i>
FGF : <i>fibroblast growth factor</i>	TGF-β : <i>transforming growth factor-β</i>
FGFR : <i>fibroblast growth factor receptor</i>	VEGF : <i>vascular endothelial growth factor</i>
FLAIR : <i>fluid attenuated inversionrecovery</i>	VEGFR : <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
GAG : glycoaminoglycane	
HS : héparane sulfate	

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : ILLUSTRATION DES DIFFERENTS TYPES D'ACCIDENT VASCULAIRES CEREBRAUX	13
FIGURE 2 : ILLUSTRATION DES PRINCIPALES ORIGINES D'ISCHEMIE CEREBRALE : LA THROMBOSE ET L'EMBOLIE	14
FIGURE 3 : L'HYPERTENSION ARTERIELLE INDUIT UNE DIMINUTION DE LA LUMIERE VASCULAIRE.....	16
FIGURE 4 : COMPARAISON DU VOLUME LESIONNEL ENTRE DES RATS NORMOTENDUS ET HYPERTENDUS	16
FIGURE 5 : LES SIGNES D'ALERTE DE L'AVC	18
FIGURE 6 : EXEMPLE DE REPRODUCTION DE DESSINS REALISES PAR UN PATIENT SOUFFRANT D'HEMINEGLIGENCE.....	20
FIGURE 7 : VUE INFERIEURE DU CERVEAU LAISSANT APPARAÎTRE LES ARTERES FORMANT LE POLYGONE DE WILLIS.....	21
FIGURE 8 : TERRITOIRES IRRIGUES PAR LES ARTERES CEREBRALES ANTERIEURE, MOYENNE ET POSTERIEURE SUR LA FACE EXTERNE, INTERNE ET INFERIEURE DU CERVEAU	22
FIGURE 9 : PRINCIPE D'AUTOREGULATION	23
FIGURE 10 : FORMATION DE LA PENOMBRE ET DU FOYER ISCHEMIQUE ET LEUR EVOLUTION AU COURS DU TEMPS.....	24
FIGURE 11 : CINETIQUE DES DIFFERENTS EVENEMENTS DE LA CASCADE ISCHEMIQUE.....	25
FIGURE 12 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'EXCITOTOXICITE DU GLUTAMATE APRES UNE ISCHEMIE CEREBRALE.	26
FIGURE 13 : RESUME SCHEMATIQUE DES EVENEMENTS IMPLIQUES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ISCHEMIE CEREBRALE.	29
FIGURE 14 : ILLUSTRATION D'UNE STRATEGIE DE COMPENSATION APRES UNE HEMIPARESIE DU BRAS DROIT.	30
FIGURE 15 : EXEMPLE D'UN RAT REALISANT LE TEST DE PREHENSION.	31
FIGURE 16 : OBSERVATION PAR IRMf DES AIRES CEREBRALES IMPLIQUEES LORS D'UNE TACHE DE FERMETURE DE POING, CHEZ DES SUJETS SAINS ET DES PATIENTS APRES UNE ISCHEMIE CEREBRALE	33
FIGURE 17 : MECANISMES CELLULAIRES DE L'ANGIOGENESE APRES UNE ISCHEMIE CEREBRALE	36
FIGURE 18 : EXEMPLE D'IMAGES OBTENUES CHEZ UN PATIENT EN PHASE AIGUË AVEC UNE SEQUENCE DE DIFFUSION (DTI)	37
FIGURE 19 : EXEMPLE D'HEMATOMES MIS EN EVIDENCE PAR LA SEQUENCE T2*.....	39
FIGURE 20 : EXEMPLE DE MISMATCH OBTENU A PARTIR D'UNE IMAGERIE DE PERFUSION (PWI) ET D'UNE IMAGERIE DE DIFFUSION (ADC).....	40
FIGURE 21 : EXEMPLE D'IMAGE OBTENUE A PARTIR D'UNE IMAGERIE PONDEREE EN T2	40
FIGURE 22 : EXEMPLE D'UNE DATATION D'EVENEMENT ISCHEMIQUE GRACE A LA SEQUENCE FLAIR	41
FIGURE 23 : EXEMPLE D'ANGIOGRAPHIE OBTENUE APRES UNE SEQUENCE 3D TOF	41
FIGURE 24 : EXEMPLE D'UNE SEQUENCE SWI CHEZ UN PATIENT AYANT UNE OCCLUSION DE L'ARTERE CEREBRALE MOYENNE DROITE.	42
FIGURE 25 : EXEMPLE D'UNE LESION ISCHEMIQUE VISIBLE PAR IMAGERIE DE pH EN PHASE AIGUË.....	43
FIGURE 26 : ILLUSTRATION DES DIFFERENTS DISPOSITIFS DE LA THROMBECTOMIE.....	45
FIGURE 27 : EFFET THERAPEUTIQUE D'UNE INJECTION DE CSMS SUR LA RECUPERATION POST-ISCHEMIQUE CHEZ LE RAT.	48
FIGURE 28 : EVOLUTION DU NOMBRE DE CMN (DONT CSMS) EN FONCTION DU TEMPS DANS UN CERVEAU DE RAT ISCHEMIE.....	49
FIGURE 29 : ILLUSTRATION DE LA COMPOSITION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE.....	51
FIGURE 30 : STRUCTURE DES DISACCHARIDES FORMANT LA BASE DES PRINCIPAUX GAG DU TISSU CEREBRAL	52
FIGURE 31 : LES TROIS PRINCIPALES CLASSES DE HSPG.....	52
FIGURE 32 : FONCTIONS DES HSPG DANS LA SIGNALISATION CELLULAIRE	54

FIGURE 33 : CINETIQUE D'ÉVOLUTION DU NOMBRE DE PERLECAN ASSOCIÉS À DES MICROVASCULEUX CHEZ LE BABOUIN SOUMIS À UNE MCAO.	56
FIGURE 34 : STRUCTURE DES HÉPARANES SULFATÉS ET DU RGTA.	58
FIGURE 35 : FONCTIONNEMENT DU RGTA EN RÉPONSE À UNE LÉSION TISSULAIRE.	58
FIGURE 36 : LE RGTA INDUIT UNE ANGIOGÈNESE DE LA MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏQUE D'EMBRYON DE POULET.	59
FIGURE 37 : FENÊTRE THÉRAPEUTIQUE OPTIMALE DU RGTA.	60
FIGURE 38 : EFFET-DOSE DU RGTA APRÈS UNE OACM CHEZ LE RAT.	61
FIGURE 39 LE MARMOUCET COMMUN.	65
FIGURE 40 : CERVEAUX DE 34 ESPÈCES DE PRIMATE EN VUE DORSALE.	67
FIGURE 41 : MODÈLE ADAPTÉ AUX PRIMATES NON HUMAINS DU CANTAB.	69
FIGURE 42 : ARBORISATION CÉRÉBROVASCULAIRE DU MARMOUCET COMMUN.	70
FIGURE 43 : OCCLUSION INTRALUMINALE DE L'ARTÈRE CÉRÉBRALE MOYENNE (OACM).	106
FIGURE 44 : PROTOCOLE GÉNÉRAL DE L'ÉTUDE 1.	108
FIGURE 45 : EFFET-DOSE D'UNE INJECTION INTRA-ARTÉRIELLE DE RGTA SUR LA NEUROPROTECTION POST-ISCHÉMIQUE.	110
FIGURE 46 : DISPOSITIF DU TEST DU CYLINDRE.	117
FIGURE 47 : TEST DU COIN.	118
FIGURE 48 : PROTOCOLE GÉNÉRAL DE L'ÉTUDE 2.	119
FIGURE 49 : MESURE DE LA PRESSION ARTÉRIELLE MOYENNE CHEZ LES RATS SHR PAR RAPPORT À DES RATS NORMOTENDUS.	120
FIGURE 50 : EFFET DE L'ASSOCIATION DE RGTA ET DE CSMs SUR LE VOLUME LÉSIONNEL CHEZ DES RATS HYPERTENDUS.	121
FIGURE 51 : ÉVALUATION DE LA RECUPERATION FONCTIONNELLE.	123
FIGURE 52 : ÉVALUATION DE LA RECUPERATION SENSORIMOTRICE AU MOYEN DU TEST DE L'ADHÉSIF.	124
FIGURE 53 : OCCLUSION INTRALUMINALE DE L'ARTÈRE CÉRÉBRALE MOYENNE CHEZ LE MARMOUCET.	130
FIGURE 54 : IMAGES IRM OBTENUES EN DTI.	132
FIGURE 55 : ANGIOGRAPHIE OBTENUE PENDANT L'OCCLUSION DE L'ARTÈRE, ET APRÈS REPERFUSION.	133
FIGURE 56 : IMAGE IRM OBTENUE APRÈS UNE SÉQUENCE T2*.	133
FIGURE 57 : IMAGES IRM OBTENUES PAR UNE SÉQUENCE ANATOMIQUE T2.	134
FIGURE 58 : SCHEMATISATION DES MISMATCH RÉALISÉS SUR LES CARTES D'ADC OBTENUES ENTRE 30 MINUTES ET 2H30 APRÈS ISCHÉMIE.	135
FIGURE 59 : TEST DE L'ESCALIER VERSION COLLINE.	141
FIGURE 60 : TEST DE L'ESCALIER VERSION VALLÉE.	141
FIGURE 61 : PROTOCOLE GÉNÉRAL DE L'ÉTUDE 3.	143
FIGURE 62 : SUIVI DES PARAMÈTRES SANGUINS APRÈS L'INJECTION DU TRAITEMENT.	146
FIGURE 63 : ÉVOLUTION DU VOLUME LÉSIONNEL LE JOUR DE L'OCCLUSION.	148
FIGURE 64 : VOLUME LÉSIONNEL DE CHAQUE GROUPE À 2H30 POST-ISCHÉMIE.	149
FIGURE 65 : ÉVOLUTION DU VOLUME LA LÉSION VISIBLE EN DTI.	150
FIGURE 66 : IMAGES IRM REPRÉSENTATIVES OBTENUES EN T2.	151
FIGURE 67 : EFFET DU RGTA SUR LE VOLUME LÉSIONNEL.	151
FIGURE 68 : EFFET DU RGTA SUR L'ÉVOLUTION DU VOLUME LÉSIONNEL.	152

FIGURE 69 : ÉVOLUTION DES VALEURS D'ADC (A), DE FA (B), D'AD (C) ET DE RD (D) AU SEIN DE LA LÉSION.	153
FIGURE 70 : ÉVOLUTION DES VALEURS D'ADC (A), DE FA (B), D'AD (C) ET DE (RD) DANS LA PÉNOMBRE.....	154
FIGURE 71 : SUIVI DES SIGNES DE DÉPRESSION DES ANIMAUX APRES ISCHEMIE	155
FIGURE 72 : SUIVI DES SIGNES D'ANXIÉTÉ DES ANIMAUX APRES ISCHEMIE	155
FIGURE 73 : SUIVI DE L'ÉTAT GÉNÉRAL DES ANIMAUX APRES ISCHEMIE.....	156
FIGURE 74 : ÉVALUATION DE LA RECUPÉRATION SENSORI-MOTRICE AU MOYEN D'UN SCORE NEUROLOGIQUE	156
FIGURE 75 : ÉVALUATION DE LA RECUPÉRATION SENSORIELLE AU MOYEN D'UN TEST DE STIMULATION TACTILE.....	157
FIGURE 76 : SUIVI DE LA RECUPÉRATION SENSORIMOTRICE AU MOYEN DU TEST DE L'ÉCALIER EN VERSION COLLINE.....	158
FIGURE 77 : SUIVI DE LA RECUPÉRATION SENSORIMOTRICE AU MOYEN DU TEST DE L'ÉCALIER EN VERSION VALLÉE	159
FIGURE 78 : CAGE DE TRAVAIL POSITIONNÉE DEVANT LE CANTAB DANS LE BOX DE COMPORTEMENT.....	171
FIGURE 79 : PRÉSENTATION DES DIFFÉRENTS NIVEAUX DE DIFFICULTÉ DU « TOUCH-TRAINING ».....	172
FIGURE 80 : DISPOSITIF ET PRINCIPE DE L'ORD.....	173
FIGURE 81 : ÉTAPES INITIALES DE L'APPRENTISSAGE DU DMP.....	175
FIGURE 82 : PRINCIPES DU DMP.....	176
FIGURE 83 : PROGRESSION DE CHAQUE MARMOUSET AU TOUCH-TRAINING.....	177
FIGURE 84 : PROGRESSION DANS L'APPRENTISSAGE DE L'ORD	178
FIGURE 85 : PROGRESSION DANS L'APPRENTISSAGE DU DMP EN CONDITION FACILE	179
FIGURE 86 : PROGRESSION DANS L'APPRENTISSAGE DU DMP EN CONDITION DIFFICILE.....	179

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : RESUMES DES VARIATIONS ATTENDUES DES DIFFERENTES CARTES DE DTI EN FONCTION DES TISSUS.	38
TABLEAU 2 : REDUCTION DU VOLUME LESIONNEL PAR RAPPORT AUX ANIMAUX CONTROLES.	110
TABLEAU 3 : TAUX DE MORTALITE DES ANIMAUX APRES ISCHEMIE CEREBRALE	111
TABLEAU 4 : INFORMATIONS GENERALES DES ANIMAUX INCLUS DANS L'ETUDE.	129
TABLEAU 5 : ITEMS EVALUES LORS DE L'EVALUATION DE L'ETAT GENERAL, DE L'ETAT DEPRESSIF, ET DE L'ETAT D'ANXIETE DES ANIMAUX APRES ISCHEMIE.	138
TABLEAU 6 : ITEMS EVALUES LORS DU SCORE NEUROLOGIQUE.....	139
TABLEAU 7 : SUIVI DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES.....	144
TABLEAU 8 : TABLEAU RESUMANT LES COEFFICIENTS DE CORRELATIONS DE PEARSON OBTENUS DANS LA LESION.	160
TABLEAU 9 : TABLEAU RESUMANT LES COEFFICIENTS DE CORRELATIONS DE PEARSON OBTENUS DANS LA PENOMBRE.	161
TABLEAU 10 : INFORMATIONS GENERALES DES MARMOUSETS ENTRAINES AU CANTAB.....	170

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est un problème majeur de santé publique. Il s'agit actuellement de la deuxième cause de mortalité dans le monde. Pour l'AVC d'origine ischémique, la thrombectomie mécanique et la thrombolyse par rt-PA, qui permettent l'élimination du caillot responsable de l'occlusion, sont à ce jour les seuls traitements disponibles permettant de limiter les dommages causés par l'ischémie. Toutefois, très peu de patients peuvent en bénéficier en raison d'une fenêtre thérapeutique très étroite, et de nombreuses contre-indications. En phase chronique, seule la rééducation physique peut permettre aux patients de récupérer partiellement leurs fonctions sensori-motrices. Au cours des dernières décennies, de nombreuses approches thérapeutiques visant à protéger et/ou réparer le tissu cérébral ont été testées avec succès chez l'animal, mais aucune n'a pour le moment franchi le cap de la mise sur le marché. C'est dans ce contexte de besoin important de nouvelles thérapies que mon travail de thèse s'inscrit.

La formation de la lésion ischémique découle d'une cascade d'évènements cellulaires. Parmi ces évènements, la dégradation de la matrice extracellulaire est directement responsable de la mort neuronale et de la rupture de la barrière hémato-encéphalique. Les travaux de cette thèse font suite à de précédentes études menées au laboratoire, dans lesquelles il a été démontré que l'administration intraveineuse d'un agent matriciel, le RGTA (ReGeneraTing Agent), en association ou non avec des cellules souches mésenchymateuses, avait des effets bénéfiques sur la neuroprotection ainsi que sur la récupération fonctionnelle chez le rat soumis à une ischémie focale.

Afin d'augmenter les chances de succès de cette nouvelle thérapie, nous avons choisi d'étudier ses effets sur des modèles animaux pertinents, en accord avec les recommandations STAIR. En effet, ce comité d'expert s'est penché sur les causes probables des nombreux échecs de translations de l'animal à l'Homme dans le cadre du traitement de l'ischémie cérébrale. L'une des raisons avancée serait le manque d'intégration de facteurs de comorbidité chez les modèles animaux. Une autre explication viendrait de l'éloignement phylogénétique trop élevé entre les espèces de rongeurs, couramment utilisées en recherche préclinique, et l'Homme. Afin d'augmenter les chances de succès de la recherche thérapeutique, il est donc fortement conseillé d'utiliser un modèle animal plus proche de l'Homme, comme un primate non-humain, pour valider les résultats obtenus chez le rongeur, avant tout essai clinique.

Pour ces raisons, une partie des travaux présentés dans ce manuscrit de thèse contribuent à la caractérisation des effets du RGTA couplé ou non à des CSMs, chez des rats atteints d'hypertension artérielle, ainsi que chez le marmouset commun.

Avant d'aborder l'ensemble des travaux menés au cours de cette thèse, nous introduirons dans un premier temps l'AVC, et plus particulièrement l'ischémie cérébrale, son épidémiologie, ses facteurs de risque ainsi que les symptômes pouvant le prévenir et ses séquelles. Nous développerons l'ensemble des événements moléculaires et cellulaires qui interviennent pendant et après une ischémie, ainsi que les méthodes d'imagerie permettant de les détecter. Nous discuterons également des enjeux de la recherche thérapeutique actuelle, et l'intérêt tout particulier de la thérapie matricielle à base de RGTA. Enfin, nous exposerons les éléments qui font du marmouset commun un modèle animal pertinent dans l'étude de l'ischémie cérébrale.

Le premier travail de cette thèse a permis l'évaluation des effets sur l'évolution des dommages cérébraux d'une injection intra-artérielle de RGTA chez le rat soumis à une ischémie focale.

Dans la seconde étude, nous avons étudié l'effet sur la neuroprotection et la récupération fonctionnelle d'une thérapie combinée à base de RGTA et de cellules souches mésenchymateuses après ischémie cérébrale chez le rat atteint d'un facteur de risque majeur et aggravant de l'AVC : l'hypertension artérielle.

Grâce aux résultats obtenus chez le rongeur, nous avons pu par la suite étudier les effets de l'agent matriciel sur la protection du tissu cérébral et la récupération fonctionnelle après ischémie cérébrale chez une espèce de primate non-humain, le marmouset.

Enfin, le dernier objectif de cette thèse a été de mettre en place l'apprentissage de tests cognitifs chez le marmouset, dans le but de pouvoir les intégrer dans le futur à un protocole d'ischémie cérébrale.

INTRODUCTION

1 L'Accident Vasculaire Cérébral chez l'Homme

1.1 Définition de l'AVC

L'AVC, pour Accident Vasculaire Cérébral, est un trouble neurologique qui résulte d'une défaillance soudaine de l'apport sanguin dans une partie du cerveau. L'apport en nutriments et oxygène est stoppé, ce qui entraîne de sévères dommages au niveau du tissu cérébral. L'AVC bénéficie aujourd'hui d'une grande notoriété publique, et pour cause, rien qu'en France, on estime qu'environ 150 000 personnes sont victimes d'un AVC chaque année, soit 1 toutes les 4 minutes, et ce nombre ne cesse d'augmenter (Lecoffre *et al.*, 2017). Selon les dernières données de l'Organisation Mondiale de la Santé, il s'agirait de la seconde pathologie la plus meurtrière au monde, représentée par 10.2 % de l'ensemble des décès annuels (Thrift *et al.*, 2017). Pour les survivants, les séquelles physiques, cognitives, et psychologiques sont nombreuses, ce qui fait également de l'AVC la première cause d'handicap durable chez l'adulte (Ferro *et al.*, 2016; Kessner *et al.*, 2016; Arba *et al.*, 2017). Le coût socio-économique de l'AVC est ainsi très important puisqu'il ne se résume pas qu'aux soins médicaux prodigués lors de l'évènement initial, mais comprend également la prise en charge du handicap des survivants jusqu'à leur décès (De Pourville, 2016). Qui plus est, le vieillissement constant de la population laisse envisager une augmentation des dépenses hospitalières liées à l'AVC (Lecoffre *et al.*, 2017). Les coûts financiers indirects sont également élevés pour la société, notamment lorsque l'AVC survient chez des personnes encore en activité professionnelle. Chez les moins de 45 ans victimes d'AVC, 30 à 50 % ne pourraient pas reprendre une activité professionnelle et 10 % resteraient dépendants pour au moins une activité de la vie quotidienne (Varona, 2010).

On distingue deux catégories principales d'AVC : les hémorragies cérébrales, et les ischémies cérébrales (Figure 1).

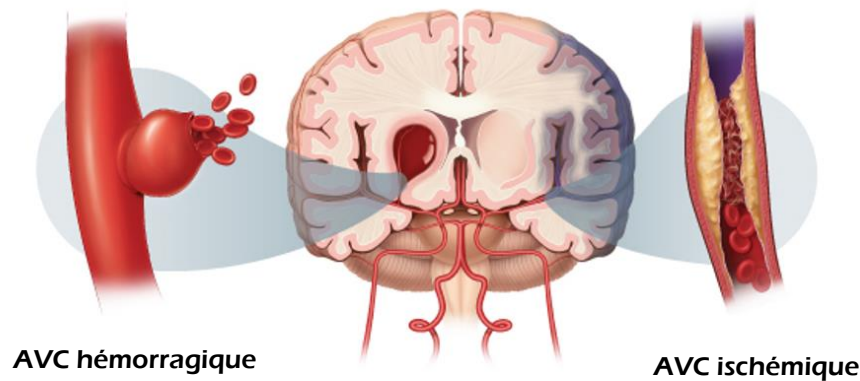


Figure 1 : Illustration des différents types d'Accident Vasculaires Cérébraux (Adapté depuis NeuroVascular Centers of southern California)

1.1.1 L'AVC hémorragique

Les hémorragies cérébrales représentent 10 à 15 % de l'ensemble des AVC. Elles sont la conséquence d'une rupture vasculaire dans le cerveau. Ces AVC se subdivisent en hémorragies sous-arachnoïdiennes, qui, essentiellement, résultent de la rupture d'un anévrisme dans l'espace sous-arachnoïdien, et en hémorragies intra-parenchymateuses définie par une irruption de sang au sein du parenchyme cérébral, causée par la rupture d'un vaisseau intra-parenchymateux.

1.1.2 L'AVC ischémique

La diminution de l'apport sanguin responsable d'un AVC ischémique résulte dans certains cas d'une sténose artérielle, autrement dit d'une réduction du diamètre artériel provoquée par la formation d'une plaque d'athérome. Deux phénomènes occlusifs majeurs sont ensuite généralement responsables de l'obstruction du vaisseau : la thrombose et l'embolie (Figure 2). Un processus thrombotique survient lorsqu'un caillot sanguin se forme au niveau du vaisseau sténosé. Un processus embolique, plus courant, survient lorsqu'un caillot provenant du cœur ou d'un vaisseau plus proximal se décroche et migre jusqu'au cerveau où il va se loger dans un plus petit vaisseau.

La grande majorité des AVC sont d'origine ischémique puisque l'ischémie cérébrale représente près de 85 à 90 % des cas (Lecoffre *et al.*, 2017; Thrift *et al.*, 2017). Pour cette raison, seule l'ischémie cérébrale fera l'objet de cette thèse.

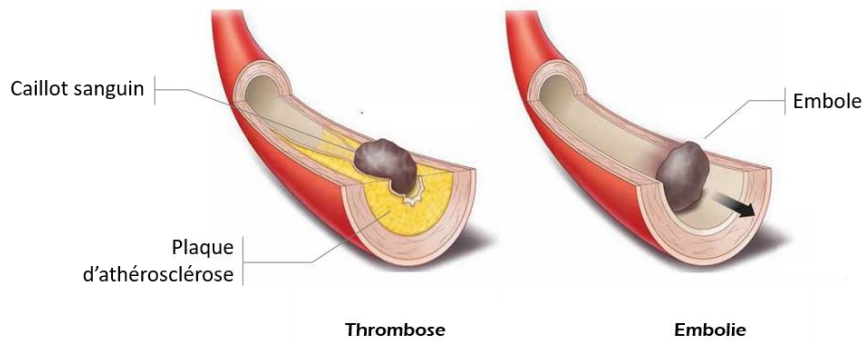


Figure 2 : Illustration des principales origines d'ischémie cérébrale : la thrombose et l'embolie (Adapté du site internet médical aibolita.com)

1.2 Facteurs de risque

Un certain nombre de facteurs contribuent à hauteur de 90 % au risque d'ischémie cérébrale (O'Donnell *et al.*, 2010). Face à l'ampleur de ce fléau, le dépistage et le traitement de ces facteurs constituent un élément essentiel de la prévention des AVC, d'autant que les plus importants (hypertension artérielle, tabagisme, obésité, mauvaise alimentation et sédentarité) sont des facteurs sur lesquels on peut agir. D'autres facteurs tels que l'âge, le sexe, ou la prédisposition génétique sont en revanche immuables. Les facteurs de risque sont ainsi classiquement divisés en deux catégories : les facteurs de risque non modifiables et les facteurs de risque modifiables.

1.2.1 Les facteurs de risque non modifiables

Avec 75 % des patients victimes d'AVC âgés de plus de 65 ans, l'âge apparaît comme le facteur de risque le plus important. Après 55 ans, les possibilités d'avoir un AVC sont multipliées par 2 tous les 10 ans, si bien qu'une personne âgée de plus de 85 ans a 4 fois plus de risques d'être victime d'une ischémie cérébrale que la population générale (Rothwell *et al.*, 2005). De récentes données rapportent toutefois une incidence croissante de l'AVC chez le jeune adulte, et les séquelles dont peuvent souffrir les jeunes survivants entravent la reprise d'une activité professionnelle optimale, ce qui alourdit d'autant plus l'impact économique de la pathologie (Varona, 2010; Smajlović, 2015). Le sexe joue également un rôle dans l'incidence de l'AVC, puisque le risque de maladies cardiovasculaires est 33 % plus élevé chez l'homme que chez la femme (Giroud *et al.*, 2017). Cependant, en raison d'une plus grande longévité des femmes, et du fait que cette pathologie touche majoritairement les personnes âgées, le taux de décès et de séquelles neurologiques liés à un AVC sont plus importants chez la femme que chez

l'homme (Löfmark & Hammarström, 2007). Il a également été observé que l'appartenance à certains groupes ethniques, ainsi que la présence d'antécédents familiaux augmentaient le risque de survenue d'un AVC, ce qui suggère l'implication de différents facteurs génétiques (Chauhan & Debette, 2016).

1.2.2 Les facteurs de risques modifiables

1.2.2.1 L'hypertension artérielle (HTA)

Avec un tiers des adultes concernés, l'hypertension artérielle (HTA) est la pathologie chronique la plus fréquente en France. Elle se définit par une pression artérielle anormalement élevée (supérieure à 140 mmHg pour la pression systolique et 90 mmHg pour la pression diastolique). Le diagnostic de l'HTA est souvent tardif, car elle agit silencieusement, en l'absence de symptômes révélateurs, si bien qu'on estime que 50 % des hypertendus ignorent même en souffrir (Perrine *et al.*, 2018). Le danger de cette maladie n'est pourtant pas anodin, puisque l'HTA est sans conteste le plus important des facteurs de risque modifiables de l'AVC, quel que soit l'âge ou le sexe des patients. Chez les patients hypertendus, le risque d'être victime d'un AVC ischémique est multiplié par 4. Dès que les valeurs de pression artérielle atteignent les 115/75 mmHg (systolique/diastolique), le risque est présent, et augmente de façon proportionnelle à la pression artérielle.

L'HTA induit des altérations structurelles des artères qui se traduisent par un rétrécissement de la lumière du vaisseau. Ce rétrécissement peut être dû à une augmentation de l'épaisseur de la paroi vasculaire (la media) provoqué par une hypertrophie des cellules musculaires lisses. On parle alors de remodelage hypertrophique. Il peut également être lié à un réarrangement des cellules musculaires qui va entraîner une diminution du diamètre de la lumière sans modification de l'épaisseur pariétale. Il s'agit dans ce cas d'un remodelage eutrophique (Figure 3) (Schiffrin, 2004; Pires *et al.*, 2013). Ces modifications vont avoir des répercussions sur les capacités dilatatrices des vaisseaux et peuvent ainsi favoriser l'installation d'un thrombus (Pires *et al.*, 2013).

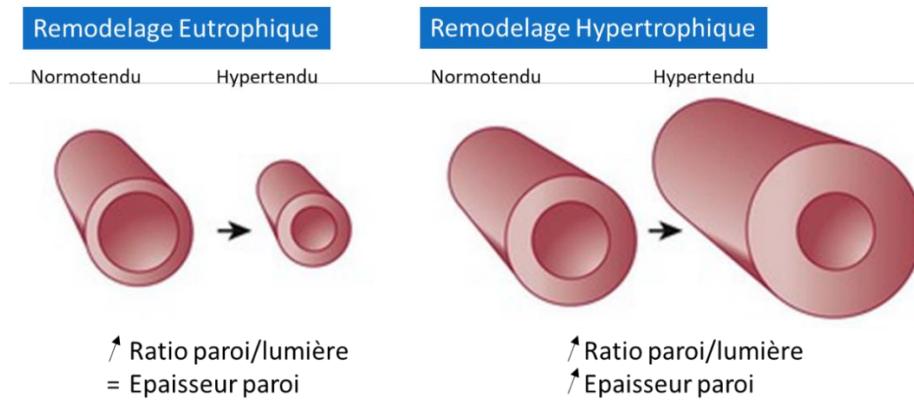


Figure 3 : L'hypertension artérielle induit une diminution de la lumière vasculaire par le biais d'un remodelage eutrophique ou hypertrophique (Adapté de Schiffrin, 2004; Themes, 2016).

La diminution de la lumière vasculaire va également entraîner une diminution de l'apport sanguin à la suite d'une ischémie. En conséquence, en plus d'augmenter le risque de survenue d'un AVC, l'HTA est également un facteur aggravant puisqu'elle engendre des lésions ischémiques plus importantes. Diverses études menées chez l'animal et chez l'Homme ont ainsi démontré que les lésions étaient plus volumineuses chez les individus hypertendus (Duverger & MacKenzie, 1988; Kumar, 2016a). En 1988, Duverger et MacKenzie ont montré que le tissu lésé après une occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez des rats souffrant d'HTA était presque trois fois plus étendu que chez des rats normotendus (Figure 4).

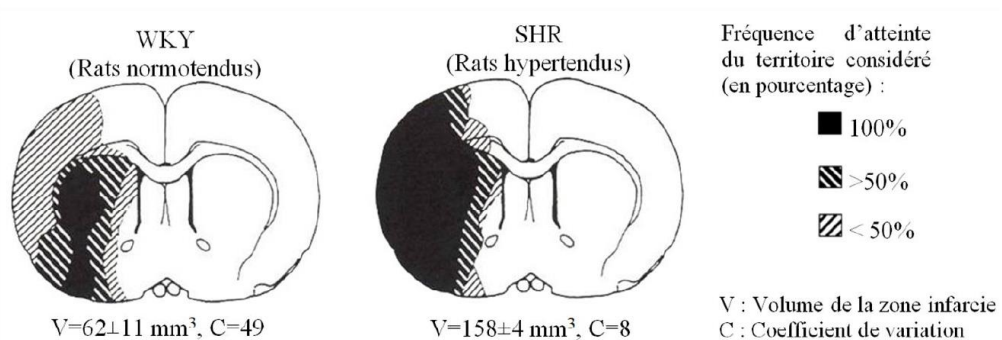


Figure 4 : Comparaison du volume lésionnel entre des rats normotendus et hypertendus (WKY : Wistar Kyoto ; SHR : Spontaneous Hypertensive Rats) (Duverger & MacKenzie, 1988).

Le dépistage et le traitement de l'HTA constituent donc un pilier fondamental des mesures préventives contre l'AVC. Toutefois, tous les patients diagnostiqués comme hypertendus ne sont pas traités par des antihypertenseurs, et seule la moitié des patients traités a une pression artérielle correctement régulée (Perrine *et al.*, 2018).

1.2.2.2 Le tabac

Depuis longtemps, il est établi que le tabagisme est associé à un risque accru (quasiment doublé) d'AVC ischémique (Boehme *et al.*, 2017). Contrairement à ce que l'on pourrait penser, et bien qu'il existe une relation dose-effet entre consommation de tabac et risque d'AVC ischémique (Bhat *et al.*, 2008), le tabagisme n'a pas besoin d'être excessif pour entraîner des dommages vasculaires, et même de petites expositions peuvent s'avérer dangereuses. Ainsi, le rôle du tabagisme passif a été confirmé avec un risque relatif de 1,8 chez les non-fumeurs ou les anciens fumeurs, hommes ou femmes exposés à un environnement de fumeurs (Malek *et al.*, 2015).

1.2.2.3 L'alcool

La littérature scientifique peine à se mettre d'accord quant à la relation entre l'alcool et le risque d'AVC, mais à ce jour, il a été démontré qu'une consommation importante d'alcool (supérieure à 30g par jour, soit environ 2 verres) multiplierait par 2 les risques d'AVC ischémiques, tandis qu'une consommation faible à modérée (inférieure ou équivalente à 30g par jour) n'aurait pas d'incidence sur la survenue d'un AVC (Mazzaglia *et al.*, 2001; Boehme *et al.*, 2017).

1.2.2.4 L'obésité

L'obésité est généralement évaluée au moyen de l'indice de masse corporelle (IMC) et se définit par un IMC supérieur à 30 kg/m². Le risque relatif de survenue d'un AVC ischémique est proche de 2 chez les patients atteints d'obésité. Pour chaque augmentation d'une unité de l'IMC, le risque d'AVC ischémique augmente de 5 %. Ainsi, son rôle est démontré comme facteur indépendant de risque d'AVC, mais ce risque peut également être majoré par l'HTA, le diabète ou l'hypercholestérolémie auxquels l'obésité est souvent associée (Kernan *et al.*, 2013).

1.2.2.5 Le diabète

Le diabète est un facteur de risque important de l'AVC, avec un risque relatif de 2 pour les patients diabétiques. Il a également été démontré que la durée du diabète avait une incidence sur le risque d'AVC puisque ce risque augmente de 3 % chaque année, et triple chez les personnes diabétiques depuis plus de 10 ans (Banerjee *et al.*, 2012). Le diabète est parfois considéré comme un facteur de risque non modifiable de l'AVC, car la correction de la glycémie seule ne réduit pas le risque relatif d'AVC chez le diabétique. En revanche, la

combinaison de différentes thérapies associées à des modifications du comportement permet de réduire ce risque (Gaede *et al.*, 2008).

1.2.2.6 Les causes cardiaques

Les cardiopathies emboligènes sont reconnues depuis longtemps comme étant un des risques majeurs de l'AVC, et sont diagnostiquées chez 1/3 des patients victimes d'une ischémie cérébrale. Elles se définissent comme étant des maladies cardiaques accompagnées de troubles du rythme cardiaque. Ces troubles sont souvent à l'origine de la formation de caillots sanguins pouvant être responsables d'embolies (Arboix, 2015). Fibrillation auriculaire

1.3 Symptômes cliniques et séquelles

« V.I.T.E ». « V » pour visage paralysé, « I » pour incapacité à lever un bras, « T » pour troubles de la parole, et enfin « E » pour extrême urgence (Figure 5). Cet acronyme devrait permettre au plus grand nombre de reconnaître les signes précoces d'un AVC. Malgré cela, encore trop peu de personnes y sont aujourd'hui sensibilisées. La connaissance de ces premiers symptômes caractéristiques est pourtant indispensable à la prise en charge rapide des patients, permettant de limiter les séquelles de l'AVC.

APPRENEZ LES SIGNES DE L'AVC

V ISAGE	I NCAPACITÉ	T ROUBLE DE LA PAROLE	E XTRÊME URGENCE
			
Est-il affaibli?	Pouvez vous lever les deux bras normalement?	Trouble de prononciation?	Composez le 1-1-4

APPRENEZ À RECONNAÎTRE LES SIGNES. PLUS **VITE VOUS RÉAGISSEZ, PLUS **VITE** VOUS SAUVEZ LA PERSONNE.**

Figure 5 : Les signes d'alerte de l'AVC. Le 114 est le numéro national d'appels d'urgence pour les personnes ayant des difficultés à entendre ou à parler (D'après Ambulances-dhuime.fr).

Deux tiers des patients victimes d'ischémie cérébrale gardent des séquelles neurologiques plus ou moins importantes. Parmi ces victimes, 40 % ne retrouveraient pas d'activité autonome dans leur vie quotidienne. Ces séquelles dépendent de la localisation de l'AVC, de sa durée et de son étendue. Elles peuvent être de type moteur, sensoriel, cognitif et psychologique. Ainsi, l'AVC représente la première cause d'handicap acquis non traumatique

chez l'adulte, et également la deuxième cause de démence après la maladie d'Alzheimer (Rist *et al.*, 2013).

1.3.1 Les séquelles motrices

Les déficits moteurs sont liés à une atteinte du cortex moteur primaire, de la capsule interne, des ganglions de la base, de la corona radiata ou du pont de Varole. Ils se traduisent généralement par une hémiparésie, c'est-à-dire une paralysie d'une ou plusieurs parties d'un hémicorps. Cette paralysie, qui peut être complète ou partielle, touche généralement le bras et/ou la jambe, ainsi que le visage. Dans d'autres cas, les troubles moteurs peuvent se traduire par des syncinésies, des contractions musculaires involontaires au cours des mouvements, ce qui gêne leur bonne exécution. Une forme de raideur musculaire, appelée spasticité, peut également apparaître et être source de douleur pour le patient.

1.3.2 Les séquelles sensorielles

Les séquelles sensorielles sont liées à des dommages au niveau de l'aire somesthésique primaire, du thalamus, de la corona radiata et du pont de Varole. Les atteintes somatosensorielles sont courantes après un AVC et toucheraient près de 60 % des victimes. Le plus souvent, ces troubles sont de nature proprioceptive, c'est-à-dire que les patients perdent leur capacité à percevoir la position de différentes parties du corps dans l'espace. Des déficits de la stéréognosie, impliquant une perte des capacités à reconnaître un objet au toucher, sont également fréquemment retrouvés. Ces derniers vont de paire avec une atteinte des sensations tactiles comprenant une perte de la sensation du toucher, une anesthésie thermique, et une perte des sensations douloureuses (Kessner *et al.*, 2016).

1.3.3 Les séquelles cognitives

Bien que fréquentes, les conséquences cognitives de l'AVC sont encore très peu représentées dans la littérature scientifique par rapport aux déficits moteurs et sensoriels. Ces troubles apparaissent généralement dans les 3 mois suivant l'AVC. Étant donné qu'il n'existe pas de standard de diagnostic des troubles cognitifs, il est difficile d'obtenir une prévalence précise de ces séquelles. Aussi, celle-ci varie de 11 à 80 % en fonction des études (Rist *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014). Plusieurs domaines cognitifs peuvent être atteints : la mémoire de travail, l'attention, les fonctions exécutives (résolution de problèmes), le langage, l'orientation et l'héminégligence visuo-spatiale (Al-Qazzaz *et al.*, 2014). Une héminégligence est diagnostiquée chez 85 % des patients ayant une lésion dans l'hémisphère cérébral droit. Les

patients souffrant d'héminégligence perdent toute conscience des objets présents dans leur héli-champ visuel gauche (qui est traité par l'hémisphère droit), bien qu'aucun déficit purement visuel ne soit détecté (Figure 6). Ces patients n'utilisent également plus leur bras gauche (dont le contrôle dépend de l'hémisphère droit), même s'ils ne souffrent pas de troubles moteurs (Trejo-Gabriel-Galan *et al.*, 2016). Sur le long-terme, ces séquelles cognitives sont généralement associées au développement d'un état dépressif chez les patients. En outre, 25 % des personnes souffrant de troubles cognitifs développent une démence dans les 3 années suivant l'AVC (Merriman *et al.*, 2019). Malgré la prévalence des atteintes cognitives, et les preuves existantes de leurs conséquences négatives sur la qualité de vie des patients, la recherche de nouvelles thérapies se focalise encore principalement sur la récupération motrice et sensorielle, occultant la récupération des fonctions cognitives.

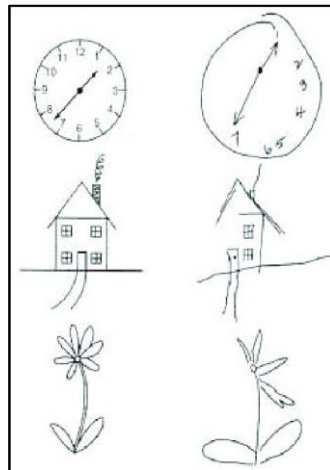


Figure 6 : Exemple de reproduction de dessins réalisés par un patient souffrant d'héminégligence. Le patient ne reproduit que la moitié droite des dessins puisqu'il n'a pas conscience de ce qui apparaît dans son champ visuel gauche à la suite d'une lésion ischémique touchant le lobe pariétal de l'hémisphère droit (Marti, 2016).

1.3.4 Les séquelles psychologiques

L'anxiété et la dépression touchent respectivement un quart et un tiers des victimes, 3 mois après leur AVC (Pariante *et al.*, 2001; Ferro *et al.*, 2016; Chun *et al.*, 2018). La survenue de ces troubles est souvent associée à la présence de plusieurs facteurs : stress, soutien social peu présent, antécédents d'anxiété ou de dépression, et déficits moteurs importants. Les troubles psychologiques post-AVC peuvent être traités classiquement par des anxiolytiques et des antidépresseurs, mais ils ne sont néanmoins pas à négliger puisque leur présence nuit à la qualité de vie, au bon rétablissement et à la récupération fonctionnelle des patients (Alawieh *et al.*, 2018).

2 Physiopathologie de l'ischémie cérébrale

2.1 Physiologie de la circulation cérébrale

2.1.1 Vascularisation cérébrale

Bien qu'il ne pèse qu'1,4 kg en moyenne, soit seulement 2 % du poids du corps, le cerveau humain est un organe gourmand qui nécessite 20 % de la consommation totale en oxygène, et 25 % de la consommation en glucose. Sa très haute activité métabolique (et l'absence de réserves énergétiques) requiert donc un système vasculaire très performant pourvu d'un système d'autorégulation qui lui permet de maintenir un débit sanguin constant dans l'encéphale, quelle que soit la pression artérielle et la demande métabolique.

Pour mieux visualiser la vascularisation cérébrale, je vous propose de vous reporter au schéma suivant :

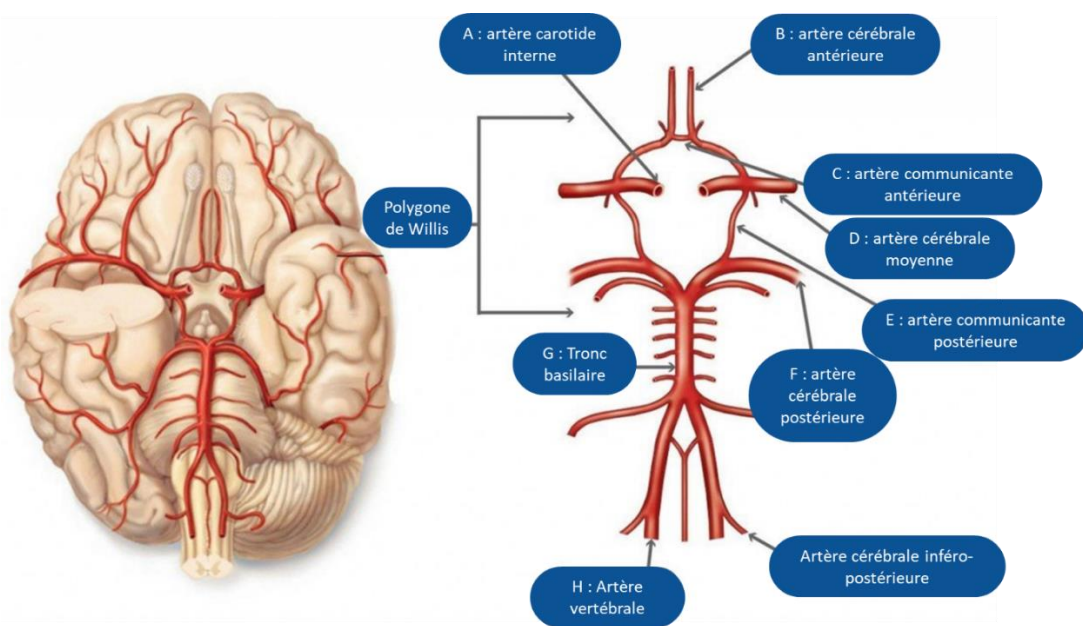


Figure 7 : Vue inférieure du cerveau laissant apparaître les artères formant le polygone de Willis (Adapté de Ashish, 2017).

Le cerveau est irrigué par deux artères carotides internes et deux artères vertébrales. Les artères carotides internes (Figure 7A), situées en avant du cou, donnent naissance aux artères cérébrales antérieures (Figure 7B), reliées entre elles par l'artère communicante antérieure (Figure 7C), ainsi qu'aux artères cérébrales moyennes (Figure 7D). Les artères vertébrales (Figure 7H) sont situées en arrière du cou, et se rejoignent pour former le tronc basilaire (Figure 7G) qui se divise pour donner naissance aux artères cérébrales postérieures (Figure 7F) et aux artères communicantes postérieures (Figure 7E). Ces dernières, comme leur nom l'indique,

unissent les artères postérieures et les artères carotides internes. L'ensemble de ces vaisseaux constitue un cercle artériel fermé, dit en anastomoses, appelé « Polygone de Willis ». Cette configuration joue un rôle important dans le cadre d'une ischémie cérébrale, car en cas d'occlusion unilatérale d'une carotide, elle va permettre, dans une certaine limite, une compensation en apport sanguin provenant des autres artères (Karatas *et al.*, 2015).

Chacune de ces artères est responsable de l'irrigation d'un territoire cérébral (Figure 8). L'artère cérébrale antérieure vascularise le lobe frontal ainsi que la face interne du lobe pariétal. L'artère cérébrale moyenne nourrit la face externe du lobe temporal et pariétal, ainsi qu'une petite partie du lobe frontal. Elle participe également à la vascularisation du noyau lenticulaire et de la partie antérieure de la capsule interne. Enfin, l'artère cérébrale postérieure est chargée d'irriguer la face interne du lobe temporal et le lobe occipital.

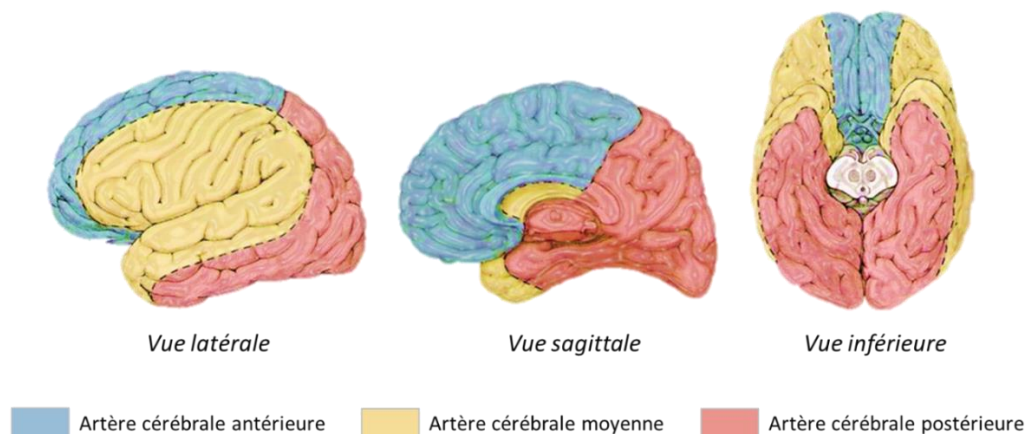


Figure 8 : Territoires irrigués par les artères cérébrales antérieure, moyenne et postérieure sur la face externe, interne et inférieure du cerveau (Adapté de Kaplan, 1977)

L'artère cérébrale moyenne (ACM) occupe une place particulièrement importante dans la recherche sur l'ischémie cérébrale, car il s'agit de l'artère la plus communément touchée par cette pathologie chez l'Homme (Thrift *et al.*, 2017).

2.1.2. Foyer et pénombre ischémique

Le système vasculaire cérébral est un système dynamique doté d'un mécanisme permettant de maintenir un débit sanguin cérébral (DSC) constant malgré des variations de la pression de perfusion : c'est ce qu'on appelle l'autorégulation (Ozturk & Tan, 2018). En conditions physiologiques, le DSC est ainsi maintenu autour de 50 mL/100 g/min. Toutefois, l'autorégulation ne peut s'effectuer que si la pression de perfusion est comprise entre des

valeurs de 60 à 150 mmHg, au-delà de ces valeurs, le DSC n'est plus régulé et devient pression-dépendant (Figure 9). De manière générale, on parle d'ischémie lorsque le DSC descend sous des valeurs de 20 mL/100 g/min car l'apport énergétique n'est alors plus suffisant pour subvenir aux besoins des cellules. Un DSC inférieur à 10 mL/100 g/min induit des dommages cellulaires irréversibles (Schell *et al.*, 1993).

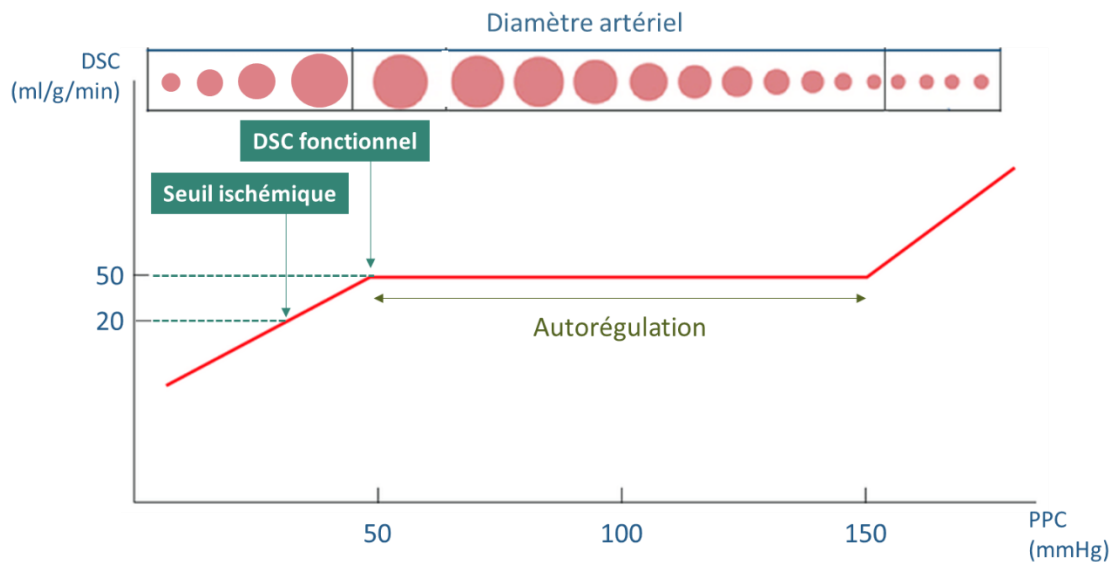


Figure 9 : Évolution du débit sanguin cérébral (DSC) en fonction de la pression de perfusion cérébrale (PPC) et principe d'autorégulation (D'après Hall *et al.*, 2019).

Le DSC au niveau de la lésion ischémique n'est pas homogène et deux régions principales se distinguent : la pénombre et le foyer ischémique. L'identification de ces deux régions remonte à la fin des années 70, dans des travaux qu'Astrup et collaborateurs ont mené sur le primate non-humain (Astrup *et al.*, 1977). Ils caractérisent le foyer ischémique comme étant le cœur de la lésion, c'est-à-dire la région du cerveau la plus sévèrement atteinte, dont l'irrigation dépendait entièrement du vaisseau obstrué. Dans le foyer, le DSC est inférieur à 10 mL/g/min, et le manque énergétique entraîne irrémédiablement une mort cellulaire rapide par nécrose. La pénombre ischémique, quant à elle, se situe autour du foyer et est décrite comme étant une zone dont le DSC est compris entre 10 et 20 mL/g/min, et dont l'irrigation peut être partiellement compensée par d'autres vaisseaux. De cette façon, l'apport énergétique est suffisant pour que les neurones puissent rester structurellement intacts mais fonctionnellement inactifs. Dans la pénombre, le tissu est en souffrance et les neurones demeurent dans un état quiescent, mais ils ne sont pas engagés dans un processus de mort cellulaire, et peuvent encore être sauvés par une revascularisation efficace ou par de potentielles thérapies neuroprotectrices qui en font leur

cible de prédilection (Ghobrial *et al.*, 2014). Toutefois, l'état des neurones de la pénombre n'est pas constant, et si le débit sanguin n'est pas rapidement rétabli (par thrombolyse ou thrombectomie), les dommages cellulaires deviennent peu à peu irréversibles, augmentant la zone nécrosée (Figure 10). Chez l'Homme, on estime que la disparition de la pénombre au profit du foyer ischémique se fait généralement en 4h30 après le début de l'occlusion (Figure 10). C'est la raison pour laquelle la prise en charge des patients est extrêmement urgente dès l'apparition des premiers symptômes. Cependant, de nouvelles données basées sur des techniques d'imagerie cérébrale ont démontré, chez certains patients, la présence d'une pénombre jusqu'à 48 h après le début de l'ischémie (Heiss *et al.*, 1992; Markus *et al.*, 2004; Davis & Donnan, 2014). Ces résultats sous-entendent qu'il serait possible d'étendre la fenêtre thérapeutique des traitements au-delà des 4h30 établies.

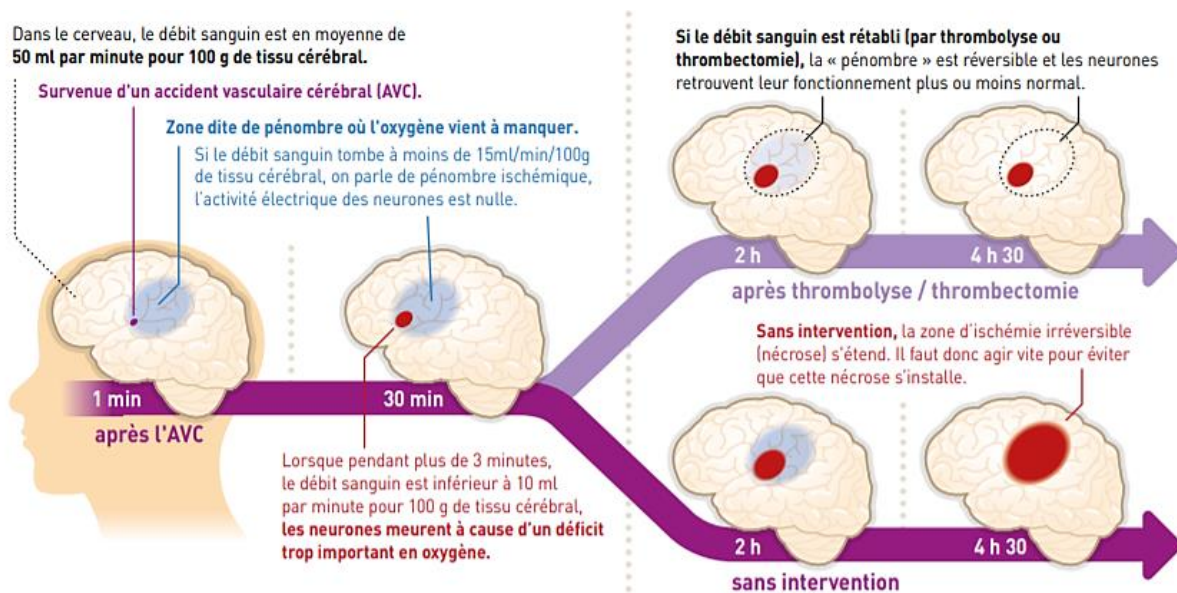


Figure 10 : Formation de la pénombre et du foyer ischémique et leur évolution au cours du temps (©Lorenzo Timon).

2.2 Mécanismes impliqués dans le développement de la lésion ischémique

La formation de la lésion ischémique découle d'une série d'événements cellulaires et moléculaires appelée cascade ischémique (Dirnagl *et al.*, 1999). Certains de ces éléments, comme l'excitotoxicité, ou le stress oxydant, débutent immédiatement après l'occlusion du vaisseau. D'autres, comme la réaction inflammatoire et l'apoptose, se mettent en place quelques heures après le début de l'ischémie et prolongent leur activité pendant plusieurs semaines (Figure 11).

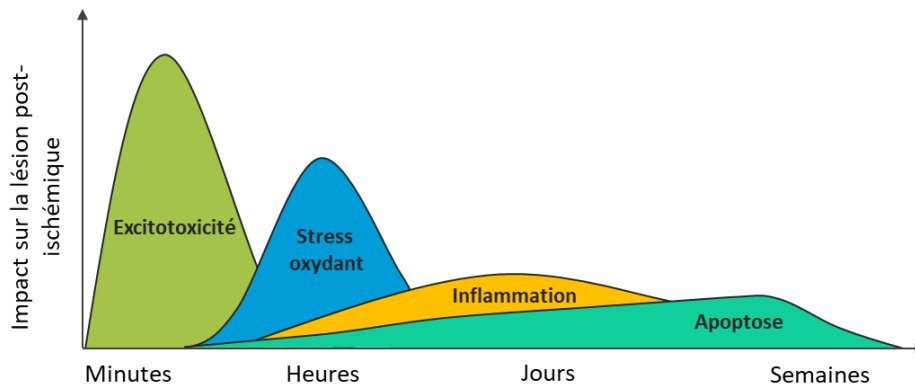


Figure 11 : Cinétique des différents événements de la cascade ischémique (D'après Dirnagl et al., 1999).

2.2.1 L'excitotoxicité

Puisqu'il ne dispose d'aucune réserve énergétique, le cerveau est totalement dépendant d'un apport sanguin constant pour pouvoir assurer ses fonctions. Lorsque cet apport cesse et que l'oxygène et le glucose viennent à manquer dans une région du cerveau, la glycolyse ne peut plus se faire dans des conditions normales d'aérobie, ce qui entraîne une accumulation de lactate dans les cellules, et donc une acidose. De plus, la production cellulaire d'adénosine triphosphate (ATP) n'est plus réalisée à cause d'un arrêt de la phosphorylation oxydante. Or l'équilibre cellulaire ionique est assuré par des pompes dont le fonctionnement dépend directement de l'ATP. Le déficit en ATP provoque ainsi des perturbations des pompes ioniques dépendantes de l'ATP, qui auront pour conséquence une accumulation délétère de calcium dans les cellules. Ce déséquilibre ionique entraîne une dépolarisation des membranes neuronales, et, par conséquent, une libération massive de glutamate dans le milieu extracellulaire. Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur, et sa fixation aux récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et AMPA (μ -amino-3-hydroxy-5methyl-4-isoxazole propionic acid) entraîne une entrée massive des ions Ca^{2+} , Cl^- et Na^+ dans la cellule (Figure 12). De ce fait, l'homéostasie ionique est d'autant plus perturbée, et la conséquence principale en sera une accumulation d'eau dans la cellule. C'est ce qui provoque l'œdème cytotoxique (Xing *et al.*, 2012).

2.2.2 La formation des radicaux libres oxygénés

L'excès de calcium dans les cellules entraîne l'activation de nombreuses enzymes qui vont générer une production de radicaux libres oxygénés (Figure 12). Lorsqu'ils sont en concentration trop importante, ces radicaux libres sont particulièrement toxiques pour les cellules car ils peuvent altérer la structure de l'ADN, dénaturer des protéines et causer des

dommages au niveau de la mitochondrie, de la membrane et du cytosquelette ce qui aura pour conséquence la mort de la cellule (Xing *et al.*, 2012).

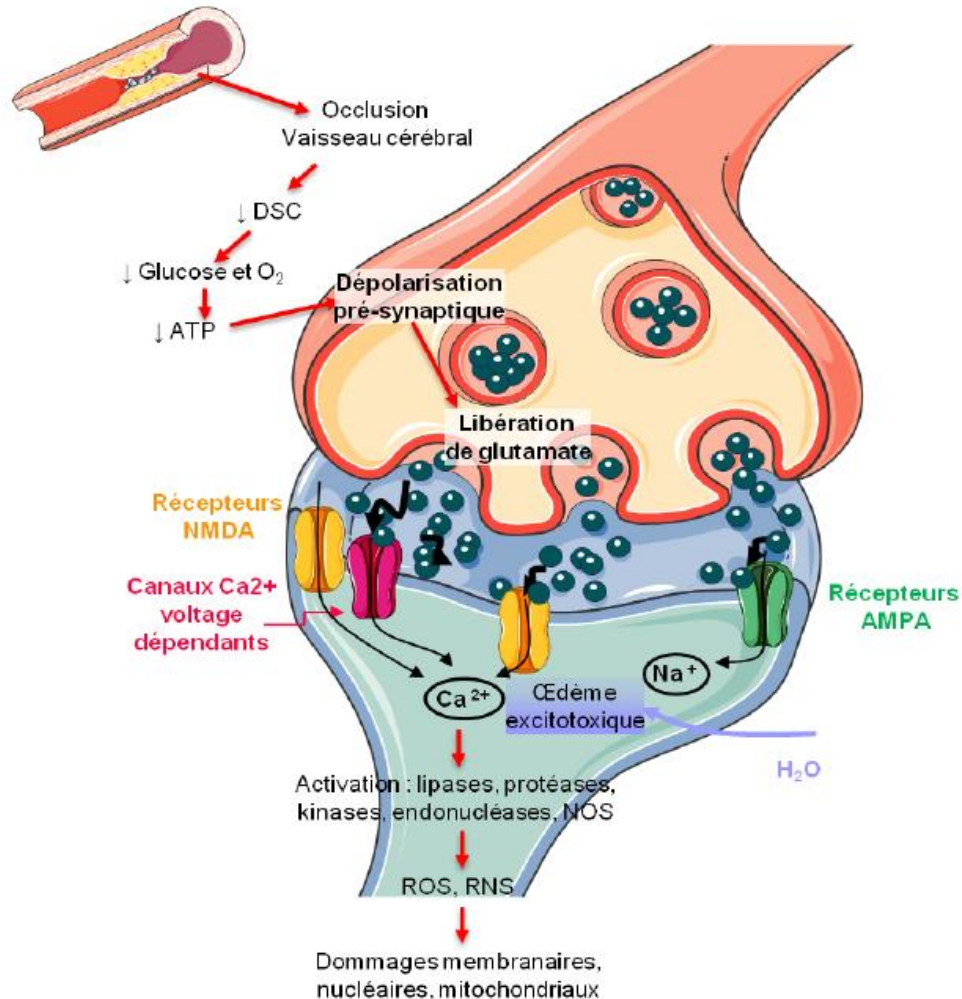


Figure 12 : Représentation schématique de l'excitotoxicité du glutamate après une ischémie cérébrale. ATP : adénosine triphosphate ; DSC : débit sanguin cérébral ; NOS : monoxyde d'azote synthétase ; ROS, RNS : espèces réactives à l'oxygène ou à l'azote (Thèse Annelise Letourneur, 2010).

2.2.3 La réaction inflammatoire

Dans le tissu lésé, une neuroinflammation se met en place en réponse à des signaux libérés par les cellules mourantes ou soumises à un stress important. Les cellules microgliales sont les premières à être activées. La microglie représente l'immunité résidente du compartiment cérébral. Les cellules microgliales scannent en permanence leur environnement et peuvent réagir rapidement à tout type de changement. Dans le cadre d'une ischémie, la réponse microgliale est à son apogée entre 48 et 78 h après l'ischémie, mais elle peut se

prolonger sur une ou plusieurs semaines. Une infiltration de macrophages s'opère également des suites de la rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ceux-ci vont migrer jusqu'au tissu ischémique et soutenir l'action des cellules microgliales. En condition physiologique, ces cellules sont caractérisées par un petit corps cellulaire et de fins prolongements. Lorsque la microglie s'active, elle subit des modifications morphologiques et évolue vers des formes moins ramifiées avec un corps cellulaire plus grand ou des formes typiquement amiboïdes qui la rendent alors identique aux macrophages. Il a été prouvé que la réaction inflammatoire post-ischémique pouvait être délétère pour le tissu en souffrance, car les cellules immunitaires ainsi activées vont entraîner une libération de radicaux libres oxygénés, de métalloprotéases matricielles, et de cytokines pro-inflammatoires qui vont conduire à des dommages secondaires. Toutefois, la réaction inflammatoire post-ischémie peut également avoir des effets bénéfiques puisque les cellules immunitaires peuvent également sécréter des cytokines anti-inflammatoires qui aident à la survie des neurones, et guider la migration des cellules souches jusqu'au site de la lésion pour favoriser la neurogenèse. Les cellules microgliales et les macrophages ont également une activité phagocytaire qui permet l'élimination des cellules mortes et la sécrétion de facteurs de croissances comme IL-10 et TGF- β . Ces facteurs inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires et joueraient un rôle dans les processus de neuroprotection et neurorégénération (Xing *et al.*, 2012; Kawabori & Yenari, 2015).

Les astrocytes sont des cellules gliales qui peuvent également s'activer après une ischémie cérébrale. L'activation astrocytaire mène à la formation de la cicatrice gliale. Cette cicatrice permet d'isoler le tissu endommagé et d'éviter des dommages collatéraux, liés à la réaction inflammatoire, jusqu'au tissu sain qui l'entoure. Mais en agissant comme une barrière, cette cicatrice gliale gêne également la croissance axonale, limitant la réparation du tissu (Kawabori & Yenari, 2015). Les astrocytes activés vont également sécréter des facteurs de croissance comme le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) qui peuvent jouer un rôle crucial dans les processus de régénération tels que l'angiogenèse et la neurogenèse (Schmid-Brunclik *et al.*, 2008).

2.2.4 La mort cellulaire par apoptose

Après tous ces événements, un destin funeste attend les cellules de la zone ischémique. Alors que l'excitotoxicité a déjà entraîné la nécrose des cellules du foyer, c'est bien souvent une mort cellulaire programmée par apoptose qui prédomine dans la pénombre. Pour rappel, le déficit énergétique provoqué par l'ischémie entraîne une série d'évènements menant à une

production importante de radicaux libres de l'oxygène toxiques pour les cellules. Ces radicaux libres causent des dommages au niveau de l'ADN, ce qui entraîne une activation de la cascade apoptotique conduite par voie nucléaire. En outre, l'apoptose peut également être générée par voie mitochondriale suite aux dommages mitochondriaux causés par les radicaux libres, ou à l'augmentation intracellulaire de calcium (Deb *et al.*, 2010).

2.2.5 Dégradation de la Matrice Extracellulaire (MEC) et de la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE)

L'augmentation de l'activation de métalloprotéases matricielles (MMPs) fait également partie de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. En conditions physiologiques, les MMPs jouent un rôle fondamental dans le remodelage de la MEC et contribuent à l'homéostasie cellulaire. L'activité de ces enzymes participe à de nombreux processus physiologiques tels que la prolifération, la différenciation, la migration et la mort cellulaires (Rivera *et al.*, 2004). Cependant, après une ischémie, la microglie, les macrophages, ainsi que les astrocytes impliqués dans les réactions inflammatoires et gliales entraînent une forte production de MMPs dans la zone péri-lésionnelle (Rosenberg *et al.*, 2001). En dégradant la MEC, ces protéases contribuent de manière directe à l'anoïkis des cellules, une forme d'apoptose qui résulte de la perte d'interactions entre les cellules et la MEC (Gu *et al.*, 2002). Des études chez le rat ont démontré que seule l'expression de deux sous-types de MMPs était augmentée dans le tissu ischémique : les MMP-9 et les MMP-2 (Rosenberg *et al.*, 2001). Toutefois, seules les MMP-9 semblent impliquées dans la physiopathologie de l'ischémie. En effet, une réduction du volume lésionnel est observée chez un modèle murin d'ischémie cérébrale après inhibition des MMP-9 (Asahi *et al.*, 2000), mais ce résultat n'est pas retrouvé après une inhibition des MMP-2 (Asahi *et al.*, 2001). Ces résultats semblent être en adéquation avec les données cliniques, qui rapportent une corrélation positive uniquement entre le taux de MMP-9 retrouvé dans le sérum et le volume lésionnel (Montaner *et al.*, 2001).

Durant la phase aiguë de l'ischémie, les MMP-9 participent également à la rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) en agissant sur les jonctions entre les cellules endothéliales et la MEC constituant la membrane basale (Figure 13) (Kim & Han, 2006). La BHE est considérée comme la première ligne de défense du cerveau. Grâce à ses jonctions serrées et adhérentes, elle est imperméable aux macromolécules, et empêche leur migration du compartiment sanguin vers le parenchyme cérébral. L'ouverture de la BHE va entraîner, d'une part, l'entrée de leucocytes circulants dans le parenchyme, ce qui contribue à la réaction

inflammatoire, mais également l'entrée massive d'eau dans le tissu interstitiel. C'est ce qu'on appelle l'œdème vasogénique. Cet œdème va augmenter la pression intracrânienne et ainsi contribuer aux dommages ischémiques secondaires en aggravant la perfusion vasculaire (Abdullahi *et al.*, 2018).

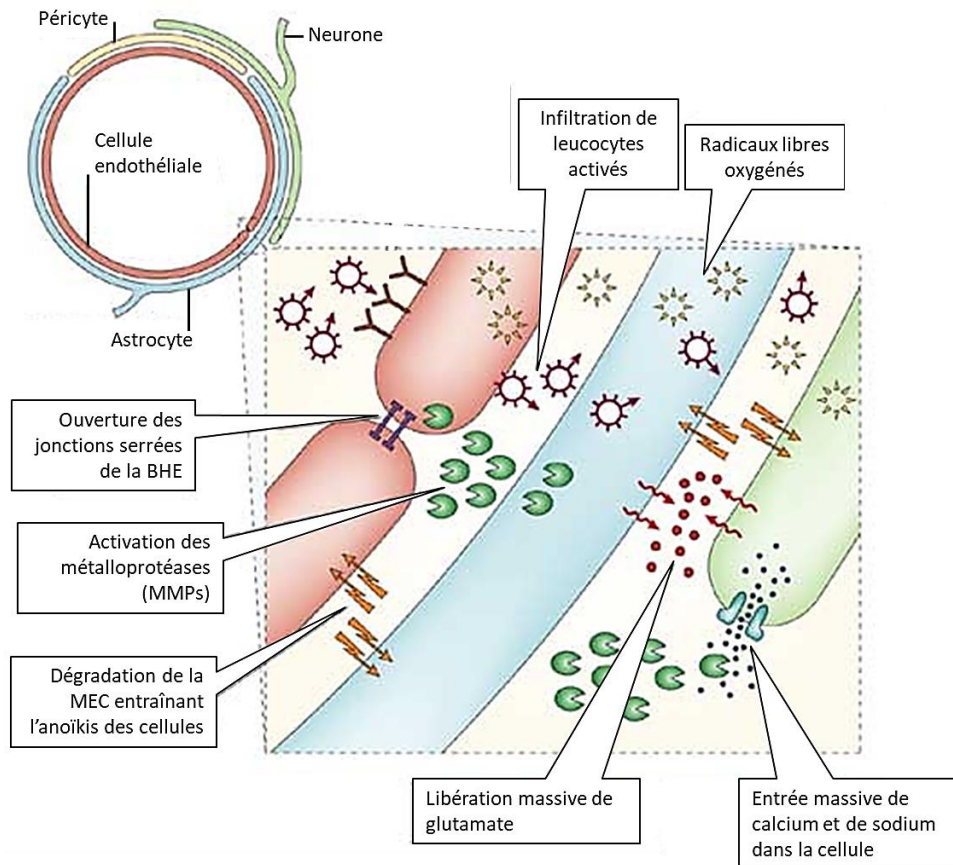


Figure 13 : Résumé schématique des événements impliqués dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. Le manque énergétique provoqué par l'arrêt d'afflux sanguin entraîne une libération massive de glutamate ayant pour conséquence un déséquilibre ionique et une entrée massive de calcium dans les neurones. L'excès de calcium va entraîner la production de radicaux libres oxygénés, responsables de nombreux dommages cellulaires. Dans le parenchyme, les cellules immunitaires endogènes (la microglie) produisent des métalloprotéases matricielles (MMPs). Ces MMPs vont dégrader la matrice extracellulaire (MEC), et par conséquent, générer une mort cellulaire par anoïkis, ainsi que l'ouverture des jonctions serrées des cellules endothéliales composant la barrière hémato-encéphalique (BHE). Enfin, la rupture de la BHE permet l'infiltration d'eau et de leucocytes dans le parenchyme. Ces leucocytes vont s'allier à la microglie et renforcer la réponse inflammatoire, entraînant encore d'avantage la production de radicaux libres oxygénés et de MMPs (Adapté de Lo *et al.*, 2003).

2.3 Récupération et régénération post-ischémique

Dans les cas où la lésion ischémique n'est pas fatale, elle n'en reste pas moins une grande source d'handicap pour les survivants. Cependant, dès les premiers jours qui suivent l'accident

vasculaire, une récupération fonctionnelle spontanée est observée chez les patients. En effet, plusieurs mécanismes cellulaires et comportementaux se mettent en place et permettent une amélioration notable des déficits moteurs et sensoriels.

2.3.1 Le phénomène de compensation

En réponse à l'incidence très importante des déficits moteurs après une ischémie cérébrale, de nombreux patients utilisent une stratégie de compensation comportementale. Cette stratégie désigne les ajustements moteurs qui vont être mis en place pour pallier le handicap et permettre l'exécution de certaines tâches. Prenons l'exemple des déficits moteurs touchant le membre supérieur d'un hémicorps (bras et main). Pour la plupart des tâches du quotidien, l'utilisation de nos deux mains est nécessaire. La réponse adaptative la plus commune au dysfonctionnement moteur d'une de ces mains est de se reposer davantage sur celle qui n'est pas handicapée (Figure 14c). L'utilisation du tronc et de l'épaule est également renforcée lorsqu'il s'agit d'atteindre des objets avec le bras atteint (Figure 14b) (Jones, 2017).

La compensation est souvent confondue avec la récupération fonctionnelle. Il s'agit pourtant de deux phénomènes distincts. Tandis que la compensation se réfère à la mise en place d'une nouvelle stratégie adaptative en assistant ou détournant l'utilisation du membre handicapé, la récupération fonctionnelle se définit comme étant une réapparition de l'ancien pattern moteur présent avant la lésion ischémique (Jones, 2017).

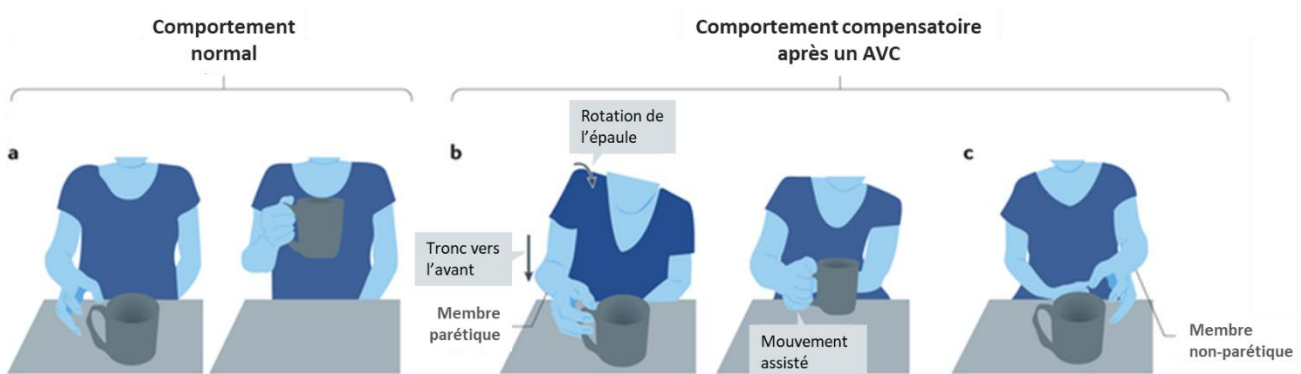


Figure 14 : Illustration d'une stratégie de compensation après une hémiparésie du bras droit. L'illustration (a) nous montre les mouvements typiquement réalisés pour atteindre et attraper un objet. Après un AVC, une rotation de l'épaule et un mouvement du tronc vers l'avant vont assister le bras parétique (qui souffre d'une paralysie partielle) pour compenser le déficit et permettre le succès du mouvement (b). Il arrive également que les patients mobilisent un soutien du bras non-parétique pour réaliser la tâche (b). Le plus souvent, lorsque la mobilisation des deux bras n'est pas nécessaire, le bras non-parétique est utilisé (c) (D'après Jones, 2017).

Des phénomènes de compensation ont également pu être mis en évidence chez l'animal. Une tâche de préhension a notamment été développée chez le rat afin de permettre une distinction entre phénomène de compensation, et une récupération « réelle ». Ce test consiste à

observer les mouvements fins des membres antérieurs du rat lorsque celui-ci attrape une récompense à travers une petite ouverture (Figure 15). Les performances des animaux sont évaluées avant puis après ischémie. Grâce à un système d'enregistrement vidéo, 20 mouvements et postures sont analysés et scorés, ce qui permet de déterminer avec une grande précision si l'animal parvient à attraper la récompense en employant une stratégie compensatoire (en s'aidant du membre non atteint), ou en récupérant son comportement initial (Krakauer *et al.*, 2012). Plusieurs constats ont pu être dégagés de l'utilisation de ce test chez le rat. Premièrement, il semblerait que chez les individus souffrant d'une lésion massive, l'amélioration des fonctions motrices se traduit majoritairement par l'adoption de nouveaux comportements compensatoires (Metz *et al.*, 2005). Deuxièmement, lorsque la lésion épargne une partie du cortex moteur, une compensation est affichée en phase aiguë, mais les animaux affichent une récupération partielle en phase chronique (Moon *et al.*, 2009). Ceci suggère que les neurones épargnés de la zone péri-lésionnelle jouent un rôle dans la récupération fonctionnelle. Les mécanismes sous-jacents aux phénomènes de compensation et de récupération sont liés et font notamment appel à la plasticité cérébrale, la neurogenèse et l'angiogenèse (Castro-Alamancos & Borrel, 1995).

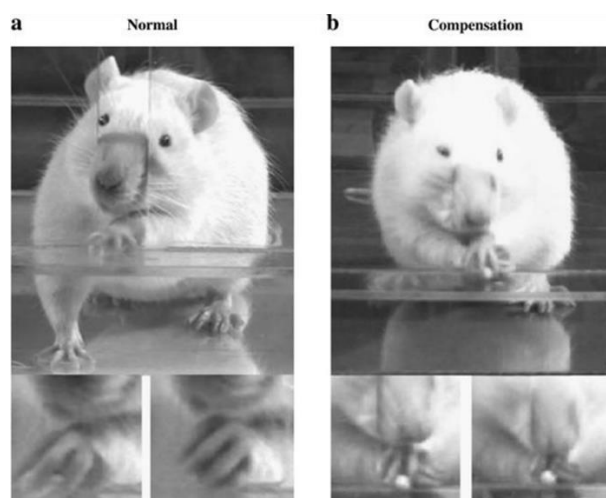


Figure 15 : Exemple d'un rat réalisant le test de préhension a) de façon normale, puis b) en adoptant des mouvements compensatoires (utilisation de la deuxième patte et rotation de l'épaule) (Wu *et al.*, 2009).

2.3.2 La plasticité cérébrale

Contrairement aux croyances qui ont longtemps été populaires, le cerveau n'est pas un organe immuable. Au contraire, il est capable d'évoluer et de s'adapter quel que soit son âge. La plasticité cérébrale, ou neuroplasticité, décrit cette capacité du cerveau à se modifier en

fabriquant de nouvelles connexions neuronales en réponses à différents stimuli. Chez l'Homme, ce phénomène est décrit au cours du développement cérébral et de l'apprentissage. Grâce à des outils d'imagerie fonctionnelle, l'implication d'une plasticité cérébrale dans la récupération fonctionnelle post-AVC a récemment été mise en évidence (Johansson, 2000; Loubinoux *et al.*, 2017). Dans les premiers jours suivant l'ischémie, de nombreuses études en imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) ont démontré que l'hémisphère controlatéral (hémisphère sain) prenait temporairement le relais du cortex ipsilatéral (hémisphère lésé). Autrement dit, les fonctions normalement prises en charge par l'hémisphère ipsilatéral sont transférées à l'hémisphère controlatéral (Loubinoux *et al.*, 2017; Coleman *et al.*, 2017). Prenons l'exemple de patients paralysés de la main droite après un AVC au niveau de l'hémisphère gauche (Figure 16A). Environ 10 jours après l'ischémie, les données IRMf dévoilent des activations au niveau de l'hémisphère controlatéral, qui ne sont pas présentes chez les sujets sains, après la réalisation de mouvements avec la main droite (Grefkes & Ward, 2014). Il semblerait toutefois que ce phénomène ne se produise que chez les patients souffrant de déficits sévères puisque ce même recrutement des aires controlatérales n'est pas retrouvé chez les patients ayant un déficit fonctionnel léger (Figure 16B).

Lorsque la récupération, après rééducation sur plusieurs mois, est presque totale, c'est à nouveau l'hémisphère ipsilatéral qui est activé pour réaliser le mouvement (Figure 16A). Cependant, l'aire d'activation est généralement plus étendue comparativement aux sujets sains, ce qui pourrait correspondre à une réorganisation corticale par recrutement des aires péri-lésionnelles. La rééducation semble être un élément clé de cette réorganisation corticale. En effet, des études chez un modèle d'ischémie focale chez le primate non-humain ont montré que l'activation des aires motrices de la main était significativement moins présente si l'animal n'avait réalisé aucun exercice de rééducation en amont. En revanche, dans le cas contraire, l'activité des aires motrices ipsilatérales étaient préservées (Nudo & Milliken, 1996). Plusieurs études menées chez l'animal ont par la suite validé cette hypothèse (Nudo, 2007; Nishibe *et al.*, 2015; Combs *et al.*, 2016).

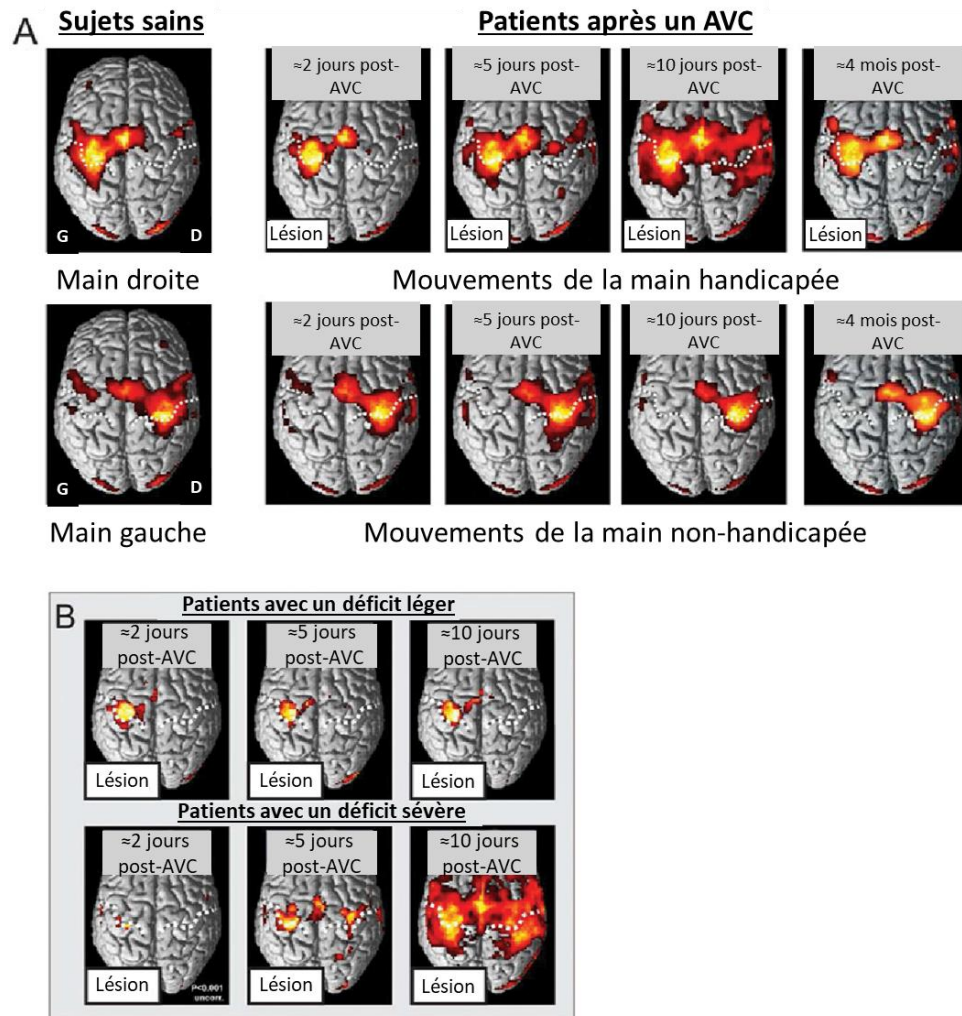


Figure 16 A : Observation par IRMf des aires cérébrales impliquées lors d'une tâche de fermeture de poing, chez des sujets sains et des patients après une ischémie cérébrale. B. Comparaison des aires recrutées lors de cette même tâche entre des patients ayant des déficits fonctionnels sévères, et des patients ayant un déficit fonctionnel léger (D'après Rheme *et al.*, 2011).

De nombreuses questions subsistent encore quant aux mécanismes qui sous-tendent la réorganisation corticale et le remodelage des régions péri-lésionnelles, mais on sait que 3 processus principaux interviennent : la synaptogenèse (création de nouvelles connexions neuronales), une consolidation des synapses déjà existantes, et enfin l'activation de réseaux neuronaux existants mais « endormis » (Murphy & Corbett, 2009). La bonne exécution de ces processus est liée à la libération de facteurs de croissances par les cellules gliales dans la région péri-lésionnelle. Parmi ces facteurs de croissance, on retrouve le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), qui encourage la croissance des synapses et est impliqué dans la survie des neurones, et le VEGF (Vascular endothelial growth factor), qui favorise la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Malykhina *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2014).

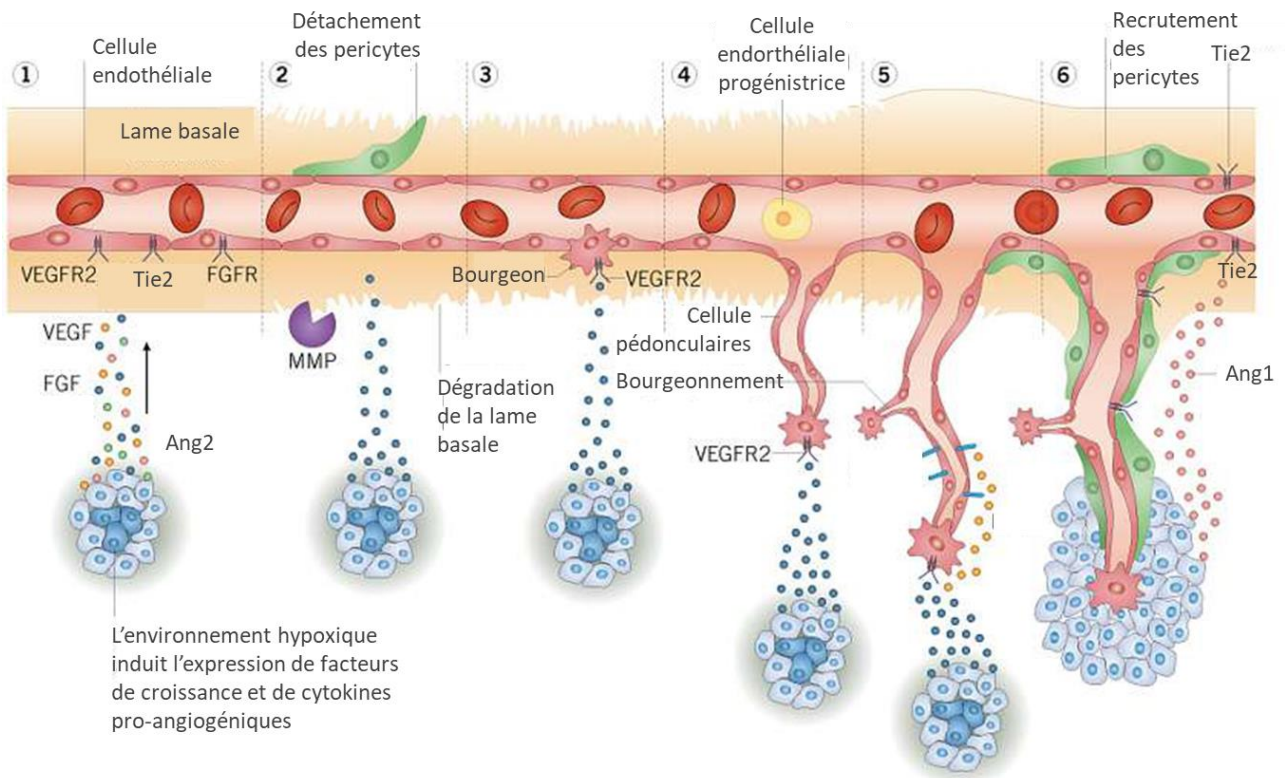
2.3.3 La neurogenèse

On le sait désormais : le cerveau adulte est toujours capable de produire de nouveaux neurones. Cette découverte remonte à l'année 1962, quand les biologistes Altman et Das parviennent à observer la formation de nouveaux neurones fonctionnels dans l'hippocampe de rats adultes (Altman, 1962). Ce phénomène a depuis été rapporté chez plusieurs espèces, dont l'Homme, et dans plusieurs zones cérébrales, appelées zones neurogéniques : le gyrus denté de l'hippocampe, et les zones sous-ventriculaires. Dans ces différentes régions, des cellules souches neurales (CSN) sont capables de s'autorenouveler, et de se différencier en différentes cellules du système nerveux : neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Lindvall & Kokaia, 2015). Dans les jours qui suivent une ischémie cérébrale, des études chez le rongeur ont démontré que le nombre de CSN produites et différenciées en cellules neurales matures dans le gyrus denté était 12 fois plus important (Liu *et al.*, 1998; Li & Chopp, 1999). Après une ischémie chez le rat adulte, la prolifération de CSN est également augmentée dans les zones sous-ventriculaires (Arvidsson *et al.*, 2002). Chez l'Homme, les preuves d'une prolifération de CSN dans les zones sous-ventriculaires ipsilatérales ont également été apportées après autopsies de patients décédés durant la phase aiguë de leur AVC (Martí-Fàbregas *et al.*, 2010). Ces CSN, guidées par des chimiocattractants (Stromal cell Derived Factor-1(SDF-1)/CXCR4), vont migrer vers le site lésionnel et se différencier en prenant le phénotype des cellules qui sont à remplacer. Ces données semblent donc indiquer que le cerveau est capable d'avoir une réponse adaptative à la présence de dommages ischémiques en stimulant une neurogenèse permettant de remplacer les neurones endommagés. Ce remplacement reste toutefois très marginal, puisqu'environ 80 % des CSN nouvellement créées à la suite d'une ischémie meurent dans les deux semaines suivant leur formation, et seul 0.2 % parviendront à se différencier en neurones fonctionnels (Arvidsson *et al.*, 2002). Les mécanismes cellulaires qui sous-tendent cette neurogenèse post-ischémique sont peu connus, mais on sait que l'environnement hypoxique de la lésion entraîne l'expression de certains facteurs de croissance impliqués dans la prolifération des CSN, comme le VEGF, le FGF (Fibroblast Growth Factor) ou le BDNF (Leker *et al.*, 2009).

2.3.4 L'angiogenèse

L'angiogenèse se définit comme la capacité de l'organisme à créer de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Dans le cadre d'une ischémie, il s'agit d'un remodelage des vaisseaux collatéraux permettant une revascularisation du tissu cérébral endommagé (Marti & Risau, 1999). Dès l'occlusion vasculaire, la baisse de la pression partielle en oxygène génère une hypoxie (un manque d'apport en oxygène dans les cellules). Cette

hypoxie est un stimulus angiogénique de première importance, puisqu'elle va induire l'expression de gènes codant pour certains facteurs de croissance qui interviennent dans l'angiogenèse dont le VEGF, le FGF, et les angiopoïétines (Ang). Le VEGF joue un rôle important dans les premières étapes de l'angiogenèse, et agit en se liant principalement à un récepteur exprimé par les cellules endothéliales : le VEGFR-2 (Vascular Endothelial Factor Receptor 2). Après liaison à ce récepteur, le VEGF va induire la transmission de signaux de prolifération et de migration endothéliale permettant la formation de nouvelles structures vasculaires (Ma *et al.*, 2012). Le FGF intervient également dans les phases précoces de l'angiogenèse. En se liant à son récepteur, le FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor), exprimé en surface des cellules endothéliales, le FGF stimule la prolifération, la différenciation et la maturation des cellules endothéliales progénitrices (Folkman & Klagsbrun, 1987). Dans les cellules endothéliales, l'hypoxie induit également l'expression de cytokines qui contribuent à la maturation des nouveaux vaisseaux au cours de l'angiogenèse : les angiopoïétines 1 et 2. Brièvement, l'angiopoïétine-1 (Ang1) et l'angiopoïétine-2 (Ang2) sont capables de se lier avec une affinité semblable au récepteur Tie2, mais vont avoir des propriétés antagonistes et n'interviendront pas au même moment au cours de la reconstruction angiogénique. Comme le VEGF, l'activité d'Ang2 intervient dans les étapes de l'activation de l'angiogenèse, et va permettre le détachement des péricytes (cellules entourant la lame basale de l'endothélium), et la dégradation de la lame basale. Les cellules endothéliales vont ainsi pouvoir capter les signaux du VEGF. L'expression d'Ang1 augmente plus tardivement et permet la maturation et la stabilisation des vaisseaux nouvellement formés via un recrutement de péricytes (Figure 17) (Qin *et al.*, 2013).



1. Hypoxie	2. Dégradation	3. Migration	4. Prolifération	5. Régulation de la prolifération	6. Vascolarisation
L'hypoxie induit l'expression et la libération de facteurs de croissance et de cytokines pro-angiogéniques dont le VEGF et l'Ang2	Les cellules endothéliales activées par Ang2 se détachent des cellules périvasculaires et dégradent la lame basale à l'aide de métalloprotéases (MMP)	Les cellules endothéliales migrent en suivant les facteurs de croissance et forment des bourgeons	Les cellules endothéliales se différencient en cellules pédonculaires qui forment les parois du nouveau vaisseau	Arrêt de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales. Formation de la lumière vasculaire	Dépôt d'une nouvelle lame basale et recrutement de nouvelles cellules périvasculaires grâce à une activation d'Ang1. Revascularisation du tissu en hypoxie

Figure 17 : Mécanismes cellulaires de l'angiogenèse après une ischémie cérébrale. Ang1 : Angiopoïétine 1 ; Ang2 : Angiopoïétine2 ; FGF : Fibroblast Growth Factor ; FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor ; MMP : Métalloprotéase ; Tie2 : tyrosine kinase ; VEGF : Vascular Endothelium Growth Factor ; VEGFR2 : Vascular Endothelium Growth Factor Receptor 2 (Adapté de Product Guides & Listings | Tocris Bioscience).

2.4 L'apport de l'IRM dans le diagnostic et le suivi de la lésion ischémique

Lors de la prise en charge des patients, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est l'outil de prédilection lorsqu'il s'agit de confirmer de façon fiable et rapide un diagnostic. Grâce à son caractère multimodal et non invasif, l'imagerie sert plusieurs objectifs : confirmer la présence d'une lésion et évaluer l'étendue de la zone lésée, éliminer la présence d'hémorragie, contre-indiquant une thrombolyse, et explorer les vaisseaux intracrâniens. Plusieurs séquences sont ainsi utilisées. Le scanner, moins précis et plus invasif (pour cause d'irradiations), est

utilisé par défaut, lorsque l'IRM n'est pas disponible, ou en cas de contre-indication (Daubail *et al.*, 2015).

2.4.1 Séquence de diffusion

La séquence de diffusion, ou DTI (pour Diffusion Tensor Imaging) permet de visualiser la lésion de façon très précoce et ainsi de valider la présence d'une ischémie. Cette séquence repose sur une sensibilité aux mouvements extracellulaires de l'eau. Elle permet ainsi le calcul du coefficient de diffusion apparent (ADC), qui représente l'amplitude du mouvement des molécules d'eau. Lors de la phase très précoce de l'ischémie, un œdème cytotoxique se forme : les cellules situées au sein de la lésion gonflent en raison d'une rétention d'eau dans l'espace cytoplasmique, réduisant ainsi l'espace extracellulaire et générant une restriction de diffusion des molécules d'eau. En raison de cet œdème, l'ADC au sein de la lésion est très fortement diminué, ce qui permet sa visibilité précoce en hyposignal (Figure 18A).

Le DTI permet également un calcul de la fraction d'anisotropie (FA). Les cartes d'anisotropie nous donnent des informations concernant l'intégrité de la substance blanche (SB) et la myélinisation. En effet, l'anisotropie est voisine de 0 dans les tissus isotropes tels que les noyaux gris de la base et le cortex, mais des valeurs de FA plus élevées et proches de 1 sont retrouvées dans la SB, constituée de fibres myélinisées unidirectionnelles (Figure 18B). Après une ischémie, une diminution des valeurs de FA dans la SB est donc synonyme de dommages le long des faisceaux de fibres.

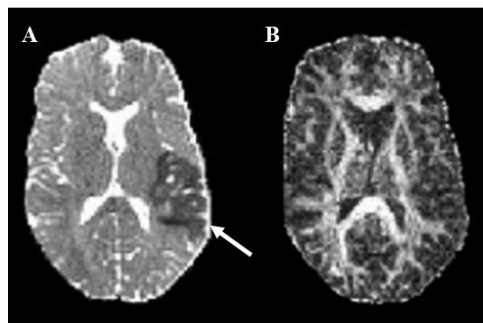


Figure 18 : Exemple d'images obtenues chez un patient en phase aiguë avec une séquence de diffusion (DTI). A : Carte d'ADC sur laquelle la lésion ischémique est visible en hyposignal (noir). B : Carte de FA sur laquelle les faisceaux de fibres de la SB sont visibles en hypersignal (blanc) (D'après Bhagat, 2007).

Les dernières mesures qui peuvent être extraites des images DTI sont basées sur l'orientation dans l'espace de la diffusion par rapport aux fibres de la SB. Ainsi, le calcul de l'AD (Axial Diffusivity) mesure le taux de diffusion dans les directions parallèles aux faisceaux

de la SB, tandis que la RD (Radial Diffusivity), elle, mesure le taux de diffusion dans les directions perpendiculaires aux faisceaux de la SB. Les cartes obtenues à partir de ces calculs permettent de déterminer si les faisceaux de la SB ont une orientation normale (Feldman *et al.*, 2010).

Globalement les informations obtenues au moyen de chacune de ces cartes peuvent être résumées de la façon suivante (Tromp, 2016) :

- L'ADC permet de mettre en avant les œdèmes cellulaires ainsi que le tissu nécrosé.
- La FA mesure l'intégrité microstructural de la SB. Bien que la FA soit sensible aux changements d'intégrité, elle ne permet pas une distinction spécifique du type de changement.
- L'AD est sensible à la densité axonale. Sa diminution est ainsi synonyme de dommages tandis que son augmentation a été observée en cas de maturation cérébrale.
- La RD met en avant la démyélinisation et peut également être influencée par des changements au niveau des diamètres ou de la densité des axones.

Le tableau ci-dessous tente de clarifier les mesures attendues en fonction du tissu biologique et de ses altérations (Tromp, 2016) :

Tableau 1 : Résumés des variations attendues des différentes cartes de DTI en fonction des tissus (D'après Tromp, 2016).

	ADC	FA	AD	RD
Matière Grise	—	↓	↓	↑
Matière Blanche	—	↑	↑	↓
Liquide Céphalo-Rachidien	↑	↓	↑	↑
Forte myélinisation	↓	↑	—	↓
Densité axonale	↓	↑	—	↓
Maturation de la SB	↓	↑	↑	↓
Dégénération axonale	↑	↓	↓	↑
Démyélinisation	↑	↓	—	↑

2.4.2 La séquence T2*

En raison de leur forte susceptibilité magnétique, les séquences T2* sont sensibles aux inhomogénéités des champs magnétiques, provoqués par exemple par la présence de produits sanguins. Cette séquence permet ainsi la détection d'hémorragies intra-parenchymateuses qui

apparaissent distinctement en hyposignal (Figure 19). La séquence T2* est utilisée en phase hyper aiguë de l'ischémie car la présence d'hématomes est une contre-indication à la thrombolyse.

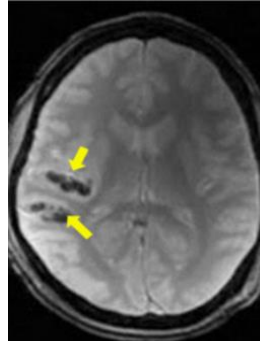


Figure 19 : Exemple d'hématomes mis en évidence par la séquence T2* en hypointensité (D'après Mirza & Gokhale, 2016).

2.4.3 L'imagerie de perfusion PWI (Perfusion Weighted Imaging)

L'imagerie de perfusion permet une étude de la microvascularisation cérébrale. Son efficacité repose sur l'injection, et l'étude de la cinétique de passage d'un agent de contraste non diffusible dans le cerveau injecté par voie intraveineuse : le chélate de Gadolinium. Le Gadolinium est doté de fortes propriétés magnétiques, et son passage dans les capillaires cérébraux entraîne une diminution de signal de séquence T2*, très sensible à l'effet de susceptibilité magnétique. La chute du signal est ainsi proportionnelle à la concentration de l'agent de contraste dans la microcirculation, ce qui permet de déterminer la zone d'hypoperfusion au sein du parenchyme. Les anomalies révélées par l'imagerie de diffusion représenteraient le foyer de l'ischémie et les anomalies sur la séquence de perfusion représentent le tissu cérébral hypoperfusé. Ainsi le territoire sévèrement hypoperfusé sans hypersignal de diffusion (mismatch perfusion/diffusion) correspondrait à la pénombre ischémique (Figure 20). L'utilisation conjointe de l'imagerie de diffusion et de l'imagerie de perfusion est ainsi systématiquement utilisée après la prise en charge des patients afin de déterminer l'étendue de la zone cérébrale qui peut potentiellement être sauvée par les stratégies thérapeutiques de reperfusion et de neuroprotection (Mandeville *et al.*, 2017).

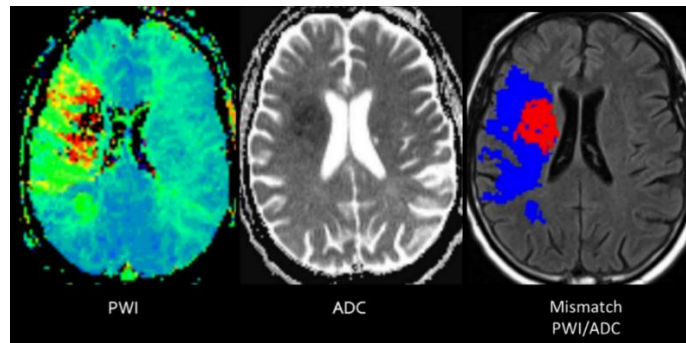


Figure 20 : Exemple de mismatch obtenu à partir d'une imagerie de perfusion (PWI) et d'une imagerie de diffusion (ADC). La zone rouge représente le foyer ischémique obtenu à partir de l'ADC, la zone bleue représente la pénombre ischémique obtenue à partir de l'imagerie de perfusion (D'après Johns Hopkins Medecine).

2.4.4 L'imagerie pondérée en T2

Au cours de la cascade ischémique, la rupture de la BHE entraîne une accumulation d'eau dans l'espace interstitiel, responsable de l'œdème vasogénique. L'imagerie pondérée en T2 est une séquence anatomique basée sur l'analyse du signal émanant des protons de l'eau. Elle permet ainsi de visualiser en hypersignal les lésions ischémiques constituées, car l'œdème vasogénique n'apparaît que plusieurs heures après l'évènement ischémique (Figure 21). Cette séquence permet donc de mettre en évidence une lésion en phase subaiguë et chronique de l'ischémie.

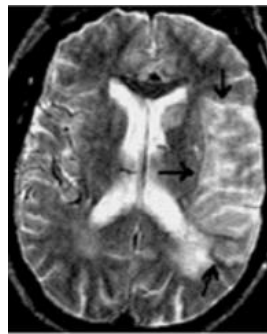


Figure 21 Exemple d'image obtenue à partir d'une imagerie pondérée en T2 chez un patient, 12 heures après l'évènement ischémique. La lésion est visible en signal hyperintense (flèches noires) (D'après Xavier *et al.*, 2003)

2.4.5 La séquence T2 FLAIR (Fluid attenuated inversion-recovery)

La séquence FLAIR est une séquence pondérée en T2 avec une suppression du signal de l'eau libre comme le liquide céphalo-rachidien. Elle permet une identification en hypersignal

de la lésion ischémique. Le signal apparaît néanmoins plus tardivement qu’avec une séquence de diffusion : entre 6 et 8 h post-ischémie. Elle permet également l’identification de lésions plus anciennes. En clinique, le différentiel entre le temps d’apparition retardé du signal FLAIR et le temps d’apparition immédiat du signal en DTI est utilisé pour dater l’évènement ischémique (Figure 22) (De Roquefeuil *et al.*, 2014).

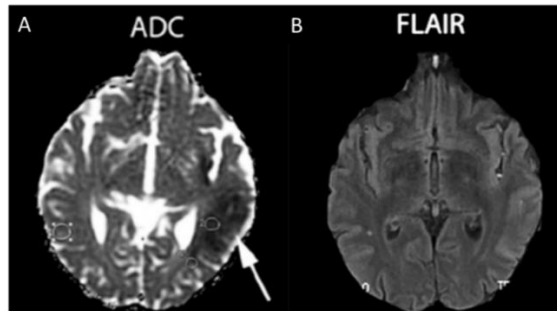


Figure 22 : Exemple d’une datation d’évènement ischémique grâce à la séquence FLAIR. Ici, un patient présentant des signes d’AVC a été pris en charge à l’hôpital. A : une séquence de diffusion permet la visualisation précoce de la lésion ischémique en hyposignal. B : La lésion est également visible en hypersignal avec la séquence FLAIR, ce qui signifie que l’accident vasculaire remonte à plus de 6 h (D’après Roldan-Valadez & Lopez-Mejia, 2014).

2.4.6 La séquence TOF (Time of Flight)

Cette séquence permet l’étude de la vascularisation cérébrale. Les branches du polygone de Willis sont visibles sans nécessité d’agent de contraste, et l’occlusion artérielle peut ainsi être observée (Figure 23).

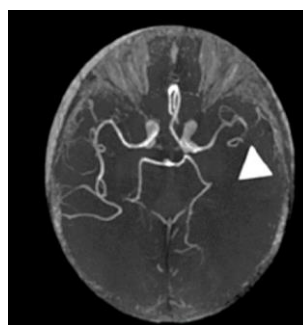


Figure 23 : Exemple d’angiographie obtenue après une séquence 3D TOF. Ici, on distingue une occlusion du segment M2 de l’artère cérébrale moyenne (sous la flèche) (D’après Roldan-Valadez & Lopez-Mejia, 2014).

2.4.7 L'imagerie de susceptibilité magnétique (SWI)

La séquence SWI (Susceptibility Weighted Imaging) est une technique d'imagerie émergente dans le diagnostic de l'ischémie cérébrale. Cette séquence exploite l'effet BOLD (Blood Oxygen Level Dependent), reflétant des variations de l'oxygène transporté par l'hémoglobine, et les différences de susceptibilité magnétique entre les tissus. La SWI est ainsi très sensible aux dépôts de sang (riches en désoxyhémoglobine) et de fer dans le cerveau et peut mettre en évidence un thrombus artériel ou veineux de façon plus précise que les séquences d'angiographie classiques (Figure 24). Son utilisation peut notamment permettre de détecter les thrombo-embolies des petits vaisseaux sanguins qui peuvent avoir lieu après fragmentation du thrombus principal, et ainsi vérifier l'efficacité des thérapies de reperfusion. La SWI est également très sensible aux saignements, aussi petits soient-ils, et permet d'établir un pronostic fiable quant aux potentielles transformations hémorragiques des lésions (Rastogi *et al.*, 2015; Hsu *et al.*, 2017). Cette technique d'imagerie, de meilleure résolution, présente ainsi une alternative aux séquences T2* généralement utilisées pour détecter les saignements. Malgré ses avantages, la séquence SWI reste peu utilisée en clinique car sa réalisation prend du temps (8 minutes) et la présence d'artéfacts est encore trop importante.

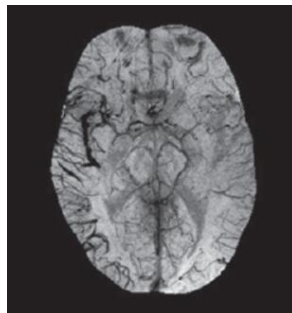


Figure 24 : Exemple d'une séquence SWI chez un patient ayant une occlusion de l'artère cérébrale moyenne droite (à gauche sur l'image). L'artère occlue est visible en hyposignal et les veines de l'hémisphère droit (à gauche sur l'image) apparaissent également en signal réduit, ce qui sous-entend une augmentation en désoxyhémoglobine dans ces vaisseaux, et donc une hypoperfusion du tissu (Rastogi *et al.*, 2015).

2.4.8 L'imagerie APT (Amine Proton Transfer) ou imagerie du pH

Au cours de la cascade ischémique, le déficit en oxygène et en nutriments contraint les cellules à réaliser leur glycolyse en anaérobie. Dans de telles conditions, du lactate s'accumule, ce qui conduit à une acidose du tissu hypoperfusé. Il est désormais possible de visualiser cette acidose grâce à des cartographies cérébrales du pH réalisées par IRM. Le principe de cette imagerie repose sur l'observation du transfert de saturation entre deux ou plusieurs groupes de protons en échange : le CEST (Chemical Exchange dependant Saturation Transfer). Plus

précisément, pour visualiser le niveau d'acidité du tissu, les échanges endogènes de protons amine présents dans les protéines et les peptides sont observés. Ces échanges sont normalement catalysés par un environnement basique. L'acidose provoquée par l'ischémie réduit donc le taux d'échange des protons et par conséquent le signal IRM. Ce signal est visible durant la phase hyperaiguë et aiguë de l'ischémie (Figure 25). La lésion qui apparaît grâce à l'imagerie de pH est généralement plus grande que celle visible en imagerie de diffusion, mais plus petite que celle visible en imagerie de perfusion. Ainsi, en comparant les 3 signaux, il est possible de délimiter de façon plus précise la zone de pénombre, et de la différencier d'une oligémie bénigne (Sun *et al.*, 2010; Rastogi *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2018).

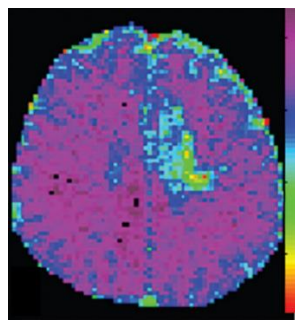


Figure 25 : Exemple d'une lésion ischémique visible par imagerie de pH en phase aiguë (Rastogi *et al.*, 2015)

3 Approches thérapeutiques de l'ischémie cérébrale

3.1 Les traitements préventifs

Les stratégies préventives se subdivisent en deux catégories : la prévention primaire, qui repose essentiellement sur la prise en charge des facteurs de risque en amont de l'évènement ischémique, et la prévention secondaire, pratiquée après la survenue de l'AVC.

Comme cité précédemment, l'hypertension artérielle est un facteur de risque majeur de l'AVC. Ainsi, les traitements antihypertenseurs, lorsqu'ils sont efficaces, constituent le pilier de la prévention primaire. En effet, il existe un lien de causalité linéaire entre la pression artérielle et le risque d'AVC, et il a été prouvé qu'un contrôle positif de la pression artérielle, chez les personnes âgées de 80 ans et plus, réduisait de 39 % les taux de mortalité, et de 30 % le risque de survenue de l'AVC (Beckett *et al.*, 2008). L'objectif de ces traitements est donc de contrôler la pression artérielle et de la maintenir sous un seuil de 140/90 mmHg. Le sevrage tabagique,

la pratique d'une activité physique, et une alimentation équilibrée sont également des modifications de l'hygiène de vie permettant de limiter le risque d'AVC.

Même après la survenue d'un AVC, les différents facteurs de risque doivent être contrôlés pour limiter le risque de récurrence. Après une attaque ischémique, des traitements anti-thrombotiques de longue durée sont également recommandés (Sarikaya *et al.*, 2014).

3.2 La thrombolyse

L'objectif premier, suite à la prise en charge des patients, est la revascularisation (ou reperfusion) du tissu cérébral ischémique, visant à éviter l'aggravation et favoriser la récupération des déficits neurologiques. Cette revascularisation est réalisée grâce à l'injection d'une protéine recombinante, le rt-PA (recombinant tissue plasminogen activator), qui va lyser le caillot sanguin responsable de l'occlusion du vaisseau. Le rt-PA est à ce jour l'unique traitement pharmacologique disponible permettant de limiter les dommages causés par l'ischémie. La thrombolyse par le rt-PA n'est toutefois pas sans inconvénients, et seuls 12 % des patients peuvent en bénéficier en Europe (Craig *et al.*, 2019). Pour cause, si ce traitement n'est pas administré dans les 4 à 6 h suivant l'apparition des premiers symptômes, il augmente considérablement (de près de 10 fois) le risque d'hémorragie cérébrale. Ainsi, la thrombolyse par le rt-PA est écartée chez les patients qui arrivent à l'hôpital après ce délai de 6h, d'où l'urgence de la prise en charge dès l'apparition des premiers symptômes. La fenêtre thérapeutique très étroite du rt-PA n'est pas le seul facteur limitant son administration. En effet, de nombreuses contre-indications sont également en cause. Parmi ces contre-indications, on retrouve notamment des antécédents d'hémorragie, la prise d'anticoagulants, une hypertension artérielle sévère (185/110 mmHg), des antécédents d'AVC dans les 3 derniers mois, ou encore un âge inférieur à 18 ans ou supérieur à 80 ans (Fugate & Rabinstein, 2015).

3.3 La thrombectomie

La thrombectomie mécanique est une technique récente et novatrice de reperfusion qui consiste à retirer par voie endovasculaire le caillot sanguin responsable de l'occlusion. Brièvement, un accès au thrombus est obtenu à la suite de l'introduction puis de l'avancée d'un cathéter au niveau de l'artère fémorale, jusqu'à l'artère occlue. Plusieurs dispositifs permettent ensuite l'élimination du caillot (Figure 26). La première génération de dispositifs de thrombectomie mécanique, appelés Coil retrievers, permet de capturer puis de retirer le thrombus à la manière d'un tire-bouchon. Le deuxième dispositif développé permet une

extraction du caillot grâce à une fragmentation puis une aspiration des débris. Enfin, le dispositif le plus récent, appelé *Stent retriever*, consiste en un petit filet grillagé qui capture le caillot dans ses mailles (Spiotta *et al.*, 2015).

La thrombectomie mécanique peut être réalisée en complément de la thrombolyse par rt-PA, ou d'emblée si cette dernière est contre-indiquée. Son utilisation demeure toutefois limitée car elle ne concerne que les patients atteints d'une ischémie au niveau d'une grosse artère proximale, qui peuvent être opérés dans les 24h suivant l'apparition des premiers symptômes (Raychev & Saver, 2012).

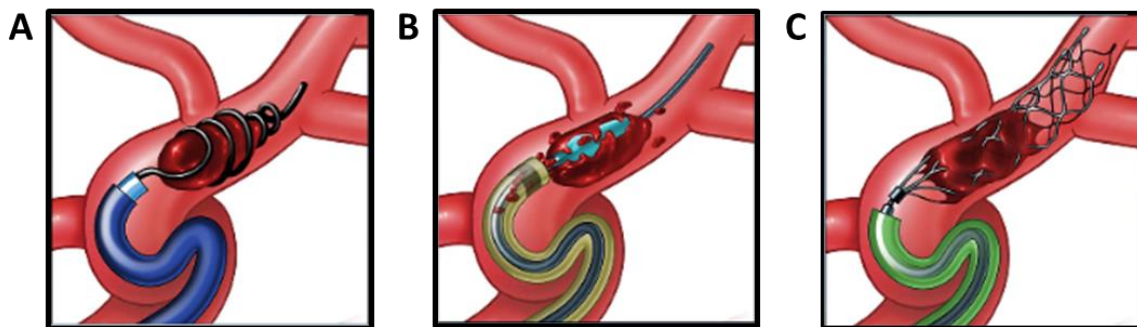


Figure 26 : Illustration des différents dispositifs de la thrombectomie. A : le Coil retriever, B : le dispositif d'aspiration, et C : le Stent retriever (D'après Spiotta *et al.*, 2015).

3.4 La rééducation

A ce jour, la rééducation est la seule stratégie thérapeutique mise en place permettant aux patients de récupérer au moins partiellement leurs fonctions neurologiques. Elle débute généralement dès la première semaine suivant l'AVC, et se poursuit même après le retour du patient à son domicile. Les travaux de rééducation sont réalisés sur tous les aspects : motricité, sensibilité, et cognition, et tous partagent le même objectif : conduire le patient à son autonomie optimale en lui apprenant à compenser ses déficits, à défaut de les récupérer totalement. Cette stratégie repose sur une stimulation de la plasticité cérébrale permettant l'adaptation du réseau neuronal, soit par la création de nouvelles connexions, soit par des changements de connexions synaptiques (Hara, 2015). Le degré de rééducation dépend de la sévérité de la lésion cérébrale, mais débute généralement par une récupération fonctionnelle très rapide dans les premiers mois suivant l'ischémie, avant de ralentir.

4 Nouvelles stratégies thérapeutiques pour l'ischémie

4.1 Les enjeux de la recherche actuelle : exemple de la thérapie cellulaire

La recherche pharmaceutique se concentre principalement sur deux stratégies thérapeutiques de l'AVC. La première, s'oriente vers une stratégie de neuroprotection : qui vise à bloquer l'expansion du foyer ischémique en agissant sur les mécanismes responsables de la mort neuronale. En favorisant la survie des cellules, elles pourraient permettre d'étendre la fenêtre d'opportunité thérapeutique des traitements de reperfusion qui pour l'heure demeure très étroite. A ce jour, mis à part l'hypothermie dont l'utilisation reste très controversée, aucune stratégie de neuroprotection n'a montré de réelle efficacité lors des essais cliniques (Hankey, 2017).

La seconde stratégie étudiée se focalise sur les mécanismes de réparation tissulaire et de plasticité cérébrale qui interviennent après un AVC : la synaptogenèse, la neurogenèse et l'angiogenèse. Il s'agit d'un champ thérapeutique en plein essor depuis une vingtaine d'années. Diverses tentatives de l'amélioration de la neurogenèse endogène ont été proposées via l'injection de facteurs de croissance permettant de favoriser le recrutement des CSN. Malheureusement, malgré des résultats prometteurs en préclinique, les essais cliniques sur ces facteurs trophiques se sont révélés soit inefficaces, soit toxiques pour les patients (Bogousslavsky *et al.*, 2002; England *et al.*, 2016).

Plus récemment, les études réalisées sur le potentiel des thérapies cellulaires après ischémie cérébrale s'avèrent prometteuses. Ces thérapies reposent sur l'administration de cellules souches. Leur intérêt repose sur leur capacité à se différencier en différents types de cellules du système nerveux (neurones, cellules gliales, cellules endothéliales), permettant ainsi de remplacer les cellules détruites ou endommagées, et leur aptitude à libérer des facteurs de croissances impliqués dans les mécanismes d'angiogenèse et de neurogenèse. De nombreuses études chez l'animal font état de l'efficacité de cette thérapie, aussi bien sur la réduction du volume lésionnel que sur la récupération des fonctions sensorimotrices (Vu *et al.*, 2014).

Il existe différents types de cellules souches possibles pour ces thérapies : les CSN, les cellules souches embryonnaires, les cellules souches pluripotentes induites, et les cellules souches mésenchymateuses (CSMs). Parmi elles, les CSMs se dégagent grâce à plusieurs avantages : elles peuvent être facilement extraites à partir de la moelle osseuse, du tissu adipeux ou du sang des patients et cultivées assez rapidement pour pouvoir être injectées durant la phase

aiguë de l'ischémie sans poser de problèmes éthiques ou immunologiques (Toyoshima *et al.*, 2017). L'efficacité d'une injection de CSM après ischémie cérébrale a largement été étudiée chez l'animal (Vu *et al.*, 2014; Toyoshima *et al.*, 2017). Il a ainsi été suggéré que les CSMs avaient la capacité de se différencier en cellules endothéliales ainsi qu'en cellules neuronales (Yasuhara *et al.*, 2006; Wakabayashi *et al.*, 2010). Toutefois, les effets bénéfiques des CSMs proviendraient majoritairement de leur capacité à sécréter différents facteurs neurotrophiques, angiogéniques et chimiotactiques (Wakabayashi *et al.*, 2010; Shinozuka *et al.*, 2013). La sécrétion de ces facteurs favorise la réduction du volume lésionnel en réduisant la réponse inflammatoire et apoptotique, tout en encourageant la migration des cellules souches endogènes au site lésionnel, la synaptogenèse, la neurogenèse et l'angiogenèse (Chen *et al.*, 2003). L'étude de 2011 de Lim et collaborateurs nous donne un bon exemple du potentiel thérapeutique des CSMs (Lim *et al.*, 2011). Leurs résultats démontrent qu'une injection intraveineuse ou intrathécale de CSMs chez des rats soumis à une OACM entraînent une réduction significative du volume lésionnel ainsi qu'une meilleure récupération fonctionnelle visible jusqu'à 28 jours post-ischémie (Figure 27).

L'inconvénient de cette thérapie est que, de la même manière que les cellules souches endogènes, la grande majorité des cellules injectées ne survivent pas longtemps une fois parvenue au site lésionnel. En 2010, Brenneman et collaborateurs ont réalisé un suivi immunohistologique de cellules mononucléaires de moelle osseuse (CMN) contenant des populations de CSMs et de cellules souches hématopoïétiques, jusqu'à 7 jours après leur injection par voie intra-artérielle à des rats ayant subi une OACM et une occlusion de la carotide commune (Brenneman *et al.*, 2010). Le marquage révèle la présence des cellules souches au niveau du site péri-lésionnel 1 heure après leur injection, mais leur nombre décroît rapidement de façon exponentielle en raison d'une mort cellulaire par apoptose (Figure 28). Malgré le faible taux de survie des cellules souches, les animaux traités présentent une récupération fonctionnelle significativement supérieure à celle des animaux contrôles. Ces données suggèrent qu'avant leur mort, les CSMs sécrètent des facteurs trophiques à l'origine de l'effet thérapeutique. Ainsi les propriétés bénéfiques des CSMs seraient d'avantage liées à leurs capacités de sécrétion plutôt qu'à un phénomène de remplacement cellulaire.

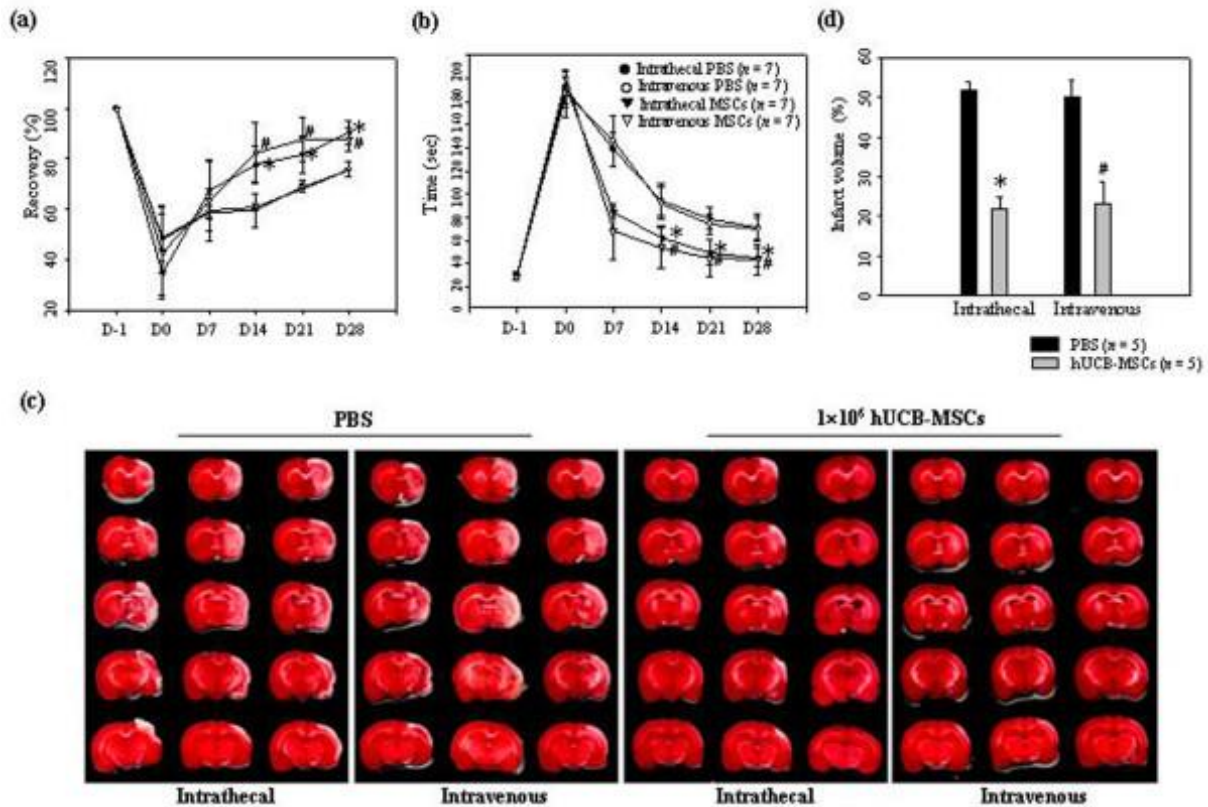


Figure 27 : Effet thérapeutique d'une injection de CSMs sur la récupération post-ischémique chez le rat. Performances au a) Rotarod et b) Test de l'adhésif entre 1 et 28 après ischémie (moyennes \pm SD). (c) Coupes cérébrales marquées au TTC 7 jour après injections de CSMs ou de PBS (contrôle). La lésion est visible en blanc. (d) Volume lésionnel (moyennes \pm SD). Les différences significatives ont été déterminées par analyses de variances entre les groupes (* $P < 0.05$ différence avec le groupe « injection intrathécale de PBS »; # $P < 0.05$ différence avec le groupe « injection intraveineuse de PBS ») (Lim *et al.*, 2011).

L'effet paracrine des CSMs est également lié à leur capacité à libérer des exosomes au niveau du site lésionnel. Ces exosomes sont des vésicules mesurant entre 40 et 100 nm qui se détachent de la surface des cellules, et contiennent des protéines ainsi que des micro ARNs. En 2013, Xin et collaborateurs ont démontré que l'injection intraveineuse d'exosomes issus de CSMs, chez des rats soumis à une ischémie focale, permettait d'améliorer la récupération fonctionnelle et d'améliorer les mécanismes de régénération tissulaires (Xin *et al.*, 2013). De nombreuses études précliniques ont démontré l'efficacité des CSMs dans le traitement de l'ischémie cérébrale, mais leur utilisation n'est pas sans risque, car ces cellules peuvent conduire à la formation d'un embolie lorsqu'elles sont administrées par voie intra-artérielle, ou rester piégées dans les poumons lorsqu'elles passent dans la circulation systémique. Des complications tumorigènes peuvent également survenir de par leur nature de cellules souches (Bang & Kim, 2019). Les thérapies à base d'exosomes offrent donc une alternative thérapeutique intéressante, permettant d'éviter les problèmes propres aux injections de cellules.

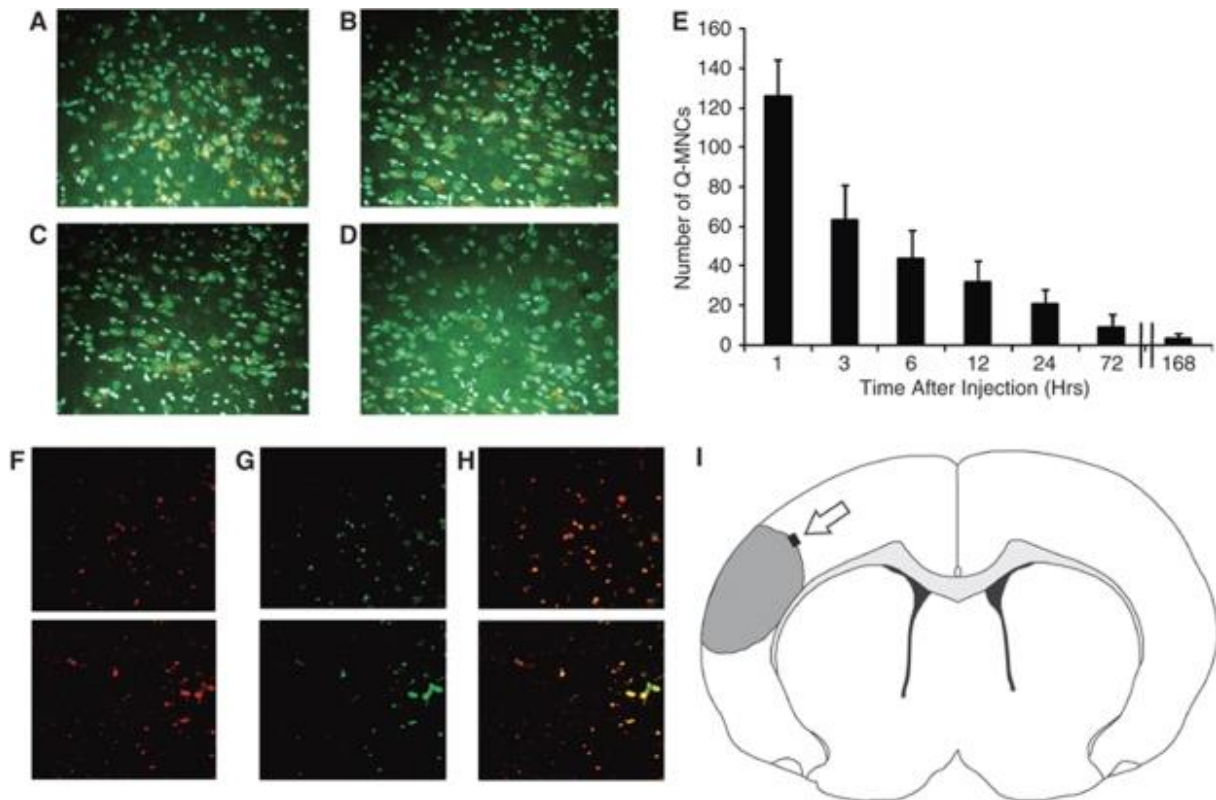


Figure 28 : Evolution du nombre de CMN (dont CSMs) en fonction du temps dans un cerveau de rat ischémié. Les images de microscopies par fluorescence illustrent l'élimination des CMNs dans la zone péri-lésionnelle (A) 1h, (B) 6h, (C) 24h et (D) 7 jours après injection. En vert : fluorescein isothiocyanate (marquage aspécifique) ; en rouge : Q-Tracker (marquage des CMNs). (E) Réduction exponentielle du nombre de CMNs dans la zone péri-lésionnelle au cours du temps (n=4 par groupe). (F à H) Images de microscopie à fluorescence de deux zones péri-lésionnelles différentes. (F) les CMNs marquées Q-CMNs (en rouge), (G) des cellules marquées TUNEL-CMNs (en vert), et (H) les CMNs en apoptose doublement marquées TUNEL-Q-CMNs (en jaune). (I) Région de la zone péri-lésionnelle prélevée pour les analyses histologiques (Brenneman *et al.*, 2010).

La transposition des thérapies cellulaires en phase clinique semble tenir ses promesses, puisque plusieurs essais cliniques (ACTISIMA, InveST, RECOVER, MASTERS, Sanbio et PISCES, I-ACT, CoBIS2) ont démontré qu'une injection de cellules souches après une ischémie cérébrale permettait d'améliorer l'issue clinique des patients, sans montrer de toxicité majeure à long terme (Kenmuir & Wechsler, 2017; Krause *et al.*, 2019). Toutefois, la réalisation de ces études n'était pas homogène, avec des types cellulaires, ainsi que des doses, des voies et des temps d'injection différents. Des recherches complémentaires sont donc nécessaires pour mieux déterminer les modalités optimales de ces traitements. De plus, pour optimiser l'efficacité des thérapies cellulaires, il serait intéressant de se pencher vers l'utilisation concomitante d'un mécanisme permettant de promouvoir la survie des cellules souches injectées. La communauté scientifique s'est donc penchée vers l'utilisation de support pour

fournir un environnement favorable et stable pour un ancrage à la fois des cellules endogènes et exogènes (Hou *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2010; Ghuman *et al.*, 2016). Les dernières avancées technologiques en matière d'ingénierie tissulaire ont permis de mettre au point des hydrogels constitués d'éléments de la MEC, ayant les mêmes propriétés mécaniques que le tissu cérébral (Hou *et al.*, 2005). Chez le rat, après leur implantation au niveau du tissu lésionnel, ces hydrogels favorisent l'infiltration des cellules souches endogènes et l'angiogenèse tout en réduisant la formation de la cicatrice gliale (Hou *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2007; Ghuman *et al.*, 2016). L'implantation concomitante de cellules souches soutenues par un hydrogel constitué d'acide hyaluronique et d'héparanes sulfates s'est ainsi révélée d'autant plus efficace pour le traitement de l'ischémie chez la souris (Zhong *et al.*, 2010). L'environnement cellulaire prodigué par l'hydrogel favorise la survie des cellules souches implantées, permettant ainsi de contourner la principale limitation de la thérapie cellulaire. Ces différentes études soulignent l'importance de la compréhension des mécanismes sous-jacents la stabilité de l'environnement cellulaire dans laquelle la MEC joue un rôle central.

4.2 Intérêt de la thérapie matricielle dans l'ischémie cérébrale

4.2.1 Généralités sur la matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire (MEC) est un assemblage acellulaire et complexe qui entoure les cellules dans chaque tissu. Elle est composée de 3 grands types de molécules : les protéines de structure (collagène, élastine), les protéines spécialisées dites adhésives ou d'adhésion (laminine, fibronectine) qui assurent un lien direct entre la MEC et les cellules, et les macromolécules protéoglycanes qui forment un gel hydraté grâce à leur longue chaîne polysaccharidique de glycoamino-glycanes (GAGs) (Figure 29). C'est une structure dynamique, en remaniement constant, et selon l'organe considéré, les proportions des éléments la constituant peuvent varier pour s'adapter spécifiquement aux fonctions du tissu (Frantz *et al.*, 2010). De par ses propriétés biochimiques et mécaniques, la MEC participe à la communication intercellulaire, à la mise en place et au maintien de l'homéostasie tissulaire, mais elle interagit également avec les cellules en les mettant en contact avec différents facteurs de croissance pour permettre leur prolifération, leur migration et leur différenciation (Bonnans *et al.*, 2014).

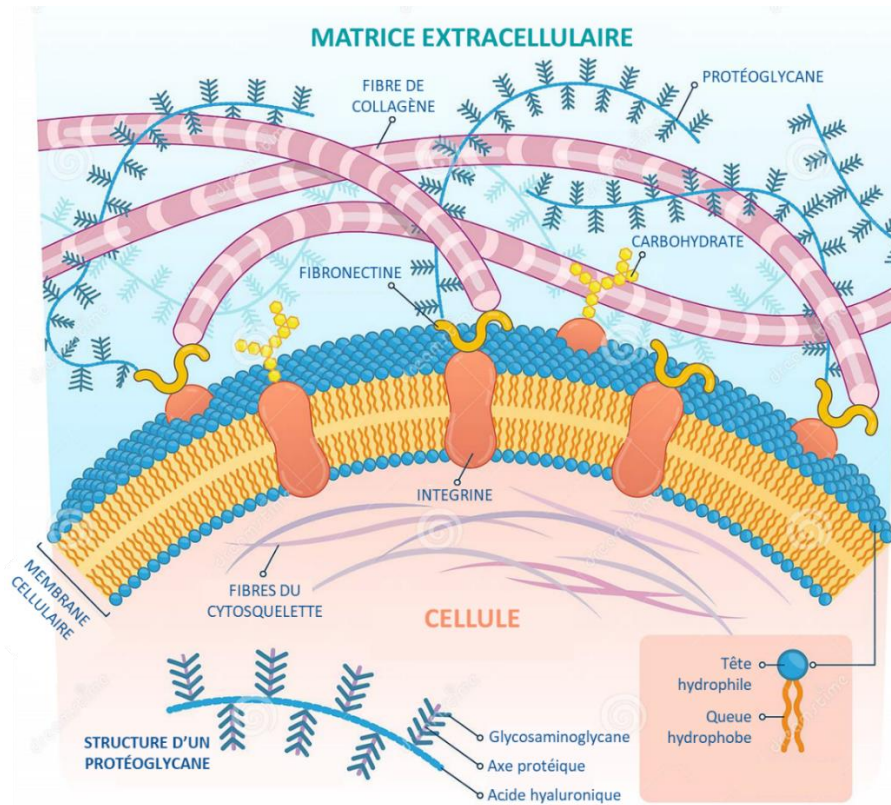


Figure 29 : Illustration de la composition de la matrice extracellulaire (Adaptée de ©VectorMine).

4.2.2 La MEC dans le tissu cérébral : focus sur les HSPG (Heparan Sulfate Proteoglycans)

Dans le cerveau, la MEC occupe 10 à 20 % du volume total (Lau *et al.*, 2013). La composition de la MEC dans le tissu cérébral se différencie grandement des autres organes. En effet, le collagène et la fibronectine sont généralement majoritaires. Or, dans le cerveau adulte, ces macromolécules sont très peu représentées tandis que les protéoglycane (PG) sont exprimés en abondance dans l'espace extracellulaire entre les neurones et les cellules gliales (Bandtlow & Zimmermann, 2000). Les PG sont des protéines sur lesquelles sont greffées de façon covalente une à plusieurs dizaines de chaînes de glycosaminoglycane (GAG). Il existe différentes familles de PG qui se différencient de par leur corps protéique, et la nature des GAG qui y sont attachés. Les GAG sont des polymères complexes composés d'une succession d'unités disaccharidiques répétées. Dans le cerveau, la majorité des PG sont constitués de deux familles de GAG : les chondroïtines sulfates (CS) et les héparanes sulfates (HS) (Figure 30).

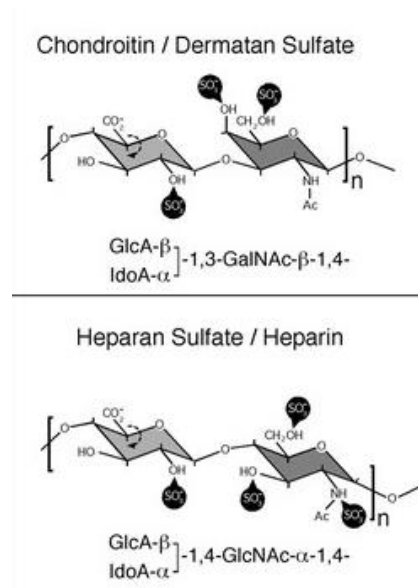


Figure 30 : Structure des disaccharides formant la base des principaux GAG du tissu cérébral.

On retrouve trois classes principales de HSPG dans le tissu cérébral : les HSPG ayant un core protéique transmembranaire, font partie du groupe des syndecans, ceux qui sont liés à la surface cellulaire sont des glypicans, enfin, les HSPG sécrétés dans le milieu extracellulaire sont les perlecans (Figure 31).

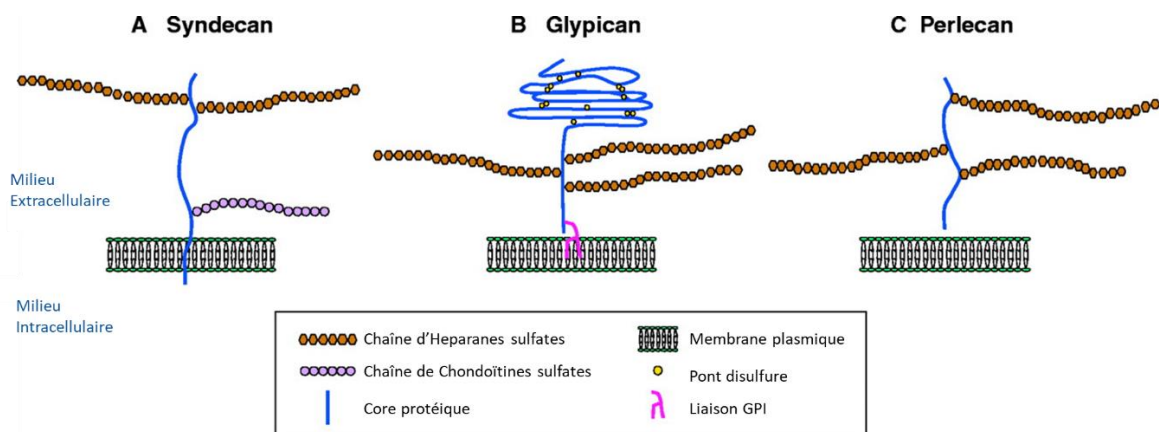


Figure 31 : Les trois principales classes de HSPG : A. Le core protéique des syndecans est transmembranaire. Certains d'entre eux contiennent également une chaîne de CS, à proximité de la membrane cellulaire. B. Les glypicans ont un core protéique lié à la membrane cellulaire par une liaison glycosylphosphatidylinositol (GPI) et stabilisé par des ponts disulfures. C. Les perlecans sont des HSPG sécrétés par les cellules dans le milieu extracellulaire (Adapté de Lin, 2004).

Les HSPG disposent de nombreux domaines de liaisons leur permettant d'interagir avec le collagène, d'autres protéines matricielles, ou encore des molécules de signalisation comme les

facteurs de croissance. Ces propriétés leur confèrent différentes fonctions. Leur interaction avec les autres composants matriciels permettent de structurer et d'assurer le maintien de l'architecture tissulaire. En plus de ce rôle structural, les HSPG possèdent une fonction de médiateur entre les facteurs de croissance et les cellules cibles. Ils modulent la signalisation cellulaire en captant différents facteurs de croissance, comme le VEGF, le FGF ou le SDF-1 (Sweeney *et al.*, 2002), puis en facilitant leur liaison avec leurs récepteurs membranaires. En effet, les HSPG ont la particularité de pouvoir protéger les facteurs de croissance d'une dégradation enzymatique, avant de pouvoir les libérer par une dégradation contrôlée des chaînes d'HS (Lin, 2004). Ils peuvent ainsi augmenter leur concentration dans une zone bien définie en agissant comme des « réservoirs », et moduler leur biodisponibilité en fonction des besoins (Figure 32A). Les HSPG associés à la membrane plasmique (syndecans et glypicans) vont également avoir la propriété de permettre ou de stimuler l'activation des récepteurs membranaires par leurs ligands, jouant ainsi un rôle de corécepteurs. En effet, le complexe nécessaire à l'activation du VEGF et du FGF est un dimère de facteur de croissance lié à son récepteur, le tout stabilisé par des chaînes d'HS (Lin, 2004) (Figure 32B). Les HSPG ont également la capacité de se lier à des cytokines inflammatoires. Il a ainsi été démontré que les HSPG situés à la surface des cellules endothéliales étaient impliqués dans la création d'un gradient de cytokines permettant de guider les leucocytes circulants jusqu'au site de la lésion. En résumé, via leurs interactions avec les molécules de signalisation (facteurs de croissance et cytokines), les HSPG ont un rôle de première importance dans les mécanismes d'adhésion, de prolifération, de migration et de différenciation cellulaire, aussi bien au cours du développement que de la réparation tissulaire (Lau *et al.*, 2013).

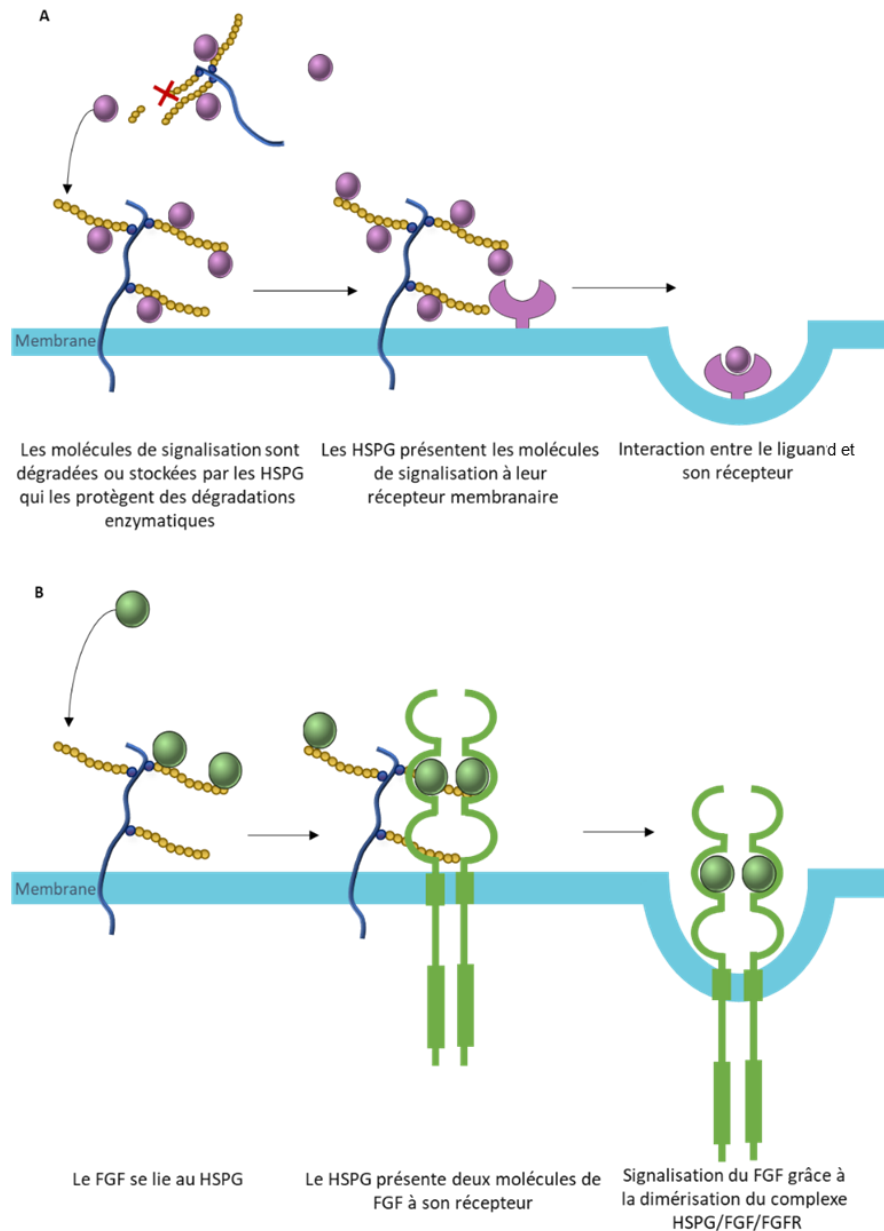


Figure 32 : Fonctions des HSPG dans la signalisation cellulaire. A. Fonctions de stockage et de présentation aux récepteurs des molécules de signalisation. B. Mécanismes de potentialisation de liaison entre le FGF et son récepteur par les HSPG membranaires. HSPG : Protéoglycanes à héparanes sulfates ; FGF : Fibroblast Growth Factor ; FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor

4.2.3 Intérêt des HSPG dans l'ischémie cérébrale

Dans le cadre d'une ischémie, les HSPG représentent un allié de taille puisqu'ils permettent un recrutement rapide des facteurs de croissance impliqués dans la réparation tissulaire, tout en contrôlant leur biodisponibilité et leur localisation. De plus, l'environnement ischémique est responsable de l'activation de nombreuses protéases comme les MMP-2 et 9, ainsi que des

héparanases. Les HSPG participent ainsi à la protection des facteurs de croissance contre une dégradation enzymatique (Billings & Pacifici, 2015).

Puisque les HSPG sont de puissants médiateurs des cytokines et facteurs de croissance, il paraît logique qu'ils soient impliqués dans différents processus de neuroprotection et de récupération fonctionnelle post-ischémiques comme l'angiogenèse et la neurogenèse. En effet, après une ischémie, l'expression du FGF et du VEGF est augmentée (Li *et al.*, 2012). Or, comme précisé plus tôt, le FGF et le VEGF, deux facteurs majeurs de l'angiogenèse et de la neurogenèse, ont tous les deux besoin des HSPG pour potentialiser l'activation de leurs récepteurs respectifs. Leur signalisation pro-angiogénique et pro-neurogénique dépend donc de la présence des HSPG. En 2014, Qiang et collaborateurs ont démontré que les HSPG avaient des propriétés pro-angiogéniques chez des souris soumises à une ischémie des membres inférieurs (Qiang *et al.*, 2014). Pour ce faire, ils ont réalisé les ischémies sur des souris transgéniques dont les perlecanes n'expriment pas de chaînes d'HS. Grâce à une imagerie de perfusion au laser Doppler, ils ont pu constater que les souris contrôles présentaient une meilleure récupération de la reperfusion que les animaux transgéniques. De plus, l'expression endogène de VEGF était significativement réduite chez les souris transgéniques. Ces données soutiennent l'idée que les HSPG sont d'importants médiateurs de l'angiogenèse via une régulation de l'expression du VEGF. De la même manière, l'implication des HSPG dans la neurogenèse post-ischémique a été mise en avant par les travaux de Hill et collaborateurs (Hill *et al.*, 2012). Leurs résultats démontrent qu'une injection de glypicans 7 jours après une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne chez des rats permet d'améliorer la récupération fonctionnelle en phase chronique. Pour mieux comprendre les mécanismes d'action des glypicans, ils ont réalisé des analyses *in vitro* en traitant des cultures de neurones avec le HSPG. Ces analyses dévoilent une croissance significative des neurites, associée à une augmentation de l'expression en FGF. Dans le cadre de la neurogenèse post-ischémique, les HSPG ont également la capacité de se lier au SDF-1 (Sweeney *et al.*, 2002), qui est un chimioattractant nécessaire à la migration des CSN et également impliqué dans la croissance axonale (Cheng *et al.*, 2017).

Au-delà de leurs fonctions liées aux molécules de signalisation, les HSPG pourraient également avoir des effets bénéfiques sur la formation de la cicatrice gliale. Des données allant dans ce sens ont été apportées en 2012, lorsque Hill et collaborateurs ont constaté qu'une injection de glypicans réduisait l'épaisseur de la cicatrice gliale et avait un effet bénéfique sur la récupération fonctionnelle (Hill *et al.*, 2012).

Plus récemment, il a été montré chez un modèle murin que les HSPG, et plus précisément les perlecans, jouaient un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de la BHE après une ischémie cérébrale. En effet, pour mettre en avant le rôle des perlecans dans la rupture de la BHE, Nakamura et collaborateurs ont réalisé des ischémies transitoires chez des souris transgéniques qui n'expriment pas de perlecans (Nakamura *et al.*, 2017). Ils ont ainsi découvert que les souris transgéniques présentaient un volume lésionnel ainsi qu'une perméabilité de la BHE plus importante que les animaux témoins.

Les HSPG semblent ainsi être bénéfiques à de nombreux processus de régénération tissulaire post-ischémique. Or, durant la phase aiguë de l'ischémie, les cellules inflammatoires augmentent l'expression de métalloprotéases (MMPs) et d'héparanases. Des études menées chez la souris ont montré que l'expression des héparanases dans la pénombre était significativement augmentée dès le premier jour suivant une ischémie focale (Li *et al.*, 2012). L'expression de ces protéases est directement responsable de la dégradation de la MEC et des HSPG qui la constituent. La cinétique de dégradation des HSPG après une ischémie cérébrale a été évaluée chez le babouin soumis à une occlusion de l'artère cérébrale moyenne pendant 1, 1.5, 2, 3 ou 4 heures (Fukuda *et al.*, 2004). Les données *ex vivo* recueillies indiquent que les HPSG identifiés (les perlecans) sont plus sensibles à la protéolyse ischémique que d'autres composants de la matrice comme la laminine. En effet, dans le foyer ischémique, leur nombre chute brutalement et devient significativement inférieur à celui de la laminine dès 2 h après le début de l'ischémie (Figure 33).

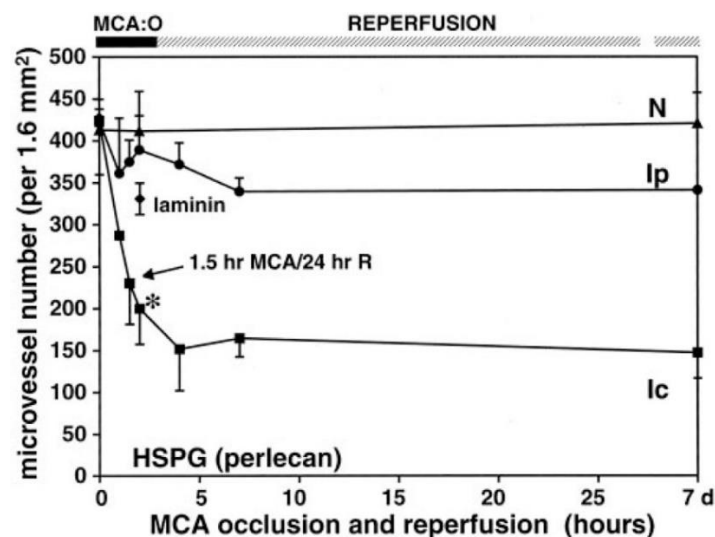


Figure 33 : Cinétique d'évolution du nombre de perlecans associés à des microvaisseaux chez le babouin soumis à une MCAO. * $p < 0.009$ (t test) vs laminine à 2h après le début de l'ischémie. (Ic : indique le foyer ischémique ; Ip : indique la région périphérique ; N : indique le tissu controlatéral non ischémié) (Fukuda *et al.*, 2004).

Cette dégradation est délétère à plusieurs niveaux. Elle est directement responsable de la perte d'adhésion cellules/matrice conduisant à la mort des cellules. Elle mène également à la rupture de la BHE qui précède la formation de l'œdème vasogénique. Enfin, elle entrave les effets bénéfiques des HSPG sur les mécanismes de la récupération fonctionnelle, car suite à leur destruction, les molécules de signalisation se retrouvent vulnérables à une dégradation enzymatique. De plus, chez le primate non-humain, la cinétique de disparition des HSPG corrobore avec les premières apparitions de dommages de l'ADN sur les cellules neuronales (Tagaya *et al.*, 1997).

Une potentielle piste thérapeutique pourrait donc consister à remplacer les HSPG détruits à la suite d'une ischémie, afin de maintenir l'architecture matricielle et la biodisponibilité des facteurs de croissance.

4.3 La thérapie matricielle ou RGTA (ReGeneraTing Agent)

Le RGTA (pour ReGeneraTing Agent), est un biopolymère disaccharidique, fruit d'une collaboration entre la société OTR3 et le laboratoire CRRET. Il s'agit d'un mimétique des HS, obtenu à partir de dextrans de deux-cent-cinquante unités glucosidiques reliées entre elles par des liaisons α 1-6 (Figure 34). Son analogie avec les HS naturels lui confère les mêmes propriétés de liaison aux différents composants de la MEC (collagène, fibronectine, laminine...) ainsi qu'aux diverses cytokines et facteurs de croissances impliqués dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale (VEGF, FGF, SDF) tout en ayant des propriétés anticoagulantes 10 fois moins importantes que l'héparine (Tardieu *et al.*, 1992; Rouet *et al.*, 2005a, 2006). En revanche, de par sa structure, il possède l'avantage d'être plus stable que les HS naturels, et de pouvoir résister aux attaques enzymatiques (Tardieu *et al.*, 1992). Ainsi, lors de lésions tissulaires, les HS détruits peuvent être remplacés par les molécules de RGTA qui peuvent se fixer aux protéines matricielles sans être dégradées par les héparanases. Les facteurs de croissances et les cytokines peuvent de nouveau être stockés et présentés à leurs récepteurs pour agir sur le site lésé. De ce fait, cet agent, administré de façon précoce, devrait permettre de stabiliser la structure de la MEC durant l'ischémie, et maintenir la biodisponibilité des facteurs de croissance impliqués dans les processus de régénération (Figure 35).

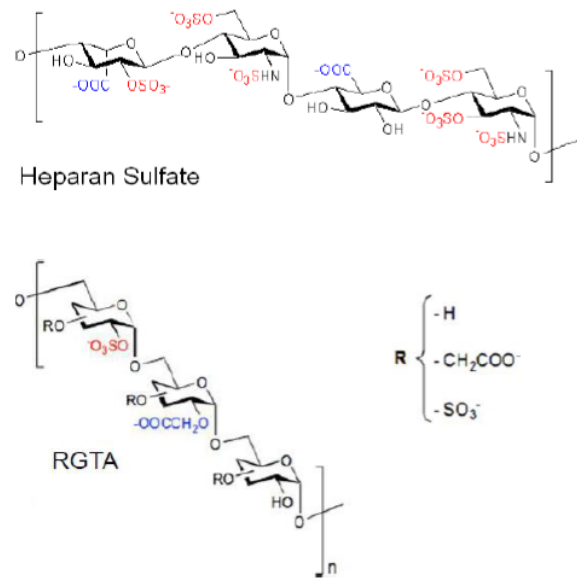


Figure 34 : Structure des héparanes sulfates et du RGTA

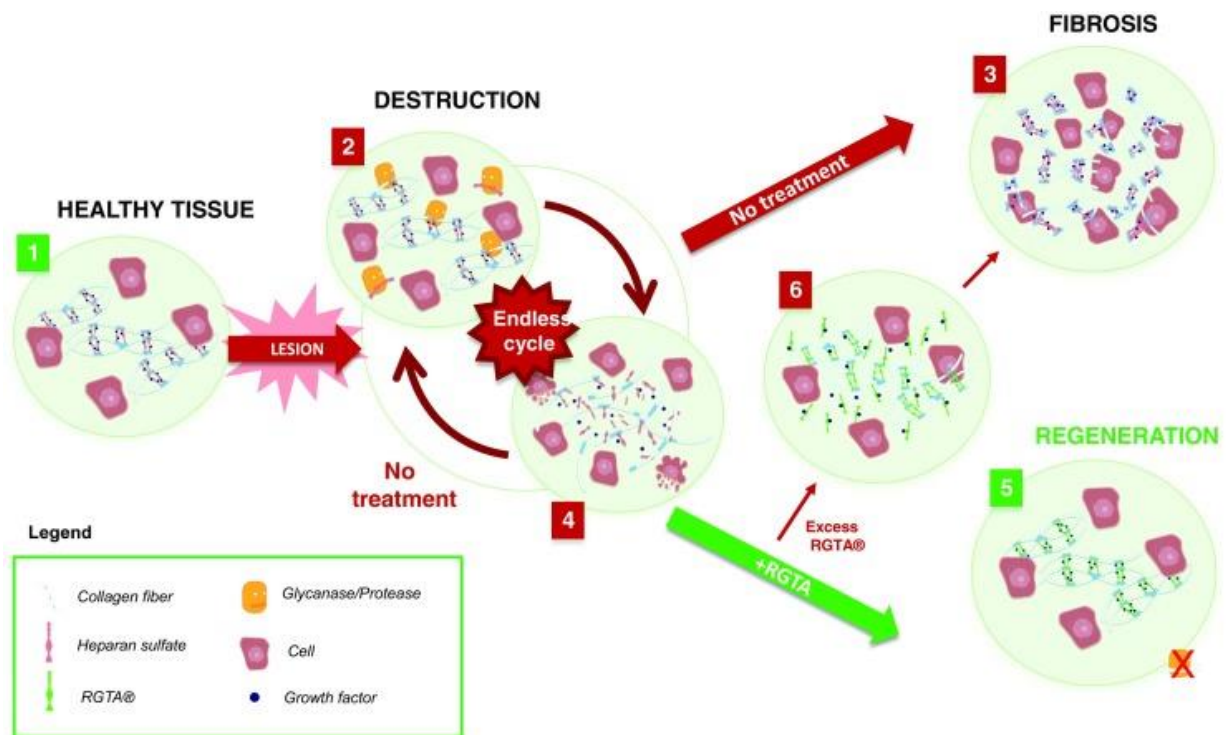


Figure 35 : Fonctionnement du RGTA en réponse à une lésion tissulaire. 1. L'organisation de la MEC dans un tissu sain : les HS maintiennent l'échafaudage de la matrice et stockent les facteurs de croissance. 2. Après une lésion la structure matricielle et les HS sont dégradés, laissant les facteurs de croissance à la merci d'une dégradation enzymatique. 3. Une réparation rapide est enclenchée menant à une fibrose (tissu cicatriciel). 4. Si l'inflammation n'est pas régulée, l'inflammation chronique mène à un cycle de réparation/destruction de la matrice empêchant la cicatrisation tissulaire. 5. Le RGTA remplace les HS dégradés permettant la restauration du microenvironnement cellulaire et de la biodisponibilité des facteurs de croissance pour faciliter la régénération tissulaire. 6. L'excès de RGTA pourrait empêcher le processus de réparation en accaparant les facteurs de croissance (Adapté de Barritault *et al.*, 2017)

De nombreux travaux ont permis d'établir qu'une administration de RGTA stimulait la régénération tissulaire (Barritault *et al.*, 2017b). Si nous restons concentrés sur les effets avérés du RGTA dans la régénération d'un tissu ischémié, Desgranges et collègues ont établi qu'une administration de RGTA après écrasement musculaire chez le rat favorisait la régénération et la réinnervation du muscle (Desgranges *et al.*, 1999). L'administration de RGTA dans un modèle d'ischémie du myocarde chez le cochon a également mis en évidence une diminution significative de la taille de l'infarctus, ainsi qu'un retour de près de 80 % de la fonction cardiaque (Yamauchi *et al.*, 2000). Par ailleurs des études menées sur la vascularisation des membranes chorio-allantoïdiennes d'un embryon de poulet ont prouvé que le RGTA avait des propriétés pro-angiogéniques via une potentialisation de l'activité du VEGF (Rouet *et al.*, 2005a). En effet, l'application de 1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de RGTA induit une augmentation du réseau vasculaire de 30 % tout en augmentant l'expression des deux récepteurs au VEGF (VEGFR-1 et 2) (Figure 36) (Papy-Garcia *et al.*, 2002; Rouet *et al.*, 2005a).

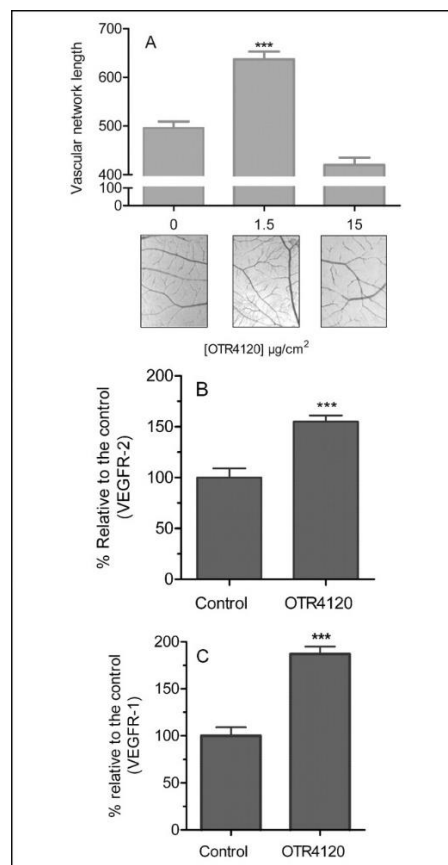


Figure 36 : Le RGTA induit une angiogenèse de la membrane chorio-allantoïque d'embryon de poulet. (A) Des photographies ont été prises afin de mesurer la longueur totale des vaisseaux. Trois doses différentes ont été testées avec $n=15-20$ par groupe. (Moyenne \pm SD). Des RT-PCR ont été réalisées afin de quantifier l'expression membranaire (B) du VEGFR-2 et (C) du VEGFR-1 (moyenne \pm SE). ***, $p < 0.001$ (test statistique non communiqué). OTR4130 se réfère au RGTA (Rouet *et al.*, 2005a)

4.4 Le RGTA dans le traitement de l'ischémie cérébrale

Des études sur les effets du RGTA après ischémie cérébrale ont été récemment menées chez le rat au sein de notre laboratoire en collaboration avec le CRRET et la société OTR3 (Khelif *et al.*, 2018a). Dans un premier temps, l'étude du temps d'administration optimal du RGTA a été menée. Après une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (OACM 1h), 1.5 mg/kg de RGTA a été administré par voie intraveineuse 1, 2.5 ou 6 h après le début de l'ischémie. L'évolution du volume lésionnel a ensuite été analysée dans chaque groupe 2 jours et 14 jours après ischémie. Les résultats obtenus indiquent qu'une injection 1 h après ischémie confère une meilleure neuroprotection. En effet, les animaux ayant reçu le traitement à ce temps ont un volume lésionnel significativement réduit à J2 par rapport aux animaux contrôles (Figure 37). Il s'agit donc du temps d'administration retenu pour les futures études.

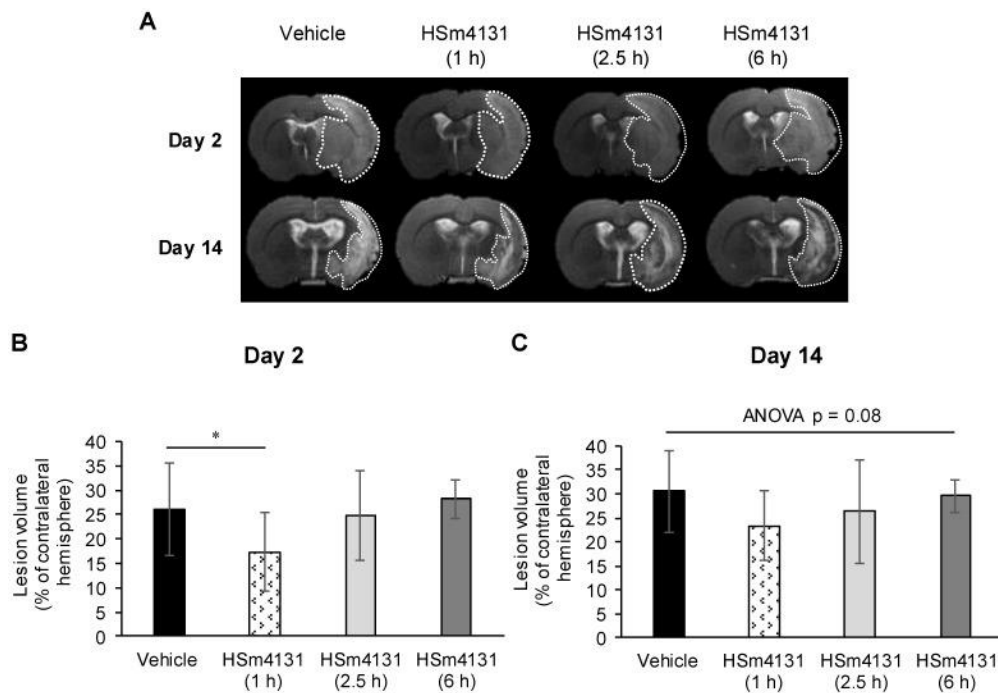


Figure 37 : Fenêtre thérapeutique optimale du RGTA. (A) Images IRM T2-weighted obtenues 2 jours et 14 jours après ischémie. (B) Volume lésionnel au jour 2 et (C) jour 14. (moyenne \pm SD) (Contrôles n = 21; 1.5 mg/kg RGTA (1 h n = 15; 2.5 h n = 10, et 6 h n = 6)) (*one-way ANOVA suivie par un test post-hoc de Tukey HSD test, $p < 0.05$) (HSm4131 se réfère au RGTA) (Khelif *et al.*, 2018a)

Par la suite, la dose optimale de RGTA a été déterminée chez le même modèle animal (Khelif *et al.*, 2018a). Toujours après une OACM d'1 h, 4 doses différentes de RGTA ont été administrées par voie intraveineuse. L'effet de ces doses sur le volume lésionnel ainsi que sur la récupération fonctionnelle a ensuite été évalué. Les données IRM obtenues à 2 jours et 14 jours post-ischémie indiquent une réduction significative et persistante du volume lésionnel à la suite d'une injection de 0.5 mg/kg de RGTA (Figure 38). L'effet bénéfique de cette dose a

également été validé par les tests comportementaux réalisés jusqu'à 10 jours post-ischémie, puisque les animaux traités par 0.5 mg/kg de RGTA présentent une meilleure récupération fonctionnelle (Figure 38).

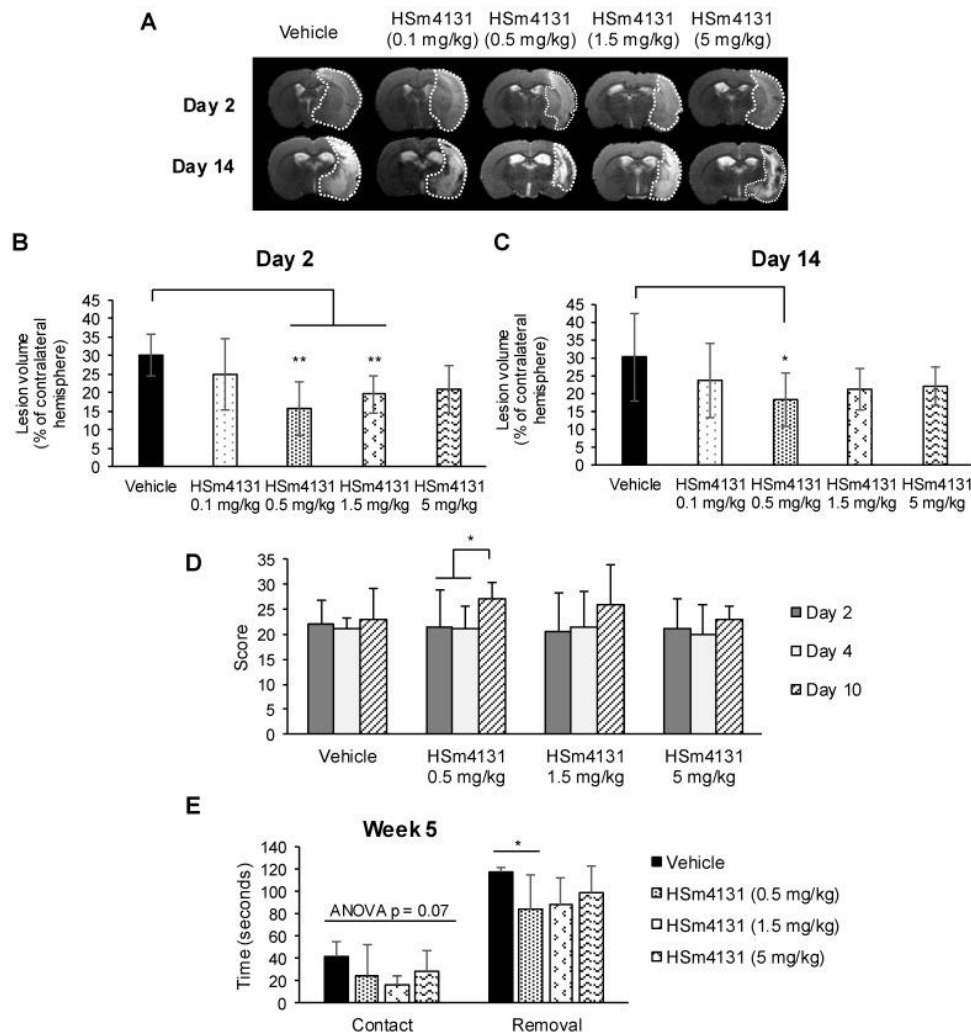


Figure 38 : Effet-dose du RGTA après une OACM chez le rat. (A) Images IRM T2-weighted obtenues 2 jours et 14 jours après ischémie. (B) Volume lésionnel au jour 2 et (C) jour 14. (Moyenne \pm SD) (Contrôles $n = 11$; RGTA (0.1 mg/kg $n = 7$; 0.5 mg/kg $n = 10$; 1.5 mg/kg $n = 10$; 5 mg/kg $n = 7$)) (One-way ANOVA suivie par un test post-hoc de Tukey HSD, $**p < 0.01$; $*p < 0.05$). (D) Evolution du score neurologique. Un score maximal de 28 signifie qu'il n'y a aucun déficit (Médiane \pm IQR) (Contrôles $n = 8$; RGTA (0.5 mg/kg $n = 10$; 1.5 mg/kg $n = 10$; 5 mg/kg $n = 7$)) (*One-way ANOVA suivie par un test post-hoc de Tukey HSD, $p < 0.05$). (E) Test de l'adhésif 5 semaines après l'OACM. Le temps de contact et de retrait de l'adhésif du côté controlatéral est mesuré en secondes (Moyenne \pm SD) (Contrôles $n = 8$; RGTA (0.5 mg/kg $n = 10$; 1.5 mg/kg $n = 10$; 5 mg/kg $n = 7$)) (*One-way ANOVA suivie par un test post-hoc de Tukey HSD, $p < 0.05$). (HSm4131 se réfère au RGTA) (Khelif *et al.*, 2018a)

. Ces résultats sont corroborés par les analyses *ex vivo* qui démontrent une neurogenèse et une angiogenèse plus efficaces chez ces animaux (Khelif *et al.*, 2018a).

Ces données révèlent le potentiel thérapeutique du RGTA dans le traitement de l'ischémie cérébrale. Cette stratégie pourrait à la fois permettre d'étendre la fenêtre thérapeutique des

thérapies de reperfusion de l'AVC grâce à ses propriétés neuroprotectrices, et promouvoir la régénération du tissu cérébral afin d'améliorer la récupération fonctionnelle.

4.5 La recherche thérapeutique pour l'AVC : les raisons d'un échec

Selon le registre des essais cliniques de l'AVC, on dénombre près de 1500 études conduites en phase 1, 2 et 3 (en cours ou terminées) (Clinical Trials Registry - Internet Stroke Center). Malheureusement, hormis la thrombolyse, aucun traitement pharmacologique n'est commercialisé à l'heure actuelle. La raison probable de cet échec est multifactorielle, et de nombreux comités d'experts se réunissent régulièrement afin d'élaborer des recommandations à prendre en compte lors des études précliniques. En 1999, un premier groupe d'experts composants le STAIR (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable) a souhaité créer un guide à l'intention de la communauté scientifique comprenant plusieurs points d'amélioration (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR), 1999). Ces recommandations ont depuis été mises à jour et sont détaillées ci-après (Fisher *et al.*, 2009) :

Effet-dose : La dose efficace la plus petite ainsi que le seuil de tolérance doivent être définis. Une dose optimale doit pouvoir être dégagée et validée par des analyses histologiques et comportementales.

La fenêtre thérapeutique : Bien que ce sujet soit encore soumis à débats, il semblerait que le rat soit un modèle animal pertinent pour établir le temps d'administration optimal d'un agent thérapeutique (Fisher *et al.*, 2009; Mohamadpour *et al.*, 2019). Bien souvent chez l'animal, les temps d'administration sont parfaitement contrôlés et ont lieu peu de temps après l'induction de l'ischémie. Chez l'Homme, le temps d'administration est hétérogène car il dépend de la prise en charge du patient qui n'a pas toujours lieu au même moment. Ainsi, il est important que les études précliniques considèrent des fenêtres thérapeutiques réalistes par rapport au milieu hospitalier, autrement dit, suffisamment éloignées du début de l'évènement ischémique pour pouvoir être reproduits chez l'Homme.

Durée d'étude : Afin de démontrer un effet durable du traitement, des analyses histologiques et comportementales doivent être réalisées sur au moins 3 semaines suivant l'AVC afin d'inclure les mécanismes physiologiques ayant lieu durant la phase chronique.

Suivi des paramètres physiologiques : Certains paramètres physiologiques peuvent avoir un impact sur les dommages ischémiques. Pour assurer la reproductibilité du modèle d'un animal à l'autre, il est donc recommandé de suivre et de maintenir à des valeurs stables les paramètres

suiuants : la pression artérielle, les gaz sanguins, et la température. L'imagerie ou le Doppler peuvent également être utilisés pour s'assurer d'une occlusion artérielle puis d'une reperfusion adéquate.

Échantillons d'étude : Des calculs de puissance et de tailles d'échantillon appropriés doivent être réalisés. Les animaux doivent être répartis de façon randomisée, des critères d'inclusion et d'exclusion doivent être mis en place *a priori* puis les analyses doivent être réalisées en aveugle afin d'éliminer tout biais d'interprétation.

Comorbidités : La plupart des études sont réalisées chez des animaux jeunes et sains. Or, l'AVC atteint en grande majorité des individus âgés avec des affections concomitantes comme l'hypertension artérielle, le diabète, l'obésité etc... Il serait donc judicieux d'ajouter ces différentes comorbidités aux analyses précliniques afin de s'adapter au mieux à la population cible.

Sexe : Bien souvent, dans la recherche chez l'animal (principalement chez le rongeur), on retrouve une utilisation exclusive de mâles au détriment des femelles. Les cycles hormonaux de celles-ci sont généralement mis en cause, puisqu'ils seraient une source de variabilité dans le comportement. Or depuis peu il apparaît que ce n'est pas forcément vrai puisque le principal facteur de variabilité comportementale chez le rongeur ne serait pas leur sexe, mais le nombre d'animaux par cage (Beery, 2018). L'AVC est une pathologie qui touche aussi bien les hommes que les femmes. Les deux sexes devraient donc être représentés dans la recherche préclinique, et l'efficacité du traitement devrait être montrée chez les mâles comme chez les femelles.

Étude d'interaction : Les patients qui arrivent assez tôt à l'hôpital peuvent bénéficier d'une thrombolyse par le rt-PA. Les effets d'une interaction entre le nouveau traitement et le rt-PA devraient donc être connus.

Le modèle animal : L'efficacité du traitement doit être validée aux moyens d'analyses histologiques et comportementales chez au moins deux espèces animales différentes. La grande majorité des études précliniques sont réalisées chez le rat ou la souris. Le trop grand éloignement phylogénétique entre ces espèces et l'Homme pourrait expliquer les échecs de translation rencontrés. Après avoir obtenu des résultats préliminaires chez le rongeur ou le lapin, il est donc fortement recommandé de les valider chez le PNH (Primate Non-Humain), physiologiquement plus proche de l'Homme.

5 Le marmouset commun : un compromis idéal entre rongeurs et grands primates

Au cours des dernières décennies, de nombreuses approches thérapeutiques ont été testées, mais aucune n'a pour le moment fait preuve de son efficacité et n'a franchi le cap de la mise sur le marché (Minnerup *et al.*, 2012a). Une des raisons mise en avant, pouvant expliquer les difficultés de transposition à l'Homme, est l'utilisation de modèles animaux non-appropriés. En effet, le plus souvent les modèles expérimentaux sont des modèles rongeurs qui présentent un grand éloignement phylogénétique vis-à-vis de l'Homme. Afin d'améliorer la qualité des études précliniques et également de faciliter la translation à l'Homme en cas d'efficacité avérée, un groupe d'experts académiques et industriels, le groupe STAIR suggère l'utilisation de modèles venant d'espèces plus proches de l'Homme, dont les primates non-humains (PNH), pour confirmer les résultats observés chez les rongeurs. Récemment, le choix spécifique d'une espèce de petit primate se dégage dans le domaine des neurosciences : le marmouset commun (*Callithrix jacchus*) (Kishi *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018; Ohira *et al.*, 2019; Pomberger *et al.*, 2019).

5.1 Présentation de l'espèce

Le marmouset commun est un petit primate arboricole du Nouveau Monde, originaire du nord-est du Brésil. Ses touffes de poils blancs au niveau des oreilles lui valent l'appellation plus commune de « ouistiti à toupets blancs » (Figure 39).

A l'âge adulte, sa taille peut varier de 17 à 25 cm (sans la queue) pour un poids avoisinant les 250-350g, aussi bien chez les mâles que chez les femelles. A l'état naturel, les marmousets vivent en groupes sociaux composés de 2 à 20 individus placés sous l'autorité d'un couple dominant. Ce sont des animaux aux systèmes visuels et olfactifs très développés, qui se nourrissent principalement de fruits, d'insectes, et de gomme. Ils atteignent leur maturité sexuelle vers 18 mois, et donnent généralement naissance à des jumeaux après une période de gestation de 148 jours (Hearn, 2012). En captivité, un marmouset peut vivre jusqu'à 16 ans en moyenne, contre 12 à l'état sauvage.



Figure 39 : Le marmouset commun (*Callithrix jacchus*) (©Shutterstock)

5.2 Avantages du marmouset en tant que modèle animal pour l'ischémie cérébrale

L'utilisation des PNH dans la recherche sur l'AVC n'est pas une nouveauté : plusieurs modèles ont été développés chez le macaque ou le babouin, mais la taille imposante et la disponibilité de ces espèces sont autant de contraintes qui amènent progressivement la communauté scientifique à s'en détourner. En comparaison, le marmouset possède l'énorme avantage d'être d'une taille réduite, pour ne pas dire presque similaire à celle d'un rat. Cette petite taille va d'une part grandement faciliter sa manipulation, mais également drastiquement réduire les coûts d'investissement engagés au niveau des structures d'hébergement, de leur gestion et de leur alimentation. La reproduction des marmousets est également très efficace : contrairement aux primates plus imposants, les femelles donnent généralement naissance à deux petits à la fois et sont capables de se reproduire dès l'âge de 18 mois.

De façon générale, 4 avantages principaux rendent les modèles rongeurs particulièrement attractifs : leur facilité de manipulation, leur faible coût, leur facilité de reproduction, et la faisabilité d'espèces génétiquement modifiées. Le marmouset cohabit d'emblée les trois premières cases, mais depuis peu, il s'avère qu'il remplit également le dernier critère. En effet, les premiers marmousets génétiquement modifiés ont vu le jour au Japon en 2009 (Sasaki *et al.*, 2009). Cette avancée scientifique ouvre considérablement le champ des possibles quant à l'élaboration de nouveaux modèles de pathologies chez le primate. D'ailleurs, plusieurs laboratoires se focalisent désormais sur le développement de modèles génétiques des maladies d'Alzheimer et de Parkinson chez le marmouset (King, 2018; Kumita *et al.*, 2019).

D'un point de vue neuro-anatomique et neuro-vasculaire, le marmouset est certes plus éloigné de l'Homme que d'autres primates, mais de par son statut de primate et sa légère gyrencéphalie, il n'en reste pas moins plus proche que les rongeurs (Kishi *et al.*, 2014). En effet, contrairement aux rongeurs, les PNH ont comme l'Homme un cerveau gyrencéphale, c'est-à-dire qu'il forme des plis permettant d'augmenter la surface corticale (Heuer *et al.*, 2019) (Figure 40). Les animaux lissencéphales, comme les rongeurs, ont un ratio SG/SB (Substance Grise/Substance Blanche) plus élevé, ce qui ne reflète pas le ratio retrouvé chez l'Homme. Cela sous-entend qu'une ischémie réalisée chez un rongeur ne permettra pas d'apprécier les dommages induits à la SB comme le ferait un modèle primate (Fan *et al.*, 2017). La gyrencéphalisation va également influencer la localisation de certaines zones cérébrales, comme l'hippocampe. En outre, les PNH disposent d'une organisation cérébrale similaire à celle de l'Homme, avec 4 aires somatosensorielles, et 5 aires motrices tandis que les rongeurs n'en ont que 2 de chaque (Kaas, 2012). Enfin, la plupart des rongeurs ne disposent pas d'un cercle de Willis complet, ce qui explique pourquoi les lésions corticales chez les rongeurs sont généralement plus massives que celles des primates (Fan *et al.*, 2017). Ainsi, on retrouve une plus grande proximité neuro-anatomique et neuro-vasculaire entre l'Homme et les PNH, dont le marmouset, ce qui est d'une importance non négligeable dans un contexte d'ischémie cérébrale puisque l'évolution et l'établissement de la lésion cérébrale et des déficits fonctionnels seront ainsi mieux modélisés chez le marmouset que chez les rongeurs.

L'utilisation de PNH n'est toutefois pas sans limites. Leur grande proximité avec l'Homme constitue un atout mais se révèle également être un facteur entraînant une pression éthique supérieure à celle rencontrée dans le cadre d'expérimentation sur des modèles rongeurs. De plus, l'utilisation des PNH en recherche expérimentale se heurte à différents problèmes techniques : des difficultés d'approvisionnement, et un coût élevé d'achat et d'hébergement. Pour ces raisons, les études réalisées chez le rongeur comprennent généralement de grands effectifs d'animaux, ce qui n'est pas le cas avec des PNH.

Avec l'attractivité croissante du marmouset dans la recherche biomédicale, différents outils de recherche fondamentale ont été spécifiquement développés. Toutes les séquences IRM utilisées chez l'Homme dans le cadre de l'AVC (DTI, T2, T2*, Angiographie) ont été adaptées à l'étude du marmouset (Bihel *et al.*, 2011). Récemment, des cartographies fonctionnelles du cortex visuel, auditif, et somatosensoriel ont été réalisées par IRMf chez le marmouset éveillé (Liu *et al.*, 2013; Sadagopan *et al.*, 2015; Hung *et al.*, 2015a; Silva, 2016). Des analyses en IRMf ont également permis de voir l'émergence depuis peu d'un atlas, d'une reconstitution en

3D complète du cerveau, ainsi que de la caractérisation du réseau de mode par défaut du marmouset (Burman *et al.*, 2008, 2011; Liu *et al.*, 2019). Ces outils devraient pouvoir grandement faciliter les futures analyses du cortex cérébral du marmouset.

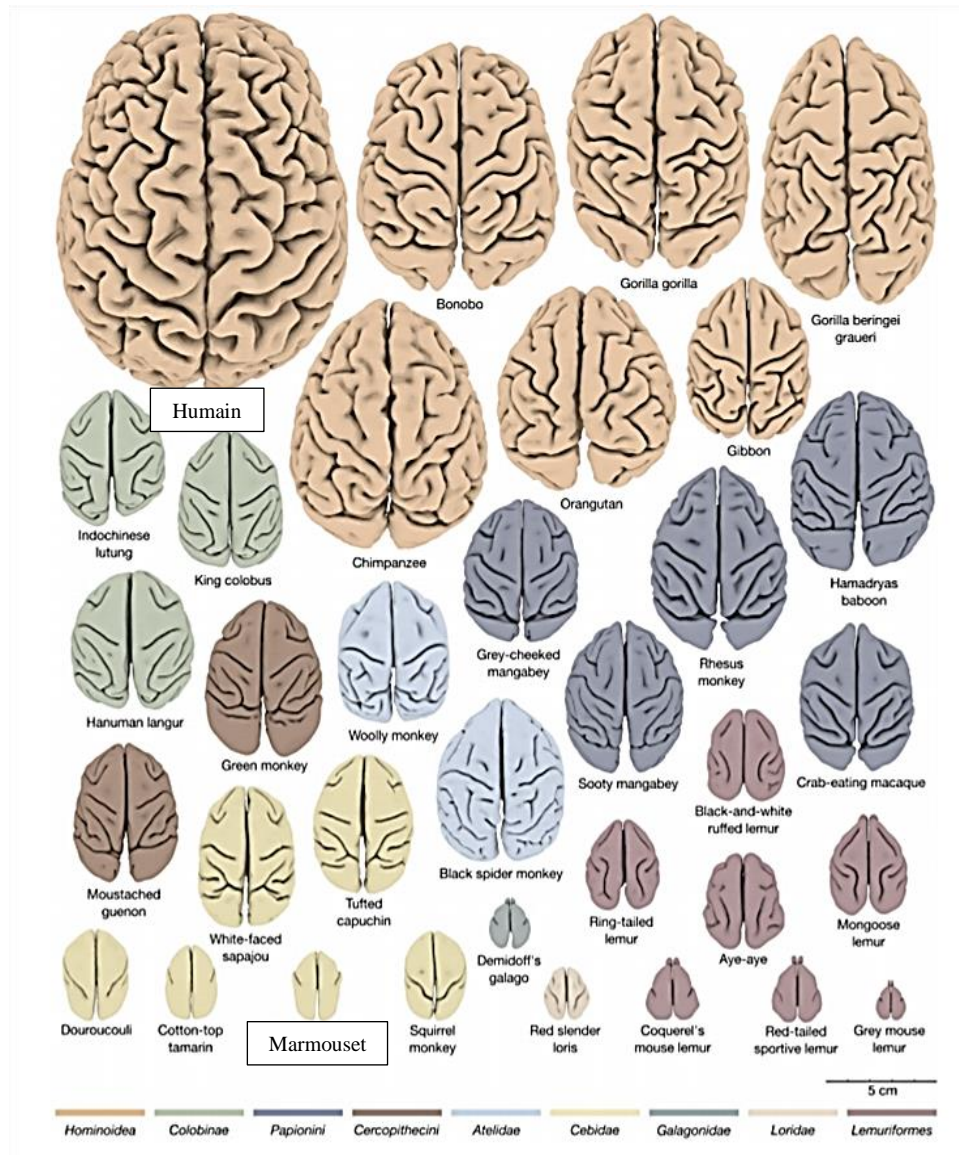


Figure 40 : Cerveaux de 34 espèces de primate en vue dorsale. Les espèces représentées sont classées par clade (D'après Heuer *et al.*, 2019).

5.3 Évaluation des déficits fonctionnels chez le marmouset

Étant donné que le but ultime de toute intervention thérapeutique suivant un AVC est d'améliorer, si ce n'est de restaurer, les fonctions sensorimotrices et cognitives des patients, l'inclusion de tests comportementaux est primordiale à toute étude préclinique. Chez le marmouset, de nombreux tests permettant d'évaluer les fonctions sensorimotrices après un AVC

ont été développés (Le Gal *et al.*, 2017). La présentation de ces tests a fait l'objet d'une revue publiée dans *Behavioural Brain Research*, présentée ci-après. Les tests utilisés au cours de cette thèse sont présentés dans la partie méthodologie.

En parallèle, les informations concernant l'évolution des fonctions cognitives après ischémie cérébrale manquent cruellement aux études thérapeutiques actuelles. Il est pourtant reconnu que les patients souffrent, sur le long terme, de troubles cognitifs pouvant toucher la mémoire, l'attention ou encore les fonctions exécutives (Brainin *et al.*, 2015). Ces troubles cognitifs, en plus de dégrader la qualité de vie des patients, sont un frein à la réinsertion professionnelle de près de 25 % d'entre eux. Ainsi, il paraît essentiel d'inclure des tests cognitifs, en plus des tests sensorimoteurs, aux études précliniques dans le but d'évaluer l'effet de nouveaux traitements sur la récupération de ces fonctions.

Le CANTAB (Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery) est un répertoire de tests cognitifs non-verbaux assistés par ordinateur et relié à un écran tactile. En offrant un large panel de tests, cet outil de recherche permet d'optimiser l'évaluation des déficits cognitifs liés à de nombreuses pathologies neurologiques, et ainsi démontrer de façon précise l'efficacité et l'innocuité de nouveaux traitements (Kehagia *et al.*, 2010; Roque *et al.*, 2011; Chamberlain *et al.*, 2011). Dans le cadre des études cliniques sur l'AVC, le CANTAB propose différentes tâches permettant d'évaluer la mémoire épisodique, la mémoire de travail, ainsi que les fonctions exécutives. L'intérêt particulier de cet outil vient du fait qu'il a également été adapté aux PNH et permet donc de maximiser l'aspect translationnel d'une étude (Figure 41). Bien que la durée d'apprentissage nécessaire ne soit que rarement précisée, de nombreuses études font état des capacités du marmouset commun à réaliser avec succès diverses tâches cognitives avec le CANTAB (Ridley *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1992; Spinelli *et al.*, 2004, 2006). Il pourrait être intéressant d'inclure une évaluation cognitive au moyen du CANTAB dans les futures études précliniques chez le marmouset. Pour cette raison, une partie de mes travaux de thèse a consisté à mettre en place un test évaluant la mémoire spatiale de travail chez le marmouset, dans un contexte d'ischémie cérébrale.



Figure 41 : Modèle adapté aux primates non humains du CANTAB (MonkeyCANTAB).

5.4 Modèles d'induction de l'ischémie cérébrale

Différents modèles d'ischémie cérébrale ont été développés chez le marmouset. En 1996, Marshall et collaborateurs ont proposé un modèle reposant sur une OACM par électrocoagulation (Marshall & Ridley, 1996). L'ACM est l'artère la plus communément atteinte au cours d'une ischémie chez l'Homme, ce qui en fait une cible pertinente. De plus, son occlusion entraîne de nombreux déficits moteurs, sensoriels et cognitifs, ce qui facilite l'évaluation d'une récupération fonctionnelle. Toutefois, l'approche de ce modèle d'induction est hautement invasive car elle requiert une craniotomie, ce qui peut entraîner des dommages collatéraux liés à une forte inflammation. De plus, le caractère permanent de l'occlusion engendre des lésions cérébrales massives, ce qui ne reflète pas les modalités retrouvées en clinique.

Plus tard, Virley et collaborateurs ont développé un modèle d'ischémie transitoire reposant sur l'application d'un agent vasoconstricteur, l'endothéline-1, directement sur l'ACM (Virley *et al.*, 2004). Là encore, cette technique nécessite une craniotomie pouvant alourdir les dommages cérébraux. Ce modèle permet toutefois une reperfusion, mais génère une forte variabilité interindividuelle car elle ne permet pas un contrôle strict des temps d'occlusion.

Après une étude de l'arborisation cérébrovasculaire du marmouset, Virley et collaborateurs ont conclu qu'une occlusion transitoire de l'ACM par voie intraluminale, fréquemment réalisée chez le rongeur, et moins invasive, était impossible chez le marmouset. La cause en reviendrait à la présence d'un « siphon » au niveau de la carotide interne qui empêcherait le passage mécanique d'un embolo (Virley *et al.*, 2004) (Figure 42). Néanmoins, ce modèle a su être adapté au marmouset avec succès au sein de notre laboratoire (Freret *et al.*, 2008; Bihel *et al.*, 2010). L'occlusion intraluminale repose sur l'insertion d'un embolo depuis la carotide externe jusqu'à

l'ACM. Avec cette méthode, aucune craniotomie n'est nécessaire ce qui réduit considérablement le côté invasif de l'acte chirurgical, et par conséquent, les dommages collatéraux. L'embolie peut ensuite être retiré à un temps précis pour permettre une reperfusion et une durée d'occlusion reproductible. Le profil lésionnel induit chez le marmouset, ainsi que les déficits comportementaux observés jusqu'à 7 semaines après ischémie (Bihel *et al.*, 2010) semblent indiquer que l'OACM par voie intraluminale est une méthode d'induction adaptée pour l'étude d'une nouvelle thérapie sur la physiopathologie de l'AVC.

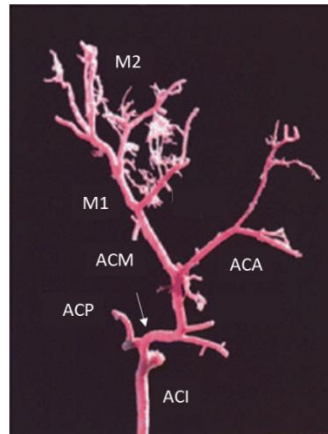


Figure 42 : Arborisation cérébrovasculaire du marmouset commun. La flèche désigne le siphon de la carotide interne. ACA : Artère Cérébrale Antérieure ; ACI : Artère Carotide Interne ; ACM : Artère Cérébrale Moyenne ; ACP : Artère Communicante Postérieure ; M1 : portion proximale de l'ACM ; M2 : portion distale de l'ACM (D'après Virley *et al.*, 2004).

Un modèle d'ischémie par photothrombose chez le marmouset a récemment été mis en place par Ikeda et collaborateurs (Ikeda *et al.*, 2013). La réalisation de cette méthode repose sur l'injection intraveineuse d'un agent photosensible : le Rose Bengal. Lorsque le Rose Bengal est illuminé par une longueur d'onde bien précise, il s'active et génère un thrombus dans la zone éclairée. Cette méthode est également peu invasive et reproductible car elle permet de contrôler l'étendue et la localisation de la lésion avec précision.

En 2015, Puentes et collègues ont décrit un modèle d'ischémie suivant une occlusion permanente de l'artère choroïde antérieure chez le marmouset. Cette artère irrigue la capsule interne. Son occlusion permet donc d'évaluer les dommages de la substance blanche et leurs conséquences (Puentes *et al.*, 2015). Cependant, cette approche est très invasive car elle requière une craniotomie large ainsi qu'une rétraction du cerveau.

Compte tenu de sa pertinence scientifique, et de l'expertise présente au sein de notre laboratoire, l'OACM par voie intraluminale est la méthode d'induction qui a été utilisée au cours de cette thèse.

5.5 Évaluation d'agents thérapeutiques chez le marmouset

Le marmouset commun a servi à l'évaluation de 2 nouvelles stratégies thérapeutiques de l'ischémie cérébrale : le clomethiazole (Marshall *et al.*, 2000) et le NXY-059 (Marshall *et al.*, 2001). Ces traitements ont tous les deux montré des effets positifs sur la neuroprotection et la récupération fonctionnelle chez le rat et la gerbille (Kuroda *et al.*, 1999 ; Sydserff *et al.*, 2000) avant d'être transposés chez le marmouset. Les résultats obtenus chez ces derniers a permis de valider les bénéfices du clomethiazole et du NXY-059 sur la récupération fonctionnelle des animaux (Marshall *et al.*, 2000, 2001). Cependant, aucun de ces agents n'a montré de résultats satisfaisants au cours des essais cliniques (Wahlgren *et al.*, 1999; Diener *et al.*, 2008). Pour autant, il ne s'agit pas ici de remettre en cause le modèle animal choisi, mais plutôt les conditions dans lesquelles il a été utilisé. Comme nous l'avons précisé plus tôt, Marshall et collaborateurs induisent leurs ischémies selon un modèle d'occlusion permanente et invasive. Ce modèle entraîne des lésions bien trop massives pour refléter correctement les conditions cliniques. En effet, une OACM permanente chez le marmouset endommage près de 40% de l'hémisphère ipsilatéral (Marshall & Ridley, 1996, 2003) alors que les lésions ischémiques ne représentent généralement que 4.5 à 14% de l'hémisphère ipsilatéral chez l'Homme (Carmichael, 2005). Pour une bonne translation de l'animal à l'Homme, le choix de l'espèce a son importance, mais le modèle ischémique également. Il y a maintenant 10 ans, notre équipe a développé une nouvelle approche d'induction d'ischémie chez le marmouset beaucoup moins invasive et permettant une reperfusion : l'OACM intraluminale transitoire (Freret *et al.*, 2008; Bihel *et al.*, 2010). Ce modèle n'induit aucun dommage collatéral lié à une craniotomie, génère des lésions plus petites, et paraît donc plus pertinent dans la modélisation des cas cliniques. Ainsi, même s'il est impossible de reproduire à la perfection chez l'animal les conditions et les conséquences d'une ischémie chez l'Homme, certains modèles ischémiques s'en rapprochent plus que d'autres.

Pour toutes les raisons citées précédemment, le marmouset commun nous paraît être un modèle animal de choix dans l'étude de l'ischémie cérébrale, à condition d'être utilisé avec un modèle d'induction d'ischémie adéquat. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier les effets d'un nouvel agent thérapeutique, le RGTA, après OACM intraluminale transitoire chez le marmouset.

REVUE : LE GAL ET AL., BEHAV BRAIN RES, 2017

“Assessment of behavioural deficits following ischaemic stroke in the marmoset”

Rozenn Le Gal, Myriam Bernaudin, Jérôme Toutain, Omar Touzani

Behavioural Brain Research

DOI : 10.1016/j.bbr.2017.07.042

Assessment of behavioural deficits following ischaemic stroke in the marmoset

Authors: Rozenn Le Gal^a, Myriam Bernaudin^a, Jérôme Toutain^a, Omar Touzani^{a,*}

Affiliations: ^aNormandie-Univ, UNICAEN, CEA, CNRS, ISTCT/CERVOxy group, Caen, France.

***Corresponding author:** Omar Touzani, ISTCT, CYCERON, Bd Becquerel, BP5229, F-14074 CAEN, France. Phone: 33-2-31-47-02-73; fax: 33-2-31-47-02-22. E-mail: touzani@cyceron

Abstract

Stroke is a common and devastating disease worldwide. Over the last two decades, many therapeutic approaches to ameliorate ischaemic stroke have been promising in animal studies but failed when transferred to the clinical situation. One of the possible explanations for these failures is the widespread use of animal models of cerebral ischemia that do not mimic the pathology encountered in the clinic. Accordingly, many expert committees recommended the integration of higher order species such as non-human primates in pre-clinical stroke studies. The common marmoset (*Callithrix jacchus*), a small New World monkey, start to stand out in the neuroscience field as a good compromise between larger primates and rodents. In this review, we discuss the relevance of the use of the marmoset in stroke studies. We will focus on behavioural tests developed in this species to assess sensorimotor deficits and their recovery during acute and chronic stages of brain ischaemia. The aim of this appraisal is to provide a comprehensive overview of the existing approaches to induce stroke in the marmoset as well as the paradigms for behavioural testing in this species. The data summarized in this review should contribute to the improvement of future stroke studies in the marmoset and accordingly improve the translation of the results from bench to bed.

Key word s: Stroke, Ischemia, Sensorimotor tests, Common marmoset, functional deficits

Abbreviations : AChA, Anterior choroidal artery; AChAO, Anterior choroidal artery occlusion; ET-1, Endothelin-1; MCA, Middle cerebral artery; MCAO, Middle cerebral artery occlusion; pMCAO, Permanent middle cerebral artery occlusion; tMCAO, Transient middle cerebral artery occlusion

Introduction

Stroke is a common and devastating disease worldwide. Despite declining stroke mortality rates in developed countries, its global burden is increasing. Fifty percent of survivors of the acute phase remain physically or mentally impaired, which represent a major socio-economic burden (DiLuca & Olesen, 2014; O'Donnell *et al.*, 2016). Ischaemic strokes, which represent 80-85% of all stroke subtypes, are caused by an abrupt occlusion of a major feeding vessel resulting in a decrease in local blood flow and hence delivery of oxygen and nutrients to the affected brain territory. Nowadays, the only approved treatments are thrombolysis with t-PA and mechanical thrombectomy, both of which are administered within the first hours after the initial onset of symptoms and therefore are limited to a minority of the patients that enter into this therapeutic window (Anon, 1995; Lees *et al.*, 2010). Consequently, further preclinical and clinical investigations are required to better understand the pathophysiology of stroke and to develop novel therapeutic interventions.

Over the last two decades, many therapeutic approaches to ameliorate ischaemic stroke have been proven efficient in animal studies but failed when transferred to the clinical situation (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR), 1999). One of the issues that has been put forward to explain these failures of translation between the bench and the bed is the inadequacy of the animal models of stroke (Anon, 1995; Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR), 1999;

Mergenthaler & Meisel, 2012). Indeed, most of the available preclinical studies rely on the use of young and healthy rodents (mice and rats) due to their low cost compared to most other laboratory species and because rodents are generally considered as ethically more acceptable (Mergenthaler & Meisel, 2012). In an attempt to improve the translation of findings from bench to bed, many recommendations, such as those of the STAIR (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable), have been published to emphasize the integration of higher order animals such as non-human primates in preclinical stroke research, due to their significant similarities (cerebrovascular, neuroanatomical and biomolecular) to man [5,7]. In this review, we address the interest of a new world primate, namely the common marmoset, as a reasonable and complementary animal model of stroke. We focus on an appraisal description of behavioural tests which are employed to assess functional deficits and their recovery following ischaemic stroke in the marmoset.

1. Interest of the marmoset for stroke's studies

Although momentous studies in respect to the pathophysiology of stroke have been performed in non-human primates such as baboons and macaques (Astrup *et al.*, 1977; Mansfield, 2003), these species have been relatively abandoned over the last three decades. The reasons for this are mainly due to the high cost and the absence of technically simple stroke models in these species. Recently, there has been considerable interest in the

common marmoset (*Callithrix jacchus*) for neuroscience research (Tokuno *et al.*, 2012). Indeed, the marmoset, a small new world primate of a non-endangered status, is closer to man than rodents in term of cerebrovascular system, brain metabolism, gray-to-white matter ratio and presents several advantages in matter of economies, size (close to rats), husbandry and ease of breeding (Mansfield, 2003; Okano *et al.*, 2012). Although marmosets are not fully gyrencephalic, they are closer in the phylogenetic tree to man. On the other hand, their relative lissencephaly provides advantages for the analysis of the cerebral cortex (Tokuno *et al.*, 2012). Marmosets also have a larger brain to body weight ratio than rodents since an adult marmoset has a brain approximately 4 times the size of the rat with similar body weight of 250 to 400 g. As a result of their small size, common marmosets are generally easy to manage and handle, which represent a great advantage for behavioural testing. Moreover, the common marmoset has a disease susceptibility profile that is similar to humans, making it a suitable model for drug development (Carrion Jr & Patterson, 2012).

Furthermore, various fundamental research tools have been developed for marmosets (Kishi *et al.*, 2014). Firstly, magnetic resonance imaging (MRI) techniques are largely employed in order to investigate internal body structure in details *in vivo*. Since this method is non-invasive, the animal does not have to be sacrificed which opens the possibility to perform long-term studies in the same subject. Among the MRI techniques, T1 and

T2-weighted scanning sequences are commonly used to obtain neuroanatomical information. T2-weighted sequences enable to visualize tissue presenting more mobile water protons, thus ventricles or damaged tissue as ischaemic lesion. The vasogenic oedema is also visible thanks to this sequence. Another MRI technique, called diffusion tensor image (DTI), is designed to detect random water molecules movement. Water movement becomes restricted in the intracellular space in ischaemic brain tissue, resulting in an extremely bright signal on DTI. Thus, DTI is an extremely sensitive method for detecting acute stroke and visualize cytotoxic oedema. DTI is also used to visualize and follow major white matter features in the brain that is based on the preferential diffusion of water along the direction of axonal tract (Mori *et al.*, 2009). Since white-to-grey matter ratio is higher in marmosets than in rodents, they are more suited for a white matter analyse. Another technique is employed to detect small structural differences, namely statistical parametric mapping by voxel-based morphometry (VBM) (Hikishima *et al.*, 2011). Recently, functional mapping of the visual (Hung *et al.*, 2015c, 2015b), auditory (Sadagopan *et al.*, 2015) and somatosensory cortex (Liu *et al.*, 2013) of the marmoset's brain has been carried out using fMRI in the anaesthetised and awake marmoset (for review see (Silva, 2017)). A full 3D reconstitution of the entire marmoset cerebral cortex as well as a brain template are now available which will facilitate future MRI investigations on this species (Huffman & Krubitzer, 2001; Burman *et al.*, 2008, 2011). Furthermore, the complete

genome of the common marmoset is currently being sequenced and the recent development of the first genetically-modified marmoset (Sasaki *et al.*, 2009) has attracted attention for its potential in pre-clinical studies since genetic models of primates are with their long lifespan (i.e. more than 10 years), highly attractive (Fischer & Austad, 2011).

2. Models of ischaemic stroke in the marmoset

In order to benefit of the many advantages of this primate, several groups have developed various approaches to induce focal brain ischaemia (Fig. 1). Most of these approaches are adaptations of those performed in rodents and target mainly the middle cerebral artery (MCA), the vessel that is the most frequently affected in patients.

The first model of focal stroke in the marmoset was described by Marshall and Ridley (Marshall & Ridley, 1996). In this paradigm, ischaemia was induced by unilateral electrocoagulation of the proximal portion of the MCA following a large fronto-temporal craniotomy (Fig. 1.1). The MCA occlusion (MCAO) produced an infarction in the frontal, temporal and parietal cortices, the underlying white matter and the caudate and putamen (Marshall *et al.*, 2000) (Fig. 2). Although, this model requires somewhat sophisticated surgical procedures, it had the merit to be the first in which behavioural deficits, be they sensorial or motor, were assessed with a battery of tests up to ten weeks after the induction of stroke (Marshall & Ridley,

1996). Thus, many behavioural tests were described and validated in this model and formed a valuable base for the subsequent stroke studies in the same species. The main disadvantage is the craniotomy technique, which may lead to injury of the underlying cortex or rupture of a vessel by drilling or electrocoagulation. Furthermore, this procedure affects intracranial pressure and blood brain barrier function, and requires significant surgical skills to be performed. Nonetheless, in addition to the invasiveness of the surgical approach (lesion of the temporalis muscle, large craniotomy, dura dissection, brain retraction), this model of stroke has the disadvantage of the impossibility to reperfuse because of the electrocoagulation of the artery.

To overcome this issue, Virley and collaborators (Virley *et al.*, 2004) reported a model of transient ischaemia in the marmoset through the use of the vasoconstrictor agent, endothelin-1 (ET-1) that was applied directly onto the distal segments of the MCA (Fig. 1.2). The craniotomy can expose the region distal to the M1 branch and the M2 branch of the MCA *via* the pterional approach. Blocking these sites produces a limited infarct area (Fig. 2). Control on the localization of the ischaemia is an advantage of cortical ET-1 application that provides a suitable model to study behavioral and long-term effects of focal ischaemia. The main disadvantage of this model, in addition to the collateral damages possibly caused by the craniotomy, is that the duration of the occlusion cannot be efficiently controlled and,

accordingly induces an increased inter-individual variability (Virley *et al.*, 2004).

To reduce the invasiveness of the surgical approach and to permit the induction of both permanent and transient ischaemia in the marmoset, our group has adapted the intraluminal filament approach, which is widely employed in laboratory rodents and is considered to better replicate the clinical situation. To avoid craniotomy, the insertion of a calibrated nylon thread into the external carotid artery up to the origin of the MCA requires relatively minor cervical surgery and results in minimal morbidity and suffering (Freret *et al.*, 2008) (Fig. 1.5). Through the use of multiple outcome analyses (neuroimaging, behavioural tests, along with post-mortem neuropathology), the evolution of brain damage and behavioural impairments in acute, subacute and chronic stages of ischaemia following permanent (pMCAO) or temporary MCAO (tMCAO) have been described (Bihel *et al.*, 2010). The intraluminal occlusion of the MCA produced reproducible brain lesions that embraced both cortical and subcortical structures (Fig. 2) and persistent functional deficits up to 6 weeks following the induction of ischaemia (Bihel *et al.*, 2010). These alterations were more severe in marmosets subjected to pMCAO in comparison to those in which reperfusion was applied 3 hours after the occlusion (tMCAO). *Post-mortem* analyses revealed a widespread neuronal loss and associated astrogliosis in greater extent in permanently occluded animals. Interestingly, and thanks to the relative high white to grey

matter ratio in the marmoset, which facilitates imaging of white matter lesions, intraluminal occlusion of the MCA has been showed to result in major alterations of the white matter bundles, analysed by DTI-MRI, that were correlated with functional deficits and could explain, at least in part, the persistence of stroke-induced functional deficits (Bihel *et al.*, 2010). The profile of brain damage and functional deficits seen in the marmoset suggest that this model of intraluminal MCAO could be suitable to investigate the pathophysiology and the treatment of ischaemic stroke. Besides, the relevance of this reversible MCAO model has already been well demonstrated in rodents by stroke researchers (Carmichael, 2005; Bacigaluppi *et al.*, 2010; Mergenthaler & Meisel, 2012). While the rodent model can provide a rapid screening of new therapeutic molecules, the marmoset model allows a more detailed characterization of the drug therapy before a possible clinical adaptation.

Recently, a model of focal stroke by photothrombosis has been reported in the marmoset (Ikeda *et al.*, 2013). It is an adaptation of the approach initially described in the rat (Watson *et al.*, 1985). Following an exposition of the skull, the sensorimotor area of the cerebral cortex is irradiated with green light after intravenous injection of the photosensitive Rose Bengal dye (Watson *et al.*, 1985) (Fig. 1.4). The thrombosis so induced results in circumscribed cortical lesion, the size of which is determined by the extent of the irradiated zone (Fig. 2). This technique does not require any craniotomy and is thus less invasive and

also lead to small variations between individuals since the ischaemic area can be precisely defined. A thrombolytic agent can induce reperfusion but the reperfusion time is difficult to control. Less control of the reperfusion is a limiting feature of the photothrombotic occlusion of MCA. Although the photothrombotic ischemic stroke model has some limitations, this procedure allows ongoing processes in the perilesional area and the contralateral cortex to be elucidated and helps to gain a better understanding of neuronal repair after stroke (Harrison *et al.*, 2013). Thus the photothrombotic ischaemic stroke model may address specific questions, e.g. in the field of

restorative drug studies and neuronal repair evaluation.

In order to analyse white matter impairments after stroke, Puentes and colleagues (Puentes *et al.*, 2015) described a model in the marmoset in which the anterior choroidal artery (AChA) that feeds the internal capsule is permanently occluded (Fig. 1.3). This approach induces infarction of the internal capsule (Fig. 2) and subsequent motor deficits. Nonetheless, the method is somewhat surgically challenging and highly invasive in that it requires a large craniotomy and retraction of the brain.

Fig. 1

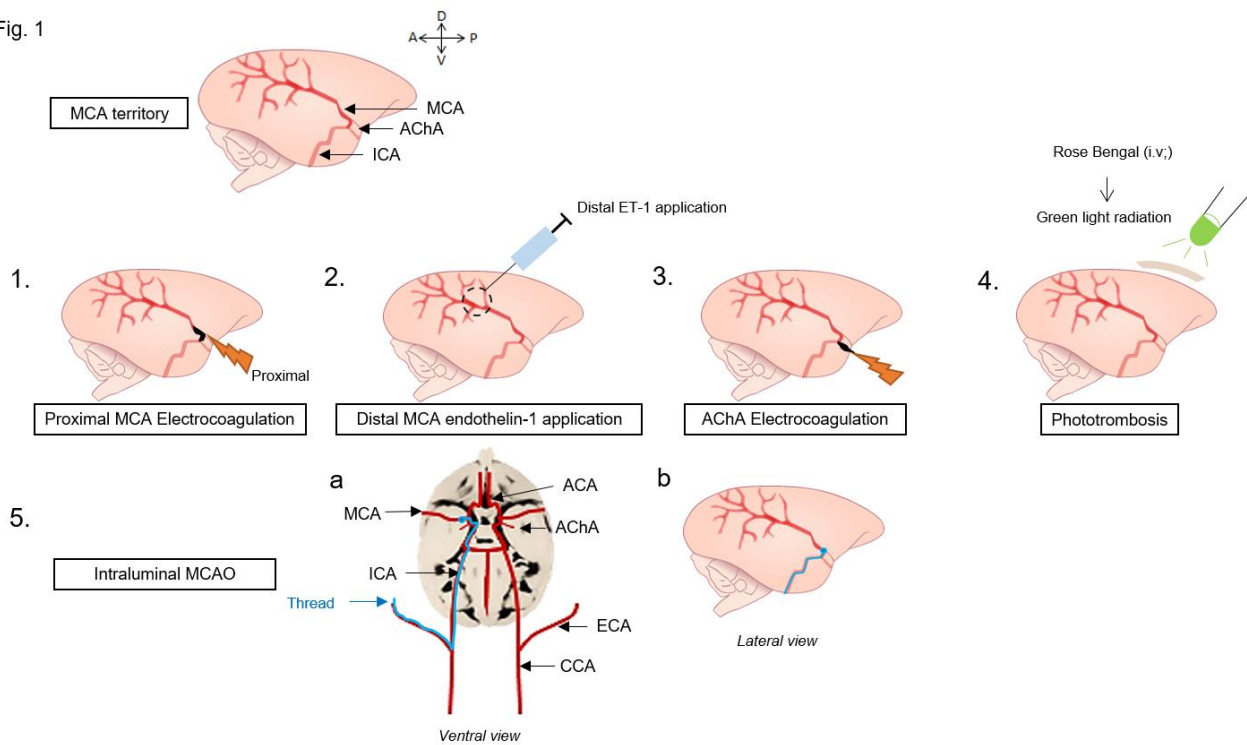


Fig. 1 Stroke models in the marmoset. Ischaemic stroke is induced through the use of an extravascular approach to permanently occlude the proximal segment of the MCA by electrocoagulation (1), to transiently occlude the distal segment of the MCA by application of endothelin-1 (2), or to permanently occlude the AChA by electrocoagulation (3). These approaches require a craniotomy. Phototrombosis is induced by an intravenous injection of rose bengal followed by an irradiation of the cortex with a green light (4). Stroke is also induced with the intraluminal method (5) in which a nylon thread is introduced into the external carotid artery and advanced up to the origin of the MCA (a: ventral view; b: lateral view). The intraluminal method permits the induction of permanent and temporary MCAO. ACA, anterior cerebral artery; AchA, anterior choroidal artery; CCA, common carotid artery; ECA, external carotid artery; ICA, internal carotid artery; MCA, middle cerebral artery; MCAO, middle cerebral artery occlusion; D, dorsal; V, ventral, A, anterior; P, posterior.

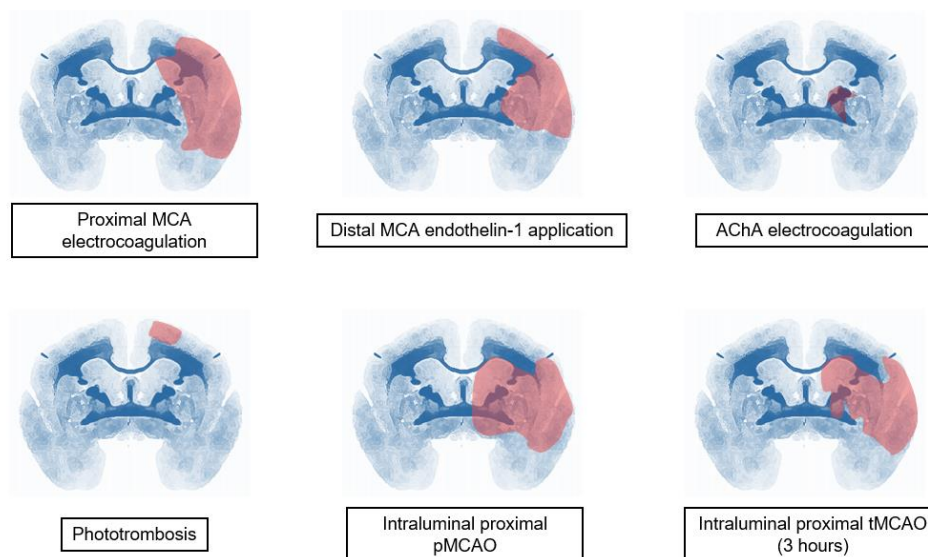


Fig. 2: Patterns of lesions displayed in different stroke models in the marmoset. AChAO, anterior choroidal artery occlusion; pMCAO, permanent middle cerebral artery occlusion; tMCAO, transient middle cerebral artery occlusion.

3. Behavioural tests in the marmoset following stroke

Since the ultimate goal of any therapeutic intervention following stroke is the restoration, or at least, the improvement of patients' functions, it is mandatory to include behavioural assessments in preclinical studies (especially those that assess novel therapeutic strategies). Many investigations focus solely on the determination of lesion size by various MRI or histologic techniques. However, there are proofs in the literature that the histopathological features of ischaemic brain are not necessarily correlated with functional impairments (Bouët *et al.*, 2007; Freret *et al.*, 2009). One difficulty with experimental studies is that, in rodents, usually only transient deficits are reported following focal ischaemia (Lindner *et al.*, 2003;

Macrae, 2011). This is probably due to the intrinsic capabilities of rodents to recover rapidly and/or to the inadequate sensitivity of the behavioural tests employed to highlight those deficits (Zarruk *et al.*, 2011). Those facts have been the basis of many recommendations that advocate the inclusion of higher order species in preclinical investigations of stroke [5]. Indeed, primates are known to display a richer and elaborated behavioural repertoire, which can be precisely analysed by adequate tests.

Several behavioural tests were developed in marmosets to assess deficits of sensorimotor functions and their recovery during acute and chronic ischaemic phases. It remains important to notice that the relevance and the sensitivity of those tests depend on the model of stroke induction, and on the period during which they are performed.

3.1. General precautions preceding behavioural tests

By nature, marmosets are apprehensive animals, thus the arrival of unknown experimenter or equipment can become very stressful. Training a highly anxious and agitated animal is much more challenging when compared with quieter animals, this can affect performances. Therefore, it is strongly recommended to habituate the animal to the human presence, to the objects, to the sounds, or the smells that it will be confronted during behavioural tests. During few weeks, the experimenter must visit the marmosets every day to familiarize them. He may try to give them small pieces of marshmallow, or another kind of treat that is going to be used in the following tests as a reward, so that the monkeys do not consider him a threat anymore. This process must continue until the fear behaviours completely disappear, i.e. until the marmosets come to seek the treats in the hands of the experimenter without hesitation and show no signs of escape when the experimenter moves abruptly. In the same time, marmosets must be confronted each day with the equipment used in the following tests until its behaviour remains neutral in its presence. This habituation takes generally about two weeks. Moreover, to guaranty optimum motivation towards rewards during tests, and thus optimum performances, the marmosets should be fed with their usual diet after behavioural testing and not before.

Generally, each test is performed pre-operatively to assess sensorimotor functions in normal conditions. The results are then used as

control reference. Moreover, it is valuable to define if there is any hand preference in each marmoset in order to determine, if possible, which cerebral hemisphere will be subjected to ischaemia and more importantly to better interpret the data of tests.

3.2. Neurological score

The neurological score is one of the most frequently used tests of sensorimotor functions following stroke. This impairment scale involves scoring of various motor and sensory functions to provide an index of neurological status. In analogy to neurological scales, used with patients that had undergone a stroke (NIH score scale (Lyden *et al.*, 1994), Glasgow scale (Teasdale & Jennett, 1974), Orgozogo stroke scale (De Haan *et al.*, 1993), European stroke scale (Hantson *et al.*, 1994)...), neurological examinations have been developed for pre-clinical studies on rodents (Bederson *et al.*, 1986) and on non-human primates (Crowell *et al.*, 1970). In 1996, Marshall and Ridley (Marshall & Ridley, 1996) described a new version of the neurological score adapted for marmosets. The animals are encouraged to move around the cage with pieces of food reward and their activity is observed during 3-5 minutes each day for 10 consecutive days. The presence (score= 1) or absence (score= 0) of the following abnormal movements and postures is noted for each side of the body: (i) hands and feet slipping off poles; (ii) hands left dangling below the level of the perches; (iii) an uncharacteristic posture in which the monkeys held their arm across the midline of their chest; and (iv) an uncoordinated arm movement and

hand waving. Therefore, a maximum score of 4 for each side of the body stands for a severe presence of deficits.

From this neurological score, several authors developed their own variant by adding new score scales and items in order to refine the test. The absence (score= 2), scarce occurrence (score= 1), or presence (score= 0) of the abnormal movements previously described is noted for each body side. In some versions, subtests with visual and auditory stimulations were also used (Freret *et al.*, 2008; Bihel *et al.*, 2010). The response to a visual stimulation is rated as the previous items. The auditory stimulus' response rate is scored as follows: immediate= 2; slightly delayed (< 2sec) = 1; strongly delayed (> 2sec) = 0). The experimenter also reports if the stimulus induces the occurrence of a head rotation. With those additional items, a maximum score of 22 can be attributed to each side of the marmoset. The more important are the deficits, the lower is the score (Table 1).

Through the use of the same scoring scheme, Ikeda and collaborators (Ikeda *et al.*, 2013) evaluated feeding behaviour, by giving a score of 4 when the marmoset uses its contralateral forelimb, 3 for the use of the ipsilateral forelimb, 2 if the animal ate the pellet directly without using forelimb, 1 if it licked the milk of the dish directly; and 0 if it was unable to eat.

More recently, Puentes and colleagues (Puentes *et al.*, 2015) developed a new version of the neurological score scale

named Marmoset neurologic scale (MNS). Firstly, the marmoset is globally evaluated on the absence (score = 1) or presence (score = 0) of several abnormal signs recorded during 10 minutes in its home cage emptied from all its content (Table 2). Secondly, the animal is evaluated during 5 more minutes after a perch and a loft have been introduced in the cage. Finally, the monkey is hold in the experimenter's arm to assess its grasping capacity, its body balance and its ability to target food correctly. A maximal total score of 40 is attributed to a marmoset without any dysfunctions (Table 2).

In addition, some studies also evaluate abnormal signs in a qualitative manner (Virley *et al.*, 2004; Freret *et al.*, 2008). To highlight global deficits, the marmoset freely emits behaviours during 3 minutes in which several items are quantified by the experimenter such as: time spent on the ground, time spent hanging on the perch, motility, presence of a miosis on the ipsilateral side, drooping eyelid, fur's aspect, food intake, movement's accuracy, rate of limb scratching, and presence of vocalizations (frequency and call type: *phoe*, long-distance contact call; *tsik*, predator/alarm call (Stevenson & Poole, 1976)).

Whatever the type of the neurological score employed, this evaluation has been performed in every published stroke models in the marmoset. In general, the initial deficits depicted are a function of the extent of ischaemia-induced brain damage. In the majority of cases, a functional recovery can be observed after a certain time, depending on the

method used to induce ischaemia. In extravascular pMCAO (Marshall & Ridley, 1996), the neurological score test revealed transient abnormal behaviours in the contralateral side compared to sham animals up to 3 weeks. At 8 weeks post-surgery, all the animals partially recovered. Functional deficits were significantly detected on the contralateral side in marmosets subjected to intraluminal pMCAO during the acute (Freret *et al.*, 2008), subacute and chronic phases (Bihel *et al.*, 2010) up to 41 days post-ischaemia. Signs of functional recovery were significantly visible only at the end of the protocol (day 41)(Bihel *et al.*, 2010). In marmosets with transient ischaemia, the deficits on the neurological score test were lesser and transient since the animal recovered well from day 8 post ischaemia (Bihel *et al.*, 2011) (Table 3).

3.3. Rotation behaviour

According to Marshall and co-workers (Marshall *et al.*, 1999), pMCAO-induced striatal damage is often followed by a biased rotation since marmosets usually rotate preferentially on the ipsilateral side after ischaemia. Thus, quantification of this rotation represents a reliable marker of motor asymmetry. The marmoset is contained singly in its home cage, emptied from its perches and nest box. During 15 minutes, the experimenter, who is sitting at 2-3 m away from the cage, records the number and directions of spontaneous 360° rotations done by the animal. As expected, this test has shown to be sensitive in revealing the beneficial effects of neuroprotective agents, namely Clomethiazole

and NXY-059 up to respectively 9 weeks (Marshall *et al.*, 1999) and 10 weeks (Marshall & Ridley, 2003) following the induction of permanent ischaemia (Table 3).

3.4. Response to tactile stimulation

The original version of this test is the *Von Frey hair test* (Schallert *et al.*, 1982) that was designed to highlight asymmetric sensorial and motor behaviours in rodents. Later, in 1992, Annett and co-workers (Annett *et al.*, 1992) developed an equivalent test adapted for a marmoset model of Parkinson's disease.

This test allows to highlight brain ischaemia-induced sensory deficits, by measuring motor responses to a tactile stimulus in various parts of the body. The marmoset is held around the torso and both marmoset's ears, hindlimbs and forelimbs are stimulated with the hair of a paintbrush while being careful not to enter its visual field to avoid interference with its visual capacities (Virley *et al.*, 2004; Bihel *et al.*, 2010). The marmoset can also be coaxed to move around the cage with pieces of food while the brush is slowly approaching zones to be stimulated (Freret *et al.*, 2008). Each body part is stimulated 3 times in a random manner and scored as follows: 2 = clearly noticeable reflex to the stimulus, e.g., attempting to bite or grip the brush; 1 = modest reflex to stimulus, e.g., turn of the eyes; 0 = no response to stimulus (Virley *et al.*, 2004). Animals with normal somatosensory functions will tend to a score of 6 for each body side. Although this test provides a good indication on the animal's sensorial functions, one bias that can occur is the

habituation phenomenon due to repeated stimulations. In that case, the marmoset may tend to have weaker responses despite absent or slight deficits.

The tactile stimulation test sensitively revealed persistent sensory deficits in all models of MCAO (Marshall & Ridley, 1996; Virley *et al.*, 2004; Freret *et al.*, 2008; Bihel *et al.*, 2010) (Table 3). Nonetheless, some differences regarding the time course of the deficits can be noticed among studies, which reveal the relative subjective character of this test.

3.5. Grip test

The purpose of this test is to evaluate functional consequences of cerebral ischaemia on grip reflexes and muscular strength. Often used in clinical research (Sunderland *et al.*, 1992; Quaney *et al.*, 2005) and in experimental investigations in rodents (Chaudhary *et al.*, 2003; Kilic *et al.*, 2008; Ferrara *et al.*, 2009), this test has been adapted for marmosets in 2004 by Virley and collaborators (Virley *et al.*, 2004). The animal is held around the torso in front of the experimenter and a shaft of paintbrush is slowly approached to its hand. Initially it is possible to evaluate the grip reflex, usually natural for marmosets when contained. Secondly, the experimenter pulls away the paintbrush and assesses the animal's resistance which reflects its muscular strength. Each forelimb and hindlimb is tested two (Freret *et al.*, 2008) or three times (Virley *et al.*, 2004) in a random fashion and scored as follows: strong grip and resistance to the pull = 2, moderate grip without resistance = 1 and no grip = 0. The

inconvenience of such a procedure is that the scores obtained are highly influenced by the motivation of the animal as well as the rapidity with which the experimenter pulls the paintbrush.

The grip test successfully differentiated ET-1-induced MCAO and control marmosets 24 hours after ischaemia (Virley *et al.*, 2004). In the intraluminal model of permanent stroke, temporary deficits were reported during the acute phase until 6 days post-surgery (Freret *et al.*, 2008). This test also revealed persistent deficits in animals that have undergone photochemically induced ischaemia, up to 24 days (Ikeda *et al.*, 2013). However, it seems that the grip test is not sensitive enough to highlight impairments in marmosets subjected to transient ischaemia (Freret *et al.*, 2008) (Table 3). This suggests that the test should be used only in animals with relatively severe brain damage.

3.6. Adhesive removal test

The adhesive removal test, or tactile extinction test was initially established in rats to analyse long-term effects of brain injury on sensorimotor behaviour (Schallert *et al.*, 1982, 1983). The test, adapted for marmosets (Annett *et al.*, 1992), presents similarities with the clinical examination named Double-Simultaneous Stimulation (DSS) (Schatz, 2011) used to evaluate the clinical course of sensory extinction phenomenon in patients with an acute unilateral brain lesion. The Adhesive removal test has been reported as a meaningful tool for assessment of sensorimotor deficits during both

the acute and chronic phases of stroke in the marmoset (Bouët *et al.*, 2007; Freret *et al.*, 2009).

During testing, the marmoset is held by an assistant while the experimenter applies small adhesive tape (2cm x 4.5cm) to each hindpaw, between ankle and fingers. Adhesives are placed with an equal pressure and the order of placement (right or left) alternates between trials. In order to decrease bias, the experimenter may apply a pressure on both hindpaws directly after having put both tapes. Marmosets must then contact and remove adhesives within a maximum time of 10 minutes. The order and latency to contact and remove each adhesive tape is recorded. Contact represents the time needed by the animal to be aware of the adhesive presence and occurs when the animal shakes his paw or when its mouth is used to touch it. The latency to contact the patch is an index of the efficiency of a response to a sensorial stimulation. However, removal of the adhesive requires both sensory and motor systems. The adhesive is considered to be correctly removed if at least its major part ($\frac{3}{4}$) is detached, including the portion under the feet. The test is repeated 2 to 3 times a day, with an inter-trial interval of 15 minutes (Freret *et al.*, 2008). To achieve optimal performances, animals should be trained for 2 weeks before the induction of ischaemia, at a rate of 2 trials a day.

The adhesive removal test was able to highlight long-lasting functional deficits in the contralateral body side up to 8 weeks after the induction of stroke (Marshall & Ridley, 1996). The test also revealed lesser sensorimotor

neglects in marmosets subjected to transient ischaemia in comparison those permanently occluded (Bihel *et al.*, 2010) (Table 3).

3.7. Staircase test

Functional deficits in skilled movements after brain injury represent ideal predictors of long-term outcomes and should become standard measures in the assessment of preclinical animal models (Girard *et al.*, 2014). Initially developed by Montoya and colleagues (Montoya *et al.*, 1991), the staircase test has been proved to be a sensitive test for long-lasting functional impairments up to 3 months after brain ischaemia in rats (Colbourne *et al.*, 2000). Its first use in marmosets dates back to 1992 (Annett *et al.*, 1992). Since then, several authors demonstrated its relevance to illustrate motor dexterity deficit and recovery in marmosets following ischaemia (Marshall & Ridley, 1996; Virley *et al.*, 2004; Freret *et al.*, 2008; Bihel *et al.*, 2010; Demain *et al.*, 2015).

The staircase test has been developed to assess independent use of forelimbs in skilled reaching and grasping tasks. It allows the analysis of arms' and hands' dexterity, agility as well as coordination and spatial attention. For optimum tasks learning, marmosets must be trained each day for at least 8 days before the induction of brain lesion (Bihel *et al.*, 2010). Two versions of the staircase test have been described: hill and valley staircases.

3.7.1. Hill staircase

During testing, animals are placed singly in their home cage. A Plexiglas platform

is fixed inside of this cage so that the animal can work at an ideal height and keep the same visual field during all sessions. The apparatus is composed of a 5 steps double staircase, positioned in front of a Plexiglas screen that separates the marmoset from the staircase (Fig. 3.A). On each step, a treat is placed and the animal must catch it by passing its arm through a vertical slot. In the Hill version, the highest steps are at the centre of the device and two slots are located in front of each lowest step (Fig. 3A). In order to prevent food rewards to fall too easily from the staircases, Demain and colleagues (Demain *et al.*, 2015) have slightly modified the original device by digging a little hollow on each step to wedge correctly the treats.

The test lasts 3 minutes during which the marmoset must use its right arm to catch treats located on the right staircase, and its left arm to catch treats located on the left staircase. The experimenter provides scores according to the treats that the marmoset was able to catch: the more elevated is the step, the higher is the attributed score (lowest step= 1, highest= 5). The maximal score is 15 when the animal succeeds in catching every treat in one staircase. The experimenter may also quantify the time spent by the animal to catch each treat and the number of mistakes (e.g. when a treat is dropped) made during the test.

The hill staircase device is constructed so as the marmoset uses its arm placed in the same side as the visual field that it is using (Fig. 3A). Thus, the hill staircase test evaluates ipsi- and contralateral arms' mobility, but cannot

differentiate hemiparesis (motor impairment) from visual neglect (spatial impairment). Therefore, it is necessary to complete this test with the valley version of the staircase in order to identify the nature of deficits'.

3.7.2. Valley staircase

In the valley staircase, the lowest stairs of both staircases are facing each other at the middle of the device, and there is only one central slot common to both staircases (Fig 3B). In this version, also called reversed staircase (Marshall & Ridley, 1996), the animal can only use its right arm to catch treats located on the left staircase and vice-versa. Accordingly, spatial and motor impairments can be separately identified. A pure motor deficit can be depicted when an animal is able to use the ipsilateral arm in both devices (i.e. valley and hill) but displays an impairment of the contralateral arm. However, the animal suffers from both spatial and motor deficits when it fails to reach rewards only from contralateral side of the hill staircase and from either sides of the valley staircase (Marshall & Ridley, 1996).

The staircase tests have been shown to be highly sensitive in revealing long-lasting functional deficits following focal cerebral ischaemia in the marmoset (Table 3). As an example, in the proximal pMCAO, Marshall and colleagues (Marshall *et al.*, 2003) reported persistent deficits up to 20 weeks after the induction of brain ischaemia. Temporary spatial neglects were also highlighted as the animals could not reach correctly the rewards through the use of their ipsilateral arms in their

contralateral visual fields. In the model of transient ischaemia, the staircase test evidenced slight motor deficits which persisted up to 7 weeks although a spontaneous recovery was noticed from week 4 following the induction of ischaemia. Minor spatial impairment was also observed during the first two weeks of stroke (Bihel *et al.*, 2010). Besides, the staircase test has shown sensitivity to therapeutic effects of clomethiazole (Marshall *et al.*, 1999, 2000), and NXY-059 (Marshall & Ridley, 2003; Marshall *et al.*, 2003) in the marmoset subjected proximal pMCAO (Table 3).

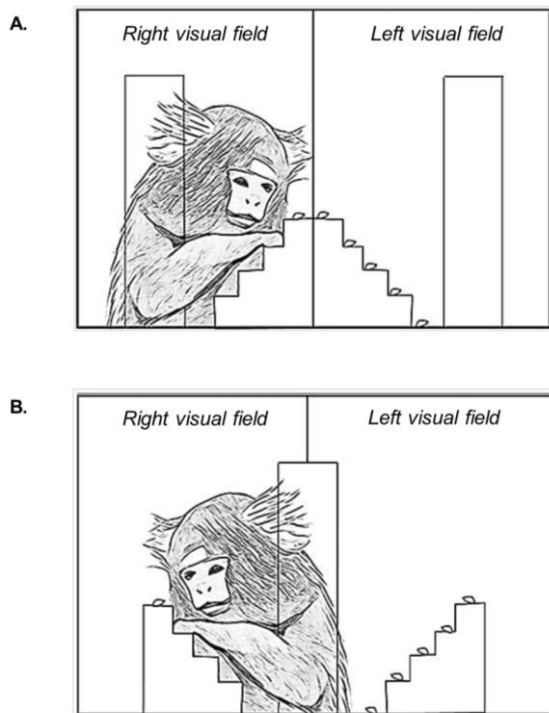


Fig. 3. A: Hill staircase test. Highest steps are at the centre of the device and slots are positioned in front of each lowest step such as the marmoset inevitably uses the arm located in the ipsilateral visual field to catch a food reward. B: Valley staircase test. Lowest steps face each other in the middle of the device and a central slot allows the marmoset to catch food rewards. In this case, the animal uses it opposed arm and visual field.

3.7.3. Six-tubes search task

The six-tube search task has been developed by Marshall and collaborators in 2000 (Marshall *et al.*, 2000) in order to further analyse the nature of the spatial deficits observed after stroke and to differentiate between pure spatial neglect and attention deficit. In this test, there is only one reward available per trial, thereby eliminating the risk that the animals focus on some treats and neglect others. However, hemispacial neglect is a symptom frequently described in patients with ischaemic stroke affecting the right hemisphere (Albert, 1973; Ogden, 1985; Stone *et al.*, 1991, 1993; Beis *et al.*, 2004; Hildebrandt *et al.*, 2005); accordingly, the six-tube search task may not detect deficits in marmosets with brain damage in the left hemisphere.

The device six-tube search task is constituted of 6 black plastic tubes (depth: 5 cm, diameter: 3 cm), separated by 0.2 cm and fixed horizontally at the front of the home cage on a Plexiglas strip (Fig. 4). The marmoset can reach the tubes only by sitting on a little platform (width: 6 cm). This platform is centred regarding the device, which prevents the marmoset to position itself in front of each tube. Thus, its exploration can only be correlated with its visual field (Fig. 4). A piece of treat is randomly placed in one tube. Because the tubes are non-transparent, the animals must thoroughly explore each tube to find the reward. The 6 tubes are tested in a random order, and the test is repeated twice. The experimenter records the time needed by the animal to retrieve the reward (30 sec maximum after the arrival of the marmoset on the platform). This test requires a

daily training during 2 weeks, so that the animals become familiar with the device and understand the exercise. Usually, a marmoset without brain damage explores similarly every tube and spends the same time to find the treat where ever it is (either in its left or right visual field). Following ischaemia, several studies showed that the marmosets spend more time searching for rewards when they are placed in their contralateral visual field, thus highlighting spatial hemi-neglect (Marshall *et al.*, 2003; Freret *et al.*, 2008; Bihel *et al.*, 2010). Originally, after extravascular proximal pMCAO, marmosets had difficulties at finding rewards in any tube other than the most ipsilateral tubes at 3 weeks after surgery and had completely recovered at 10 weeks (Marshall *et al.*, 2000). This test was also sensitive to therapeutic effects of Clomethiazole (Marshall *et al.*, 1999, 2000, 2003), NXY-059 (Marshall *et al.*, 2003), and AR-R15896AR (Marshall & Ridley, 2003; Marshall *et al.*, 2003) following stroke.

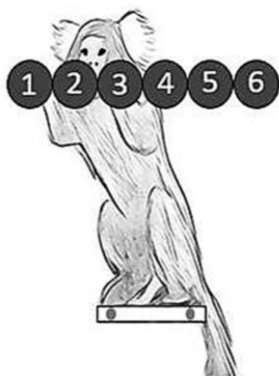


Fig. 4: Six-tube choice test. Six non-transparent tubes are positioned horizontally in front of the marmoset. A food reward is placed randomly in one of the tubes.

3.8. Reaching up tubes

This test measures independently each animal's arm dexterity. Originally developed by Annett and collaborators (Annett *et al.*, 1994) to analyse motor deficits in a model of Parkinson disease, in the marmoset. Subsequently, Marshall and Ridley applied this test to highlights durable functional impairments (up to 8 weeks) after permanent unilateral brain damage in marmosets (Marshall & Ridley, 1996). This test, unlike the staircase one, assesses independent use of forelimbs, without interferences of visual capacities.

A non-translucent 10 mL syringe truncated at the end is fixed horizontally at the front of the home cage, with its plunger outside of the cage on the experimenter's side (Fig. 5). A little food reward is placed against the plunger, 1 cm up the tube. The animal can easily reach the treat by using its hand or its tongue. The marmoset has 60 seconds to catch the reward at this distance. If the animal succeeds, another treat is placed in the tube, 1 cm further by using the plunger, and the animal has then a maximum period of 2 minutes to reach it. The experimenter continues so on by gradually increasing the distance between the marmoset and the treat until a maximum distance of 5 cm. When the reward is at more than 2 cm away from the tube entrance, the marmoset must necessarily use its arm to reach it. If the marmoset fails to catch the treat at any distance exceeding 1 cm, the plunger is returned in the 1cm position to check if the animal is still motivated by the reward when it can be reached easily. If the marmoset does catch the treat, a

new attempt at the previous failed distance is performed. On the contrary, if the marmoset proves that it is not motivated by the reward anymore, it is assumed that the last position in which the marmoset could reach the reward is the maximum successful distance. This task is repeated 3 times in the same conditions. Subsequently, the test is realised in restrictive conditions during which one forelimb is immobilized by a small leather finger stall. Both hands are covered in a random order. The experimenter can then record, for each marmoset's arm, the maximum distance of success to reach the treat and the time needed to catch it.

Before surgery, animals are trained in free hand and restrictive conditions. During the free hand training, the experimenter may note the hand that the marmoset use the most to reach the reward, it will next be the first covered hand during the restrictive training condition. Thus, the animal's performances with its non-preferential hand will be improved. It is considered that the marmosets have correctly learned the task when they achieve it with a reward 5 cm up the tube in less than 1 minute whatever the arm used. It takes usually about 2 weeks to obtain this result.

This test has rarely been used but successfully detected long-lasting contralateral motor deficits during 8 weeks, with no improvement in the performances (Marshall & Ridley, 1996).

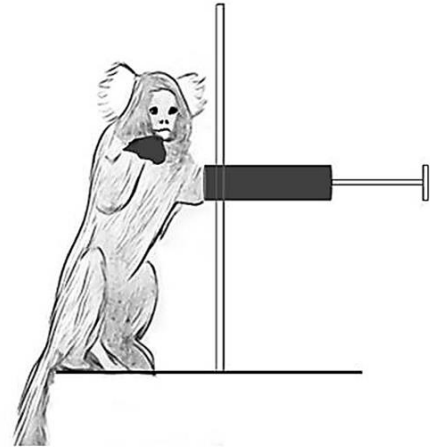


Fig. 5: Reaching up tubes. A truncated syringe containing a food reward is positioned in front of the marmoset. The distance between the marmoset and the reward is adjusted thanks to the plunger.

4. Perspectives with common marmoset

A future area of interest is to provide information concerning cognitive functions since tests to evaluate stroke-induced cognitive impairments in the marmoset are lacking in the literature. Indeed, it is increasingly recognised that stroke patients also suffer cognitive deficits (Bach-y-Rita, 1990). This lack should be remedied, especially as several cognitive tests have been described in the marmoset, mainly through the use of the Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB). The CANTAB, that is also employed in man, consists of a series of non-verbal computerized tasks of memory, attention, and executive function, administered via a touch-sensitive screen (Kehagia *et al.*, 2010; Roque *et al.*, 2011; Chamberlain *et al.*, 2011). It has already been proved that the marmoset can be trained to a high and stable level of performance on different cognitive

function tasks (Ridley & Baker, 1991). Future studies should employ these tests to assess cognitive deficits induced by stroke in the marmoset.

Increased stroke risk factors are major contributing factors to the rising prevalence of stroke and include hypertension, obesity, and diabetes (Jones *et al.*, 2010). To evaluate the therapeutic potential of a new molecule, we may need, at some point, to model those important factors. Arterial hypertension is the leading cause of brain's predisposition to cardiovascular diseases in patients (Lawes *et al.*, 2004). Numerous hypertensive models have been developed on rodents, ranging from pharmacological or genetic manipulation and selective breeding, to unilateral renal arterial clipping (Lerman *et al.*, 2005). In marmosets, achievement of a sustained increase in blood pressure has been done using the two-kidney, one clip (2K1C) renal hypertension method. However, 10 weeks after surgery, the blood pressure was back to normal, making the hypertensive phase only transient (Wood *et al.*, 1986). Daily administration of cyclosporine to marmosets also succeeded in elevating the blood pressure (Bartholomeusz *et al.*, 1998). As for arterial hypertension, diabetes and hyperglycaemia are present in a large proportion of patients with ischemic stroke (Fisher *et al.*, 2009). Streptozotocin is a chemotherapeutic agent, commonly used to induce a diabetes-like condition on rodent models and Old World primate species (White *et al.*, 1974; Jonasson *et al.*, 1985; Dufrane *et al.*, 2006). However, the low streptozotocin sensitivity in marmoset related to a low

expression of GLUT2, renders this species inappropriate in modelling streptozotocin - induced diabetes (Kramer *et al.*, 2009). Still, diet-induced obesity in captive marmosets have been described (Tardif *et al.*, 2009; Wachtman *et al.*, 2011). Although a few marmoset models for these comorbidities exist, they are still to be tested in stroke studies to see how they influence the lesion's pathophysiology and whether candidate stroke drugs retain efficacy in the face of these comorbidities.

5. Conclusion

Assessment of acute and chronic behavioural deficits in animal stroke models is an important prerequisite in the pre-clinical evaluation of therapeutic strategies before clinical trials in stroke patients. It is well known that rodents, the most widely used laboratory animals, recover relatively rapidly and display only transient stroke-induced behavioural deficits, which often preclude long-term investigations (Liu *et al.*, 2009). The marmoset, thanks to its numerous similarities with human, its behavioural wealth and its small size, might be considered as a reasonable animal species to be employed in stroke research. Several approaches to induce focal stroke have been described in the marmoset. In addition, a battery of behavioural tests has been described and validated in this species. Most of the tests have been shown to be highly sensitive in identifying sensorimotor deficits during a long period following stroke (up to 20 weeks).

Acknowledgements

The studies were supported in part by the Conseil Régional de Normandie and the French National Agency for Research (ANR MAESTRO 15-CE18-0029-01). The authors wish to thank Dr. Eric MacKenzie for his revision of the manuscript.

References

- [1] M. DiLuca, J. Olesen, The Cost of Brain Diseases: A Burden or a Challenge?, *Neuron*. 82 (2014) 1205–1208. doi:10.1016/j.neuron.2014.05.044.
- [2] M.J. O'Donnell, S.L. Chin, S. Rangarajan, D. Xavier, L. Liu, H. Zhang, P. Rao-Melacini, X. Zhang, P. Pais, S. Agapay, P. Lopez-Jaramillo, A. Damasceno, P. Langhorne, M.J. McQueen, A. Rosengren, M. Dehghan, G.J. Hankey, A.L. Dans, A. Elsayed, A. Avezum, C. Mondo, H.-C. Diener, D. Ryglewicz, A. Czlonkowska, N. Pogosova, C. Weimar, R. Iqbal, R. Diaz, K. Yusoff, A. Yusufali, A. Oguz, X. Wang, E. Penaherrera, F. Lanas, O.S. Ogah, A. Ogunniyi, H.K. Iversen, G. Malaga, Z. Rumboldt, S. Oveisgharan, F.A. Hussain, D. Magazi, Y. Nilanont, J. Ferguson, G. Pare, S. Yusuf, Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study, *The Lancet*. 388 (2016) 761–775. doi:10.1016/S0140-6736(16)30506-2.
- [3] K.R. Lees, E. Bluhmki, R. von Kummer, T.G. Brott, D. Toni, J.C. Grotta, G.W. Albers, M. Kaste, J.R. Marler, S.A. Hamilton, B.C. Tilley, S.M. Davis, G.A. Donnan, W. Hacke, ECASS, ATLANTIS, NINDS and EPITHET rt-PA Study Group, K. Allen, J. Mau, D. Meier, G. del Zoppo, D.A. De Silva, K.S. Butcher, M.W. Parsons, P.A. Barber, C. Levi, C. Bladin, G. Byrnes, Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials, *Lancet Lond. Engl.* 375 (2010) 1695–1703. doi:10.1016/S0140-6736(10)60491-6.
- [4] Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, *N. Engl. J. Med.* 333 (1995) 1581–1587. doi:10.1056/NEJM199512143332401.
- [5] Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR), Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development, *Stroke*. 30 (1999) 2752–2758.
- [6] P. Mergenthaler, A. Meisel, Do stroke models model stroke?, *Dis. Model. Mech.* 5 (2012) 718–725. doi:10.1242/dmm.010033.

- [7] M. Fisher, G. Feuerstein, D.W. Howells, P.D. Hurn, T.A. Kent, S.I. Savitz, E.H. Lo, STAIR Group, Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations, *Stroke*. 40 (2009) 2244–2250. doi:10.1161/STROKEAHA.108.541128.
- [8] K. Mansfield, Marmoset models commonly used in biomedical research, *Comp. Med.* 53 (2003) 383–392.
- [9] J. Astrup, L. Symon, N.M. Branston, N.A. Lassen, Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia., *Stroke*. 8 (1977) 51–57. doi:10.1161/01.STR.8.1.51.
- [10] H. Tokuno, K. Moriya-Ito, I. Tanaka, Experimental Techniques for Neuroscience Research Using Common Marmosets, *Exp. Anim.* 61 (2012) 389–397. doi:10.1538/expanim.61.389.
- [11] H. Okano, K. Hikishima, A. Iriki, E. Sasaki, The common marmoset as a novel animal model system for biomedical and neuroscience research applications, *Semin. Fetal. Neonatal Med.* 17 (2012) 336–340. doi:10.1016/j.siny.2012.07.002.
- [12] R. Carrion Jr, J.L. Patterson, An animal model that reflects human disease: the common marmoset (*Callithrix jacchus*), *Curr. Opin. Virol.* 2 (2012) 357–362. doi:10.1016/j.covi02.007.
- [13] E. Sasaki, H. Suemizu, A. Shimada, K. Hanazawa, R. Oiwa, M. Kamioka, I. Tomioka, Y. Sotomaru, R. Hirakawa, T. Eto, S. Shiozawa, T. Maeda, M. Ito, R. Ito, C. Kito, C. Yagihashi, K. Kawai, H. Miyoshi, Y. Tanioka, N. Tamaoki, S. Habu, H. Okano, T. Nomura, Generation of transgenic non-human primates with germline transmission, *Nature*. 459 (2009) 523–527. doi:10.1038/nature08090.
- [14] K.E. Fischer, S.N. Austad, The development of small primate models for aging research, *ILAR J.* 52 (2011) 78–88.
- [15] N. Kishi, K. Sato, E. Sasaki, H. Okano, Common marmoset as a new model animal for neuroscience research and genome editing technology, *Dev. Growth Differ.* 56 (2014) 53–62. doi:10.1111/dgd.12109.
- [16] E. Bihel, P. Pro-Sistiaga, A. Letourneur, J. Toutain, R. Saulnier, R. Insausti, M. Bernaudin, S. Roussel, O. Touzani, Permanent or transient chronic ischemic stroke in the non-human primate: behavioral, neuroimaging, histological, and immunohistochemical investigations, *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 30 (2010) 273–285. doi:10.1038/jcbfm.2009.209.
- [17] J.W.B. Marshall, R.M. Ridley, H.F. Baker, L.D. Hall, T.A. Carpenter, N.I. Wood, Serial MRI, functional recovery, and long-term infarct maturation in a non-human primate model of stroke, *Brain Res. Bull.* 61 (2003) 577–585. doi:10.1016/S0361-9230(03)00214-4.

- [18] E. Bihel, S. Roussel, J. Toutain, M. Bernaudin, O. Touzani, Diffusion Tensor MRI Reveals Chronic Alterations in White Matter Despite the Absence of a Visible Ischemic Lesion on Conventional MRI, *Stroke*. 42 (2011) 1412–1419. doi:10.1161/STROKEAHA.110.596650.
- [19] S. Mori, K. Oishi, A.V. Faria, White matter atlases based on diffusion tensor imaging, *Curr. Opin. Neurol.* 22 (2009) 362–369. doi:10.1097/WCO.0b013e32832d954b.
- [20] K. Hikishima, K. Ando, Y. Komaki, K. Kawai, R. Yano, T. Inoue, T. Itoh, M. Yamada, S. Momoshima, H.J. Okano, H. Okano, Voxel-based morphometry of the marmoset brain: In vivo detection of volume loss in the substantia nigra of the MPTP-treated Parkinson's disease model, *Neuroscience*. 300 (2015) 585–592. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.041.
- [21] C.-C. Hung, C.C. Yen, J.L. Ciuchta, D. Papoti, N.A. Bock, D.A. Leopold, A.C. Silva, Functional MRI of visual responses in the awake, behaving marmoset, *NeuroImage*. 120 (2015) 1–11. doi:10.1016/j.neuroimage.2015.06.090.
- [22] C.-C. Hung, C.C. Yen, J.L. Ciuchta, D. Papoti, N.A. Bock, D.A. Leopold, A.C. Silva, Functional Mapping of Face-Selective Regions in the Extrastriate Visual Cortex of the Marmoset, *J. Neurosci.* 35 (2015) 1160–1172. doi:10.1523/JNEUROSCI.2659-14.2015.
- [23] S. Sadagopan, N.Z. Temiz-Karayol, H.U. Voss, High-field functional magnetic resonance imaging of vocalization processing in marmosets, *Sci. Rep.* 5 (2015). doi:10.1038/srep10950.
- [24] J.V. Liu, Y. Hirano, G.C. Nascimento, B. Stefanovic, D.A. Leopold, A.C. Silva, fMRI in the awake marmoset: Somatosensory-evoked responses, functional connectivity, and comparison with propofol anesthesia, *NeuroImage*. 78 (2013) 186–195. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.03.038.
- [25] A.C. Silva, Anatomical and functional neuroimaging in awake, behaving marmosets, *Dev. Neurobiol.* 77 (2017) 373–389. doi:10.1002/dneu.22456.
- [26] K.J. Burman, D.H. Reser, H.-H. Yu, M.G.P. Rosa, Cortical input to the frontal pole of the marmoset monkey, *Cereb. Cortex N. Y. N 1991.* 21 (2011) 1712–1737. doi:10.1093/cercor/bhq239.
- [27] K.J. Burman, S.M. Palmer, M. Gamberini, M.W. Spitzer, M.G.P. Rosa, Anatomical and physiological definition of the motor cortex of the marmoset monkey, *J. Comp. Neurol.* 506 (2008) 860–876. doi:10.1002/cne.21580.
- [28] K.J. Huffman, L. Krubitzer, Area 3a: topographic organization and cortical connections in marmoset monkeys, *Cereb. Cortex N. Y. N 1991.* 11 (2001) 849–867.
- [29] J.W.B. Marshall, R.M. Ridley, Assessment of Functional Impairment Following Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in a Non-Human Primate Species, *Neurodegeneration*. 5 (1996) 275–286. doi:10.1006/neur.1996.0036.

- [30] J.W.B. Marshall, A.J. Cross, D.M. Jackson, A.R. Green, H.F. Baker, R.M. Ridley, Clomethiazole protects against hemineglect in a primate model of stroke, *Brain Res. Bull.* 52 (2000) 21–29. doi:10.1016/S0361-9230(99)00275-0.
- [31] D. Virley, S.J. Hadingham, J.C. Roberts, B. Farnfield, H. Elliott, G. Whelan, J. Golder, C. David, A.A. Parsons, A.J. Hunter, A New Primate Model of Focal Stroke: Endothelin-1—Induced Middle Cerebral Artery Occlusion and Reperfusion in the Common Marmoset, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24 (2004) 24–41. doi:10.1097/01.WCB.0000095801.98378.4A.
- [32] T. Freret, V. Bouet, J. Toutain, R. Saulnier, P. Pro-Sistiaga, E. Bihel, E.T. MacKenzie, S. Roussel, P. Schumann-Bard, O. Touzani, Intraluminal Thread Model of Focal Stroke in the Non-Human Primate, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28 (2008) 786–796. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600575.
- [33] M. Bacigaluppi, G. Comi, D.M. Hermann, Animal Models of Ischemic Stroke. Part Two: Modeling Cerebral Ischemia, *Open Neurol. J.* 4 (2010) 34–38. doi:10.2174/1874205X01004020034.
- [34] S.T. Carmichael, Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose, *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 2 (2005) 396–409. doi:10.1602/neurorx.2.3.396.
- [35] S. Ikeda, K. Harada, A. Ohwatashi, Y. Kamikawa, A. Yoshida, K. Kawahira, A New Non-Human Primate Model of Photochemically Induced Cerebral Infarction, *PLoS ONE.* 8 (2013) e60037. doi:10.1371/journal.pone.0060037.
- [36] B.D. Watson, W.D. Dietrich, R. Busto, M.S. Wachtel, M.D. Ginsberg, Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis, *Ann. Neurol.* 17 (1985) 497–504. doi:10.1002/ana.410170513.
- [37] S. Puentes, T. Kaido, T. Hanakawa, N. Ichinohe, T. Otsuki, K. Seki, Internal capsule stroke in the common marmoset, *Neuroscience.* 284 (2015) 400–411. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.10.015.
- [38] V. Bouët, T. Freret, J. Toutain, D. Divoux, M. Boulouard, P. Schumann-Bard, Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse, *Exp. Neurol.* 203 (2007) 555–567. doi:10.1016/j.expneurol.2006.09.006.
- [39] T. Freret, V. Bouet, C. Leconte, S. Roussel, L. Chazalviel, D. Divoux, P. Schumann-Bard, M. Boulouard, Behavioral deficits after distal focal cerebral ischemia in mice: Usefulness of adhesive removal test, *Behav. Neurosci.* 123 (2009) 224–230. doi:10.1037/a0014157.
- [40] I.M. Macrae, Preclinical stroke research—advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia, *Br. J. Pharmacol.* 164 (2011) 1062–1078. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01398.x.

- [41] M.D. Lindner, V.K. Gribkoff, N.A. Donlan, T.A. Jones, Long-lasting functional disabilities in middle-aged rats with small cerebral infarcts, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23 (2003) 10913–10922.
- [42] J.G. Zarruk, I. Garcia-Yebenes, V.G. Romera, I. Ballesteros, A. Moraga, M.I. Cuartero, O. Hurtado, M. Sobrado, J.M. Pradillo, D. Fernandez-Lopez, J. Serena, M. Castillo-Melendez, M.A. Moro, I. Lizasoain, Neurological tests for functional outcome assessment in rodent models of ischaemic stroke, *Rev. Neurol.* 53 (2011) 607–618.
- [43] P. Lyden, T. Brott, B. Tilley, K.M. Welch, E.J. Mascha, S. Levine, E.C. Haley, J. Grotta, J. Marler, Improved reliability of the NIH Stroke Scale using video training. NINDS TPA Stroke Study Group, *Stroke.* 25 (1994) 2220–2226.
- [44] G. Teasdale, B. Jennett, Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale, *Lancet Lond. Engl.* 2 (1974) 81–84.
- [45] R. De Haan, J. Horn, M. Limburg, J. Van Der Meulen, P. Bossuyt, A comparison of five stroke scales with measures of disability, handicap, and quality of life, *Stroke.* 24 (1993) 1178–1181.
- [46] L. Hantson, W. De Weerd, J. De Keyser, H.C. Diener, C. Franke, R. Palm, M. Van Orshoven, H. Schoonderwalt, N. De Klippel, L. Herroelen, The European Stroke Scale, *Stroke.* 25 (1994) 2215–2219.
- [47] J.B. Bederson, L.H. Pitts, M. Tsuji, M.C. Nishimura, R.L. Davis, H. Bartkowski, Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination, *Stroke.* 17 (1986) 472–476.
- [48] R.M. Crowell, Y. Olsson, I. Klatzo, A. Ommaya, Temporary Occlusion of the Middle Cerebral Artery in the Monkey: Clinical and Pathological Observations, *Stroke.* 1 (1970) 439–448. doi:10.1161/01.STR.1.6.439.
- [49] M.F. Stevenson, T.B. Poole, An ethogram of the common marmoset (*Calithrix jacchus jacchus*): general behavioural repertoire, *Anim. Behav.* 24 (1976) 428–451.
- [50] J.W.B. Marshall, A.J. Cross, R.M. Ridley, Functional Benefit from Clomethiazole Treatment after Focal Cerebral Ischemia in a Nonhuman Primate Species, *Exp. Neurol.* 156 (1999) 121–129. doi:10.1006/exnr.1998.6994.
- [51] J.W.B. Marshall, R.M. Ridley, Assessment of Cognitive and Motor Deficits in a Marmoset Model of Stroke, *ILAR J.* 44 (2003) 153–160. doi:10.1093/ilar.44.2.153.

- [52] T. Schallert, M. Upchurch, N. Lobaugh, S.B. Farrar, W.W. Spirduso, P. Gilliam, D. Vaughn, R.E. Wilcox, Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 16 (1982) 455–462.
- [53] L.E. Annett, D.C. Rogers, T.D. Hernandez, S.B. Dunnett, Behavioural analysis of unilateral monoamine depletion in the marmoset, *Brain J. Neurol.* 115 (Pt 3) (1992) 825–856.
- [54] A. Sunderland, D.J. Tinson, E.L. Bradley, D. Fletcher, R.L. Hewer, D.T. Wade, Enhanced physical therapy improves recovery of arm function after stroke. A randomised controlled trial., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 55 (1992) 530–535. doi:10.1136/jnnp.55.7.530.
- [55] B.M. Quaney, S. Perera, R. Maletsky, C.W. Luchies, R.J. Nudo, Impaired grip force modulation in the ipsilesional hand after unilateral middle cerebral artery stroke, *Neurorehabil. Neural Repair.* 19 (2005) 338–349. doi:10.1177/1545968305282269.
- [56] E. Kilic, U. Kilic, M. Bacigaluppi, Z. Guo, N.B. Abdallah, D.P. Wolfer, R.J. Reiter, D.M. Hermann, C.L. Bassetti, Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice, *J. Pineal Res.* 45 (2008) 142–148. doi:10.1111/j.1600-079X.2008.00568.x.
- [57] A. Ferrara, S. El Bejaoui, S. Seyen, E. Tirelli, J.-C. Plumier, The usefulness of operant conditioning procedures to assess long-lasting deficits following transient focal ischemia in mice, *Behav. Brain Res.* 205 (2009) 525–534. doi:10.1016/j.bbr.2009.08.011.
- [58] G. Chaudhary, U. Sharma, N.R. Jagannathan, Y.K. Gupta, Evaluation of *Withania somnifera* in a middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30 (2003) 399–404. doi:10.1046/j.1440-1681.2003.03849.x.
- [59] T. Schallert, M. Upchurch, R.E. Wilcox, D.M. Vaughn, Posture-independent sensorimotor analysis of inter-hemispheric receptor asymmetries in neostriatum, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 (1983) 753–759.
- [60] P. Schatz, Double Simultaneous Stimulation, in: J.S. Kreutzer, J. DeLuca, B. Caplan (Eds.), *Encycl. Clin. Neuropsychol.*, Springer New York, 2011: pp. 894–895. http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-0-387-79948-3_174 (accessed January 6, 2017).
- [61] M. Modo, R.P. Stroemer, E. Tang, T. Veizovic, P. Sowniski, H. Hodges, Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion, *J. Neurosci. Methods.* 104 (2000) 99–109.

- [62] S. Girard, K.N. Murray, N.J. Rothwell, G.A.S. Metz, S.M. Allan, Long-term functional recovery and compensation after cerebral ischemia in rats, *Behav. Brain Res.* 270 (2014) 18–28. doi:10.1016/j.bbr.2014.05.008.
- [63] C.P. Montoya, L.J. Campbell-Hope, K.D. Pemberton, S.B. Dunnett, The “staircase test”: a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats, *J. Neurosci. Methods.* 36 (1991) 219–228.
- [64] F. Colbourne, D. Corbett, Z. Zhao, J. Yang, A.M. Buchan, Prolonged but delayed postischemic hypothermia: a long-term outcome study in the rat middle cerebral artery occlusion model, *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 20 (2000) 1702–1708. doi:10.1097/00004647-200012000-00009.
- [65] B. Demain, C. Davoust, B. Plas, F. Bolan, K. Boulanouar, L. Renaud, R. Darmana, L. Vaysse, C. Vieu, I. Loubinoux, Corticospinal Tract Tracing in the Marmoset with a Clinical Whole-Body 3T Scanner Using Manganese-Enhanced MRI, *PLOS ONE.* 10 (2015) e0138308. doi:10.1371/journal.pone.0138308.
- [66] J.W.B. Marshall, A.R. Green, R.M. Ridley, Comparison of the neuroprotective effect of clomethiazole, AR-R15896AR and NXY-059 in a primate model of stroke using histological and behavioural measures, *Brain Res.* 972 (2003) 119–126. doi:10.1016/S0006-8993(03)02511-3.
- [67] M.L. Albert, A simple test of visual neglect, *Neurology.* 23 (1973) 658–664.
- [68] J.A. Ogden, Anterior-posterior interhemispheric differences in the loci of lesions producing visual hemineglect, *Brain Cogn.* 4 (1985) 59–75.
- [69] S.P. Stone, B. Wilson, A. Wroot, P.W. Halligan, L.S. Lange, J.C. Marshall, R.J. Greenwood, The assessment of visuo-spatial neglect after acute stroke, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 54 (1991) 345–350.
- [70] S.P. Stone, P.W. Halligan, R.J. Greenwood, The incidence of neglect phenomena and related disorders in patients with an acute right or left hemisphere stroke, *Age Ageing.* 22 (1993) 46–52.
- [71] J.-M. Beis, C. Keller, N. Morin, P. Bartolomeo, T. Bernati, S. Chokron, M. Leclercq, A. Louis-Dreyfus, F. Marchal, Y. Martin, D. Perennou, P. Pradat-Diehl, C. Prairial, G. Rode, M. Rousseaux, C. Samuel, E. Sieroff, L. Wiart, P. Azouvi, French Collaborative Study Group on Assessment of Unilateral Neglect (GEREN/GRECO), Right spatial neglect after left hemisphere stroke: qualitative and quantitative study, *Neurology.* 63 (2004) 1600–1605.
- [72] H. Hildebrandt, C. Schütze, M. Ebke, F. Brunner-Beeg, P. Eling, Visual search for item- and array-centered locations in patients with left middle cerebral artery stroke, *Neurocase.* 11 (2005) 416–426. doi:10.1080/13554790500263511.

- [73] L.E. Annett, F.L. Martel, D.C. Rogers, R.M. Ridley, H.F. Baker, S.B. Dunnett, Behavioral assessment of the effects of embryonic nigral grafts in marmosets with unilateral 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway, *Exp. Neurol.* 125 (1994) 228–246. doi:10.1006/exnr.1994.1026.
- [74] P. Bach-y-Rita, Brain plasticity as a basis for recovery of function in humans, *Neuropsychologia.* 28 (1990) 547–554. doi:10.1016/0028-3932(90)90033-K.
- [75] D.T. Roque, R.A.A. Teixeira, E.C. Zachi, D.F. Ventura, The use of the Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB) in neuropsychological assessment: application in Brazilian research with control children and adults with neurological disorders, *Psychol. Amp Neurosci.* 4 (2011) 255–265. doi:10.3922/j.psns.2011.2.011.
- [76] A.A. Kehagia, G.K. Murray, T.W. Robbins, Learning and cognitive flexibility: frontostriatal function and monoaminergic modulation, *Curr. Opin. Neurobiol.* 20 (2010) 199–204. doi:10.1016/j.conb.2010.01.007.
- [77] S.R. Chamberlain, T.W. Robbins, S. Winder-Rhodes, U. Müller, B.J. Sahakian, A.D. Blackwell, J.H. Barnett, Translational approaches to frontostriatal dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder using a computerized neuropsychological battery, *Biol. Psychiatry.* 69 (2011) 1192–1203. doi:10.1016/j.biopsych.2010.08.019.
- [78] R.M. Ridley, H.F. Baker, A critical evaluation of monkey models of amnesia and dementia, *Brain Res. Rev.* 16 (1991) 15–37. doi:10.1016/0165-0173(91)90018-4.
- [79] M.A. Moskowitz, J.C. Grotta, W.J. Koroshetz, The NINDS Stroke Progress Review Group Final Analysis and Recommendations, *Stroke.* 44 (2013) 2343–2350. doi:10.1161/STROKEAHA.113.001192.
- [80] C.M.M. Lawes, D.A. Bennett, V.L. Feigin, A. Rodgers, Blood pressure and stroke: an overview of published reviews, *Stroke.* 35 (2004) 1024.
- [81] L.O. Lerman, A.R. Chade, V. Sica, C. Napoli, Animal models of hypertension: an overview, *J. Lab. Clin. Med.* 146 (2005) 160–173. doi:10.1016/j.lab.2005.05.005.
- [82] J.M. Wood, N. Gulati, J.B. Michel, K.G. Hofbauer, Two-kidney, one clip renal hypertension in the marmoset, *J. Hypertens.* 4 (1986) 251–254.
- [83] B. Bartholomeusz, K.J. Hardy, A.S. Nelson, P.A. Phillips, Modulation of nitric oxide improves cyclosporin A-induced hypertension in rats and primates, *J. Hum. Hypertens.* 12 (1998) 839–844.
- [84] M. Abdul-Ghani, R.A. DeFronzo, S. Del Prato, R. Chilton, R. Singh, R.E.J. Ryder, Cardiovascular Disease and Type 2 Diabetes: Has the Dawn of a New Era Arrived?, *Diabetes Care.* 40 (2017) 813–820. doi:10.2337/dc16-2736.

- [85] O. Jonasson, C.W. Jones, A. Bauman, E. John, J. Manaligod, M.O. Tso, The pathophysiology of experimental insulin-deficient diabetes in the monkey. Implications for pancreatic transplantation, *Ann. Surg.* 201 (1985) 27–39.
- [86] D. Dufrane, M. van Steenberghe, Y. Guiot, R.-M. Goebbels, A. Saliez, P. Gianello, Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity, *Transplantation*. 81 (2006) 36–45.
- [87] J.A. White, M.C. Bolstridge, H.J. Downing, E.H. Helm, H.J. Klomfass, Diabetogenic drugs in the vervet monkey, *South Afr. Med. J. Suid-Afr. Tydskr. Vir Geneesk.* 48 (1974) 273–276.
- [88] J. Kramer, E.L. Moeller, A. Hachey, K.G. Mansfield, L.M. Wachtman, Differential expression of GLUT2 in pancreatic islets and kidneys of New and Old World nonhuman primates, *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296 (2009) R786–R793. doi:10.1152/ajpregu.90694.2008.
- [89] L.M. Wachtman, J.A. Kramer, A.D. Miller, A.M. Hachey, E.H. Curran, K.G. Mansfield, Differential contribution of dietary fat and monosaccharide to metabolic syndrome in the common marmoset (*Callithrix jacchus*), *Obes. Silver Spring Md.* 19 (2011) 1145–1156. doi:10.1038/oby.2010.303.
- [90] S.D. Tardif, M.L. Power, C.N. Ross, J.N. Rutherford, D.G. Layne-Colon, M.A. Paulik, Characterization of obese phenotypes in a small nonhuman primate, the common marmoset (*Callithrix jacchus*), *Obes. Silver Spring Md.* 17 (2009) 1499–1505. doi:10.1038/oby.2009.77.
- [91] S. Liu, G. Zhen, B.P. Meloni, K. Campbell, H.R. Winn, RODENT STROKE MODEL GUIDELINES FOR PRECLINICAL STROKE TRIALS (1ST EDITION), *J. Exp. Stroke Transl. Med.* 2 (2009) 2–27.

Table 1: Freret's version of the neurological score scale

<i>N°</i>	<i>Items</i>	<i>Contralateral side</i>	<i>Ipsilateral side</i>
1	Slipping hand	while resting	
2		while moving	
3	Slipping feet	while resting	
4		while moving	
5	Hand dangling below the level of the perch		
6	Feet dangling below the level of the perch		
7	Arm across the midline of the chest		
8	Uncoordinated arm movement and hand waving		
9	Response to a visual stimulation		
10	Response to an auditive stimulation		
11	with occurrence of a head rotation		
	Total		

The test was reported by Freret and colleagues (Freret *et al.*, 2008). Total score: 22 points per body side.

Table 2: Items of the marmoset neurologic score (MNS)

<i>General evaluation</i>	<i>During holding in the examiner's arm</i>	<i>Hemilateral evaluation</i>
Stays in back of the cage	Inadequate grasping to the examiner's arm	Body tilting
Stays still for 1 min	Poor body balance	Head tilting
Cannot stand in the perch	Inaccurate food targeting	Hand waving
Dysmetria1		Repeated touching before grasp cage bars
Required assisted feeding		Hand crossing the chest
Circling behavior		Hand slipping from the cage bars
Left palpebral ptosis		Hand dangling from the cage bars
No jumping from cage walls		No grasping a stick when presented
No rearing without hand support		Cannot hold a stick more than 3s
		Absent retrieve reflex to hand stimuli
		Hand neglect during feeding
		Foot slipping from the cage bars
		Foot dangling from the cage bars
		Absent retrieve reflex to foot stimuli

MNS developed by Puentes and collaborators (Puentes *et al.*, 2015). Total score: 40 points (general evaluation, 9 points; during holding in the examiner's arm, 3 points; hemilateral evaluation, 14 points per side).

Table 3: Summary of the behavioural as a function of the model of stroke. pMCAO = Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion; tMCAO = transient Middle Cerebral Artery Occlusion; ET-1 = Endotheline-1; AChAO = Anterior Choroidal Artery Occlusion), how long after surgery they showed significant deficits compare to pre-operative results or sham marmosets (Deficits time), and for how long they were tested (Protocol duration).

<i>Test</i>	<i>Stroke model</i>	<i>Deficits duration</i>	<i>Protocol duration</i>	<i>Reference</i>
Neurological score	Extravascular proximal pMCAO	3 weeks	8 weeks	(Marshall and Ridley, 1996)
	Intraluminal proximal pMCAO	7 days	7 days	(Freret et al., 2008)
		41 days	41 days	(Bihel et al., 2010)
	Intraluminal proximal tMCAO (3h)	None	7 days	(Freret et al., 2008)
		41 days	41 days	(Bihel et al., 2010; 2011)
	ET-1-induced distal MCAO	24 hours	24 hours	(Virley et al., 2004)
	Photothrombosis	28 days	28 days	(Ikeda et al., 2013)
AChAO	10 days	10 days	(Puentes et al., 2015)	
Rotation	Extravascular proximal pMCAO	9 weeks	9 weeks	(Marshall et al., 1999)
		10 weeks	10 weeks	(Marshall and Ridley, 2003)
Tactile stimulation	Extravascular proximal pMCAO	8 weeks	8 weeks	(Marshall and Ridley, 1996)
	Intraluminal proximal pMCAO	7 days	7 days	(Freret et al., 2008)
		41 days	41 days	(Bihel et al., 2010)
	Intraluminal proximal tMCAO (3h)	1 day	7 days	(Freret et al., 2008)
		41 days	41 days	(Bihel et al., 2010; 2011)
ET-1-induced distal MCAO	24 hours	24 hours	(Virley et al., 2004)	
Grip test	Intraluminal proximal pMCAO	6 days	7 days	(Freret et al., 2008)
	Intraluminal proximal tMCAO (3h)	None	7 days	(Freret et al., 2008)
	ET-1-induced distal MCAO	24 hours	24 hours	(Virley et al., 2004)
	Photothrombosis	24 days	28 days	(Ikeda et al., 2013)
Adhesive removal	Extravascular proximal pMCAO	8 weeks	8 weeks	(Marshall and Ridley, 1996)
	Intraluminal proximal pMCAO	7 days	7 days	(Freret et al., 2008)
		6 weeks	6 weeks	(Bihel et al., 2010)
	Intraluminal proximal tMCAO (3h)	7 days	7 days	(Freret et al., 2008)
		4 weeks	6 weeks	(Bihel et al., 2010; 2011)
Hill and valley staircases	Extravascular proximal pMCAO	8 weeks	8 weeks	(Marshall and Ridley, 1996)
		9 weeks	9 weeks	(Marshall et al., 1999)
		10 weeks	10 weeks	(Marshall et al., 2000)
		20 weeks	20 weeks	(Marshall et al., 2003)
	Intraluminal proximal pMCAO	7 days	7 days	(Freret et al., 2008)
		7 weeks	7 weeks	(Bihel et al., 2010)
	Intraluminal proximal tMCAO (3h)	7 days	7 days	(Freret et al., 2008)
		7 weeks	7 weeks	(Bihel et al., 2010; 2011)
Six-tube choice test	Extravascular proximal pMCAO	3 weeks	10 weeks	(Marshall et al., 2000)
		10 weeks	20 weeks	(Marshall et al., 2003)
	Intraluminal proximal pMCAO	7 weeks	7 weeks	(Bihel et al., 2010)

OBJECTIFS

Seules des thérapies de reperfusion par thrombolyse ou thrombectomie permettent à l'heure actuelle de réduire les séquelles survenant à la suite d'une ischémie cérébrale. Néanmoins, en raison de leur fenêtre thérapeutique très étroite, et de leurs nombreuses contre-indications, très peu de patients peuvent en bénéficier. En dépit de nombreuses études réalisées chez l'animal et chez l'Homme, la recherche de nouvelles thérapies neuroprotectrices et neurorégénératrices pour l'AVC accumule les échecs. Une des raisons avancées est l'inadéquation des modèles animaux utilisés au cours du développement préclinique des thérapies. Dans ce contexte, des comités d'experts encouragent fortement la recherche préclinique à s'orienter vers des voies d'administrations efficaces, sûres, et compatibles avec une utilisation chez les patients. Ils recommandent également l'intégration de facteurs de risque aux études afin de se rapprocher d'avantage des conditions cliniques. Enfin, ils incitent à l'utilisation de PNH, afin de valider les résultats obtenus chez le rongeur, avant toute tentative de translation chez l'Homme.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés au potentiel thérapeutique d'une thérapie moléculaire ciblant la MEC : le RGTA. Afin de répondre aux recommandations actuelles, les études ont été réalisées chez plusieurs modèles animaux : le rat et un PNH du nouveau monde, le marmouset commun.

Avant le début ma thèse, de précédents travaux réalisés au sein de notre équipe chez le rat soumis à une ischémie cérébrale avaient d'ores et déjà permis de révéler des effets bénéfiques du RGTA sur l'évolution du volume lésionnel et la récupération fonctionnelle. La fenêtre thérapeutique ainsi que la dose optimale du traitement ont ainsi pu être déterminées. Cependant, le RGTA était alors injecté par voie intraveineuse et aucune autre voie d'administration n'a été testée. Or, de nombreux avantages, que je décrirai plus en détail plus loin, mettent désormais en avant les injections par voie intra-artérielle. Ainsi, le premier objectif de cette thèse a été d'évaluer l'effet neuroprotecteur d'une injection intra-artérielle de RGTA à la suite d'une ischémie cérébrale chez le rat. Après une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne, différentes doses de RGTA ont été injectées par voie intra-artérielle, et leurs effets respectifs sur l'évolution du volume lésionnel ont été évalués par IRM.

Les thérapies à base de cellules souches constituent un nouvel espoir dans le traitement de l'ischémie cérébrale. Grâce à leur capacité à sécréter des facteurs trophiques impliqués dans différents mécanismes de réparation cellulaire, les CSMs ont d'ores et déjà su montrer des effets bénéfiques au niveau de la neuroprotection et de la récupération fonctionnelle après une

ischémie. L'administration concomitante de RGTA pourrait permettre d'établir un environnement cellulaire plus stable, favorisant la survie des cellules et augmentant ainsi leur efficacité. C'est avec cette idée que des travaux ont été menés au sein de l'équipe sur l'effet d'une thérapie combinant RGTA et CSMs après une ischémie cérébrale chez le rat. Une étude antérieure avait dans un premier temps démontré une potentialisation de l'effet bénéfique des CSMs par le RGTA, et établi la combinaison optimale chez des rats normotendus soumis à une ischémie cérébrale. Par la suite, j'ai eu l'occasion de collaborer sur une étude visant à valider ces résultats chez des rats souffrant d'un facteur de risque majeur de l'ischémie cérébrale : l'hypertension artérielle. Pour cette étude, l'effet du traitement combiné a été testé sur une souche de rats spontanément hypertendus (SHR). L'ischémie est réalisée chez tous les animaux par OACM. Les effets de la thérapie sur l'évolution du volume lésionnel ainsi que sur la récupération fonctionnelle ont ensuite été évalués.

Afin de pallier aux échecs de translations des études précliniques chez l'Homme, il est fortement recommandé de valider les résultats obtenus chez le rongeur sur un modèle animal plus proche de l'Homme. Pour cette raison, une fois que les paramètres optimaux d'administration ont été déterminés chez le rat, le second objectif de cette thèse a consisté à évaluer les effets du RGTA sur la neuroprotection et la récupération fonctionnelle après ischémie cérébrale chez un petit PNH : le marmouset. Après une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne, des analyses IRM réalisées à différents temps ont permis d'évaluer l'évolution du volume lésionnel, tandis que divers tests comportementaux ont permis d'évaluer la récupération fonctionnelle. Les données recueillies ont par la suite fait l'objet d'une analyse plus approfondie afin de déterminer s'il était possible de prédire de façon précoce l'intensité des déficits comportementaux grâce aux données IRM.

Parmi les nombreux déficits comportementaux qui surviennent à la suite d'une ischémie cérébrale, les informations concernant l'évolution des fonctions cognitives après ischémie cérébrale manquent cruellement aux études précliniques actuelles. L'intégration de tests cognitifs permettrait d'évaluer l'effet de nouveaux traitements sur la récupération de ces fonctions. Une partie de mes travaux de thèse a donc été dédiée également à la mise en place de tests cognitifs adaptés à un contexte ischémique chez le marmouset. Plusieurs dispositifs ont été employés : dans un premier temps, des marmousets ont été entraînés à la réalisation de tâches cognitives au moyen d'un écran tactile assisté par ordinateur (CANTAB) ; dans un second temps, de nouveaux animaux ont été entraînés à la réalisation de tâches cognitives au moyen de dispositifs plus classiques.

ÉTUDE 1 - Effet d'une administration intra-artérielle de RGTA sur la neuroprotection chez le rat soumis à une ischémie cérébrale

1 Contexte de l'étude

L'ischémie cérébrale est aujourd'hui encore un problème majeur de santé publique en étant la deuxième pathologie la plus meurtrière au monde, ainsi que la première cause de handicap acquis chez l'adulte (Thrift *et al.*, 2017; Arba *et al.*, 2017). Pourtant, hormis les thérapies de reperfusion par thrombolyse par t-PA ou de thrombectomie, et malgré une intense activité de recherche, toutes les nouvelles stratégies de neuroprotection et/ou de régénération se soldent par un échec. La nécessité de nouveaux traitements pour une prise en charge optimale de l'AVC apparaît donc clairement.

Après une ischémie, la MEC est rapidement dégradée par des protéases, ce qui a pour conséquence d'augmenter la mort cellulaire, et de limiter les mécanismes de prolifération, de migration et de différenciation cellulaire. Plusieurs études ont su démontrer l'intérêt de protéger la MEC pour réduire les dommages cérébraux à la suite d'un AVC (Asahi *et al.*, 2000; Khatri *et al.*, 2007). Au cours de précédents travaux menés au sein du laboratoire, il a été démontré que l'administration intraveineuse d'un agent de la MEC, le RGTA, permettait une réduction du volume lésionnel ainsi qu'une récupération fonctionnelle chez le rat après ischémie cérébrale (Khelif *et al.*, 2018a). Le RGTA est un analogue des HS constituant la MEC ayant l'avantage de résister aux dégradations enzymatiques. L'administration de cet agent permet notamment de maintenir l'échafaudage de la MEC durant l'ischémie, et de maintenir la biodisponibilité des facteurs de croissance (Barritault *et al.*, 2017b). Par ailleurs, grâce à cette propriété, le RGTA a déjà été démontré comme étant un agent de régénération tissulaire efficace dans divers modèles de lésion : gingivale, osseuse, cutanée, musculaire, tendineuse et oculaire (Barritault *et al.*, 2017b). Plusieurs protocoles ont été réalisés chez le rat soumis à une OACM transitoire afin de déterminer la dose ainsi que le temps d'injection permettant une efficacité optimale de ce traitement (Khelif *et al.*, 2018a). Toutefois, dans toutes ces études, le RGTA était administré par voie intraveineuse. Or, de nombreux avantages se dégagent d'une administration par voie intra-carotidienne : étant donné que l'injection se fait directement au niveau du tissu cible, la biodisponibilité du traitement n'en est que plus forte et plus rapide par rapport à une injection

intraveineuse. Cela signifie également que le traitement n'a pas à passer par la circulation systémique avant d'atteindre le tissu cible, et que la quantité de produit nécessaire à l'effet pharmacologique peut être réduite. En conséquence, le coût économique, mais également les éventuels risques de toxicité du traitement s'en trouvent réduits. De plus, l'émergence des nouvelles techniques de reperfusion par voie intra-artérielle facilitent cette voie d'administration. En effet, la thrombectomie nécessite un accès artériel. Ainsi, au moment de l'injection d'un nouveau traitement, aucune chirurgie supplémentaire n'est nécessaire puisque la voie d'administration est déjà en place (Abou-Chebl, 2013; Maniskas *et al.*, 2015).

Toutefois, la question de son efficacité subsiste. C'est pourquoi, afin de déterminer la voie d'administration optimale du RGTA, nous avons réalisé une étude d'*effet-dose* de RGTA injecté par voie intra-carotidienne après ischémie cérébrale chez le rat. Pour cela, 6 doses différentes de RGTA ont été testées, et les dommages cérébraux ont été évalués par IRM à 2 jours et 14 jours après ischémie.

2 Matériel et méthodes

Les protocoles ont été approuvés par le comité d'éthique régional (APAFiS #18450) et réalisés au sein du GIP CYCERON (Caen, France, numéro d'agrément : FA- 118-001). L'ensemble des expérimentations et des analyses ont été réalisées en aveugle et de façon randomisées selon les recommandations ARRIVE (Animal Research Reporting of In Vivo Experiments).

2.1 Animaux utilisés

Les animaux inclus dans cette étude sont des rats mâles de souche Sprague Dawley (SD) (CERJ, France) pesant entre 250 et 300g au moment de l'induction de l'ischémie. Les animaux sont hébergés dans une animalerie agréée (CURB, France) maintenue à température (22 °C) et hygrométrie (55 %) constantes. L'eau et la nourriture ont été distribuées *ad libitum* tout au long du protocole.

2.2 Induction de l'ischémie cérébrale

Chez tous les animaux, l'ischémie cérébrale est induite par OACM transitoire. Ce modèle d'induction intraluminal, largement utilisé en recherche préclinique en raison de sa forte homologie avec la situation clinique (Bouët *et al.*, 2007; Quittet *et al.*, 2015a; Shahjouei *et al.*, 2016; Khelif *et al.*, 2018a), a initialement été développé par les travaux de Koizumi et

collaborateurs en 1986 (Koizumi *et al.*, 1986), avant d'être modifié par Longa et collaborateurs quelques années plus tard (Longa *et al.*, 1989). Pour commencer, l'animal est anesthésié par inhalation de 5 % d'isoflurane dans un mélange O₂/N₂O (ratio 1/3). Une fois l'anesthésie induite, le rat est positionné en position dorsale et maintenu sous anesthésie à 2.5 % d'isoflurane. Une incision d'environ 2cm est réalisée au niveau du côté droit du cou pour dégager un accès aux carotides (commune, interne et externe). Une fois les carotides isolées, des ligatures temporaires sont placées autour de la partie distale de l'artère carotide externe (ACE), et des parties proximales de l'artère carotide commune (ACC) et de l'artère carotide interne (ACI) afin d'interrompre le flux sanguin au niveau de l'intersection entre ces trois artères. L'ACE est ensuite partiellement incisée afin de permettre l'insertion d'un embole réalisé à partir d'un embout en silicone (0.39mm de diamètre et 3-4mm de longueur) positionné à l'extrémité d'un filament de nylon (Doccole, USA). Une fois l'embole introduit, l'ouverture de l'ACE est fermement ligaturée tandis que la ligature de l'ACI est relâchée en prévision du passage de l'embole. L'ACE est alors sectionnée dans sa partie distale et alignée avec l'ACI. De cette façon, l'embole peut être délicatement poussé jusqu'à l'obstruction de l'ACM (Figure 43). Suite à cette procédure, les animaux sont placés en cage de réveil.

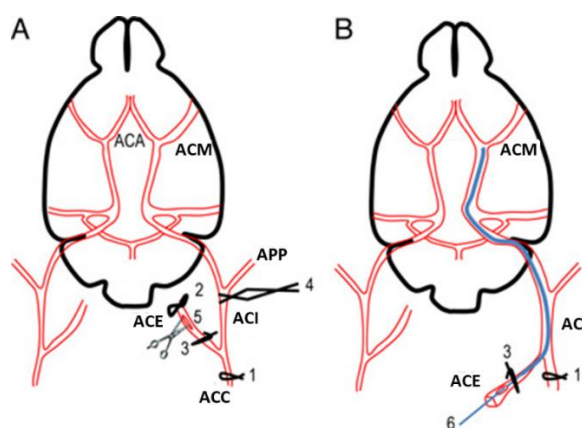


Figure 43 : Occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne (OACM). A : Mise en place des ligatures et incision de l'ACE. B : Insertion de l'embole jusqu'à l'ACM. ACA : artère cérébrale antérieure ; ACC : artère carotide commune ; ACE : artère carotide externe ; ACI : artère carotide interne ; ACM : artère carotide moyenne ; APP : artère ptériquo palatine (Rousselet *et al.*, 2012)

Une heure après l'induction de l'ischémie, les animaux sont de nouveau anesthésiés puis l'embole est retiré afin de permettre une reperfusion. Les plaies sont ensuite suturées, et les animaux reçoivent 5 mL de sérum physiologique en intrapéritonéale afin de maintenir une bonne hydratation après le réveil. Deux autres doses seront injectées les 2 jours suivant la chirurgie. L'analgésie est assurée par l'administration de lidocaïne en gel (Aguettant®) au

niveau de la zone du cou incisée, et l'injection sous-cutanée de 0.02 mg/kg de buprénorphine (Buprécare® 0,3 mg/mL Axience®). Après leur réveil, les animaux sont redéposés dans leur cage d'hébergement dans laquelle des coupelles contenant de l'eau et des aliments ramollis sont mis à disposition.

2.3 Administration du RGTA par voie intra-artérielle

Pour l'injection intra-artérielle du traitement, aucune chirurgie supplémentaire n'est nécessaire. Une heure après l'induction de l'ischémie, juste après la reperfusion, un cathéter effilé est introduit à la place de l'embolie, sur environ 2 cm de sorte à atteindre l'ACI. Au moyen d'une seringue Hamilton de 50 µl et d'un pousse seringue, 50 µl de RGTA sont administrés selon un débit de 25 µl/min suivi d'1 min de pause. Le cathéter est ensuite délicatement retiré et le moignon de l'ACE est électrocoagulée. Les animaux contrôles reçoivent une solution saline (0.9 % NaCl) de la même façon.

Afin d'évaluer l'effet-dose du traitement, différentes doses de RGTA ont été testées : 0.24 µg, 0.74 µg, 2.22 µg, 6.66 µg, 20 µg et 60 µg. Ces doses ont été déterminées selon les résultats obtenus lors de l'étude de la dose optimale par voie intraveineuse.

2.4 Analyses IRM

Les effets du traitement sur l'évolution de la lésion ischémique sont évalués par analyse IRM à 2 jours, et 14 jours post-ischémie (7T, PharmaScan®, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany, plateforme d'imagerie CYCERON, Caen, France). L'antenne utilisée est une antenne 1H réseau phasé en réception uniquement pour cerveau de rat. Une fois encore, l'anesthésie est induite par inhalation de 5% d'isoflurane dans un mélange O₂/N₂O puis maintenue à 2.5 % d'isoflurane le temps des séquences IRM. Une séquence T2 anatomique est utilisée afin de visualiser l'œdème vasogénique présent en phase subaigüe et chronique. Pour chaque animal, 20 coupes recouvrant la totalité du cerveau sont obtenues par une acquisition rapide en echo de spin (RARE 8, TR/TE = 5000/16.25 msec, 2 répétitions, 256 x 256 pixels, FOV = 3,84 x 3,84 cm, résolution = 0,15 x 0,15 x 0,75 mm³). Les images sont ensuite analysées grâce au logiciel ImageJ® Wayne (Rasband, NIMH, Maryland, USA). Un contour manuel est effectué pour mesurer le volume total du cerveau, des hémisphères, et de la lésion cérébrale. Le volume lésionnel obtenu est ensuite corrigé de l'œdème présent selon la formule suivante (Gerriets *et al.*, 2004a).

$$\% \text{HLVc} = \frac{\text{HVc} - \text{HVi} + \text{LVu}}{\text{HVc}} \times 100$$

HLV : Volume d'hémisphère touché par la lésion,

HLVc : Volume d'hémisphère touché par la lésion corrigé de l'œdème

HVc : Volume de l'hémisphère controlatéral

HVi : Volume de l'hémisphère ipsilatéral

LVu : Volume de lésion non corrigé de l'œdème

2.5 Analyses statistiques

L'ensemble des données obtenues a été analysé par une analyse de variance (One-way ANOVA) suivie d'un test HSD de Tukey (JMP®, SAS Institute, Cary, NC, USA). Le seuil de significativité a été fixé à une p-value de 0.05. Les données présentées sont exprimées en moyenne ± écart type à la moyenne (SEM).

2.6 Protocole général de l'étude 1

Six doses de RGTA ont été testées au cours de cette étude sur un total de 65 rats répartis de la façon suivante : 0.24 µg (n=9), 0.74 µg (n=7), 2.22 µg (n=12), 6.66 µg (n=9), 20 µg (n=8), 60 µg (n=8), et 12 animaux contrôles ayant reçu une solution saline. Des examens IRM ont été réalisés 2 jours, et 14 jours après l'induction de l'ischémie afin d'évaluer l'évolution des dommages cérébraux (Figure 44).

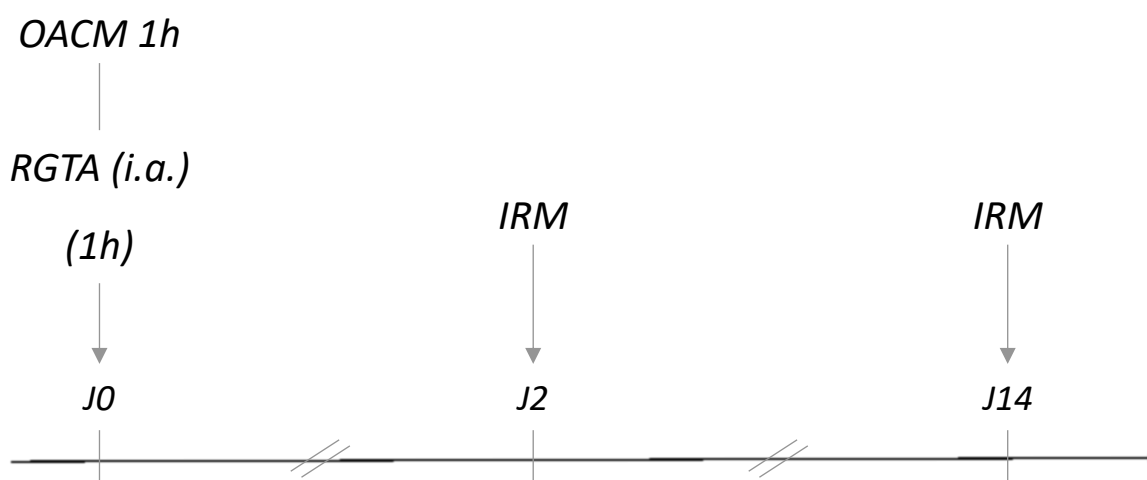


Figure 44 : Protocole général de l'étude 1. IRM : Imagerie par Résonance Magnétique ; OACM : Occlusion de l'Artère Cérébrale Moyenne ; RGTA : ReGeneraTing Agent

3 Résultats

3.1 Données IRM

Les analyses IRM réalisées 2 jours post-ischémie indiquent une réduction significative du volume lésionnel chez les animaux traités par 2.22 µg de RGTA par rapport aux animaux du groupe contrôle (One-way ANOVA, $p < 0.05$) (Figure 48A, 48B). Cette réduction s'élève à près de 42 % (Tableau 1). En effet, chez les animaux contrôles, l'OACM induit une lésion qui atteint 45 ± 13.1 % de l'hémisphère ipsilatéral 2 jours après l'ischémie (Figure 45B). Cette lésion atteint systématiquement le néocortex, le striatum, l'amygdale ainsi que l'hypothalamus latéral des rats (Figure 45A). Les animaux traités par 2.22 µg de RGTA présentent dans l'ensemble des lésions plus petites, représentant 26.3 ± 16.5 % de l'hémisphère ipsilatéral 2 jours après l'ischémie (Figure 45B). Chez ces animaux, l'amygdale et l'hypothalamus sont davantage épargnés, et les lésions du néocortex sont moins étendues. Bien que le seuil de significativité ne soit pas atteint, une injection de 6.66 µg de RGTA induit tout de même une réduction de 31 % du volume lésionnel par rapport au groupe contrôle avec une lésion occupant 30.9 ± 12.2 % de l'hémisphère ipsilatéral (Tableau 2) (Figure 45B). Les animaux de ce groupe semblent avoir un néocortex préservé par rapport aux animaux contrôles. En comparaison, on peut constater que le profil lésionnel des animaux appartenant aux autres groupes s'approche d'avantage du groupe contrôle (Figure 45A).

Quatorze jours après l'ischémie, la diminution du volume lésionnel des animaux traités par 2.22 µg de RGTA se maintient de manière statistiquement significative avec une lésion 41 % plus petite que chez les animaux contrôles (One-way ANOVA, $p < 0.05$) (Figure 45A, 45C) (Tableau 2). Celle-ci représente 17.1 ± 10.9 % de leur hémisphère ipsilatéral, contre 29.3 ± 6.5 % chez les animaux contrôles (Figure 45C).

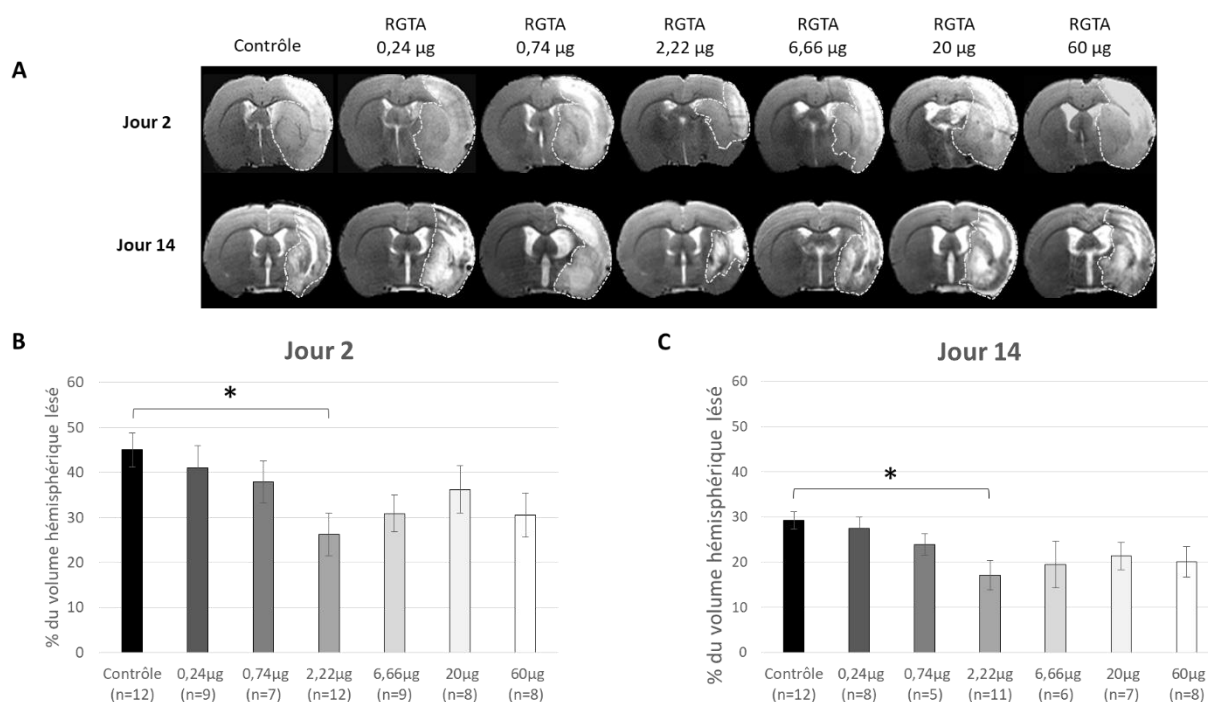


Figure 45 : Effet-dose d'une injection intra-artérielle de RGTA sur la neuroprotection post-ischémique. (A) Images IRM représentatives à 2 jours et 14 jours après l'ischémie. La lésion est entourée par des pointillés ; (B) Volume lésionnel à 2 jours post-ischémie. (Contrôle n= 12; RGTA (0.24 µg n= 9; 0.74 µg n = 7; 2.22 µg n = 12; 6.66 µg n = 9; 20 µg n = 8; 60 µg n = 8) (*One-way ANOVA suivi d'un test HSD de Tukey p < 0.05) ; (C) Volume lésionnel 14 jours post-ischémie (Contrôle n= 12; RGTA (0.24 µg n = 8; 0.74 µg n = 5; 2.22 µg n = 11; 6.66 µg n= 6; 20 µg n= 7; 60 µg n = 8)) (*one-way ANOVA suivi d'un test HSD de Tukey, p < 0.05). Toutes les données sont des moyennes ± SEM.

Tableau 2 : Réduction du volume lésionnel par rapport aux animaux contrôles.

	Réduction du volume lésionnel	
	Jour 2	Jour 14
0,24 µg	9 %	6 %
0,74 µg	16 %	18 %
2,22 µg	42 %	41 %
6,66 µg	31 %	33 %
20 µg	20 %	27 %
60 µg	31 %	36 %

1.1 Mortalité

Durant la totalité de l'étude, la mortalité des rats traités par le RGTA (toutes doses confondues) et des rats contrôles s'élève respectivement à 20 et 21 % (Tableau 3). Bien qu'aucune autopsie n'ait été réalisée *post-mortem* sur les animaux décédés, cette mortalité peut être attribuée à la pression intracrânienne liée à un œdème massif causé par l'AVC. Il s'agit d'une cause de mortalité inhérente au modèle d'induction d'ischémie choisi pour cette étude.

Tableau 3 : Taux de mortalité des animaux après ischémie cérébrale

Groupes	Nombre d'animaux inclus à J0	Nombre de décès	Taux de mortalité
Contrôle	15	3	20 %
RGTA	58	13	21 %

4 Discussion

La thérapie matricielle à base de RGTA est un nouveau traitement prometteur pour améliorer la neuroprotection et la récupération fonctionnelle après un AVC (Khelif *et al.*, 2018). Toutefois, la voie d'administration optimale de RGTA reste inconnue dans le cadre de cette pathologie. C'est pourquoi dans cette étude, nous avons évalué les effets sur la neuroprotection post-ischémique de différentes doses de RGTA après une injection intra-artérielle chez le rat.

Nous avons démontré qu'une injection intra-artérielle de RGTA offrait une neuroprotection durant la phase aiguë, persistant jusqu'en phase chronique. Parmi les 6 doses testées, la dose optimale apparaît être de 2.22 µg en induisant une réduction du volume lésionnel de 45 %, réduction similaire à celle obtenue avec la dose optimale de RGTA après une injection intraveineuse (Khelif *et al.*, 2018). Ainsi, une injection intra-artérielle de RGTA permet d'atteindre la même efficacité qu'une injection intraveineuse sur la réduction du volume lésionnel. Toutefois, dans le cas présent, une quantité bien moindre du produit est nécessaire pour atteindre ce résultat. A ce jour, aucun effet secondaire du RGTA n'a été rapporté suite à ses autres utilisations cliniques chez plus de 100 000 patients. Cependant, ces utilisations ne requièrent qu'un traitement topique et de faibles doses. Dans le cadre du traitement de l'ischémie cérébrale, une injection intra-veineuse de RGTA chez l'Homme requerrait une dose plus importante du produit, ce qui pourrait présenter un risque de toxicité plus élevé. De ce fait, la voie intra-artérielle permet de réduire le risque d'effets indésirables en clinique grâce à l'injection d'une plus faible quantité de RGTA, tout en préservant son efficacité.

Par ailleurs, la mortalité des animaux traités par le RGTA dans cette étude est de 20 %. Il en va de même pour les animaux contrôles ainsi que pour les animaux traités par voie intraveineuse (Khelif *et al.*, 2018). Il s'agit du taux de mortalité couramment retrouvé après l'induction d'une OACM chez ce modèle animal. En effet, la mort des animaux est généralement la conséquence d'un œdème cérébral massif qui survient après la procédure

chirurgicale. Ce résultat suggère donc que l'administration intra-artérielle de RGTA n'entraîne aucune toxicité, au même titre que la voie intraveineuse.

On pourrait penser que l'efficacité du RGTA augmente de façon proportionnelle à la dose injectée. Toutefois, nos résultats témoignent d'une réduction des effets bénéfiques du RGTA pour les doses supérieures à 2.22 µg. En effet, le RGTA a la capacité de se lier à différents facteurs de croissance, tout en les préservant d'une dégradation enzymatique. Ce faisant, il augmente leur biodisponibilité et favorise leur présentation aux récepteurs membranaires au niveau du site lésionnel. Cependant, un excès de RGTA pourrait limiter ses effets bénéfiques en attirant les facteurs de croissance déjà liés à leurs récepteurs, les éloignant ainsi du site lésionnel (Barritault *et al.*, 2017).

Grâce aux études antérieures réalisées au laboratoire, nous en savons un peu plus sur les mécanismes d'action du RGTA durant une ischémie. Tout d'abord, il a été démontré que le RGTA permettait de réduire la perméabilité de la BHE induite par une ischémie (brevet déposé en 2019). Durant la phase aiguë d'une ischémie, l'activation de MMP-9 entraîne la rupture de la BHE en dégradant la lame basale qui la constitue (Kim & Han, 2006). Le RGTA est un mimétique des HS de la MEC ayant la particularité de pouvoir résister aux dégradations enzymatiques. Ainsi, en remplaçant les HS dégradés il permet de restaurer et de maintenir la structure matricielle dans les tissus (Barritault *et al.*, 2017). Nous pouvons donc supposer que le RGTA permet de maintenir l'intégrité de la lame basale, ce qui limite la rupture de la BHE. D'autre part, il a été démontré que l'administration de RGTA engendrait une augmentation de l'expression du VEGF et d'Ang-2 qui s'accompagne d'une augmentation de l'angiogenèse et de la neurogenèse durant la phase chronique post-ischémique (Khelif *et al.*, 2018).

Au cours de cette étude, nous n'avons pas réalisé de suivi des déficits comportementaux. Cependant, nous savons qu'une amélioration de la récupération fonctionnelle a été observée à la suite d'une injection intraveineuse de RGTA. Dans cette étude, nous avons démontré que la réduction du volume lésionnelle était identique entre les animaux traités par voie intraveineuse, et les animaux traités par voie intra-artérielle. De plus, les expérimentations ont été réalisées sur le même modèle animal, avec le même modèle d'induction d'ischémie, et les mêmes conditions d'expérimentation. Nous pouvons donc supposer qu'une injection intra-artérielle de RGTA permet également d'améliorer la récupération fonctionnelle. Toutefois, des études complémentaires sont nécessaires afin de vérifier cette hypothèse.

En résumé, nous avons démontré dans cette étude que l'administration de RGTA par voie intra-artérielle après une ischémie focale chez le rat nous permettait d'obtenir les mêmes effets neuroprotecteurs que ceux observés à la suite d'une injection intraveineuse. Il est intéressant de noter que pour un résultat identique, la voie intra-artérielle permet d'utiliser une dose beaucoup plus faible du produit, ce qui permet de réduire de façon non négligeable le coût de traitement ainsi que les risques de toxicité chez d'autres espèces. Pour ces raisons, nous avons choisi de garder cette voie d'administration pour les futures études chez le marmouset.

ÉTUDE 2 - Étude de la combinaison de CSMs et de RGTA sur la neuroprotection et la récupération fonctionnelle après ischémie cérébrale chez le rat présentant une hypertension artérielle chronique

1 Contexte de l'étude

Parmi les nombreuses pistes thérapeutiques étudiées pour améliorer la neuroprotection et la neurorégénération après un AVC, les traitements à base de cellules souches, notamment les CSMs, semblent très prometteurs aussi bien chez l'animal que chez l'Homme. L'efficacité de cette thérapie reposerait principalement sur les capacités des CSMs à sécréter divers facteurs neurotrophiques et à pouvoir migrer vers le site lésionnel (Toyoshima *et al.*, 2017). Il a ainsi été démontré chez l'animal que l'injection de ces cellules après une ischémie cérébrale permettait de réduire le volume lésionnel en favorisant les mécanismes de neurogenèse, d'angiogenèse et de synaptogenèse (Chen *et al.*, 2003). Toutefois, un évènement majeur empêche le fonctionnement optimal de cette thérapie. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, une ischémie engendre la destruction de la MEC au niveau du site lésionnel. Or, la MEC constitue l'échafaudage cellulaire permettant la communication cellulaire et l'ancrage des cellules souches. Sa dégradation limite donc grandement la survie des cellules injectées au niveau du site lésionnel (Brenneman *et al.*, 2010). Ainsi, la recherche s'oriente désormais vers l'utilisation de supports permettant de fournir un environnement favorable aux CSMs, afin d'optimiser leur survie et donc leur efficacité. C'est ainsi que des hydrogels constitués de GAGs enrichis avec des HS ont montré leur intérêt pour favoriser la survie des cellules implantées après une ischémie focale chez la souris (Zhong *et al.*, 2010).

La thérapie matricielle que nous étudions, à base de RGTA, permet également de stabiliser la structure de la MEC après une ischémie cérébrale (Khelif *et al.*, 2018). De plus, il a été montré *in vitro* que le RGTA augmentait la survie, la prolifération ainsi que la migration des CSMs (Frescaline *et al.*, 2012). Nous avons donc émis l'hypothèse que le RGTA pourrait également potentialiser les effets bénéfiques des CSMs dans le cadre d'une ischémie cérébrale. Des études préliminaires réalisées au laboratoire sur des rats normotendus ont effectivement démontré qu'une injection de RGTA suivie d'une co-injection de RGTA et de CSMs 24 h après l'ischémie permettait d'obtenir une réduction du volume lésionnel et une récupération fonctionnelle plus importante qu'avec une injection de RGTA ou de CSMs seuls (résultats

soumis pour publication– Annexe 1). L'étude présentée ci-dessous cherche à valider l'hypothèse de l'efficacité de ce double traitement chez des rats présentant un facteur de risque et aggravant de l'ischémie : l'hypertension artérielle. J'ai eu l'opportunité de collaborer sur cette étude, en réalisant les analyses des données IRM ainsi que les tests comportementaux.

2 Matériel et méthodes

Les protocoles ont été approuvés par le comité d'éthique régional (APAFiS #4410) et sont réalisés au laboratoire d'expérimentation et d'imagerie GIP Cyceron (Caen, France, numéro d'agrément : FA-118-001). L'ensemble des expérimentations et des analyses a été réalisées en aveugle et de façon randomisée selon les recommandations ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments).

2.1 Animaux utilisés

Les animaux inclus dans cette étude sont des rats mâles de souche Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) (CURB) pesant entre 300 et 350g au moment de l'induction de l'ischémie. Les animaux sont hébergés dans une animalerie agréée (CURB, France) maintenue à température (22 °C) et hygrométrie (55 %) constantes. L'eau et la nourriture ont été distribuées *ad libitum* tout au long du protocole.

2.2 Induction de l'ischémie cérébrale

Chez tous les animaux, l'ischémie cérébrale est induite par une OACM transitoire d'1 h, comme décrite précédemment en partie 2.2 de l'étude 1.

2.3 Extraction et culture des CSMs

Les CSMs sont extraites des fémurs et tibias de rats SD (mâles 12 semaines, CERJ, France). Les animaux sont euthanasiés par inhalation d'une dose létale d'isoflurane 5 % dans un mélange O₂/N₂O (ratio 1/3). Après l'extraction des os, sous une hotte à flux laminaire, ceux-ci sont placés dans un bain d'alcool, suivi d'un bain de pénicilline-streptomycine, puis rincés dans une solution tampon de phosphate (PBS, phosphate buffer saline). Les épiphyses sont coupées et la moelle osseuse est récupérée en propulsant par des allers-retours dans la lumière osseuse du milieu de culture à 37 °C composé de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) dans du milieu α MEM (Eagle's minimal essential medium) complet (2 mM de glutamine et de 1 % de pénicilline-streptomycine), à l'aide d'une aiguille de 21 Gauge.

Les cellules extraites sont réparties dans des boîtes de culture (1 T75 par patte). Les cellules sont incubées à 5 % de CO₂ et 21 % d'O₂ à 37 °C. Après 1-2 jours, les T75 sont délicatement secouées, rincées 2 fois avec du PBS puis le milieu est remplacé par du milieu complet complété à 20 % de SVF, éliminant ainsi les cellules hématopoïétiques non-adhérentes contrairement aux CSMs. L'opération est renouvelée à J7. Dès que les cellules sont à 90% de confluence, deux rinçages sont réalisés avec du PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ puis les cellules sont décollées à l'aide de trypsine (0,25 %-EDTA). Dès le décollement du tapis cellulaire, du milieu complet 10 % SVF (2 fois le volume de trypsine) est ajouté. Les cellules sont récupérées, et centrifugées à 300 g/minutes pendant 5 minutes. Le surnageant est délicatement aspiré et le culot est dilué dans du milieu complet 10 % SVF. Les cellules sont réensemencées à une densité cellulaire de 5.10⁵ cellules par T75. Les cellules sont maintenues en culture dans du milieu complet 10 % SVF dans un incubateur à 5% CO₂ et 21 % d'O₂ à 37°C. Elles sont utilisées après 3-4 passages.

2.4 Administration du RGTA seul

Dans ce protocole, le RGTA est injecté par voie intraveineuse. Pour cela, une veine de la queue est isolée puis un cathéter effilé y est introduit sur environ 2 cm afin de permettre l'administration de 300 µL de RGTA (1.5 mg/kg). Afin que tout le produit parte bien dans la circulation sanguine, 0.1 mL de sérum physiologique sont administrés à la suite du RGTA. Le cathéter est ensuite retiré, la veine électrocoagulée, et l'incision suturée.

2.5 Co-administration des CSMs et du RGTA

La co-administration des CSMs/RGTA est réalisée 24 h après l'ischémie. L'animal est de nouveau anesthésié par inhalation d'isoflurane 5% dans un mélange O₂/N₂O pendant environ 3 minutes, puis maintenu à 2.5 % d'isoflurane pendant la chirurgie. Les CSMs et le RGTA sont injectés par voie intraveineuse. Comme précédemment, un cathéter effilé est placé dans une veine caudale sur environ 2 cm. Une solution de 300 µL contenant 3.10⁶ de CSMs et 1.5 mg/kg de RGTA dans du PBS glutamine 2 mM est administrée suivie de 0.1 mL de sérum physiologique afin de s'assurer de son passage complet. Le cathéter est ensuite retiré, la veine électrocoagulée, et l'incision suturée. Une dose de 0.02 mg/kg de buprénorphine (Buprécare® 0,3 mg/ml Axience®) est injectée puis l'animal est replacé dans sa cage.

2.6 Analyses IRM

Un suivi IRM a été réalisé au 2^{ème} et 14^{ème} jour après ischémie. Des séquences T2 ont été utilisées comme décrit dans le paragraphe 2.4 de l'étude 1.

2.7 Tests comportementaux

Les rongeurs étant naturellement non latéralisés pour des tâches de redressement, une des conséquences de l'ischémie cérébrale est la latéralisation des animaux. Cette latéralisation peut être évaluée grâce au test du cylindre (Schallert *et al.*, 2002) et au test du coin (Schallert *et al.*, 2000).

2.7.1 Test du cylindre

Le rat est placé à l'intérieur d'un cylindre en plexiglas transparent de 30 cm de haut et 20 cm de diamètre, et lors de 20 redressements consécutifs, l'examineur note quelle patte utilise l'animal en premier pour s'appuyer contre la paroi (Figure 46). Un animal sain utilise ses deux pattes autant l'une que l'autre. Le nombre de contacts bilatéraux, c'est-à-dire lorsque les deux pattes rentrent en contact en même temps avec la paroi, est également comptabilisé. Ce test a été effectué à 2 semaines, 4 semaines et 6 semaines post-ischémie.



Figure 46 : Dispositif du test du cylindre. Le rat est placé dans un cylindre en plexiglas transparent. Lorsque celui-ci se redresse, l'examineur note quelle patte sert d'appui en premier contre la paroi.

2.7.2 Test du coin

Le dispositif de ce test est constitué de deux planches fixées entre elles de sorte à former un angle de 30°. Ce coin ainsi formé permet de stimuler le comportement exploratoire du rat (Figure 47). Lorsque celui-ci arrive au bout du dispositif, les vibrisses de l'animal sont stimulées des deux côtés ce qui aura pour conséquence un retournement du rat. Le nombre de retournement de chaque côté (ipsilatéral et controlatéral) sont comptabilisés au cours de 10

essais espacés de 2 minutes chacun. L'index de latéralisation est ensuite calculé de la façon suivante (Haelewyn *et al.*, 2007) :

$$\text{Index de latéralisation} = \frac{\text{Nombre de retournements du côté ipsilatéral} - \text{Nombre de retournements du côté controlatéral}}{\text{Nombre de retournements totaux}}$$

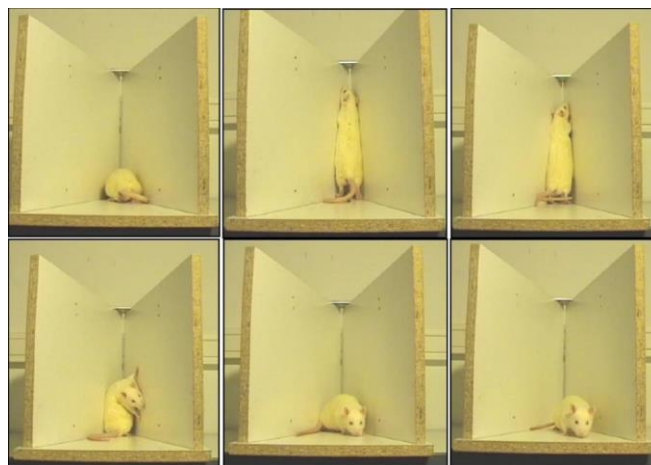


Figure 47 : Test du coin. Deux planches forment un angle de 30°. Après que l'animal a exploré le coin, l'expérimentateur note de quel côté l'animal se retourne.

2.7.3 Test du retrait de l'adhésif

Ce test évalue la négligence sensorimotrice après une ischémie cérébrale et permet plus précisément de mesurer le phénomène d'extinction tactile (c'est-à-dire l'insensibilité d'un côté du corps lors d'une stimulation bilatérale simultanée, alors que la perception peut être normale lorsque les côtés sont stimulés individuellement). Pour cela, un morceau d'adhésif d'environ 1x1 cm est placé sur les paumes de chaque patte antérieure de l'animal. Entre chaque essai, et chaque animal, l'expérimentateur prend soin de randomiser l'ordre de placement des adhésifs (entre patte gauche et droite). L'animal est ensuite placé dans une boîte en plexiglas de 20 x 25 x 32 cm à laquelle il aura préalablement été habitué pendant 2 minutes. Un miroir incliné, déposé à côté de la boîte permet de faciliter les observations. L'examineur note ensuite le temps que va mettre le rat à détecter l'adhésif. Généralement, cela se traduit par une secousse de la patte ou par un contact entre la patte et la bouche. Le temps que va mettre l'animal à retirer l'adhésif (au moins au $\frac{3}{4}$) est ensuite noté. Le temps maximal accordé à l'animal est de 120 secondes. Passé ce délai, l'essai est arrêté. Avant la chirurgie, les animaux sont entraînés pendant 5 jours consécutifs, à raison d'un essai par jour. La moyenne des 3 dernières performances est utilisée comme valeur pré-ischémique de référence. Après la chirurgie, les animaux réalisent le test durant 5 jours consécutifs durant les semaines étudiées, et la moyenne

des performances des 3 derniers essais est utilisée. Ce faisant, le biais pouvant être causé par un réapprentissage de l'exercice peut être limité.

2.8 Analyses statistiques

Les données IRM ont été analysées par un test t de Student (JMP®, SAS Institute, Cary, NC, USA). L'ensemble des données comportementales obtenues a été analysé par une analyse de variance (One-way ANOVA) suivie d'un test HSD de Tukey (JMP®, SAS Institute, Cary, NC, USA). Le seuil de significativité a été fixé à une p-value de 0.05.

2.9 Protocole général de l'étude 2

Cette étude s'est déroulée en deux temps. Dans un premier temps, 26 rats ont été utilisés afin d'évaluer les effets d'une injection de RGTA seul après une ischémie cérébrale sur des rats présentant une hypertension artérielle. Treize rats SHR contrôles ont reçu une injection de solution saline tandis que 13 autres rats SHR ont été traités par le RGTA au moment de la reperfusion. Dans un deuxième temps, 19 rats ont servi à l'évaluation des effets d'une co-administration de RGTA et de CSMs après une ischémie cérébrale chez des rats hypertendus. Dix rats SHR servant de contrôle ont reçu une injection de solution saline, et 9 rats SHR ont reçu une injection de RGTA au moment de la reperfusion, suivie d'une co-injection de CSMs et de RGTA 24 h plus tard.

L'effet des traitements sur la taille des lésions a été étudié par imagerie IRM (2 jours et 14 jours après l'ischémie), et la récupération fonctionnelle a été étudiée au moyen d'un test comportemental pendant 4 semaines pour les animaux n'ayant reçu que du RGTA, et pendant 6 semaines pour les animaux ayant reçu le co-traitement (Figure 48).

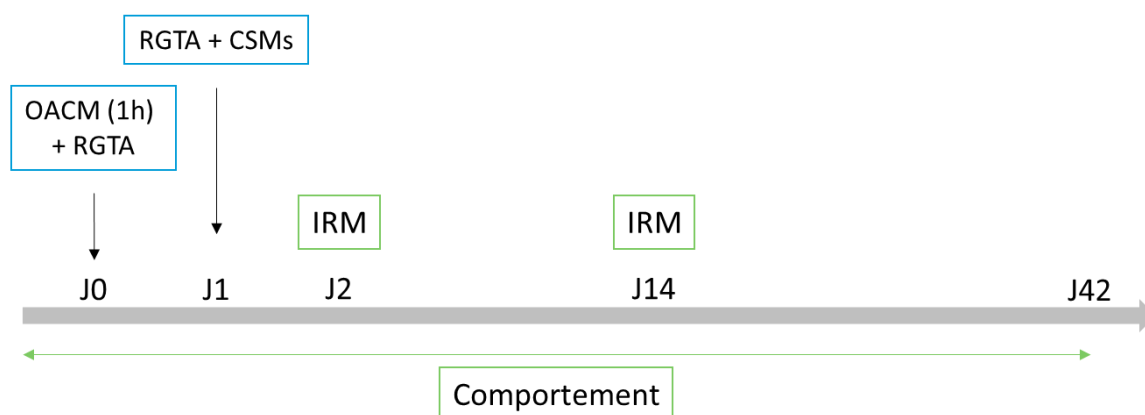


Figure 48 : Protocole général de l'étude 2. CSMs : Cellules Souches Mésoenchymateuses ; IRM : Imagerie par Résonance Magnétique ; OACM : Occlusion de l'Artère Cérébrale Moyenne ; RGTA : ReGeneraTing Agent

3 Résultats

3.1 Vérification de l'hypertension

Afin de s'assurer du développement d'une hypertension artérielle chez les rats SHR, certains rats ont subi des mesures de la pression artérielle moyenne (PA). Celle-ci est de 200 ± 5 mmHg chez les rats SHR contre 120 ± 8 mmHg pour des rats normotendus (Figure 49). Les rats SHR présentent donc bien une hypertension artérielle.

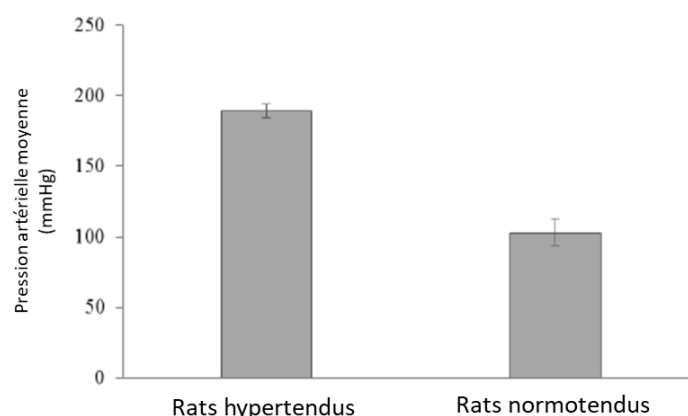


Figure 49 : Mesure de la pression artérielle moyenne chez les rats SHR par rapport à des rats normotendus (Rats hypertendus $n = 12$; Rats normotendus $n = 12$) (Moyenne \pm SEM).

3.2 Données IRM

Tous les animaux présentent des lésions, touchant le néocortex, le striatum, la capsule interne, l'amygdale ainsi que l'hypothalamus latéral (Figure 50A et 50B). Les images IRM ne montrent aucun effet neuroprotecteur d'une injection de RGTA seul chez les animaux hypertendus, que ce soit à 2 jours ou à 14 jours post-ischémie, par rapport au groupe contrôle (Figure 50C et 50E). En revanche, on constate que les animaux traités par du RGTA combiné aux CSMs présentent un volume lésionnel significativement réduit de 19 % par rapport aux animaux contrôles (Test t de Student ; $p < 0.05$). Cette réduction persiste jusqu'à 14 jours post-ischémie, avec une lésion 18 % plus petite que celle des animaux contrôles (Test t de Student ; $p < 0.05$) (Figure 50D et 50F).

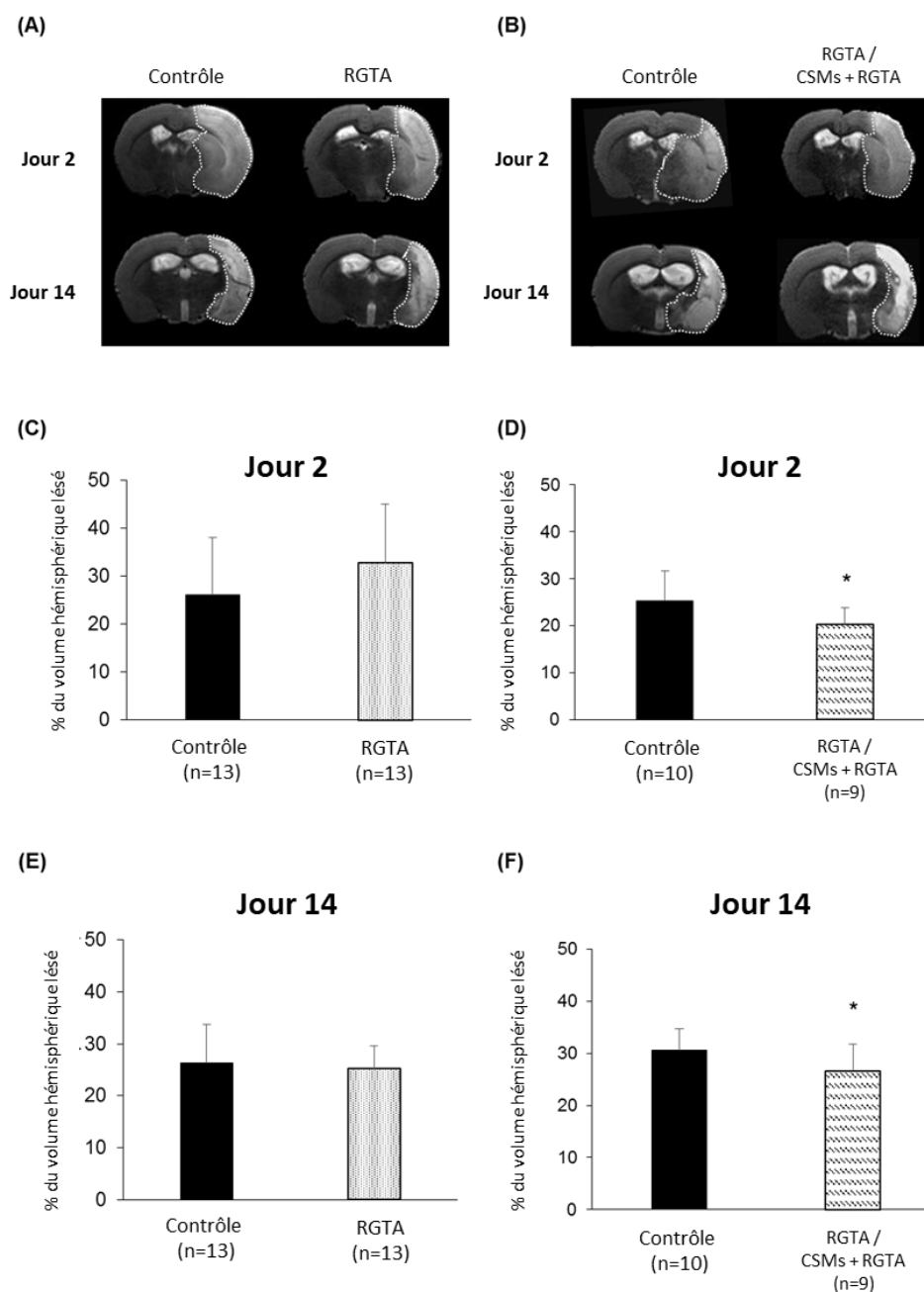


Figure 50 : Effet de l'association de RGTA et de CSMs sur le volume lésionnel chez des rats hypertendus. A) et B) Images IRM représentatives obtenues à 2 jours et 14 jours post-ischémie. C) Effet du RGTA seul sur le volume lésionnel 2 jours après ischémie. D) Effet de la co-administration de RGTA et de CSMs sur le volume lésionnel 2 jours après ischémie. E) Effet du RGTA seul sur le volume lésionnel 14 jours après ischémie. F) Effet de la co-administration de RGTA et de CSMs sur le volume lésionnel 14 jours après ischémie. Les données sont toutes présentées sous forme moyenne \pm SEM. *Test t de Student ; $p < 0.05$).

3.3 Récupération fonctionnelle

Les déficits de latéralisation et leur récupération ont été évalués grâce aux tests du cylindre et du coin. Les animaux ne présentaient aucun déficit à ces tests avant l'ischémie.

Au test du coin, un animal sans déficit aura un index de latéralisation proche de 0. On constate que seuls les animaux contrôles présentent une augmentation significative de la latéralisation 2 semaines après l'ischémie (One-way ANOVA ; $p < 0.05$) (Figure 51A et 51B). Bien que la latéralisation augmente légèrement chez l'ensemble des animaux traités, celle-ci n'est pas suffisante pour atteindre un seuil de significativité. Ce test semble donc dévoilé un effet des deux traitements sur la latéralisation.

Au test du cylindre, un animal qui ne présente pas de déficit de latéralisation utilisera sa patte controlatérale à 50 %. Les rats hypertendus traités uniquement par le RGTA développent un déficit de latéralisation, qui se manifeste par une utilisation réduite du membre controlatéral, au même titre que les animaux contrôles, durant toute la durée du test (Two-way ANOVA ; $p > 0.05$) (Figure 51C). En revanche, les animaux traités par le RGTA et des CSMs utilisent significativement plus leur membre controlatéral durant toute la durée du test, par rapport aux animaux contrôles (Two-way ANOVA effet groupe $p = 0.0241$; effet temps $p < 0.2235$; effet temps*groupe $p = 0.8356$). En effet, les animaux traités parviennent à maintenir une utilisation de leur patte controlatérale entre 40 et 50 %, tandis que le taux d'utilisation chute aux environs de 30 % pour les animaux contrôles (Figure 51D).

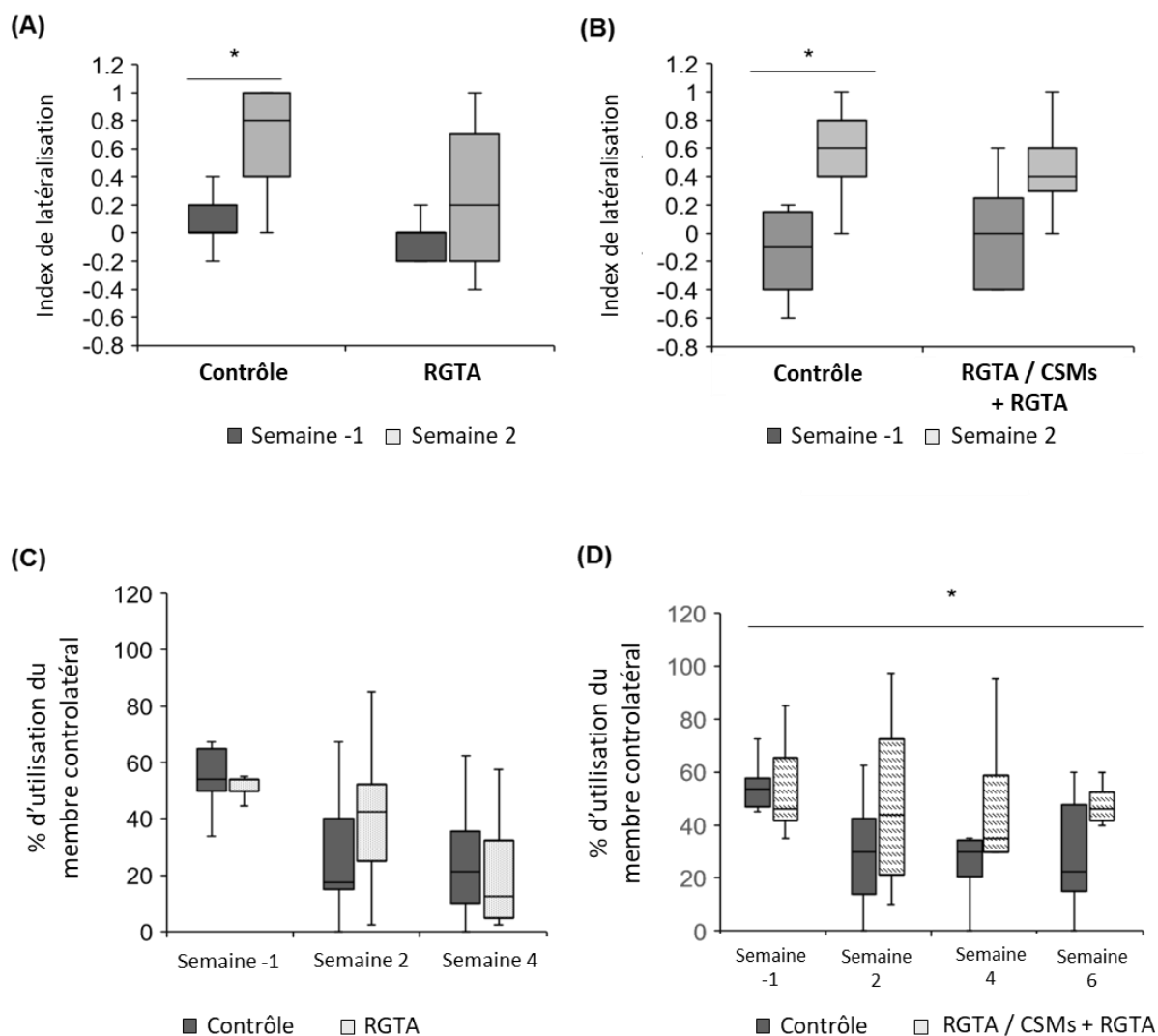


Figure 51 : Évaluation de la récupération fonctionnelle. Index de latéralisation obtenu grâce au test du coin (A) Contrôle n=13, RGTA n=13; et (B) Contrôle n=10, RGTA/CSMs + RGTA n=8 (Médiane \pm IQR). * One-way ANOVA suivie d'un test post-hoc HSD de Tukey; $p < 0.05$. Évaluation du pourcentage d'utilisation du membre controlatéral au moyen du test du cylindre (C) Contrôle n=12, RGTA n=13; et (D) Contrôle n=12, RGTA/CSMs + RGTA n=8 (Médiane \pm IQR); * groupe traité différent du groupe contrôle (Two-way ANOVA, p groupe = 0.0241; p temps = 0.2235; p temps * groupe = 0.8356 suivi d'un test post-hoc de Dunnett $p < 0.05$).

Le test de l'adhésif permet d'évaluer des fonctions à la fois sensorielles et motrices. Le temps mis par les animaux à retirer l'adhésif collé sur la patte controlatérale a été mesuré. Avant l'ischémie, les rats mettent entre 40 et 60 secondes pour retirer l'adhésif. Après l'ischémie, ce temps est globalement maintenu par l'ensemble des animaux durant toute la période de test, et aucune différence de performance entre les groupes n'a été révélée (One-way ANOVA ; $p > 0.05$) (Figure 52A et 52B).

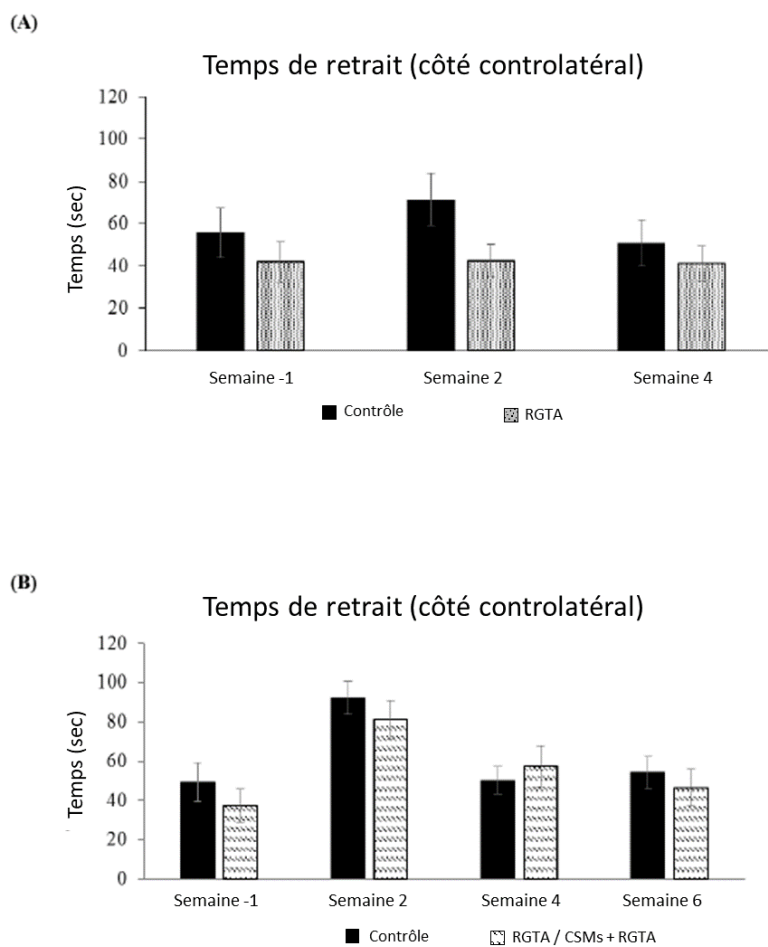


Figure 52 : Évaluation de la récupération sensorimotrice au moyen du test de l'adhésif. Le temps mis par les animaux à retirer l'adhésif sur la patte controlatérale a été mesuré. (A) Contrôle n=13, RGTA n=13; et (B) Contrôle n=10, RGTA/CSMs + RGTA n=8 (Moyenne \pm SEM) (Two-way ANOVA ; $p > 0.05$).

4 Discussion

Au cours de cette étude, nous avons démontré que l'injection de RGTA (i.v) combinée à des CSMs (i.v) a des effets bénéfiques après une ischémie cérébrale focale chez le rat souffrant d'hypertension artérielle. Ces effets s'illustrent par une neuroprotection visible en phase aiguë et persistante en phase chronique, accompagnée d'une meilleure récupération fonctionnelle.

Le RGTA est un mimétique des HS constituant la MEC qui a déjà prouvé son efficacité dans le traitement de l'ischémie cérébrale chez le rat normotendu (Khelif *et al.*, 2018). En remplaçant les HS dégradés à la suite d'une ischémie, il est capable de réparer et de maintenir la structure matricielle, tout en assurant la biodisponibilité de différents facteurs de croissance,

et leur présentation aux récepteurs membranaires (Barritault *et al.*, 2017). Lors de précédents travaux menés au laboratoire, il a été démontré que l'injection intraveineuse de 1.5 mg/kg de RGTA avait un effet neuroprotecteur sur le tissu cérébral après une ischémie chez le rat normotendu (Khelif *et al.*, 2018). Une autre dose (0.5 mg/kg) a montré des effets bénéfiques plus importants, mais afin de pouvoir mettre plus facilement en évidence une potentialisation de l'effet des CSMs par le RGTA, la dose 1.5 mg/kg a été retenue pour cette étude.

Dans le cadre d'une ischémie cérébrale, de nombreuses études font état des effets bénéfiques des CSMs (Vu *et al.*, 2014; Toyoshima *et al.*, 2017). Ces cellules souches agissent principalement *via* la sécrétion d'agents trophiques impliqués dans les mécanismes de réparation tissulaire à la suite d'un AVC (Toyoshima *et al.*, 2017). Au cours d'une ischémie cérébrale, la dégradation de la MEC rend l'environnement cellulaire très hostile pour l'implantation de cellules souches, et 90 % d'entre elles ne survivent que quelques heures (Liu *et al.*, 2011). Étant donné que le RGTA est capable de reconstruire l'échafaudage matriciel, l'hypothèse que le RGTA puisse améliorer la survie des CSMs, et donc leurs effets sur les dommages cérébraux, a émergé. Par ailleurs, cette idée est appuyée par l'étude de Frescaline et collaborateurs, qui a démontré *in vitro* qu'un traitement analogue au RGTA était capable d'augmenter la prolifération et la différenciation des CSMs (Frescaline *et al.*, 2012). Ainsi, au cours de précédents travaux menés au laboratoire, l'effet du RGTA combiné à des CSMs a été étudié après ischémie cérébrale focale chez le rat normotendu (Article soumis – Annexe 1). Cette étude a permis de valider l'hypothèse d'une potentialisation des CSMs par le RGTA. En effet, il a été démontré que les animaux ayant été traités par le RGTA au moment de la reperfusion, suivi d'une combinaison de RGTA et de CSMs 24 h plus tard présentaient une meilleure neuroprotection, ainsi qu'une meilleure récupération fonctionnelle que les animaux n'ayant reçu que du RGTA ou que des CSMs.

Afin d'améliorer la translation des études précliniques chez l'Homme, des comités d'experts suggèrent fortement l'intégration de facteurs de risques aux études chez l'animal (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR), 1999). L'hypertension artérielle est le premier facteur de risque de l'AVC, ainsi qu'un facteur aggravant. Pour autant, peu d'études le prennent en considération (Kumar, 2016). Nos résultats indiquent qu'une injection de RGTA seul à la dose 1,5 mg/kg n'a pas d'effet significatif sur la lésion cérébrale après ischémie chez le rat atteint d'hypertension artérielle, alors qu'à dose équivalente, il est neuroprotecteur chez le rat normotendu (Khelif *et al.*, 2018). En effet, l'hypertension artérielle provoque un épaississement de la paroi des vaisseaux, ce qui entraîne une forte diminution de leur lumière.

Ce phénomène touche les gros vaisseaux comme les artères, et encore plus sévèrement les vaisseaux de plus petite taille comme les petites artères et les artérioles. De plus, l'hypertension artérielle engendre une raréfaction des capillaires sanguins en réduisant fortement leur densité spatiale (Bernard & Waeber, 2009). Ainsi, durant une ischémie cérébrale, en raison d'une quasi absence d'apport sanguin substitutif par les vaisseaux collatéraux, le volume de la pénombre est beaucoup plus faible chez les individus hypertendus que chez des individus normotendus (Letourneur *et al.*, 2011). De ce fait, il reste très peu de tissu cérébral à protéger pouvant être ciblé par le traitement. Pour cette raison, seules 10 % des interventions thérapeutiques ayant montré un effet bénéfique chez l'animal normotendu parviennent à le maintenir en présence d'hypertension artérielle (O'Collins *et al.*, 2013). C'est pourquoi l'hypertension artérielle présente chez les patients est une raison importante d'échec de translation entre les études précliniques, et les cas cliniques. Néanmoins, nos résultats indiquent un effet neuroprotecteur de la thérapie combinant RGTA et CSMs à 2 jours et 14 jours après ischémie chez les rats hypertendus. De plus, les résultats obtenus au test du cylindre indiquent que ce traitement permet de réduire à long terme les déficits de latéralisation, jusqu'à 6 semaines après l'ischémie. Le test du coin a également mis en avant une réduction des déficits de latéralisation après l'ischémie, probablement liée à la protection du tissu cérébral. Il serait toutefois intéressant de renouveler cette expérience en utilisant cette fois-ci la dose intraveineuse de 0.05 mg/kg de RGTA, qui a permis d'obtenir la neuroprotection la plus importante chez des animaux normotendus (Khelif *et al.*, 2018a).

Chez le rat normotendu, la thérapie matricielle combinée à la thérapie cellulaire présentait déjà un fort potentiel thérapeutique en protégeant le tissu cérébral sur le long terme, tout en améliorant la récupération fonctionnelle. Dans cette étude, nous avons voulu vérifier si ces résultats se maintenaient chez le rat atteint d'hypertension artérielle. En raison de l'évolution très rapide de la lésion chez les individus hypertendus, il paraît très difficile d'obtenir une protection du tissu cérébral efficace grâce à un traitement. La combinaison de RGTA et de CSMs offre une neuroprotection persistante ainsi qu'une meilleure récupération fonctionnelle chez les animaux hypertendus. Ces résultats soulignent d'autant plus le fort potentiel de cette thérapie. Afin de répondre aux recommandations des comités scientifiques, il serait intéressant de poursuivre cette étude chez le primate afin de valider les résultats obtenus chez le rongeur afin d'augmenter les chances de translation en phase clinique en cas de réussite.

ÉTUDE 3 - Effet du RGTA sur la neuroprotection et la récupération fonctionnelle après ischémie cérébrale chez le marmouset

1 Contexte de l'étude

Au cours des dernières décennies, de nombreuses approches thérapeutiques visant à limiter les séquelles après une ischémie ont été testées, mais aucune n'a pour le moment franchi le cap de la mise sur le marché. Une des raisons à cet échec de transposition à l'Homme mise en avant, est l'utilisation de modèles animaux non-appropriés. En effet, le plus souvent les modèles expérimentaux sont des modèles rongeurs qui présentent un grand éloignement phylogénétique vis-à-vis de l'Homme. Afin d'améliorer la qualité des études précliniques et également de faciliter la translation à l'Homme en cas d'efficacité avérée, des comités d'experts suggèrent l'utilisation de modèles venant d'espèces plus proches de l'Homme, dont les PNH, pour confirmer les résultats observés chez les rongeurs (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR), 1999). Parmi ces PNH, le marmouset commun (*Callithrix jacchus*), un petit primate du Nouveau Monde, gagne en popularité dans le domaine des Neurosciences (Tokuno *et al.*, 2012). Le succès de ce modèle animal s'explique, d'une part, par sa proximité phylogénétique, métabolique et anatomique avec l'Homme, mais également par sa petite taille, qui lui confère un avantage non négligeable d'un point de vue économique et pratique par rapport aux plus grands primates.

Une étude menée chez le rat a démontré que le RGTA permettait de réduire les dommages cérébraux ainsi que les déficits comportementaux (Khelif *et al.*, 2018). Afin de répondre aux recommandations des comités d'experts, la présente étude cherche à valider les effets bénéfiques du RGTA, obtenus chez le rat, chez une espèce plus proche de l'Homme : le marmouset. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'évaluation des dommages cérébraux et de la récupération fonctionnelle chez le marmouset commun. Pour les raisons qui ont été évoquées en introduction, les ischémies ont été réalisées par OACM transitoires de 3 h (Freret *et al.*, 2008; Bihel *et al.*, 2010). Au cours de l'étude précédente menée chez le rat, nous avons pu déterminer la dose d'efficacité optimale du traitement après une injection par voie intra-artérielle : 2.22 µg. En nous basant sur le volume cérébral des modèles animaux, cette dose a pu être adaptée au marmouset. En effet, celui-ci possède un cerveau 4 fois plus volumineux que

celui du rat. La dose retenue chez le marmouset a donc été de 8.88 µg. L'évaluation des dommages cérébraux et de la récupération fonctionnelle a ensuite été réalisée durant la phase aiguë, subaiguë, et chronique de l'ischémie, sur une période de 28 jours.

2 Matériels et méthodes

Les protocoles ont été approuvés par le comité d'éthique régional (APAFiS #7000) et sont réalisés au laboratoire d'expérimentation et d'imagerie GIP Cyceron (Caen, France, numéro d'agrément : FA-118-001). L'ensemble des expérimentations et des analyses ont été réalisées en aveugle selon les recommandations ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments).

2.1 Animaux utilisés

L'ensemble des marmousets (*Callithrix jacchus*) inclus dans cette étude provient d'une animalerie agréée rattachée à notre laboratoire (CURB, France). Ils y sont hébergés en intérieur, avec un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*, dans un environnement maintenu constamment à 24°C et 50 % d'hygrométrie, avec un cycle d'éclairage jour/nuit de 12 h.

Quelques semaines avant le début du protocole, les marmousets sont transférés dans une animalerie dédiée aux animaux en cours de protocoles (GIP CYCERON, numéro d'agrément : FA-118-001). Cette animalerie confère les mêmes conditions de température, d'hygrométrie et d'éclairage que le CURB. En revanche, pour faciliter les études comportementales, les animaux sont isolés dans des cages individuelles mais conservent la possibilité d'interagir visuellement et de communiquer avec leurs congénères situés dans le même box. L'eau est distribuée *ad libitum*, mais comme certains tests comportementaux nécessitent une motivation alimentaire, la nourriture est retirée le matin et redistribuée en fin d'après-midi, à la fin des tests.

Seize marmousets communs ont été inclus dans cette étude. Parmi ces 16 animaux, 8 ont été traités par le RGTA, 8 ont été traités avec une solution saline. Un total de 5 animaux (3 contrôles et 2 traités par le RGTA) sont morts dans les 6 premiers jours suivant l'ischémie à cause d'un œdème massif provoqué par l'absence de reperfusion. En plus de ces animaux, 5 autres marmousets ont dû être exclus du protocole avant tout traitement : 2 en raison de l'échec de l'induction d'une ischémie, et 3 en raison d'une hémorragie cérébrale durant la chirurgie, provoquée par une rupture du cercle de Willis par l'embolie.

Toutes les caractéristiques des animaux inclus sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 4).

Tableau 4 : Informations générales des animaux inclus dans l'étude. Six marmousets ont été traités par le RGTA, 5 ont reçu une solution saline. Cinq marmousets sont décédés à cause d'un œdème massif dans les 6 premiers jours suivant l'ischémie. Cet œdème a été provoqué par l'absence anormale de reperfusion à la fin de la chirurgie. F : femelle ; M : mâle.

Numéro	Matricule	Sexe	Âge	Poids	Traitement reçu	
1	3858156	F	5 ans	349 g	Contrôle	Protocole non finalisé pour cet animal, certaines données physiologiques et comportementales sont donc manquantes.
2	9238	F	7 ans	368 g	RGTA	
3	9291	M	7 ans	292 g	RGTA	
4	4317591	F	2 ans	354 g	Contrôle	
5	3731629	M	4 ans	367 g	RGTA	
6	102819	F	15 ans	341 g	Contrôle	
7	366073	F	2 ans	355 g	RGTA	
8	3858157	M	5 ans	244 g	Contrôle	Mort à J5 (pas de reperfusion)
9	4317442	M	2 ans	340 g	Contrôle	Mort à J1 (pas de reperfusion)
10	9198	F	7 ans	326 g	RGTA	Mort à J6 (pas de reperfusion)
11	3666062	M	2 ans	298 g	Contrôle	Mort à J1 (pas de reperfusion)
12	9433	M	14 ans	324 g	Contrôle	
13	3666104	M	2 ans	343 g	RGTA	
14	9012	F	8 ans	306 g	RGTA	Mort à J1 (pas de reperfusion)
15	4317438	M	3 ans	309 g	Contrôle	
16	47200	F	2 ans	377 g	RGTA	

2.2 Induction de l'ischémie cérébrale

La nourriture est retirée au minimum 12 h avant la chirurgie afin que l'animal soit à jeun. Comme chez le rat, l'ischémie cérébrale est induite par OACM transitoire, maintenue cette fois-ci pendant 3h. L'adaptation de ce modèle d'induction d'ischémie a été réalisée avec succès chez le marmouset lors de travaux antérieurs réalisés au sein de notre laboratoire (Freret *et al.*, 2008; Bihel *et al.*, 2010). Pour commencer, l'animal est anesthésié par inhalation de 5 % d'isoflurane dans un mélange O₂/N₂O (ratio 1/3) et reçoit une première dose d'antalgique via l'injection intramusculaire de 0.04mL de tolfédine (Acide Tolfenamic, 4mg/kg, Tolfedine 4%, France). Une fois l'anesthésie induite, le marmouset est positionné en décubitus dorsal sur une couverture chauffante régulée par une sonde rectale permettant de maintenir sa température corporelle autour de 38 °C. Si nécessaire, une lampe est également utilisée pour réchauffer l'animal. Il est ensuite intubé et ventilé artificiellement par un volume respiratoire de 5mL pour

une fréquence de 35-40 respirations par minute, avec un mélange d'O₂/N₂O (ratio 1/3) et d'environ 2 % d'isoflurane. Deux cathéters sont ensuite installés dans l'artère et la veine de la queue. L'accès artériel permet ainsi un monitoring constant de la pression artérielle (PA), tandis que l'accès veineux permet l'installation d'une perfusion de curare (Atracurium® 0,75 mg/kg/h). Régulièrement pendant la chirurgie, 80µl de sang sont prélevés au niveau du cathéter artériel pour mesurer différents paramètres sanguins : paO₂ et paCO₂ artérielles, hémocrites, hémoglobine, pH et saturation en O₂. Le suivi de ces paramètres permet de pouvoir adapter la fréquence et le volume respiratoire en conséquence.

Une fois toutes ces préparations réalisées, une incision d'environ 2cm est réalisée au niveau du côté droit du cou pour dégager un accès aux carotides (commune, interne et externe). Une fois les carotides isolées, des ligatures temporaires sont placées autour de la partie distale de l'artère carotide externe (ACE), et des parties proximales de l'artère carotide commune (ACC) et de l'artère carotide interne (ACI) afin d'interrompre le flux sanguin au niveau de l'intersection entre ces trois artères. L'ACE est ensuite partiellement incisée afin de permettre l'insertion d'un embole. Tous les emboles utilisés dans cette étude ont été fabriqués par nos soins au moyen d'un fil de nylon et de colle thermo-fusible. Pour garantir la bonne flexibilité de l'embolus, un diamètre de 0.16 µm a été choisi pour le fil de nylon. En raison de la variabilité interindividuelle chez le marmouset, le diamètre de l'extrémité de l'embolus en colle thermo-fusible permettant une occlusion réussie variait entre 50 et 53 µm. Une fois l'embolus introduit, l'ouverture de l'ACE est fermement ligaturée tandis que la ligature de l'ACI est relâchée en prévision du passage de l'embolus. L'ACE est alors sectionnée dans sa partie distale et alignée avec l'ACI. L'embolus est ensuite délicatement poussé jusqu'à 27mm à partir de la bifurcation entre l'ACI et l'ACE, ce qui permet l'obstruction de l'ACM (Figure 53).

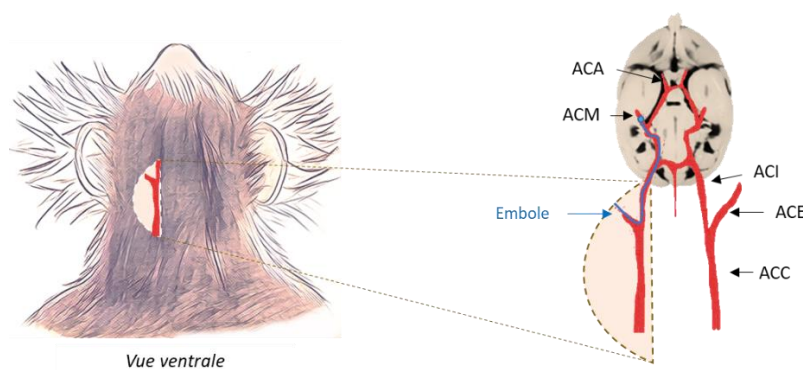


Figure 53 : Occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne chez le marmouset. ACA : artère carotide antérieure ; ACC : artère carotide commune ; ACE : artère carotide externe ; ACI : artère carotide interne ; ACM : artère cérébrale moyenne (Le Gal *et al.*, 2017).

Trois heures après l'induction de l'ischémie, l'embolie est délicatement retiré afin de permettre une reperfusion. Les plaies sont ensuite suturées, et les animaux reçoivent 5mL de sérum physiologique en intrapéritonéale afin de maintenir une bonne hydratation après le réveil. L'analgésie des animaux est assurée par l'administration de lidocaïne en gel (Chlorhydrate de lidocaïne, 10g, Xylocaïne® 2%) au niveau des zones du cou et de la queue incisées, et l'injection intramusculaire de 0.04 mL de tolfédine (Acide Tolfenamic, 4 mg/kg, Tolfedine 4%, France). A la fin de la chirurgie, les animaux reçoivent également un antibiotique (Cefamandole 15 mg/kg, intramusculaire; Kefandol, France). Deux autres doses de tolfédine et de cefamandole seront administrées les 2 jours suivant la chirurgie. Une fois réveillé, l'animal est observé pendant plus d'1 h jusqu'à avoir complètement récupéré de l'anesthésie, puis est ramené dans sa cage dans laquelle on lui donne de la compote de fruit (à la fois facile à manger et permettant d'hydrater).

2.3 Administration du RGTA par voie intra-artérielle

Pour l'injection intra-artérielle du traitement, aucune chirurgie supplémentaire n'est nécessaire. Trois heures après l'induction de l'ischémie, juste après la reperfusion, un cathéter effilé est introduit à la place de l'embolie, sur environ 2 cm de sorte à atteindre l'ACI. Au moyen d'une seringue Hamilton de 500 µl et d'un pousse seringue, 200 µl de RGTA sont administrés selon un débit de 25 µl/min suivi d'1 min de pause. Le cathéter est ensuite délicatement retiré et le moignon de l'ACE est électrocoagulée. La dose de RGTA injectée dans cette étude est de 8.88µg. Les animaux contrôles quant à eux, reçoivent une solution saline (0.9 % NaCl) de la même façon.

2.4 Suivi des paramètres physiologiques

Afin d'évaluer les effets d'une injection de RGTA sur différents paramètres physiologiques, la pression en O₂, et en CO₂ artérielles (paO₂, paCO₂), les hématocrites, l'hémoglobine, le pH, la PA, la fréquence artérielle et la température rectale sont suivis régulièrement tout au long de la chirurgie, puis pendant 1h après l'injection du traitement ou de la solution saline.

2.5 Examens IRM

Toutes les séquences IRM utilisées dans ce protocole s'apparentent à celles employées lors de la prise en charge clinique chez l'Homme et développées dans l'introduction de cette thèse.

L'imageur utilisé est une IRM 7T pour petits animaux (7T, PharmaScan®, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany, plateforme d'imagerie CYCERON, Caen, France). L'antenne utilisée est une antenne 1H réseau phasé en réception uniquement pour cerveau de rat. Le jour de l'OACM, une imagerie en tenseur de diffusion, une angiographie, une imagerie pondérée en T2* ainsi qu'une imagerie pondérée en T2 sont réalisées à 30, 60, 90, 120, 150 minutes après l'occlusion, et juste après la reperfusion. Les animaux sont sous anesthésie, et plusieurs paramètres physiologiques (pression artérielle, fréquence cardiaque, température, fréquence respiratoire, et paramètres sanguins) sont mesurés et régulés durant toute la durée de l'examen. Ces séquences sont ensuite de nouveaux réalisées 7 jours et 28 jours après ischémie afin de pouvoir évaluer les effets du traitement sur l'évolution des dommages cérébraux.

2.5.1 Séquence de diffusion (DTI)

L'imagerie de diffusion réalisée (DTI, 30 directions de diffusion; $b=1000$ et $b=0$, TE/TR=32.96/5250ms, M=128x128, FOV=50x50mm, 21 coupes, épaisseur des coupes=1.5mm) permet d'observer la lésion à des temps très précoces. Grâce au calcul de l'ADC, elle permet dans un premier temps de valider la présence d'une lésion ischémique, visible en hyposignal, synonyme de réussite de la chirurgie (Figure 54). Durant la phase aiguë de l'ischémie, les images obtenues permettent de suivre l'évolution de la lésion, tout en s'assurant de l'absence de reperfusion spontanée avant la fin du temps d'occlusion impartit. En effet, une reperfusion du tissu entraîne une perte de signal d'ADC, ainsi, la séquence DTI réalisée juste après la reperfusion nous permet de nous assurer de la bonne recanalisation vasculaire.

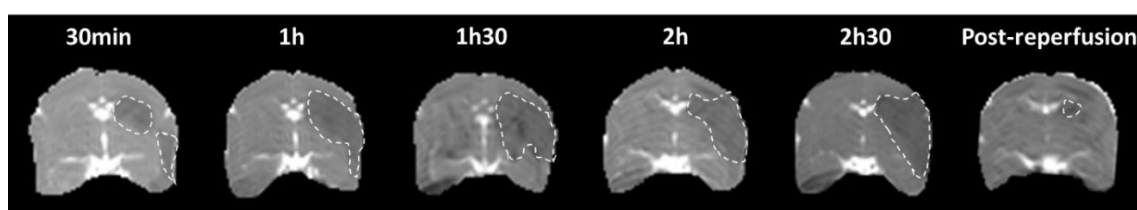


Figure 54 : Images IRM obtenues en DTI (ADC) montrant l'évolution de la lésion pendant l'OACM et après reperfusion. La lésion, entourée par les pointillés, est visible en hyposignal.

2.5.2 Angiographie

L'obstruction de l'artère ainsi que sa reperfusion sont visibles par angiographie du territoire de l'ACM (Time Of Flight, TE/TR = 4.1/15 ms, M = 256x256, FOV = 45x45 mm)

(Figure 55). En effet, les artères apparaissent en hyperintensité sur les images lorsque le sang y circule normalement.

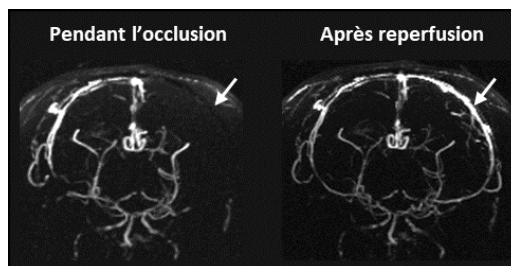


Figure 55 : Angiographie obtenue pendant l'occlusion de l'artère, et après reperfusion. L'artère occlue est désignée par la flèche.

2.5.3 Imagerie pondérée en T2*

Cette séquence nous permet de vérifier l'absence d'hémorragie cérébrale pouvant être provoquée par l'insertion ou le retrait de l'embolie (TE/TR = 11/400 ms, M = 128x128, FOV = 50x50 mm, 21 coupes, épaisseur des coupes = 1.5 mm) (Figure 56). Une hémorragie serait visible en hyposignal intense noir.

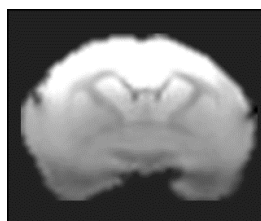


Figure 56 : Image IRM obtenue après une séquence T2*. Aucun signal hypointense n'est visible, il n'y a donc pas d'hémorragie.

2.5.4 Imagerie pondérée en T2

Une séquence T2 anatomique en echo de spin (facteur d'accélération=8; nombre de répétitions = 4; TE/TR = 65/5000 ms; M = 256x256, FOV = 50x50 mm, 21 coupes, épaisseur des coupe =1.5 mm) est utilisée afin de visualiser en hypersignal l'œdème vasogénique présent en phase subaigüe et chronique (Figure 57). L'effet du traitement sur l'évolution du volume lésionnel peut ainsi être déterminé à 7 jours et 28 jours après ischémie.

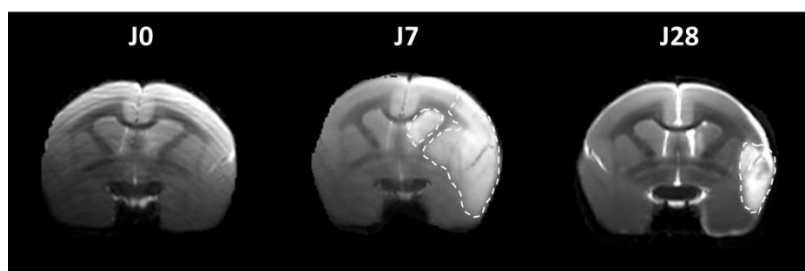


Figure 57 : Images IRM obtenues par une séquence anatomique T2 montrant l'évolution de la lésion à 7 jours (J7) et 28 jours (J28) post-ischémie. La lésion, entourée par les pointillés, est visible en hypersignal. Cette séquence ne permet pas de visualiser la lésion en phase aiguë (J0).

2.6 Analyse des images IRM

2.6.1 Détermination du volume lésionnel

Le volume lésionnel est calculé à chaque temps d'imagerie, de 30 minutes à 2h30 après l'induction de l'ischémie sur les images DTI, puis à 7 jours et 28 jours post-ischémie sur les images pondérée en T2. Pour ce faire, les images sont analysées grâce au logiciel ImageJ® Wayne (Rasband, NIMH, Maryland, USA).

Dans un premier temps les cartes d'ADC sont extraites des images DTI et les images de chaque animal et de chaque temps sont concaténées en piles de travail. Le contour des cerveaux est ensuite délimité manuellement (le bruit de fond étant trop important pour permettre un seuillage automatique), ce qui permet de soustraire les cerveaux au bruit de fond. Les contours sont ensuite divisés en deux piles de masques (ou régions d'intérêt) : l'une contenant l'hémisphère controlatéral, l'autre contenant l'hémisphère ipsilatéral. Par une méthode de seuillage, les ventricules (qui apparaissent en hypersignal) sont également délimités et soustraits aux masques des hémisphères et du cerveau entier. Les images sont ensuite normalisées, et le contraste augmenté de 5 %. De cette façon, toutes les coupes sont ramenées à des valeurs moyennes d'ADC identiques, tout en conservant les variabilités internes. Cette procédure permet l'utilisation d'un même seuillage de lésion pour toute la pile. Ce seuillage est réalisé en délimitant tous les pixels ayant une intensité en dehors des valeurs d'ADC moyennes $\pm 2SD$ de l'hémisphère controlatéral. Une vérification manuelle est ensuite réalisée afin de s'assurer que la région d'intérêt ait correctement été délimitée sur toutes les images.

Le même principe est employé pour délimiter les lésions des images en T2 réalisées 7 jours et 28 jours après l'ischémie.

Le volume lésionnel obtenu est ensuite corrigé de l'œdème présent selon la formule suivante (Gerriets *et al.*, 2004).

$$\% \text{HLVc} = \frac{\text{HVc} - \text{HVi} + \text{LVu}}{\text{HVc}} \times 100$$

HLV : Volume d'hémisphère touché par la lésion

HLVc : Volume d'hémisphère touché par la lésion corrigée de l'œdème

HVc : Volume de l'hémisphère controlatéral

HVi : Volume de l'hémisphère ipsilatéral

LVu : Volume de lésion non corrigé de l'œdème

2.6.2 Délimitation de la « pénombre » ischémique

Les cartes d'ADC obtenues le jour de l'ischémie ont également permis de réaliser un suivi de l'évolution de la région cérébrale en souffrance mais non nécrosée en phase aiguë. Par exemple, en réalisant un mismatch entre les régions lésées à 30 minutes et 2h30 après l'ischémie, nous obtenons une région cérébrale qui n'est pas encore lésée à 30 minutes mais qui le sera à 2h30. Même s'il s'agit là d'un léger abus de langage, nous qualifierons cette région de « pénombre ». En réalisant ces mismatch, la « pénombre » a ainsi pu être délimitée à 30 minutes, 1h, 1h30 et 2h après l'ischémie (Figure 58).

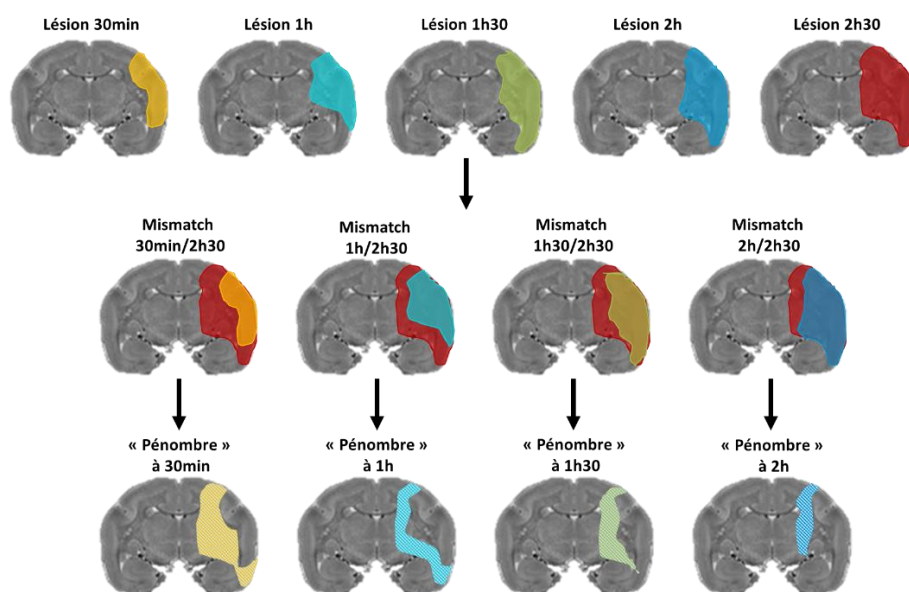


Figure 58 : Schématisation des mismatch réalisés sur les cartes d'ADC obtenues entre 30 minutes et 2h30 après ischémie. Les différences entre les volumes lésionnels ont ainsi permis l'obtention de la « pénombre » ischémique à chaque temps.

2.6.3 Analyses des valeurs absolues des séquences DTI

A partir de chaque séquence DTI réalisée à chaque examen IRM (du jour de l'ischémie jusqu'à la fin du protocole), les images de diffusions sont reconstruites en carte d'ADC, de FA, de RD et d'AD. Les valeurs absolues (en intensité de gris) de chacune de ces cartes ont été mesurées à l'intérieur des régions d'intérêt recouvrant la lésion et la pénombre précédemment délimitées.

2.7 Tests comportementaux

Les tests présentés ci-dessous servent à évaluer les effets du traitement sur les déficits fonctionnels et leur éventuelle récupération jusqu'à 28 jours après une ischémie cérébrale. La veille de la chirurgie, les animaux sont évalués sur l'ensemble des tests. Ces données serviront ensuite de référence pré-ischémique. Tous les tests basés sur une observation libre des animaux ont été réalisés au moyen d'une caméra de surveillance située dans le box où l'animal est hébergé. De cette façon, la présence de l'expérimentateur ne peut biaiser leur comportement.

2.7.1 Habituation et entraînements

Le marmouset est par nature un animal curieux mais très craintif. C'est pourquoi la confrontation avec un nouvel environnement, un nouvel expérimentateur, ou de nouveaux objets peut vite se révéler très stressante pour lui. Or, certains des tests présentés ci-dessous ne peuvent être réalisés que si l'animal est enclin à travailler, ce qui peut s'avérer très compliqué lorsqu'il présente un comportement anxieux et agité. C'est pourquoi avant même de débiter l'apprentissage des tests, il est primordial de laisser au marmouset un temps d'habituation d'au moins 1 mois à son nouvel environnement (nouvelle cage, nouvelle animalerie, nouveaux congénères après son transfert de l'animalerie d'élevage à l'animalerie de protocoles). Les marmousets sont ensuite familiarisés à l'expérimentateur. Pour ce faire, l'expérimentateur passe du temps avec les animaux tous les jours (environ 1 h par animal, matin et après-midi), et les amadoue avec des petits morceaux de marshmallow dont les marmousets raffolent. Un animal est considéré comme habitué à l'expérimentateur lorsqu'il vient spontanément récupérer des morceaux de marshmallow dans sa main, et qu'il ne manifeste aucun mouvement de recul lorsque l'expérimentateur réalise un geste brusque. Ce temps d'habituation varie d'un animal à l'autre mais demande en moyenne au moins 3 semaines. Dans le même temps, les marmousets sont familiarisés aux différents objets utilisés lors des tests (dispositifs, caméra etc...) jusqu'à ce que leur comportement demeure neutre en leur présence.

Un seul des tests réalisés nécessite un apprentissage : le test de l'escalier. Les animaux sont entraînés en milieu d'après-midi, pendant leur période d'activité maximale. La durée des séances d'entraînement varie en fonction des performances et de la motivation des animaux à travailler mais dure en moyenne 1 h par animal. Le test est considéré comme acquis lorsque le marmouset obtient une performance maximale. Là encore, la durée de l'apprentissage varie d'un animal à l'autre mais nécessite environ 2 semaines.

2.7.2 État général

Certaines anomalies comportementales peuvent suivre une ischémie, traduisant l'atteinte neurologique des animaux. Une observation libre des marmousets permet de dégager certains de ces comportements caractéristiques. Cette première observation permet d'apprécier de façon qualitative l'état général de l'animal. Chaque animal est observé pendant 10 minutes pendant lesquelles 6 items sont dégagés : le temps passé au sol, la présence d'un myosis du côté ipsilatéral (pupille contractée), la présence d'un ptosis du côté ipsilatéral (paupière tombante), l'état du pelage, la prise alimentaire, et la présence de rotations spontanées du corps entier. L'absence (score=2), la présence modérée (score=1), ou la présence forte (score=0) de ces items est évaluée. Le temps passé au sol est noté de la façon suivante : moins de 3 min = 2; entre 3 et 6 min = 1; plus de 7 min = 0. Ainsi, un score maximal de 12 est attribué à un animal qui présente un état général très bon.

Dans notre étude, nous avons également choisi de relever l'éventuelle présence de comportements dépressifs et anxieux. En effet, les marmousets inclus dans cette étude ont été soudainement placés dans un nouvel environnement, et isolés, avant de subir une opération chirurgicale lourde entraînant des séquelles. La probabilité que des comportements dépressifs et anxieux surgissent en cours d'étude n'est donc pas nulle. Or, la présence de ces troubles pourrait réduire les performances des animaux aux autres tests, c'est pourquoi il est très important de les évaluer. Une observation libre des marmousets pendant 10 minutes permet de dégager différents items caractéristiques d'un comportement dépressif ou anxieux chez le marmouset. L'ensemble de ces items est résumé dans le tableau ci-dessous (Tableau 5). L'absence (score=2), la présence modérée (score=1), ou la présence forte (score=0) de ces items est notée. Pour le score de dépression, un score maximal de 6 est attribué à un animal qui ne présente aucun comportement caractéristique d'une dépression. De la même façon, pour le score d'anxiété, un score maximal de 8 est attribué à un animal qui ne présente aucun comportement anxieux. Les comportements relevés ont été déterminés à partir des études

menées par Lutz, ainsi que par Galvao-Coelo et collaborateurs (Lutz, 2014; Galvão-Coelho *et al.*, 2017)

Tableau 5 : Items évalués lors de l'évaluation de l'état général, de l'état dépressif, et de l'état d'anxiété des animaux après ischémie.

N°	État général	État dépressif	État d'anxiété
1	Rotation (corps entier)	Inactivité (temps dans le nid*)	Marquage olfactif
2	Myosis	Balancement de la tête	Auto-toilettage (Grooming)
3	Ptosis	Grattage (Scratching)	Balancement dans la cage
4	État négligé de la fourrure		Pilo-érection
5	Défaut de prise alimentaire		
6	Temps passé au sol *		
	Score : /12	Score : /6	Score : /8
<i>Notation : 0 = forte présence ; 1 = présence ; 2 = absence</i>			
<i>*0 = supérieur à 7 min ; 1 = entre 3 et 6 min ; 2 = inférieur à 3 min</i>			

2.7.3 Score neurologique

Ce test permet d'évaluer l'atteinte de diverses fonctions motrices et sensorielles après une ischémie. D'abord très couramment employé en clinique (Hantson *et al.*, 1994; Lyden *et al.*, 1994), il a ensuite été adapté aux rongeurs (Bederson *et al.*, 1986), puis aux PNH (Crowell *et al.*, 1970) afin d'être employé dans les études précliniques. La première version du score neurologique adaptée au marmouset a été élaborée en 1996 par Marshall et Ridley (Marshall & Ridley, 1996). Au cours des années, de nouvelles versions plus complètes sont apparues. Pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser la version du score neurologique mise au point auparavant au laboratoire par Freret et collaborateurs (Freret *et al.*, 2008).

Dans un premier temps, le nid des animaux est retiré de la cage. Durant 10 minutes, l'observation libre des animaux dans leur cage permet de dégager la présence des items répertoriés dans le tableau ci-dessous. Pour les items 1 à 8, l'absence (score=2), la présence modérée (score=1), ou la présence forte (score=0) de ces postures et mouvement anormaux est notée pour chaque côté du corps. Dans la version choisie, un sous-test avec stimulation auditive est également utilisé. Le stimulus (sous forme de bip) est présenté à l'animal du côté ipsi- ou

controlatéral et l'expérimentateur mesure la vitesse de réponse de l'animal (instantanée = 2 ; légèrement retardée (<2s) = 1 ; fortement retardée (>2s) = 0). L'expérimentateur note également si le stimulus induit une rotation de l'animal. Un score maximal de 22 peut ainsi être attribué à chaque côté du corps d'un animal qui ne présente aucun déficits (Tableau 6).

Tableau 6 : Items évalués lors du score neurologique (D'après Freret *et al.*, 2008)

N°	Item	Controlatéral	Ipsilatéral
1	Main glissante		
2			
3	Pied glissant		
4			
5	Main ballante sous le perchoir		
6	Pied ballant sous le perchoir		
7	Bras croisé au milieu de la poitrine		
8	Mouvement du bras et agitation de la main non coordonnés		
9	Réponse à un stimulus visuel		
10	Réponse à un stimulus auditif		
11	avec apparition d'une rotation		
Score neurologique total		/22	/22

2.7.4 Test de stimulation tactile

Ce test permet de mettre en évidence des déficits sensoriels chez l'animal après ischémie cérébrale focale, en mesurant une réponse motrice à un stimulus tactile. L'animal est incité à se déplacer dans sa cage grâce à des morceaux de marshmallow. En prenant soin de ne pas rentrer dans son champ de vision, les oreilles, les mains et les pieds du marmouset sont stimulés à l'aide d'un pinceau. Les scores attribués sont les suivants : réponse claire = 2, réponse modérée = 1, pas de réponse = 0. Chaque partie du corps est stimulée 2 fois dans un ordre randomisé. Un score maximal de 6 pour chaque côté du corps reflètera une absence de déficit sensoriel.

2.7.5 Test de l'escalier en version colline et version vallée

Afin d'évaluer les effets à long terme de nouvelles thérapies, et compte tenu de la vitesse de récupération spontanée observée avec la plupart des autres tests sensorimoteurs, le recours à des tests comportementaux mettant en évidence des déficits fonctionnels plus durables est

nécessaire. L'un des déficits moteurs les plus persistants chez les patients souffrant d'une ischémie cérébrale est la perte de dextérité au niveau du poignet, de la main, ou encore des doigts de la main du côté controlatéral.

Le test de l'escalier permet d'évaluer la dextérité, l'agilité, ainsi que la coordination motrice des pattes antérieures gauche et droite. Il permet également de mettre en évidence la présence de déficits visuels liés à une hémiparésie. Ce test a d'ores et déjà mis en évidence des déficits durables tout en étant sensible aux traitements neuroprotecteurs ou aux procédés de réhabilitation comportementale (Marshall *et al.*, 2003a; Freret *et al.*, 2008; Bihel *et al.*, 2010).

Ce test est réalisé depuis la cage d'hébergement de l'animal, au moyen d'un dispositif qui vient s'y fixer. Une plateforme de travail est installée à l'intérieur de celles-ci afin que l'animal soit à une hauteur idéale, et qu'il conserve le même champ visuel pendant tout le test. Le dispositif est constitué d'un double escalier de 5 marches, positionné derrière un écran de plexiglass, en avant de la cage. Sur chaque marche se trouve une friandise (morceau de marshmallow de 2 à 3 mm de diamètre) que l'animal doit essayer d'attraper en passant le bras à travers une fente verticale.

Dans la version en colline, les marches les plus hautes se situent au centre du dispositif et les fentes se trouvent de chaque côté du double escalier, au niveau des marches les plus basses. Le marmouset utilise ainsi son bras droit pour atteindre les friandises de l'escalier de droite, et son bras gauche pour atteindre les friandises de l'escalier de gauche (Figure 59). L'animal dispose de 3 minutes pour parvenir à attraper les friandises. Pendant ce temps, l'expérimentateur observe à environ 2 mètres de distance de la cage. Les sujets sont notés selon le nombre de friandises qu'ils parviennent à attraper. Le score de chaque friandise dépend de la marche sur laquelle elle se situe : plus la marche est haute, donc plus la distance entre le sujet et la friandise est grande, plus le score attribué est élevé (marche la plus basse=1, marche la plus haute=5). Le score total attribué peut donc aller jusqu'à 15 pour chaque escalier.

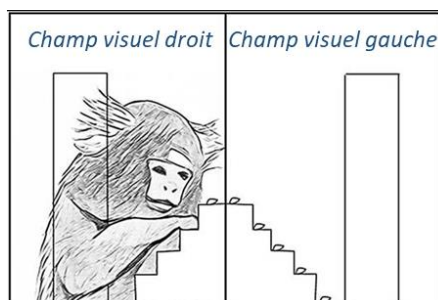


Figure 59 : Test de l'escalier version colline. Pour attraper la récompense, l'animal utilise le bras situé du même côté que le champ visuel permettant de voir la friandise.

Dans la version en vallée, le procédé expérimental reste le même, mais les marches les plus hautes se situent vers l'extérieur du dispositif, et une fente se trouve au centre des deux escaliers. Dans cette version, le marmouset utilise donc son bras droit pour attraper les friandises de l'escalier de gauche et *vice versa* (Figure 60).

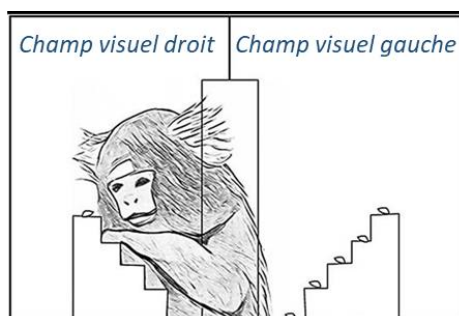


Figure 60 : Test de l'escalier version vallée. Pour attraper une récompense, l'animal utilise le bras situé du côté opposé au champ visuel permettant de voir la friandise.

La version colline permet d'évaluer la motricité du bras ipsi- et controlatéral mais à lui seul, il ne peut pas distinguer une déficience due à une hémiparésie (trouble moteur) ou à une héminégligence (trouble spatial) car l'animal travaille avec un héli-champs visuel et un bras situés du même côté. Par exemple le fait qu'un marmouset ne parvienne pas à attraper les friandises situées sur l'escalier à sa droite avec son bras droit peut s'expliquer de deux façons : soit il ne parvient pas à détecter tout ce qui se situe à sa droite et ne s'occupe donc pas de ces friandises bien que ses capacités motrices restent indemnes (héminégligence), soit il souffre de troubles moteurs touchant son côté droit, le rendant donc inapte à utiliser son bras droit correctement pour attraper les friandises (hémiparésie).

La version vallée complète donc ce test, car cette fois-ci, l'animal doit travailler avec le bras opposé à l'héli-champs visuel utilisé. Elle permet donc d'analyser si le déficit observé lors du test est dû à une baisse de motricité ou à un trouble de perception dans un héli-champs

visuel. Le marmouset doit utiliser sa main gauche (controlatérale) pour attraper les friandises situées sur l'escalier droit, ce qui permettra de mettre en évidence l'existence de troubles de mouvements fins de la main. Pour l'escalier gauche, la difficulté de l'animal à saisir les récompenses avec sa main droite (ipsilatérale donc non affectée par l'ischémie) dans l'hémichamp visuel gauche (controlatéral) traduira une hémignégligence spatiale.

2.8 Mise à mort des animaux et prélèvements

A la fin du protocole (28 jours après l'ischémie), les animaux sont mis à mort pour que leur cerveau puisse être récupéré. Aucune analyse *ex vivo* n'a été réalisée dans le cadre de cette thèse, mais ces prélèvements seront utilisés pour des études ultérieures.

Les marmousets reçoivent une dose d'analgésique : 0.02 mg/kg de buprénorphine (Buprécare® 0,3 mg/mL Axience®). Les animaux sont ensuite profondément anesthésiés à 5% d'isoflurane (dans O₂/N₂O) pendant plus de 10 minutes. Toujours sous anesthésie, les côtes sont découpées afin de dégager un accès au cœur pour une perfusion intracardiaque. Un trou est réalisé dans le ventricule gauche afin de pouvoir y passer un cathéter allant jusqu'à l'aorte. Tandis que l'atrium droit est sectionné, le système vasculaire est rincé grâce à l'administration, à travers le cathéter, de 200 mL de sérum physiologique hépariné (0.5 mL dans 250 mL de 0.9 % NaCl, soit 10 UI/mL). Le sérum physiologique est ensuite remplacé par une solution fixatrice avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4% dilué dans du tampon phosphate 0.1M dont le pH est ajusté à 7. Une fois les tissus fixés, le cerveau est prélevé puis post-fixé dans du PFA à 4% pendant 48 h. Le cerveau est ensuite plongé dans une solution de sucrose azide à 30 % puis stockés à 4 °C.

Avant de réaliser la perfusion intracardiaque, un prélèvement sanguin d'environ 4-5 mL a été réalisé sur 7 animaux. Le plasma a ensuite pu être collecté après centrifugation de l'échantillon sanguin à 3000 G pendant 15 min.

2.9 Analyses statistiques

Les paramètres physiologiques ont été analysés par une analyse de variance (Two-way ANOVA) (JMP® program, SAS Institute, Cary, NC, USA). Les données IRM ont été analysées par des tests de Wilcoxon (RStudio® (R version 3.5.3 (2019-03-11)), ainsi que des analyses de variance (Two-way ANOVA) (JMP® program, SAS Institute, Cary, NC, USA). Enfin, les données comportementales ont été analysées par un test de Cochran-Armitage (RStudio® (R

version 3.5.3 (2019-03-11)). Pour toutes ces analyses, le seuil de significativité a été fixé à une p-value de 0.05.

2.10 Protocole général de l'étude 3

Une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (3 h) a été réalisée sur 16 marmousets. Parmi eux, 6 ont été traités par le RGTA juste après la reperfusion, 5 ont reçu une solution saline, et 5 sont décédés les jours suivants à cause d'un œdème massif provoqué par une non-reperfusion. Des examens IRM (DTI, Angiographie, T2*, et T2) ont été réalisés le jour de l'occlusion puis à 7 et 28 jours post-ischémie afin d'évaluer les effets du traitement sur l'évolution des dommages cérébraux. L'effet du RGTA sur la récupération fonctionnelle a également été évalué au moyen de plusieurs tests comportementaux. L'état général, le score neurologique et la réponse à une stimulation tactile ont été réalisés tous les jours de la première semaine suivant l'ischémie, puis 2 fois par semaine jusqu'à la fin du protocole. Le test de l'escalier a été réalisé 1 fois par semaines jusqu'à la fin du protocole. Vingt-huit jours après l'ischémie, les animaux ont été mis à mort et leur cerveau prélevé (Figure 61).

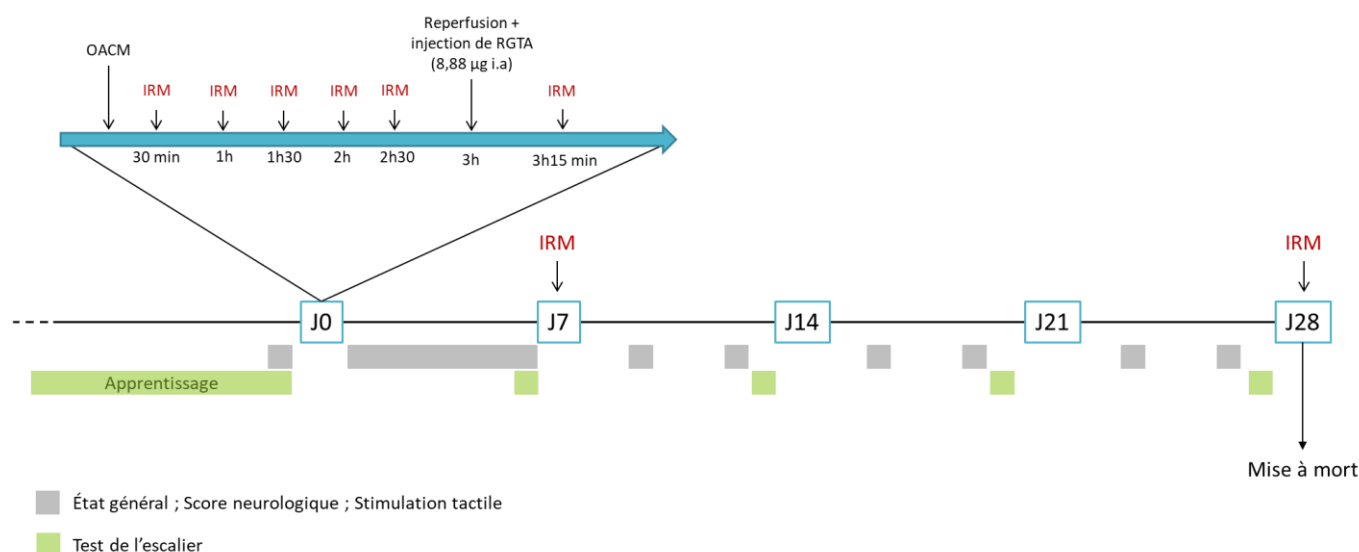


Figure 61 : Protocole général de l'étude 3. IRM : Imagerie par Résonance Magnétique ; OACM : Occlusion de l'Artère Cérébrale Moyenne

3 Résultats

3.1 Paramètres physiologiques

La PA, la fréquence cardiaque, la température, la paO_2 , la $paCO_2$, le pH, la concentration en hémoglobine ainsi que l'hématocrite ont été mesurés de 1h pré-OACM, jusqu'à 1h post-

reperfusion (Tableau 7). On ne retrouve aucune variation significative de ces paramètres physiologiques au cours du temps (two-way ANOVA ; $p > 0.05$). De plus, on ne décèle aucune différence significative entre les animaux contrôles et les animaux traités par le RGTA que ce soit avant ou après son administration (two-way ANOVA ; $p > 0.05$).

Tableau 7 : Suivi des paramètres physiologiques. La PA, la fréquence cardiaque, la température, la pO_2 artérielle, la pCO_2 artérielle, le pH, la concentration en hémoglobine ainsi que l'hématocrite ont été mesurés 30 min avant l'ischémie (pré-OACM), pendant l'occlusion (OACM), et 1h après la reperfusion. (Moyenne \pm SD) (Contrôle $n = 4-5$; RGTA $n = 6$) (two-way ANOVA; $p > 0.05$). OACM : Occlusion de l'Artère Cérébrale Moyenne.

		Pre-OACM (1h)	OACM (3h)	Post-Reperfusion (1h)
Pression artérielle (mmHg)	<i>Contrôle</i>	70 \pm 12	66 \pm 8	64 \pm 8
	<i>RGTA</i>	69 \pm 10	68 \pm 10	66 \pm 13
Fréquence cardiaque (bpm)	<i>Contrôle</i>	230 \pm 19	220 \pm 24	215 \pm 18
	<i>RGTA</i>	236 \pm 45	228 \pm 42	235 \pm 48
Température corporelle (°C)	<i>Contrôle</i>	37,6 \pm 0,4	37,9 \pm 0,1	37,6 \pm 0,4
	<i>RGTA</i>	37,5 \pm 0,1	37,7 \pm 0,6	37,3 \pm 0,7
PaO ₂ (mmHg)	<i>Contrôle</i>	122,5 \pm 28,2	112,9 \pm 13,4	129,1 \pm 15,3
	<i>RGTA</i>	146,9 \pm 14,7	137,0 \pm 9,5	133,0 \pm 25,0
PaCO ₂ (mmHg)	<i>Contrôle</i>	38,8 \pm 6,6	39,9 \pm 4,0	42,5 \pm 1,5
	<i>RGTA</i>	41,6 \pm 6,2	39,2 \pm 7,8	41,3 \pm 7,6
pH	<i>Contrôle</i>	7,542 \pm 0,086	7,498 \pm 0,069	7,470 \pm 0,040
	<i>RGTA</i>	7,461 \pm 0,056	7,476 \pm 0,043	7,459 \pm 0,059
Hématocrite (%)	<i>Contrôle</i>	37 \pm 4	37 \pm 2	37 \pm 4
	<i>RGTA</i>	38 \pm 4	38 \pm 5	38 \pm 6
Hémoglobine (g/dL)	<i>Contrôle</i>	12,5 \pm 1,4	12,7 \pm 0,7	12,6 \pm 1,2
	<i>RGTA</i>	13,1 \pm 1,3	13,0 \pm 1,7	12,9 \pm 1,9

Afin de vérifier avec plus de précision les effets systémiques du RGTA, les différents paramètres sanguins ont été mesurés toutes les 15 min pendant l'heure suivant l'injection du RGTA ou de la solution saline. Pour l'ensemble des animaux, la paO_2 reste stable entre 120 et 150 mmHg de 15 à 45 min post-injection. Ces valeurs correspondent à ce qui était retrouvé avant l'injection du produit. Lors de la mesure prise à 60 min après l'administration du traitement, la paO_2 semble légèrement augmenter au-delà des 150 mmHg chez les deux groupes

d'animaux. Cependant, cette légère augmentation peut être expliquée du fait que les marmousets subissent un changement de salle entre 45 et 60 min, impliquant un changement de respirateur et des paramètres respiratoires qui y sont associés. Cette modification ne semble toutefois pas affecter la paCO_2 , puisque celle-ci reste constante entre 40 et 50 mmHg chez tous les animaux à tous les temps de mesure. Ces valeurs sont également celles que l'on retrouve en conditions physiologiques normales. Depuis l'anesthésie des animaux jusqu'à leur réveil, leur température corporelle est maintenue à 38°C au moyen de deux dispositifs : une couverture chauffante sur la table de chirurgie, et un système de réchauffement hydraulique dans le berceau de l'IRM. On observe que la température se maintient entre 37 et 38°C chez tous les animaux jusqu'à 45 min post-injection avant de chuter légèrement en dessous de 37°C 60 min après l'administration des traitements. Là encore, cette baisse de température peut être expliquée par le changement de salle. Bien que le transfert soit réalisé rapidement, les marmousets ne disposent d'aucune graisse pouvant les protéger d'une déperdition de chaleur lorsqu'ils ne sont pas réchauffés. C'est pourquoi leur température corporelle diminue très rapidement. Le pH des animaux des 2 groupes se maintient autour des valeurs que nous avons avant l'injection de la solution saline ou du RGTA, avec une moyenne de $7,470 \pm 0,040$ pour les animaux contrôles, et de $7,459 \pm 0,059$ pour les animaux traités par le RGTA. De même, aucune variation anormale de l'hématocrite et de l'hémoglobine n'est retrouvée après l'injection des produits car les valeurs se maintiennent respectivement entre 35 et 40 %, et 12 et 14 g/dL. Dans l'ensemble, aucun des paramètres mesurés ne montre de différence significative entre les animaux contrôles et les animaux traités par le RGTA après l'injection du traitement (two-way ANOVA; $p > 0.05$) (Figure 62).

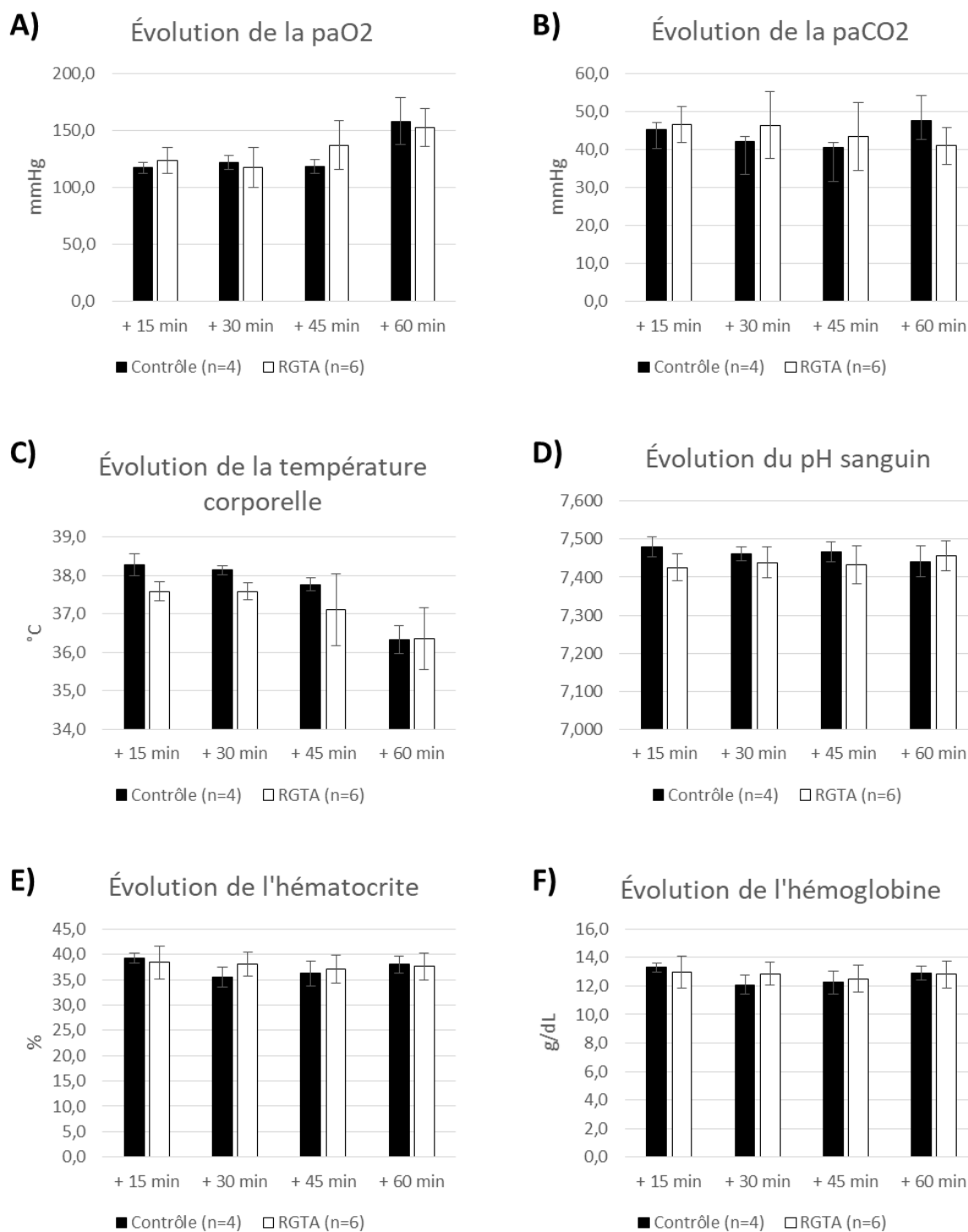


Figure 62 : Suivi des paramètres sanguins après l'injection du traitement. Mesures de la paO₂ (A), paCO₂ (B), température corporelle (C), pH (D), hématocrite (E), et hémoglobine (F) à 15, 30, 45 et 60 minutes après l'injection du RGTA ou d'une solution saline. (Moyenne ± SEM) (Contrôle n = 4 ; RGTA n = 6) (Two-way ANOVA ; p > 0.05)

3.2 Données IRM

3.2.1 *Évolution du volume lésionnel en phase aiguë*

Toutes les angiographies réalisées à chaque temps suivant la mise en place de l'embolie montrent bien une occlusion de l'ACM. Elles ont également toutes permis de confirmer la reperfusion (Figure 63). En parallèle, les images DTI (ADC) réalisées ont permis de confirmer l'établissement d'une lésion cérébrale, visible en hyposignal sur les images, ainsi que la bonne recanalisation des tissus après la reperfusion avec une disparition du signal (Figure 63A). A partir de ces images, nous avons également mesuré le volume lésionnel et suivi son évolution pendant l'OACM. La lésion atteint en moyenne 691 ± 286 mm³ dès 30 min post-ischémie. On constate que cette lésion grandit progressivement jusqu'à atteindre un volume moyen de 912 ± 464 mm³ avant la reperfusion (Figure 63B). Le tissu lésé comprend alors le cortex sensorimoteur, le cortex insulaire, le cortex auditif, le putamen, la capsule interne, et dans certains cas, le noyau caudé.

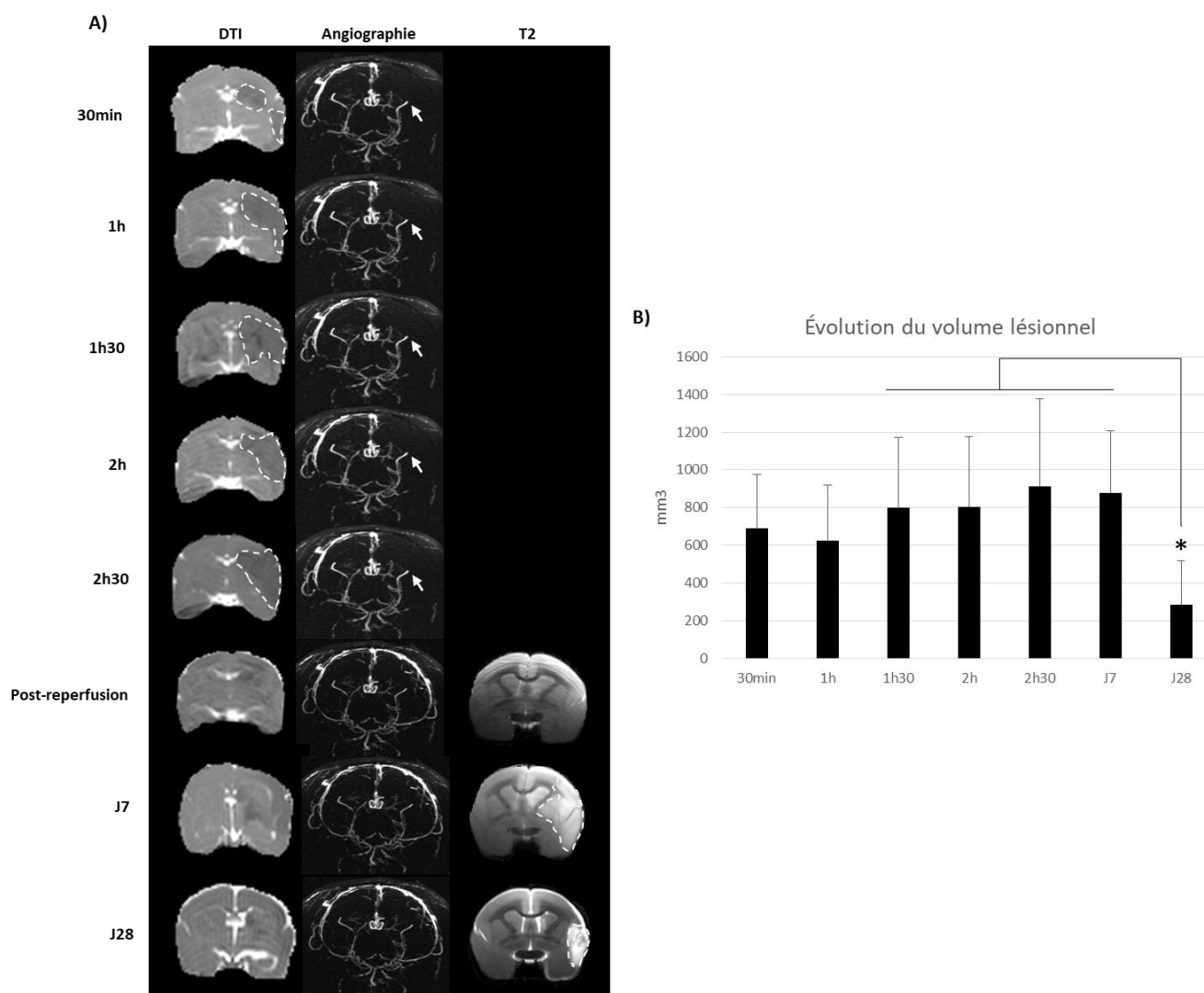


Figure 63 : Évolution du volume lésionnel le jour de l'occlusion. A) Images représentatives d'ADC obtenues par une séquence DTI, et angiographies réalisées à 30 min, 1h, 1h30, 2h, et 2h30 après l'occlusion de l'artère, puis après la reperfusion. Sur les images DTI, la lésion, visible en hyposignal, est entourée en pointillés blancs. Sur les angiographies, l'ACM occlue est pointée par la flèche blanche. B) Évolution du volume de la lésion pendant l'occlusion de l'artère chez tous les animaux (n = 10 ; Moyenne \pm SD, * One-way ANOVA suivie d'un test HSD de Tukey, $p < 0.05$).

Grâce à ces données, nous avons pu répartir les animaux dans chaque groupe en fonction du volume lésionnel mesuré à 2h30 post-ischémie. Ainsi, les 2 groupes possèdent un volume lésionnel moyen équivalent, validé statistiquement (test de Wilcoxon ; $p > 0.05$), représentant 20 à 25 % de l'hémisphère ipsilatéral, avant l'administration du traitement (Figure 64).

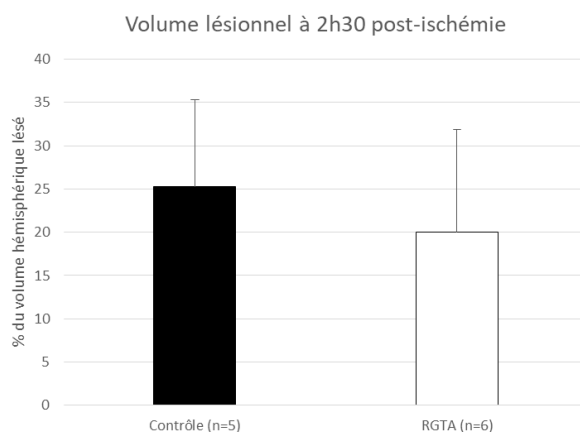


Figure 64 : Volume lésionnel de chaque groupe à 2h30 post-ischémie (Contrôle n = 5 ; RGTA n = 6 ; test de Wilcoxon ; $p > 0.05$; Moyennes \pm SD).

3.2.2 Évolution de la « pénombre »

Afin de déterminer le volume de la « pénombre » ischémique et son évolution au cours de l'OACM chez le marmouset, nous avons défini des mismatch entre les lésions obtenues à 30 min, 1h, 1h30 et 2h, et le volume lésionnel final à 2h30 après le début de l'ischémie (c'est-à-dire avant la reperfusion et l'injection du RGTA). Cette démarche nous permet de donner un ordre d'idée de la cinétique d'évolution du tissu ciblé par le traitement chez l'ensemble des animaux. Le volume lésionnel est délimité à partir des cartes d'ADC qui dévoilent l'œdème cytotoxique. Le volume lésionnel mesuré le jour de l'ischémie correspond donc au volume du foyer ischémique. Trente minutes après le début de l'ischémie, le volume de la « pénombre » atteint en moyenne 200 mm^3 pour un foyer de 700 mm^3 . Une heure après l'ischémie, on observe une diminution non significative du volume du foyer, mesurant alors 620 mm^3 . Ceci peut être expliqué par la mise en jeu d'une circulation collatérale entre 30 et 1h. Étant donné que les contours des foyers ont servi à déterminer les zones de « pénombre », en étant soustraits aux contours obtenus à 2h30, il paraît donc logique que cette légère diminution du foyer soit accompagnée d'une légère augmentation du volume de la « pénombre ». C'est à partir d'1h30 après ischémie que le foyer semble commencer à gagner plus de terrain puisqu'il passe de 620 à 800 mm^3 . En parallèle, la « pénombre », gagnée par le foyer, est réduite à 110 mm^3 . Comme la taille du foyer se maintient entre 1h30 et 2h, il en va de même pour la « pénombre » (Figure 65).

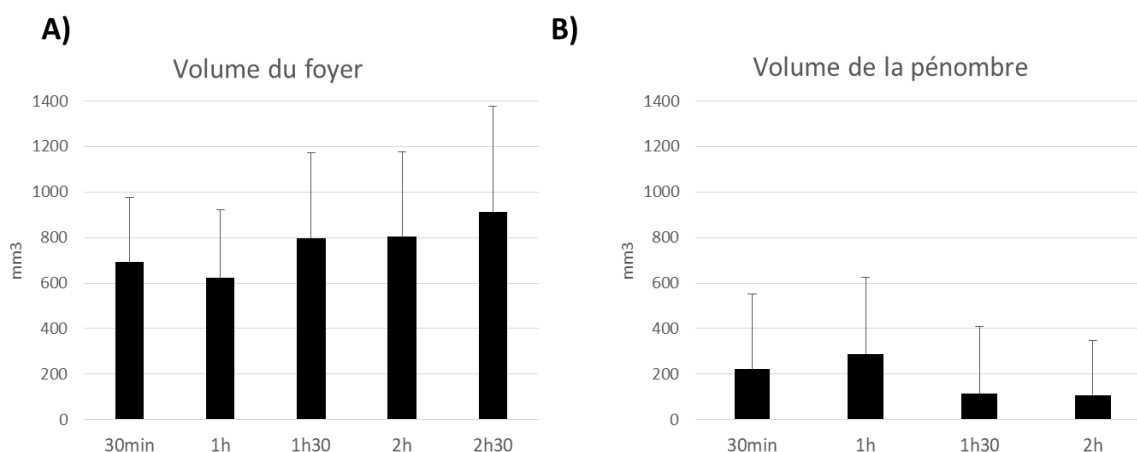


Figure 65 : Évolution du volume la lésion visible en DTI, représentant le foyer (A), et de la « pénombre » (B) entre 30 min et 2h après ischémie (n = 10 ; Moyennes \pm SD). Aucune différence significative n'est observée (One-way ANOVA ; $p > 0.05$).

3.2.3 Effet du RGTA sur l'évolution du volume lésionnel en phase subaiguë et chronique

Le volume lésionnel a été déterminé à 7 et 28 jours post-ischémie au moyen d'une séquence IRM T2. Au jour 7, comme le jour de l'ischémie, la lésion s'étend sur le cortex sensorimoteur, le cortex insulaire, le cortex auditif, le putamen, la capsule interne, et dans certains cas, le noyau caudé, et représente $19.3 \pm 12.1\%$ de l'hémisphère ipsilatéral chez les animaux contrôles, et $14.8 \pm 7.6\%$ chez les animaux traités par le RGTA (Figure 66, et 67A). On constate que 28 jours après l'ischémie, la lésion a diminué et n'atteint plus que les régions corticales (Figure 66). Elle représente alors $8.3 \pm 7.4\%$ de l'hémisphère ipsilatéral chez les animaux contrôles, et $7.1 \pm 2.8\%$ chez les animaux traités au RGTA (Figure 67B). Aucune différence significative du volume lésionnel n'est retrouvée entre les animaux traités par le RGTA et les animaux contrôles, que ce soit 7 jours ou 28 jours après l'ischémie (Wilcoxon ; $p > 0.05$). L'atrophie cérébrale a également été calculée à partir des images IRM obtenues à 28 jours post-ischémie. Cette atrophie est de $11.3 \pm 10.7\%$ chez les animaux contrôles contre $8.8 \pm 3.3\%$ chez les animaux traités par le RGTA (Figure 67C). Toutefois, là encore, aucune différence significative n'est retrouvée entre les groupes (Wilcoxon ; $p > 0.05$).

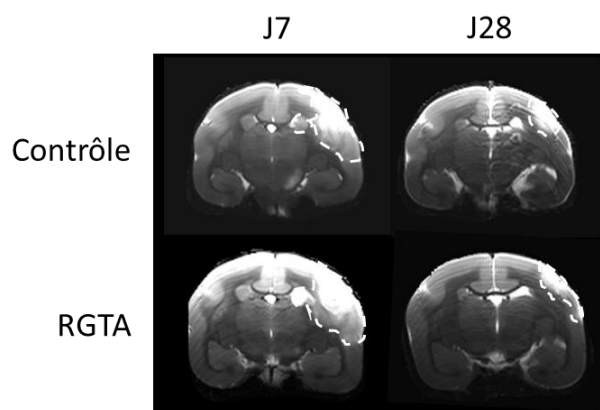


Figure 66 : Images IRM représentatives obtenues en T2 dans chaque groupe. La lésion, visible en hypersignal, est entourée en pointillés.

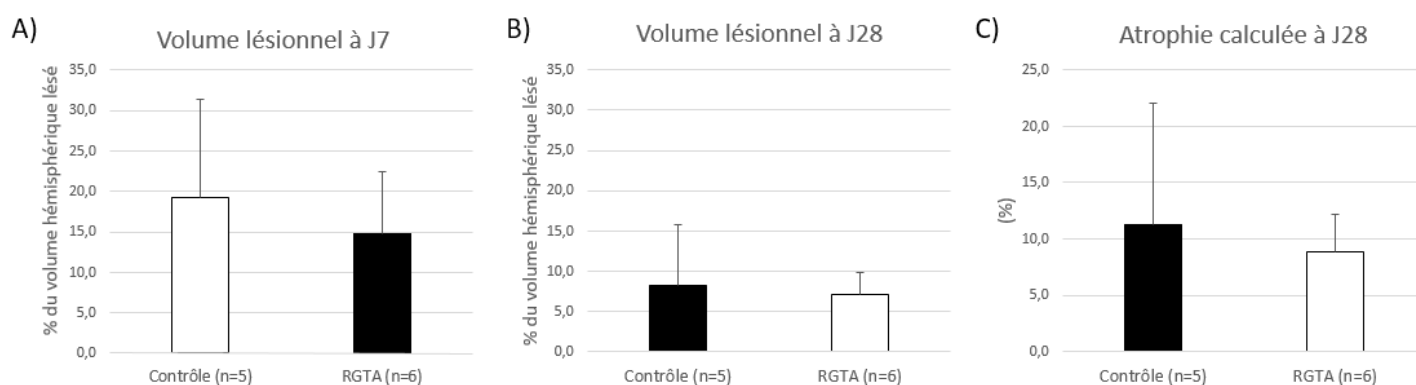


Figure 67 : Effet du RGTA sur le volume lésionnel. A) Volume lésionnel à 7 jours post-ischémie (Contrôle n = 5 ; RGTA n = 6) (test de Wilcoxon ; $p > 0.05$). B) Volume lésionnel à 28 jours post-ischémie (Contrôle n = 5 ; RGTA n = 6) (test de Wilcoxon ; $p > 0.05$). C) Atrophie cérébrale à 28 jours post-ischémie (Contrôle n = 5 ; RGTA n = 6) (test de Wilcoxon ; $p > 0.05$). Toutes les valeurs présentées sont des moyennes \pm SD.

De la même façon, lorsque le volume lésionnel est exprimé en fonction de son évolution par rapport au jour de l'occlusion, aucune différence n'est retrouvée entre les animaux contrôles et les animaux traités par le RGTA (Wilcoxon ; $p > 0.05$) (Figure 68A et 68B).

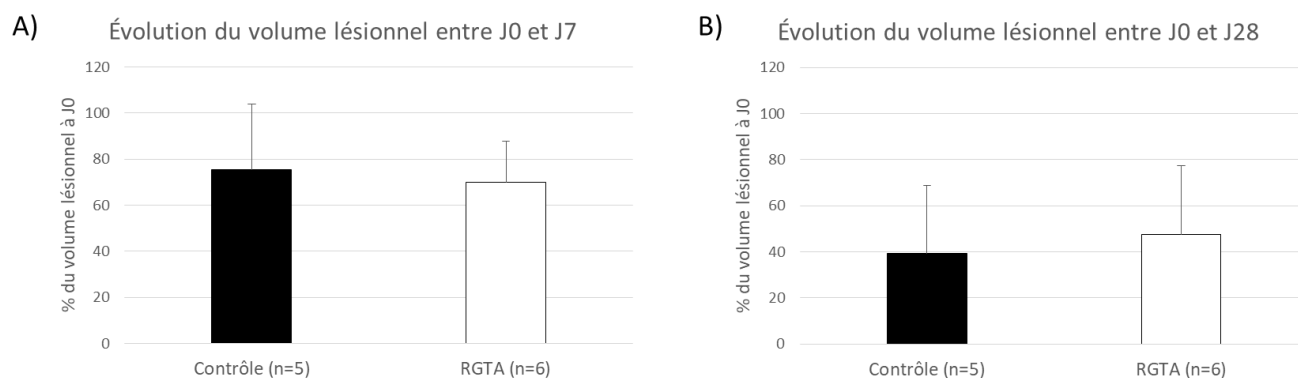


Figure 68 : Effet du RGTA sur l'évolution du volume lésionnel. A) Évolution du volume de la lésion entre le jour de l'occlusion (2h30) et 7 jours après (Contrôle n = 5 ; RGTA n = 6) (test de Wilcoxon ; $p > 0.05$). B) Évolution du volume de la lésion entre le jour de l'occlusion (2h30) et 28 jours post-ischémie (Contrôle n = 5 ; RGTA n = 6) (test de Wilcoxon ; $p > 0.05$). Les données sont présentées sous forme moyenne \pm SD.

3.2.4 Analyses des données DTI

Afin d'examiner plus en détail la nature des dommages cérébraux engendrés par l'ischémie, les valeurs absolues d'ADC, de FA, de RD et d'AD ont été mesurées. Dans un premier temps nous nous sommes concentrés sur l'évolution de ces valeurs au sein même de la lésion tout au long du protocole. Étant donné qu'aucune différence n'a été décelée entre les groupes traités par le RGTA et contrôles, les valeurs présentées sont celles de tous les animaux confondus (Two-way ANOVA ; $p > 0.05$).

Les cartes d'ADC sont les images qui nous permettent de détecter la lésion en phase aiguë. Ce sont ces images qui nous ont permis de délimiter les lésions selon l'hyposignal émis, il paraît donc logique que les valeurs d'ADC soient significativement diminuées dans la lésion par rapport aux valeurs de l'hémisphère controlatéral dès 30 min après l'ischémie (Two-way ANOVA ; $p < 0.01$) (Figure 69A). Ces données nous permettent de constater qu'au sein même de la lésion, les valeurs d'ADC n'évoluent pas au cours du temps et restent très constantes autour de $500 \pm 40 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Two-way ANOVA ; $p > 0.05$). Étonnamment il en va de même pour les temps plus tardifs à J7 et J28 post-ischémie (Figure 69A). De nouveau, les valeurs d'ADC au sein de la lésion sont significativement inférieures aux valeurs de l'hémisphère controlatéral (Two-way ANOVA ; $p < 0.01$), et sont même similaires à celles retrouvées en phase aiguë (Two-way ANOVA ; $p > 0.05$) (Figure 69A).

Le jour de l'ischémie, les valeurs de FA ne présentent aucun signal anormal. La FA dans la lésion est similaire à celle de l'hémisphère controlatéral tout au long de l'examen jusqu'à

2h30 post-ischémie (Two-way ANOVA ; $p > 0.05$) (Figure 70B). En revanche, l'apparition d'une diminution significative des valeurs de FA à J7 semble indiquer l'apparition de dommages au niveau de la SB, qui persistent jusqu'à J28 (Two-way ANOVA ; $p < 0.01$).

Pendant l'occlusion, on observe une baisse significative de signal de l'AD dans la lésion par rapport à l'hémisphère controlatéral (Two-way ANOVA ; $p < 0.01$). A J7 et J28, le signal lésionnel de l'AD redevient similaire au signal de l'hémisphère controlatéral (Two-way ANOVA ; $p < 0.01$), signifiant une normalisation de l'AD en phases subaiguë et chronique. (Figure 69C).

Enfin, durant tout le protocole, aucun signal anormal de la RD n'a été recueilli puisque le signal obtenu dans la lésion reste similaire à celui de l'hémisphère controlatéral à chaque temps (Two-way ANOVA ; $p > 0.05$) (Figure 69D).

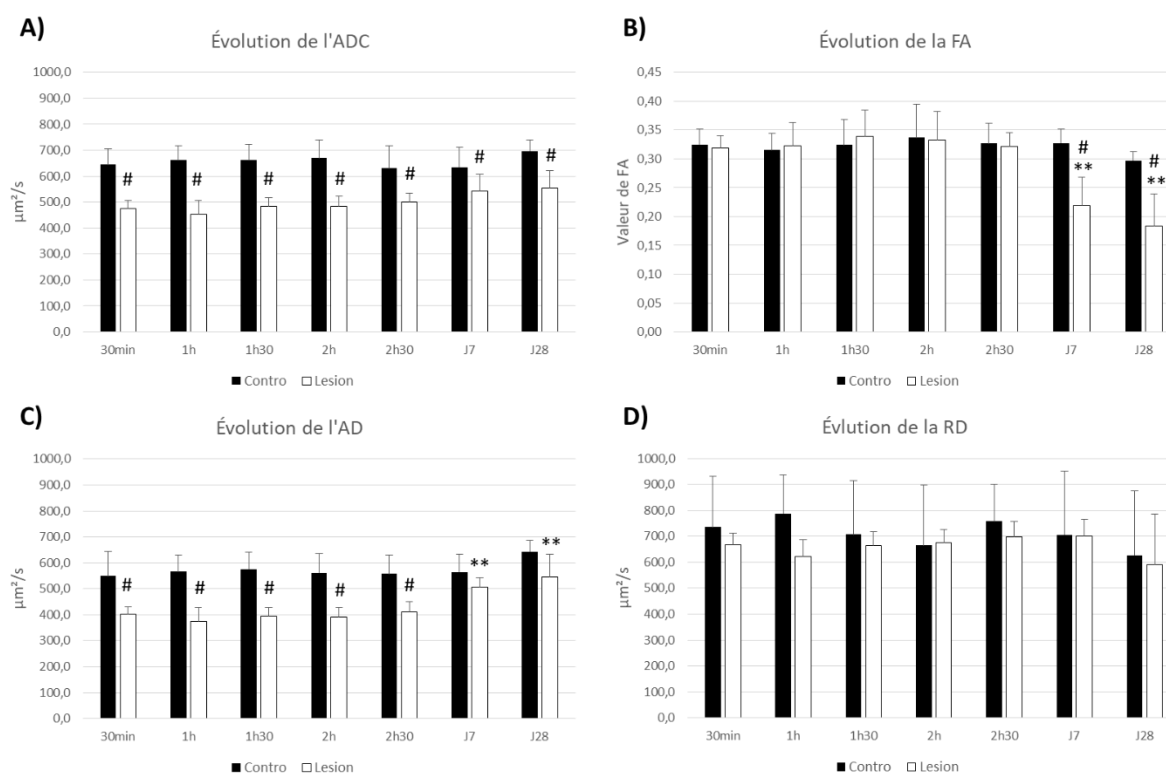


Figure 69 : Évolution des valeurs d'ADC (A), de FA (B), d'AD (C) et de RD (D) au sein de la lésion ($n = 10$; Moyennes \pm SD) (# $p < 0.01$ par rapport à l'hémisphère controlatéral ; ** $p < 0.01$ par rapport aux temps allant de 30 min à 2h30 ; Two-way ANOVA suivie d'un test post-hoc HSD de Tukey). Comme le suivi IRM n'a pas été réalisé aux mêmes temps le jour de l'occlusion pour le marmouset n°1, celui-ci n'a pas été inclus dans cette analyse. AD : Axial Diffusivity ; ADC : Coefficient de diffusion apparente ; Contro : Hémisphère controlatéral ; FA : Fraction d'anisotropie ; RD : Radial Diffusivity.

Dans un second temps, nous avons réalisé ces mêmes mesures au niveau du tissu qualifié de « pénombre ». Ce faisant, nous voulions vérifier si certaines de ces valeurs nous permettaient

de prédire de façon précoce l'étendue de la lésion. Étant donné que ces mesures dépendent d'exams IRM réalisés avant l'injection de RGTA, tous les animaux sont représentés.

Dans cette zone de « pénombre », aucune valeur ne diffère significativement de l'hémisphère controlatéral (One-way ANOVA ; $p > 0.05$) (Figure 70).

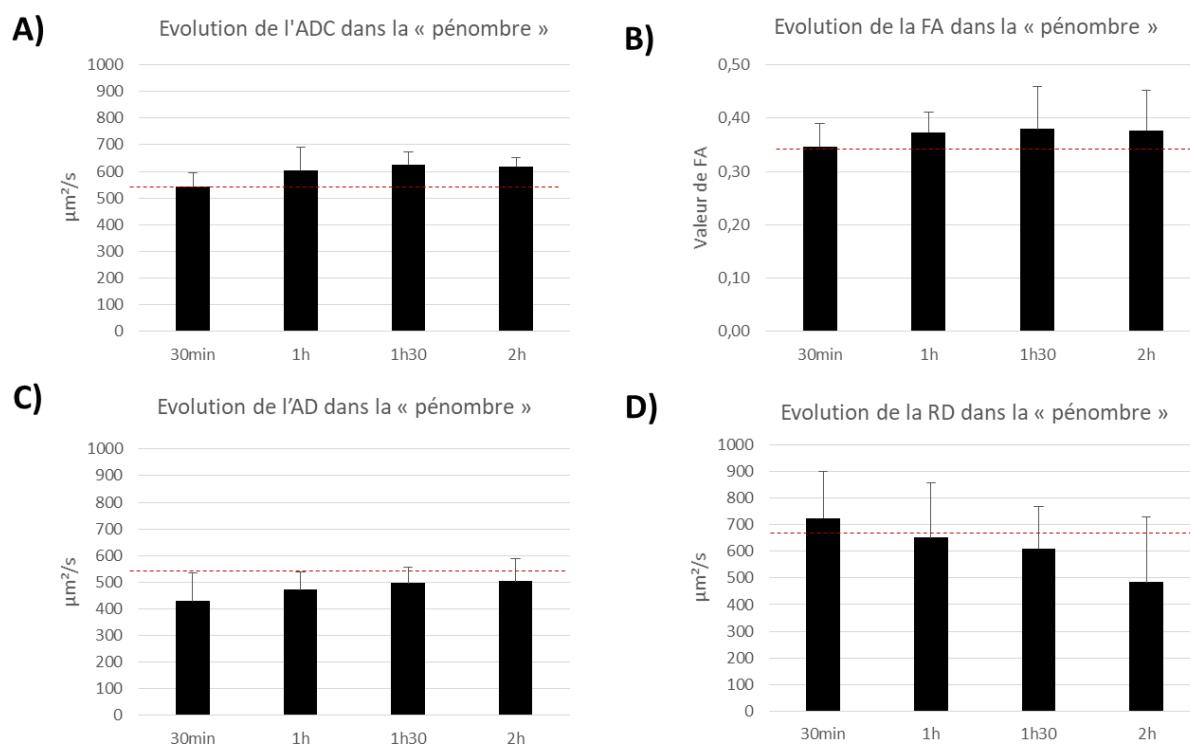


Figure 70 : Évolution des valeurs d'ADC (A), de FA (B), d'AD (C) et de (RD) dans la « pénombre » ischémique des animaux ($n = 10$; Moyennes \pm SD) Aucune différence significative entre les temps (One-way ANOVA ; $p > 0.05$). Comme le suivi IRM n'a pas été réalisé aux même temps le jour de l'occlusion pour le marmouset n°1, celui-ci n'a pas été inclus dans cette analyse. AD : Axial Diffusivity ; ADC : Coefficient de diffusion apparente ; FA : Fraction d'anisotropie ; RD : Radial Diffusivity. La ligne en pointillés rouges représente la valeur moyenne de l'hémisphère controlatéral.

3.3 Tests comportementaux

Afin d'évaluer les effets du RGTA sur la récupération fonctionnelle après une ischémie cérébrale chez le marmouset, différents tests sensorimoteurs ont été réalisés : un score sur l'état général complété par l'étude de comportements typiques de la dépression et de l'anxiété, un score neurologique, un test de stimulation tactile et le test de l'escalier. Le premier marmouset inclus dans le protocole n'a pas été soumis au score de l'état général et n'a pas réalisé les tests du score neurologique et de la stimulation tactile après la 2^{ème} semaine post-ischémie. Aucun animal ne montrait de déficits sur ces tests avant l'ischémie.

Durant toute la durée de l'étude, les animaux ne développent aucun comportement typique d'une dépression ou d'une anxiété pouvant biaiser les performances aux tests (Figure 71 et 72). Juste après l'induction de l'ischémie, l'état général des marmousets diminue. Généralement, la présence d'une forte rotation du corps, d'un myosis, d'un ptosis, ainsi qu'une diminution de la prise alimentaire en sont la cause. Leur état s'améliore ensuite progressivement : ils reprennent une alimentation normale, les rotations se font moins fréquentes, les myosis et ptosis disparaissent. Trois semaines après l'ischémie, les animaux retrouvent leur état initial. Les résultats obtenus indiquent qu'il n'y a aucune différence significative entre les animaux traités par le RGTA et les animaux contrôles au niveau de la récupération globale (Figure 73) (Cochran-Armitage; $p > 0.05$).

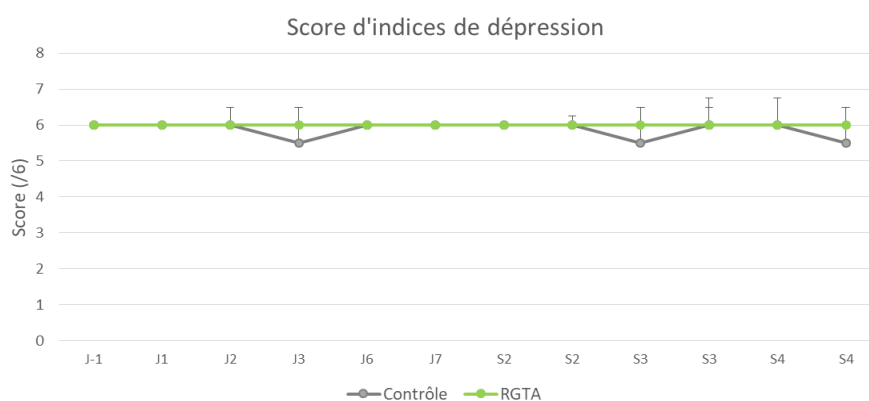


Figure 71 : Suivi des signes de dépression des animaux après ischémie. Le score maximal attribué lorsqu'il n'y a aucun signe de dépression est de 6. (Médiane + IQR) (Contrôle n = 4; RGTA n = 6). Il n'y a aucune différence significative entre les deux groupes (Cochran-Armitage; $p > 0.05$).

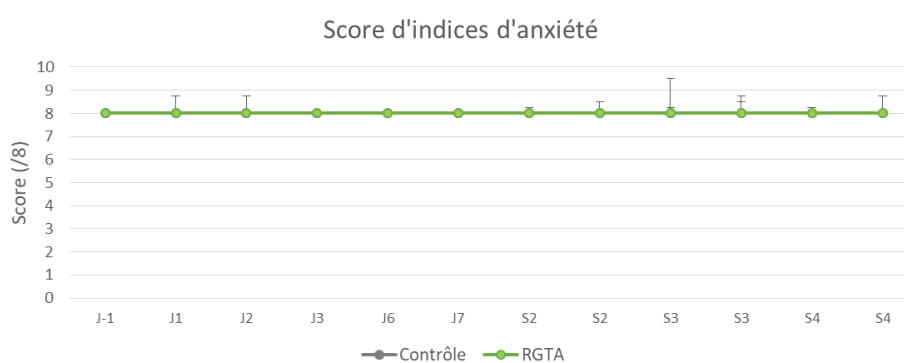


Figure 72 : Suivi des signes d'anxiété des animaux après ischémie. Le score maximal attribué lorsqu'il n'y a aucun signe d'anxiété est de 8. (Médiane + IQR) (Contrôle n = 4; RGTA n = 6). Il n'y a aucune différence significative entre les deux groupes (Cochran-Armitage; $p > 0.05$).

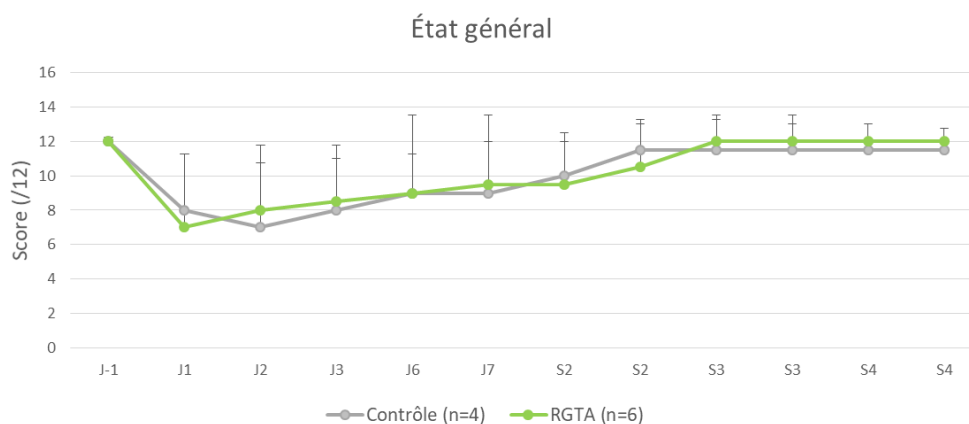


Figure 73 : Suivi de l'état général des animaux après ischémie. Le score maximal attribué lorsqu'il n'y a aucun déficit est de 12. (Médiane + IQR) (Contrôle n = 4; RGTA n = 6). Il n'y a aucune différence significative entre les deux groupes (Cochran-Armitage; $p > 0.05$).

Les résultats du score neurologique ne dévoilent aucun déficit du côté ipsilatéral chez les animaux après ischémie. En revanche, ce test révèle l'apparition de déficits sensorimoteurs du côté controlatéral dès le premier jour suivant l'ischémie chez tous les marmousets. On observe ensuite une récupération spontanée des déficits de l'hémicorps controlatéral chez les animaux par le RGTA comme chez les animaux contrôles. Ce test semble indiquer une récupération fonctionnelle presque totale en fin de 2^{ème} semaine suivant l'ischémie, mais sans différence significative entre les 2 groupes (Cochran-Armitage ; $p > 0.05$) (Figure 74).

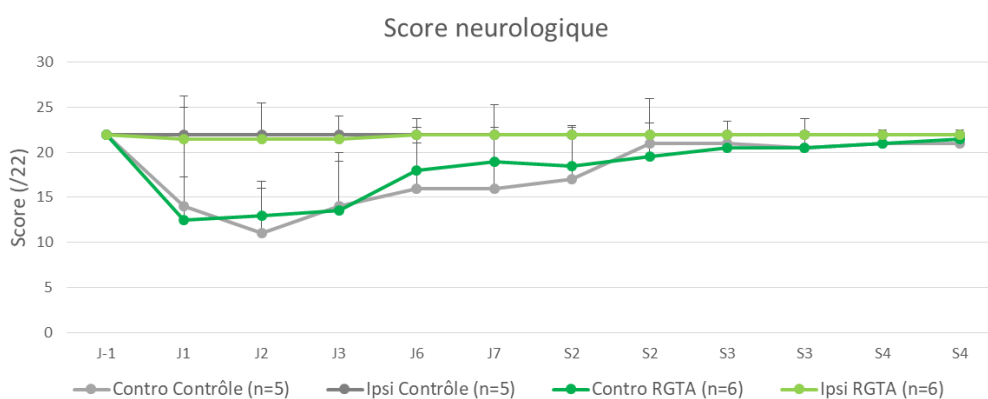


Figure 74 : Évaluation de la récupération sensori-motrice au moyen d'un score neurologique. Un score maximal de 22 pour chaque hémicorps est attribué lorsque l'animal ne présente aucun déficit. (Médiane + IQR) (Contrôle n = 4-5; RGTA n = 6). Il n'y a aucune différence significative entre les deux groupes (Cochran-Armitage; $p > 0.05$). Contro : côté controlatéral ; Ipsi : côté ipsilatéral.

Le test de stimulation tactile révèle un déficit sensoriel très important de l'hémicorps controlatéral chez les animaux contrôles comme chez les animaux traités par le RGTA. Ce déficit s'opère dès le lendemain de la chirurgie et persiste jusqu'à la fin du protocole, même si une récupération partielle peut être observée à partir de la 2^{ème} semaine post-ischémie. Par ailleurs, bien que le seuil de significativité ne soit pas atteint, la tendance d'une meilleure récupération des fonctions sensibles semble se dégager à partir de la 3^{ème} semaine post-ischémie chez les animaux traités par le RGTA (Cochran-Armitage ; $p > 0.05$) (Figure 75).

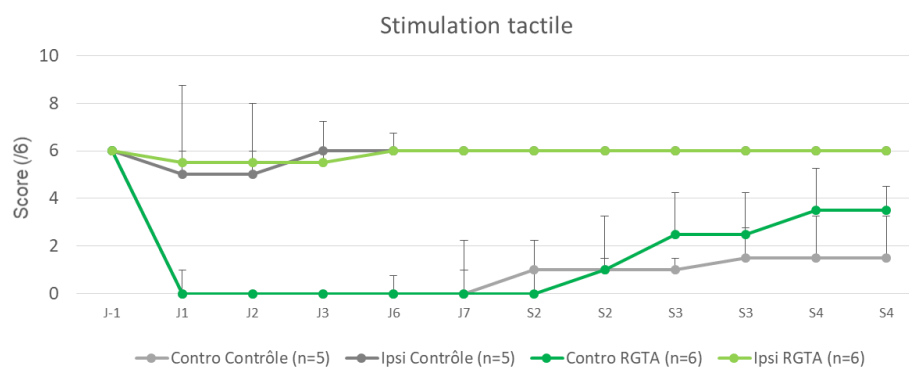


Figure 75 : Évaluation de la récupération sensorielle au moyen d'un test de stimulation tactile. Un score maximal de 6 pour chaque hémicorps est attribué lorsque l'animal réagit de façon normale. (Médiane + IQR) (Contrôle $n = 4-5$; RGTA $n = 6$). Il n'y a aucune différence significative entre les deux groupes (Cochran-Armitage; $p > 0.05$). Contro : côté controlatéral ; Ipsi : côté ipsilatéral.

Les données recueillies avec le test de l'escalier démontrent des troubles de l'utilisation du bras controlatéral chez les deux groupes quelle que soit la version de l'escalier utilisée, ce qui indique une hémiparésie (Figure 76A, et 77A). Aucune différence significative entre les animaux traités par le RGTA et les animaux contrôles n'est retrouvée (Cochran-Armitage; $p > 0.05$). Toutefois, les données obtenues avec la version colline du test semblent indiquer que les animaux contrôles souffrent d'une perte fonctionnelle du bras ipsilatéral, les semaines 1 et 2 suivant l'ischémie, bien plus importante que les animaux traités par le RGTA (Figure 76B). Les résultats de la version vallée de l'escalier montrent également une chute des performances des animaux contrôles avec le bras ipsilatéral aux mêmes temps, ce qui signifie que le trouble est d'ordre moteur (les animaux ne parviennent pas à atteindre les friandises quel que soit le champ visuel utilisé) (Figure 77B). Toujours en observant les données de la version vallée de l'escalier, on constate que les animaux traités par le RGTA présentent des déficits 1 semaine après l'ischémie, lorsque le bras ipsilatéral et le champ visuel controlatéral sont requis, alors que leurs performances restent normales lorsque le bras ipsilatéral est utilisé dans l'escalier en version

colline (Figure 76B, et 77B). Ces animaux semblent donc souffrir d'un déficit visuel transitoire une semaine après l'ischémie, récupéré dès la deuxième semaine. En raison des troubles moteurs bilatéraux des animaux contrôles aux semaines 1 et 2 post-ischémie, il est impossible de savoir si ces animaux souffrent également d'un déficit visuel dans le même temps. En résumé, ce test met en avant un déficit moteur persistant du bras controlatéral chez les deux groupes, semble indiquer un déficit moteur transitoire du bras ipsilatéral uniquement chez les animaux contrôles, et semble mettre en avant la récupération d'un déficit visuel controlatéral uniquement chez les animaux traités par le RGTA. Le seuil de significativité n'est cependant atteint dans aucune des versions du test de l'escalier (Cochran-Armitage; $p > 0.05$).

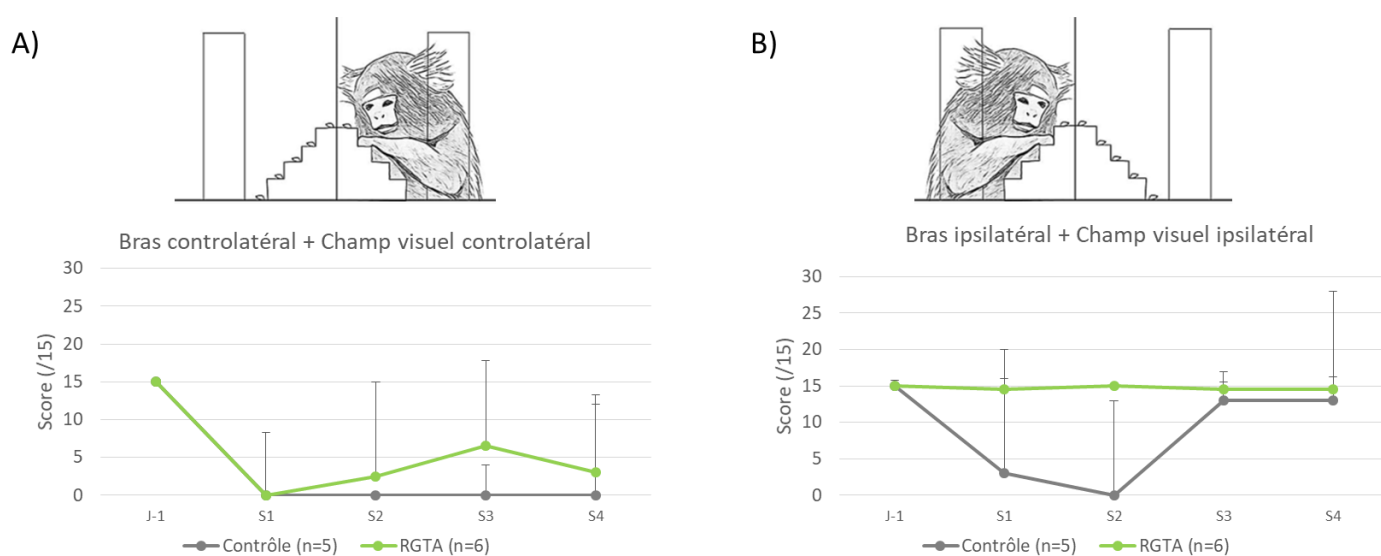


Figure 76 : Suivi de la récupération sensorimotrice au moyen du test de l'escalier en version colline. A) Scores obtenus en récupérant les récompenses en utilisant le bras et le champ visuel controlatéral. B) Scores obtenus en récupérant les récompenses en utilisant le bras et le champ visuel ipsilatéral. (Médiane + IQR) (Contrôle n = 5; RGTA n = 6). Il n'y a aucune différence significative entre les deux groupes (Cochran-Armitage; $p > 0.05$).

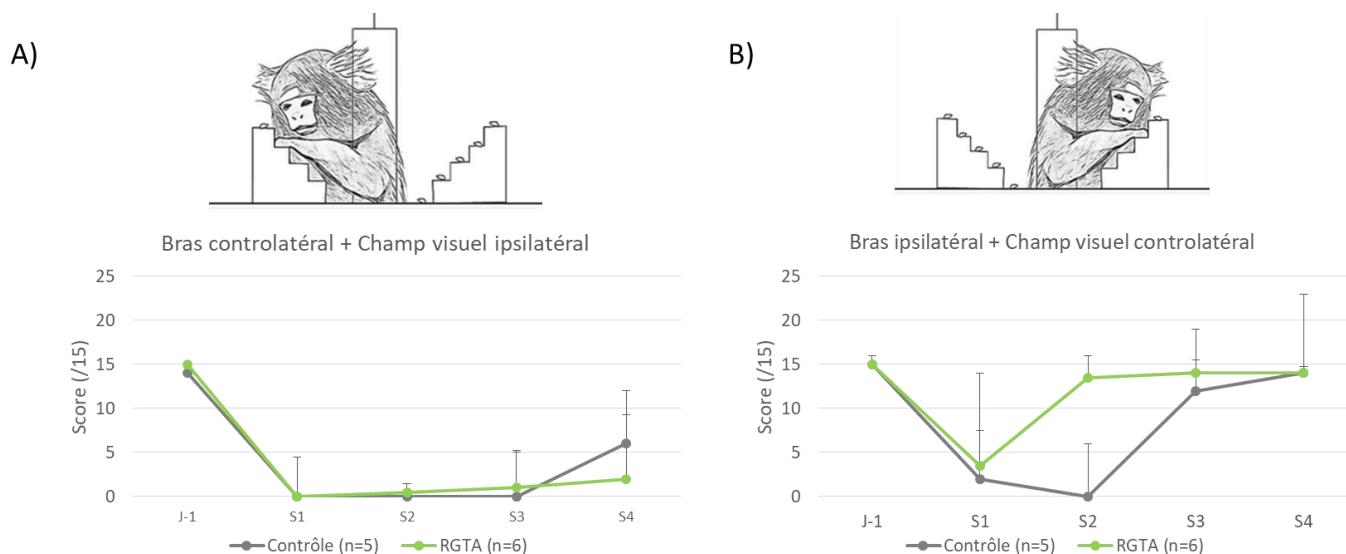


Figure 77 : Suivi de la récupération sensorimotrice au moyen du test de l'escalier en version vallée. A) Scores obtenus en récupérant les récompenses en utilisant le bras controlatéral et le champ visuel ipsilatéral. B) Scores obtenus en récupérant les récompenses en utilisant le bras ipsilatéral et le champ visuel controlatéral. (Médiane + IQR) (Contrôle n = 5; RGTA n = 6). Il n'y a aucune différence significative entre les deux groupes (Cochran-Armitage; $p > 0.05$).

3.4 Corrélations entre les données IRM et les résultats comportementaux

Afin d'évaluer le caractère prédictif des données IRM sur les déficits fonctionnels en phase subaiguë, nous avons réalisé des corrélations entre les résultats IRM obtenus à 1h post-ischémie (volume lésionnel, ADC, FA, AD, et RD) et les résultats obtenus aux différents tests comportementaux en phase subaiguë, soit 2 semaines après l'ischémie. Ces corrélations ont été réalisées séparément chez les 2 groupes d'animaux afin de déceler d'éventuelles différences.

En raison d'un trop faible nombre d'animaux, le seuil de significativité n'est pas atteint dans la plupart des cas. Néanmoins, nous avons quand même choisi de tenir compte des coefficients de corrélations à partir de 0.7, car ceux-ci indiquent une corrélation très forte. Les résultats de ces corrélations sont résumés dans le tableau 8 ci-dessous. On constate ainsi que dans la majorité des cas, le volume lésionnel n'est pas un bon prédicteur des déficits comportementaux. En effet seul le test de l'état général semble fortement corrélé de façon négative au volume lésionnel chez les animaux contrôles. Autrement dit, plus le volume lésionnel augmente, plus le score au test est faible et donc plus les déficits sont importants.

En revanche, les valeurs d'ADC, d'AD, et de RD semblent offrir une bonne prédiction des déficits moteurs puisqu'on retrouve une forte corrélation positive entre ces valeurs et les résultats de l'état général, du score neurologique, et des deux escaliers. Autrement dit, lorsque l'ADC, l'AD ou la RD diminue, les scores obtenus aux tests diminuent également, ce qui

signifie que les déficits augmentent. En revanche, nous n'avons décelé aucune diminution significative de la RD dans la lésion le jour de l'ischémie. Toutefois, en regardant nos résultats de plus près, nous pouvons voir une légère tendance de diminution de la RD 1 h après l'ischémie (Figure 69D). Cette tendance a pu suffire à faire ressortir une corrélation entre la RD et les tests comportementaux.

Cependant, aucune donnée IRM ne semble pouvoir prédire les déficits sensoriels car aucune corrélation ne ressort avec le test de stimulation tactile. De plus, de façon intéressante, la grande majorité des corrélations ne sont retrouvées que chez les animaux du groupe contrôle et disparaissent chez les animaux traités par le RGTA. Au moment des examens IRM (1 h après ischémie) aucun traitement n'a été donné, et on ne retrouve aucune différence entre les animaux des deux groupes pour toutes les valeurs mesurées. En revanche, le traitement a été administré avant la réalisation des tests comportementaux. Il se pourrait donc que le traitement agisse de façon discrète sur la récupération fonctionnelle.

Tableau 8 : Tableau résumant les coefficients de corrélations de Pearson obtenus entre les données IRM de la lésion 1h après l'ischémie, et les résultats aux tests comportementaux (côté controlatéral) à 2 semaines post-ischémie (Contrôle : n = 4 ; RGTA : n = 6). Les corrélations réalisées sont des corrélations de Pearson. Les corrélations considérées comme fortes, bien que non significatives ($p > 0.05$), sont surlignées en vert.

LESION 1h	État général		Score neurologique		Stimulation tactile		Escalier colline		Escalier vallée	
	Contrôle	RGTA	Contrôle	RGTA	Contrôle	RGTA	Contrôle	RGTA	Contrôle	RGTA
Volume	-0,9	0,5	-0,6	-0,1	0	-0,5	-0,6	-0,4	-0,6	-0,6
ADC	0,9	-0,6	0,7	0,2	0,6	0,4	0,9	0,3	0,9	0,4
FA	-0,6	0,4	-0,3	-0,3	0,6	-0,3	0,1	-0,4	0,1	-0,3
AD	1,0	-0,6	0,9	0,2	0,1	0,4	0,7	0,3	0,7	0,4
RD	0,9	-0,6	0,7	0,2	0,6	0,4	0,9	0,3	0,9	0,5

De la même façon, nous avons réalisé des corrélations entre le volume de la «pénombre» 1h post-ischémie et les résultats obtenus aux différents tests comportementaux en phase subaiguë 2 semaines après l'ischémie. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 9 ci-dessous. Il semblerait cette fois-ci que la taille de la «pénombre» soit un meilleur indicateur des futurs déficits fonctionnels, puisque de fortes corrélations sont retrouvées pour tous les tests chez les animaux contrôles. Chez les animaux traités par le RGTA, le volume de la «pénombre» est corrélé au score neurologique ainsi qu'aux deux escaliers chez les animaux traités par le RGTA. Ces corrélations indiquent que plus la «pénombre» est grande, plus les déficits sont importants. Ainsi, le volume précoce de la «pénombre» semble offrir une prédiction aussi bien des déficits moteurs que des déficits sensitifs chez les animaux contrôles, mais uniquement

moteurs chez les animaux traités par le RGTA. Dans la «pénombre», aucune différence des valeurs d'ADC, de FA, d'AD ou de RD n'a été détectée par rapport à l'hémisphère controlatéral. De ce fait, aucune corrélation n'a été retrouvée entre ces valeurs et les données comportementales.

Tableau 9 : Tableau résumant les coefficients de corrélations de Pearson obtenus entre les données IRM de la «pénombre» 1h après l'ischémie, et les résultats aux tests comportementaux (côté controlatéral) à 2 semaines post-ischémie (Contrôle : n = 4 ; RGTA : n = 6). Les corrélations réalisées sont des corrélations de Pearson. Les corrélations considérées comme fortes, bien que non significatives ($p > 0.05$), sont surlignées en vert.

	État général		Score neurologique		Stimulation tactile		Escalier colline		Escalier vallée	
	Contrôle	RGTA	Contrôle	RGTA	Contrôle	RGTA	Contrôle	RGTA	Contrôle	RGTA
PENOMBRE 1h										
Volume	-0,8	-0,1	-0,8	-0,8	-0,7	0	-0,8	-0,8	-0,8	-0,7

4 Discussion

Cette étude réalisée chez le marmouset fait suite aux résultats obtenus avec la thérapie matricielle par RGTA dans un modèle d'ischémie focale chez le rat. En effet, au cours de ces travaux, il a été montré qu'une injection intraveineuse de RGTA réduisait les dommages cérébraux et améliorait la récupération fonctionnelle (Khelif *et al.*, 2018). Précédemment, nous avons également mis en évidence un effet neuroprotecteur persistant du RGTA après une administration par voie intra-artérielle. Afin de répondre aux recommandations des comités d'experts scientifiques, la présente étude cherche à valider ces résultats chez un primate non-humain : le marmouset. Cette étude a permis de montrer qu'aucun effet toxique n'a pu être observé lorsque le RGTA est injecté à la dose de 8.88 μg , 3 heures après l'OACM. Malheureusement, les résultats obtenus sur 10 individus (4 contrôles et 6 traités par le RGTA) ne nous ont pas permis d'affirmer l'efficacité du traitement.

L'étude 3 a permis dans un premier temps d'évaluer l'innocuité du traitement chez les animaux. Cinq marmousets sont décédés les jours suivant la chirurgie. Toutefois, parmi ces animaux, seulement 2 ont été traités par le RGTA tandis que les autres ont reçu l'injection d'une solution saline. On peut donc exclure une mortalité liée au traitement. De plus, le suivi des paramètres physiologiques réalisé pendant 60 minutes après l'administration du RGTA n'indique aucune toxicité liée à la médication pour cette dose donnée. La demi-vie du RGTA étant de 30 minutes dans la circulation sanguine, si des altérations avaient dû avoir lieu, nous les aurions détectées. Cependant un même phénomène s'est produit chez l'ensemble des animaux que nous avons perdus après l'ischémie : les images IRM réalisées après le retrait de l'embolie indiquent que ces animaux n'ont pas correctement reperfusé. En effet, même si les

angiographies indiquaient que le sang passait de nouveau correctement dans les gros vaisseaux, les cartes d'ADC ne présentaient aucune diminution de l'hypersignal. Les animaux ont ensuite succombé à un œdème cérébral massif. Le modèle d'ischémie focale chez le marmouset par OACM que nous avons utilisé a été mis en place dans notre laboratoire il y a de ça 10 ans, et jusqu'alors ce phénomène n'avait encore jamais été observé (Freret *et al.*, 2008; Bihel *et al.*, 2010). La seule différence avec ces travaux, est l'injection intra-artérielle d'un produit. De nombreuses études ont fait part de complications qui peuvent survenir après l'utilisation de cette voie d'administration (Sen *et al.*, 2005; Abou-Chebl, 2013; Joshi *et al.*, 2014). Dans notre cas, ces complications pourraient être liées à un débit d'injection trop important, qui aurait abimé les petits vaisseaux sanguins, empêchant ainsi la reperfusion des tissus. Lors de nos études chez le rat, nous n'avions pas obtenu de mortalité plus importante chez les rats traités par voie intra-artérielle par rapport aux rats traités par voie intraveineuse, et le même débit d'injection a ensuite été utilisé chez le marmouset. Or, le débit sanguin cérébral du rat est de 120 à 150 ml/min/100g (Williams *et al.*, 1992) contre 70 pour le marmouset (Guibert *et al.*, 2010). Cette différence pourrait expliquer que les complications n'apparaissent que chez le marmouset. Cette hypothèse a cependant peu de chances de s'avérer correcte, car l'ensemble des injections a été réalisé à l'aide d'un injecteur automatique qui a respecté le même débit d'injection chez tous les animaux. Ce phénomène aurait donc dû apparaître chez d'avantage, si ce n'est l'ensemble, des marmousets. Toutefois, cette théorie nécessiterait d'être validée en testant différents débits d'injection sur un plus grand nombre d'animaux.

Afin d'évaluer les effets du RGTA sur la protection du tissu cérébral, un suivi IRM a été réalisé en phase subaiguë et chronique de l'ischémie. Contrairement à ce qui avait été obtenu chez le rat, nos données obtenues chez le marmouset n'ont pas montré d'effet neuroprotecteur du traitement à la dose administrée (8.88 µg). L'utilisation des PNH en tant que modèles animaux possède l'avantage d'offrir une plus grande proximité avec l'Homme par rapport aux modèles rongeurs. Toutefois, l'inconvénient majeur du modèle primate est qu'il ne permet pas de faire des études sur de grands échantillons d'individus. Pour cette raison, dans le cadre d'une étude préclinique, la détermination de la fenêtre thérapeutique et de la dose optimale se fait généralement chez le rongeur. Chez le rat, la dose optimale d'une injection intra-artérielle de RGTA a été déterminée à 2.22 µg. Pour cette étude, nous avons donc adapté cette unique dose au marmouset. Les deux espèces étudiées ont un poids corporel équivalent, mais le volume cérébral du marmouset est 4 fois plus important que celui du rat. En conséquence, la dose de

8.88 µg de RGTA a été choisie pour cette étude, et aucune autre dose n'a été testée. Celle-ci n'est peut-être pas la plus efficace chez le marmouset.

Dans ce protocole, le traitement a été injecté au moment de la reperfusion, soit 3 h après le début de l'ischémie. Nos examens DTI réalisés le jour de l'ischémie nous ont permis de mesurer l'évolution du volume lésionnel pendant l'occlusion. D'après nos analyses, ce volume augmente progressivement jusqu'à 2h30, ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment au laboratoire, également après une OACM de 3 h chez le marmouset (Bihel *et al.*, 2011). Dans cette étude précédente, le volume lésionnel a été mesuré à 30 min, 1 h, 2 h et 3 h post-ischémie, et une stabilisation du volume lésionnel est observée à partir de 2h. En associant ces résultats aux nôtres, nous pouvons donc supposer que la lésion induite par une OACM chez le marmouset atteint son volume maximal aux alentours de 2h30. Autrement dit, au moment de la reperfusion et de l'injection du traitement, des dommages irréversibles ont déjà entièrement recouvert toute la zone de pénombre, cible de prédilection des thérapies neuroprotectrices (Ghobrial *et al.*, 2014). Chez le rat de souche Sprague Dawley (SD) que nous avons utilisé pour nos études antérieures sur le RGTA, le volume de la lésion ischémique induite par une OACM augmente rapidement jusqu'à 2 h, puis se stabilise (Bardutzky *et al.*, 2005). Ainsi, chez le rat SD, la lésion atteint son volume maximal au bout de 2 h d'occlusion. Chez le rat, la fenêtre thérapeutique optimale du RGTA a été déterminée à 1h post-ischémie, soit bien avant que la pénombre n'ait totalement disparu, ce qui rend la neuroprotection possible (Khelif *et al.*, 2018). Il semblerait donc que le temps d'injection du RGTA choisi pour l'étude chez le marmouset ne soit pas approprié au modèle, et qu'il aurait fallu administrer le traitement bien plus tôt pour voir, comme chez le rat, une réduction du volume lésionnel en phase subaigüe et chronique. Les mesures que nous avons réalisées sur le volume de la «pénombre» chez le marmouset vont également dans ce sens. En effet, 1h30 après le début de l'ischémie, la «pénombre» commence à diminuer et ne mesure déjà plus que 110 mm³. Étant donné que la lésion atteint 912 mm³ à 2h30, cela signifie que seul 12 % de la lésion peut encore être sauvé à 1h30. Ce n'est pas très différent de ce que l'on peut retrouver chez le rat, chez qui 9 % du tissu appartient à la pénombre à 1h30 après ischémie, contre 25 % à 1 h (Bardutzky *et al.*, 2005). Afin d'observer un effet thérapeutique du RGTA chez le marmouset, il faudrait donc prévoir un temps d'injection antérieur à 1h30.

Les résultats aux tests comportementaux ne nous permettent pas de valider les effets bénéfiques du RGTA obtenus sur la récupération fonctionnelle chez le rat (Khelif *et al.*, 2018a). Parmi les tests réalisés, le test de stimulation tactile et de l'escalier mettent en évidence des

déficits persistants jusqu'à la fin du protocole. Le manque de différence observé ne peut donc pas être attribué à une récupération fonctionnelle spontanée trop rapide. De plus, le test de l'escalier s'est déjà montré suffisamment sensible pour révéler un effet thérapeutique sur la récupération sensori-motrice chez le marmouset (Marshall *et al.*, 2001). Bien que le seuil de significativité ne soit pas atteint, ils semblent que les animaux traités par le RGTA tendent à une meilleure récupération des fonctions sensibles à partir de la 3^{ème} semaine post-ischémie. De même, les résultats obtenus avec les 2 versions de l'escalier nous indiquent que les animaux contrôles tendent à souffrir de déficits moteurs plus importants du côté ipsilatéral. Ces déficits ipsilatéraux perdurent jusqu'à la 2^{ème} semaine post-ischémie, et ne peuvent donc pas être attribués à un simple effet secondaire de l'anesthésie pendant la chirurgie. Au cours d'une ischémie, la diminution de l'activité des neurones endommagés entraîne une sous-activation des régions cérébrales qui y sont fonctionnellement associées. Cette sous-activation aura pour conséquence une diminution du métabolisme de ces régions, ce qui se traduit par des déficits fonctionnels, le plus souvent transitoires (Seitz *et al.*, 1999). On appelle ce phénomène le diaschisis. Ainsi, au cours d'une ischémie, des diaschisis contralatéraux ont déjà été mis en évidence et pourrait expliquer l'apparition de déficits ipsilatéraux transitoires chez les animaux (Bona *et al.*, 2019).

Les examens IRM en DTI ont permis l'analyse de l'intégrité des tissus à travers l'évolution des cartes d'ADC, de FA, d'AD et de RD dans la lésion ainsi que dans la «pénombre». Les valeurs d'ADC mesurées dans la lésion restent stables pendant toute la durée de l'occlusion, ce qui signifie que dans cette fenêtre de temps, la sévérité de l'œdème cytotoxique n'évolue pas. Ces données sont comparables à celles qui ont déjà été obtenues chez le marmouset (Bihel *et al.*, 2011). Sept jours après l'ischémie, un hyposignal est toujours perceptible en ADC. De nouveau, ce résultat est en accord avec de précédents travaux menés au laboratoire chez le marmouset (Bihel *et al.*, 2011). Il semblerait donc que le profil d'évolution de l'ADC lésionnel chez le marmouset se rapproche de l'Homme chez qui les valeurs se stabilisent entre 10 et 14 jours (Eastwood *et al.*, 2003; Muñoz Maniega *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007). En comparaison, chez le rat, l'évolution du signal d'ADC dans la lésion est plus rapide car il met 4 jours à se stabiliser (Neumann-Haefelin T. *et al.*, 2000). En phase chronique, on observe toujours un signal d'ADC hypointense dans la lésion. A ce stade, les données de la littérature indiquent généralement un retour à la normale des valeurs d'ADC dans l'hémisphère ipsilatéral, chez le rongeur comme chez le primate (Neumann-Haefelin T. *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 2003b; Liu *et al.*, 2007). Néanmoins, il arrive parfois qu'un hyposignal

soit toujours visible en raison d'une formation de cavités kystiques liées à la nécrose du cerveau chez certains animaux (Eastwood *et al.*, 2003).

Concernant l'évolution de la FA durant l'occlusion, nos données sont en contradiction avec la littérature, qui expose généralement une augmentation du signal de FA (Liu *et al.*, 2007; Bhagat *et al.*, 2008; Bihel *et al.*, 2011; Alegiani *et al.*, 2017). Toutefois, cette augmentation de la FA n'est pas une caractéristique uniforme, et il arrive parfois que celle-ci ne change pas, voire diminue chez certains patients dans les heures suivant l'occlusion (Ozsunar *et al.*, 2004). Il semblerait que l'œdème cytotoxique de la zone infarctée soit la raison de ces disparités, car il aurait différents effets sur la diffusivité axiale et radiale (Liang *et al.*, 2007). De ce fait, la FA durant la phase aiguë d'une ischémie n'est pas considérée comme un marqueur de datation fiable de la lésion, car son évolution dépend d'avantage de composantes individuelles, plutôt que de la durée d'occlusion (Alegiani *et al.*, 2017). En phases subaiguë et chronique, le signal de FA observé chez le marmouset diminue significativement, ce qui est également retrouvé chez d'autres espèces de primates (Chin *et al.*, 2010). Ce phénomène met en avant l'apparition de dommages au niveau de la SB. Cependant, bien que les mesures de FA soient classiquement réalisées en recherche, elles ne permettent pas de distinguer spécifiquement les types de changements qui surviennent dans la SB. Pour cela, nous avons également réalisé des mesures de l'AD et de la RD. Ces deux paramètres sont beaucoup moins représentés dans la littérature. Nos résultats indiquent une diminution significative de l'AD pendant la phase aiguë de l'ischémie. La physiopathologie à l'origine de cette diminution n'est pas très bien comprise mais elle est vraisemblablement la conséquence d'une dégénération axonale provoquée par la nécrose cellulaire. En revanche, la raison pour laquelle la diminution de l'AD n'est pas accompagnée d'une augmentation de la RD est inconnue. Toutefois, ces résultats coïncident avec des données obtenues en phase aiguë d'ischémie chez des patients (Moulton *et al.*, 2015).

Nous avons également mesuré l'évolution de ces valeurs dans la zone de «pénombre» des animaux. Étant donné qu'on retrouve une baisse importante de signal de l'ADC et de l'AD dans la lésion, nous pensons que ces valeurs diminuaient graduellement selon l'extension de la lésion, et donc retrouver des valeurs au moins légèrement diminuées dans la «pénombre». Cependant, aucune mesure ne diffère de l'hémisphère sain. Chez le marmouset, il ne semble donc pas possible de prédire l'étendue de la lésion en mesurant les données de diffusion dans la zone péri-lésionnelle.

Les modifications des paramètres de diffusion dans la lésion sont les premiers phénomènes cérébraux qui peuvent être détectés après une ischémie. Nous avons donc voulu

vérifier si les valeurs d'ADC, de FA, d'AD ou de RD ainsi que le volume lésionnel 1 h après ischémie pouvaient être de bons marqueurs prédictifs des déficits comportementaux en début de phase chronique chez le marmouset. Étonnamment, nous n'avons retrouvé aucune corrélation entre le volume lésionnel et les déficits sensorimoteurs. Il semble n'y avoir de relation qu'avec l'état général des animaux. Le volume lésionnel est pourtant le premier indice de déficits à long-terme décrit dans la littérature, chez l'animal comme chez l'Homme (Schiemanck *et al.*, 2005; Habegger *et al.*, 2018), mais les mesures sont généralement faites à des temps beaucoup plus tardifs en clinique, et sur un volume lésionnel « final » chez les animaux. Cela souligne toutefois l'importance d'inclure un suivi comportemental dans un protocole d'étude préclinique, et de ne pas s'appuyer uniquement sur des données IRM. En revanche, nos données indiquent que le volume de la « pénombre » mesuré chez les animaux à 1 h est un excellent marqueur des déficits sensorimoteurs puisque des corrélations fortes sont retrouvées avec tous les tests. Mais dans le cas présent, la « pénombre » ne représente pas forcément la zone cérébrale d'hypoperfusion, mais la région qui sera infarctée avant la reperfusion. Autrement dit, elle peut sur ou sous-évaluer la véritable pénombre à un temps donné, et représente le volume lésionnel total que les animaux auront. De façon intéressante, on constate également que chez les animaux appartenant au groupe contrôle, le volume de la « pénombre » est corrélé avec les résultats de tous les tests, tandis que seuls les déficits moteurs ressortent pour les animaux traités par le RGTA. De la même façon, nos données indiquent des corrélations fortes entre l'ADC, l'AD et la RD à 1 h et les déficits moteurs à 2 semaines uniquement chez les animaux contrôles. Ainsi, ces valeurs semblent être de bons marqueurs précoces des déficits fonctionnels moteurs sur le long terme. L'évolution des paramètres de diffusion et des déficits fonctionnels qui y sont liés semblent ainsi être similaires entre l'Homme et le marmouset (Rosso *et al.*, 2011; Moulton *et al.*, 2015). Dans une étude, Rosso et collaborateurs ont même mis en évidence qu'en phase très aiguë de l'ischémie, les valeurs d'ADC permettaient de mieux prédire les troubles comportementaux des patients que le volume lésionnel (Rosso *et al.*, 2011). Ceci supporte les résultats que nous avons obtenus. En revanche, en accord avec les données de la littérature, la FA mesurée en phase aiguë n'est pas un bon marqueur des déficits fonctionnels (Chin *et al.*, 2010). Les DTI à partir desquels les cartes d'ADC, d'AD et de RD ont été extraites ont été réalisés avant l'administration du RGTA. De plus, les valeurs étaient homogènes entre les animaux de chaque groupe. Pourtant, on ne retrouve des corrélations qu'avec les animaux du groupe contrôle. Le lien entre les dommages tissulaires ici mesurés, et les déficits fonctionnels disparaît chez les animaux traités par le RGTA. A 2 semaines post-ischémie, aucune différence statistique ne nous permet de mettre en

avant une différence de performances aux tests entre les animaux contrôles et les animaux traités par le RGTA. Cette absence de corrélation pourrait signifier que les animaux traités par le RGTA auraient en réalité des déficits fonctionnels moins prononcés que les animaux contrôles. Il pourrait s'agir du premier indice d'une meilleure récupération fonctionnelle des marmousets grâce au RGTA. Toutefois, un nombre plus important d'animaux serait nécessaire afin de valider cette hypothèse.

A travers cette étude, nous avons cherché à évaluer les effets du RGTA sur la neuroprotection et la récupération fonctionnelle après ischémie cérébrale focale chez le marmouset commun. Le potentiel thérapeutique du RGTA a déjà été démontré chez le rat, malheureusement, mais bien que l'innocuité du traitement ait été validée, les résultats obtenus dans cette étude ne nous permettent pas d'apporter à ce stade les mêmes conclusions quant à son efficacité. Cependant, plusieurs facteurs peuvent être mis en cause. Tout d'abord, un plus grand nombre d'animaux aurait peut-être permis de dégager statistiquement une différence entre les groupes, qui pour l'heure n'apparaît que sous forme de tendance ou d'indices liés aux corrélations. Ensuite, il semblerait que la fenêtre thérapeutique choisie ne soit pas adaptée au marmouset, car au moment de l'administration du RGTA, la lésion a déjà atteint son volume maximal. Afin de visualiser un effet neuroprotecteur, il aurait fallu injecter le traitement bien plus tôt. Enfin, suite aux résultats obtenus précédemment chez le rat, la dose de 8.88 µg de RGTA a été choisie pour cette étude, et aucune autre dose n'a été testée. Celle-ci n'est peut-être pas la plus efficace chez le marmouset. En raison de tous ces facteurs, aucune conclusion sur l'efficacité ou l'inefficacité du RGTA ne peut être rendue.

ÉTUDE 4 - Mise en place de tests cognitifs chez le marmouset, dans un contexte d'ischémie cérébrale

1 Contexte de l'étude

L'AVC représente la première cause de handicap acquis d'origine non traumatique chez l'adulte. Aussi, afin de permettre aux patients de retrouver une certaine autonomie, et d'améliorer leur qualité de vie, il paraît primordial d'orienter la recherche thérapeutique vers la restauration des fonctions endommagées. Cependant, la recherche préclinique et clinique actuelle se focalise majoritairement sur l'évaluation des déficits sensori-moteurs, au détriment des troubles cognitifs pourtant très fréquents (Rist *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014; Brainin *et al.*, 2015). Plusieurs fonctions cognitives sont généralement atteintes : la mémoire de travail, l'attention, les fonctions exécutives (résolution de problèmes), le langage, l'orientation et l'héminégligence visuo-spatiale (Al-Qazzaz *et al.*, 2014). Or, ces fonctions sont essentielles à l'intégration d'un individu dans la société, si bien que près de 25 % des victimes d'un AVC sont incapables de reprendre une activité professionnelle en raison de leurs troubles cognitifs. C'est pourquoi l'évaluation des fonctions cognitives après un AVC, et leur récupération, devrait être un enjeu majeur dans l'étude de nouvelles thérapies, au même titre que les fonctions sensorimotrices.

Chez le marmouset, de nombreux tests sensorimoteurs ont été développés pour évaluer la récupération sensorimotrice après un AVC (Le Gal *et al.*, 2017), mais la littérature ne fait état d'aucun test cognitif employé pour cette pathologie. Il a pourtant été prouvé que le marmouset était capable de réaliser des tâches cognitives complexes au moyen d'un outil pertinent dans le cadre d'une ischémie cérébrale : le CANTAB (Spinelli *et al.*, 2004). Il s'agit d'une batterie de tests cognitifs assistés par ordinateurs préalablement conçue pour le diagnostic de troubles neurodégénératifs et la rééducation cognitive chez l'Homme (Roque *et al.*, 2011), et récemment adaptée au singe. Ce système d'évaluation est avantageux puisqu'il permet de mesurer, avec une grande précision, de nombreux aspects cognitifs tels que la mémoire de travail, l'attention, ou encore les fonctions exécutives, tout en demandant peu d'habileté motrice. De plus, le fait qu'il puisse être utilisé en clinique comme en préclinique facilite grandement l'aspect translationnel des études. Dans leur étude, Yamazaki et collaborateurs ont démontré que les marmousets étaient capables de réaliser de belles performances sur l'un des tests proposés par

le CANTAB : le Delayed Matching to Position (DMP) (Yamazaki *et al.*, 2016). Cet exercice évalue la mémoire de travail, et pourrait donc être intéressant dans un contexte d'ischémie cérébrale. C'est pourquoi le but originel de cette étude était de réaliser un apprentissage du DMP au moyen du CANTAB, chez le marmouset sein, dans le but de pouvoir intégrer ce test aux futures études sur l'ischémie. Toutes les étapes de l'apprentissage sur le CANTAB que nous avons réalisées sont détaillées dans cette étude.

Toutefois, très peu d'informations concernant les modalités d'apprentissage du CANTAB et de ses tests sont disponibles dans la littérature. Nous avons donc rencontré des difficultés dans ce travail, et n'avons pas pu finaliser l'apprentissage du DMP sur le CANTAB. C'est pourquoi dans un deuxième temps, nous nous sommes tournés vers la mise en place de tests cognitifs au moyen de dispositifs « manuels » plus classiques, afin de vérifier la faisabilité d'un apprentissage cognitif dans notre animalerie. Deux tests ont été retenus : le DMP, qui comme précisé plus tôt, évalue la mémoire de travail, et l'Object Retrieval with Detour (ORD) ou détournement d'objet, qui évalue les fonctions exécutives, également touchées par une ischémie.

2 Matériels et Méthodes

2.1 Habituation et entraînement au CANTAB

2.1.1 *Animaux utilisés*

Comme pour l'étude précédente, l'ensemble des marmousets (*Callithrix jacchus*) inclus dans cette étude sont élevés dans une animalerie agréée rattachée à notre laboratoire (CURB, France). Ils y sont hébergés en intérieur, avec un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*, dans un environnement maintenu constamment à 24 °C et 50 % d'hygrométrie, avec un cycle d'éclairage jour/nuit de 12 h.

Plusieurs mois avant le début du protocole, les marmousets de cette étude ont été déplacés dans une animalerie dédiée aux animaux en cours d'étude nommée animalerie de protocole. Cette animalerie confère les mêmes conditions de température, d'hygrométrie et d'éclairage que le CURB. En revanche, pour faciliter les études comportementales, les animaux sont isolés dans des cages individuelles mais conservent la possibilité d'interagir visuellement et de communiquer avec leurs congénères situés dans le même box. L'eau est distribuée *ad libitum*, mais comme les exercices comportementaux nécessitent une motivation alimentaire, la nourriture est retirée le matin et redistribuée en fin d'après-midi, à la fin des sessions de travail.

Cinq marmousets ont été entraînés au CANTAB, 3 femelles et 2 mâles, âgés de 7 ans. Les caractéristiques de ces animaux sont résumées dans le tableau suivant : (Tableau 10).

Tableau 10 : Informations générales des marmousets entraînés au CANTAB.

Matricule	Sexe	Âge
9238	F	7 ans
9081	M	7 ans
9178	F	7 ans
9291	M	7 ans
9312	F	7 ans

2.1.2 Habituation

Comme pour l'étude précédente, avant de commencer l'apprentissage il est impératif de limiter au maximum les comportements de stress des animaux en les habituant à leur environnement de travail, aux objets utilisés, et à l'expérimentateur. Lorsque je suis arrivée au laboratoire, les animaux étaient déjà présents dans l'animalerie de travail depuis plusieurs mois. Ils étaient donc déjà habitués aux locaux et à leurs congénères. Dans un premier temps, les marmousets ont donc été familiarisés à l'expérimentateur. Pour cela, pendant 3 semaines, l'expérimentateur a passé environ 2 h par jour avec les animaux en leur distribuant des petits morceaux de marshmallow jusqu'à ce que tous les marmousets soient suffisamment en confiance pour venir chercher la friandise dans sa main sans crainte.

Une fois l'habituation à l'expérimentateur acquise, les marmousets ont été entraînés pendant 1 à 2 semaines à passer dans une cage de travail, spécialement conçue pour le CANTAB (Figure 78). Cette cage vient s'accoler à la cage d'hébergement, et l'ouverture de portes guillotines de mêmes dimensions sur chacune des cages permet le passage de l'animal de l'une à l'autre. Ce système a été conçu dans le but d'éviter le stress non négligeable qui aurait été entraîné par une capture manuelle. Le travail sur le CANTAB s'effectue dans un box de comportement adjacent au box d'hébergement des animaux. Les marmousets ont donc ensuite été habitués au transfert entre les 2 box et à l'isolement social qu'il implique. Cet isolement vis-à-vis des congénères permet de limiter les perturbations et d'éviter un mimétisme des erreurs. Le box de comportement dispose d'une caméra de surveillance permettant à l'expérimentateur de surveiller l'animal à distance. Ainsi, l'influence de l'expérimentateur est limitée pendant les tests. La phase d'habituation à l'isolement et aux différents sons émanant du CANTAB (bip et pompe) s'est réalisée en sessions quotidiennes de 10 min par animal.



Figure 78 : Cage de travail positionnée devant le CANTAB dans le box de comportement. La cage de travail dispose d'une petite porte guillotine permettant le passage de l'animal depuis sa cage d'hébergement, ainsi que d'une deuxième ouverture aux dimensions du CANTAB, permettant de mettre l'animal en contact avec l'écran tactile.

2.1.3 Renforcement

La phase de renforcement permet dans un premier temps d'initier le marmouset à la prise de récompense sur le CANTAB. Cette récompense est une récompense liquide, délivrée *via* un petit tuyau situé au milieu de l'écran tactile. Après plusieurs essais constitués de jus de pomme, de yaourt liquide, de compote ou encore de sirop, la récompense retenue a finalement été du milkshake à la banane. Dans un second temps, durant des sessions quotidiennes de 10 min par animal, les marmousets sont entraînés à lécher 0.1 mL de milkshake desservi pendant 5 secondes au milieu de l'écran après un signal sonore (4000Hz) de 1 seconde, et ce toutes les 8 secondes. Ces sessions permettent ainsi aux animaux de faire le lien entre le son, qui fait office de renforcement positif, et l'obtention de la récompense. Le renforcement est considéré comme acquis lorsque le marmouset vient correctement chercher la récompense au milieu de l'écran et qu'il adopte un comportement montrant que l'association entre le son et la récompense a bien été faite : il attend le signal sonore pour récolter le milkshake et ne tente pas de le lécher avant que le son n'ait retenti.

2.1.4 Touch-training

Une fois ce renforcement auditif acquis, les marmousets doivent apprendre à utiliser l'écran tactile pour réaliser les tests. Cette phase est appelée « *Touch-training* ». Pour que les animaux commencent à associer le fait de toucher l'écran avec l'obtention de la récompense, ils sont confrontés à une tache dans laquelle ils obtiennent une récompense dès qu'ils touchent un carré jaune présenté à l'écran. Dans un premier temps ce carré remplit la totalité de l'écran, ce qui signifie que l'animal peut toucher n'importe où pour obtenir la récompense. Si les animaux

touchent correctement l'écran, le milkshake est délivré après le même signal sonore que pour l'étape précédente. Celui-ci permet désormais d'indiquer la présence de la récompense et facilite le conditionnement au toucher de l'écran. Après 10 touches consécutives, la taille du carré réduit mais celui-ci reste au centre de l'écran. Toutes les dix touches, le carré rétrécit jusqu'à atteindre la taille des figures utilisées durant les tests, puis devient mobile sur l'écran (Figure 79). Ainsi, le marmouset est censé comprendre qu'il n'obtient pas la récompense en touchant un point fixe de l'écran, mais bien le carré. Cet entraînement a d'abord été réalisé en sessions quotidiennes de 10 min, avant de voir son rythme réduit à 3 fois par semaines afin d'augmenter la motivation des animaux à l'exercice. Le *touch-training* est réalisé jusqu'à ce que l'animal parvienne à toucher au moins 10 fois le carré mobile sur l'écran, en moins de 10 minutes.

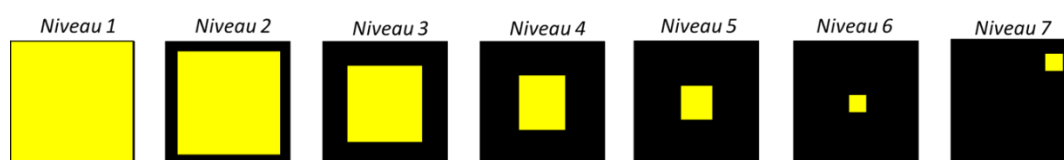


Figure 79 : Présentation des différents niveaux de difficulté du « Touch-training ». Au niveau 7, le carré change de position d'un essai à l'autre.

2.2 Entraînement à l'ORD et au DMP

2.2.1 Animaux utilisés

Quatre marmousets ont été entraînés à ces tests : 2 mâles et 2 femelles, tous âgés de 3 ans. Pour faciliter leur apprentissage, et éviter que les marmousets ne confondent les dispositifs, chaque animal n'a été entraîné qu'à un seul test. Les 2 mâles ont ainsi été entraînés au test du DMP, tandis que les femelles ont été entraînées à l'ORD. Toutefois, une des femelles a dû être retirée de ce protocole, car elle a intégré un protocole d'ischémie en cours d'étude.

De nouveau, les animaux étaient hébergés dans l'animalerie de protocole. Comme les tests nécessitent une motivation alimentaire, la nourriture était distribuée à la fin des sessions d'entraînement. L'eau était distribuée *ad libitum*.

Contrairement aux études précédentes, les marmousets de cette étude ont été hébergés par paire : les 2 femelles dans une cage et les 2 mâles dans une autre.

2.2.2 Test du contournement d'objet (Object Retrieval with Detour – ORD)

L'ORD évalue les fonctions exécutives et plus précisément les capacités de planification motrice impliquées dans une tâche de contournement d'obstacle, représenté par une barrière

transparente, pour atteindre une récompense. Pour obtenir cette récompense, l'animal doit être capable de contrôler les mouvements de ses bras, de choisir quel bras utiliser à chaque essai, et doit également inhiber une tendance naturelle à essayer d'atteindre directement la cible, sans réaliser de détour (Roberts & Wallis, 2000).

Le marmouset réalise ce test depuis sa cage d'hébergement. Une plateforme disposée au centre de sa cage lui permet de se tenir à hauteur du dispositif. Celui-ci est constitué d'un cube en plexiglas transparent (5x5x5 cm), avec un côté supprimé en guise d'ouverture. Ce cube est vissé à une planche en bois, fixée à une plaque de plexiglas, elle-même fixée à la cage de l'animal. Une fente horizontale est découpée en bas de la plaque de plexiglas pour permettre un accès au cube depuis l'intérieur de la cage.

Un morceau de marshmallow est placé à l'intérieur du cube, dont la face ouverte est positionnée à la droite du singe ou à sa gauche, de façon randomisée entre chaque essai. Ainsi, lorsque l'ouverture est du côté droit de l'animal, celui-ci doit utiliser son bras droit pour atteindre la friandise et *vice versa* (Figure 80). L'apprentissage est constitué de 30 essais par jour : 20 essais en condition facile le matin, et 10 essais en condition difficile l'après-midi. On parle de condition facile lorsque la récompense est placée au centre du cube. En condition difficile, la friandise est placée contre la face opposée à l'ouverture, ce qui augmente la difficulté de la tâche. Une session est considérée comme terminée lorsque tous les essais ont été réalisés, ou lorsque 30 min se sont écoulées depuis le début de l'exercice.

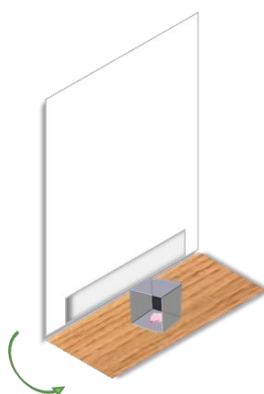


Figure 80 : Dispositif et principe de l'ORD. Une friandise est placée à l'intérieur d'un cube transparent constitué d'une face ouverte sur le côté. L'animal doit contourner l'obstacle pour atteindre la friandise sans se heurter aux autres faces du cube.

Les essais sont notés comme « parfaits » si la friandise est attrapée par un mouvement souple et précis du bon bras (bras droit pour le côté droit et gauche pour le côté gauche). Les autres essais sont notés comme étant « imparfaits ». Si l'animal met plus de 30 secondes à

recupérer la friandise, on qualifie l'essai « d'omission ». Durant l'apprentissage, l'expérimentateur note le nombre d'essais réussis parfaitement. Le test est considéré comme appris lorsque l'animal réalise au moins 80 % d'essais parfaits en condition difficile sur 3 sessions consécutives.

Une fois l'apprentissage acquis, lorsque ce test est utilisé pour évaluer des déficits post-ischémiques, d'autres analyses sont ajoutées. Lorsque l'animal réalise des essais imparfaits, l'expérimentateur note le nombre d'erreurs motrices et de rencontres avec l'obstacle. L'animal fait une erreur motrice lorsque le bras correct contourne l'obstacle mais ne parvenait pas à saisir ou à rapporter la friandise. Le marmouset rencontre l'obstacle lorsqu'il rencontre la face du cube se trouvant face à lui en tentant d'atteindre la friandise sans faire de détour. Lorsque l'ouverture du cube se trouve du côté controlatéral de l'animal, on distingue 2 types de rencontres d'obstacle : type 1 lorsque la main appropriée (controlatérale) touche la face du cube en face de l'animal, type 2, lorsque la main inappropriée (ipsilatérale) touche le cube en face de l'animal ou la face fermée du côté ipsilatéral de l'animal. De même, lorsque l'ouverture du cube se trouve du côté ipsilatéral de l'animal, on distingue 2 nouveaux types de rencontre d'obstacle : type 3, lorsque le bras inapproprié (controlatéral) rencontre la face fermée controlatérale ou le cube en face de l'animal, type 4, lorsque le bras approprié (ipsilatéral) rencontre le cube en face de l'animal.

Pour cette étude, nous nous sommes contentés d'estimer la faisabilité de ce test avec nos animaux avant tout protocole d'ischémie. Seul le nombre d'essais parfaits accomplis a donc été pris en compte.

2.2.3 *Delayed matching to position (DMP)*

Le test du DMP est un test qui permet d'évaluer la mémoire spatiale de travail. Pour obtenir une récompense cachée sous un objet, l'animal doit être capable de se souvenir de sa position parmi différents objets identiques (Lacreuse *et al.*, 2014).

Le marmouset réalise ce test depuis sa cage d'hébergement. Une plateforme disposée au centre de sa cage lui permet de se tenir à hauteur du dispositif. Celui-ci est constitué d'une planche en bois dans laquelle 4 puits circulaires ont été creusés. La planche est rattachée de façon perpendiculaire à un écran en plexiglas, lui-même fixé à la cage. Sur cet écran, une fente permet aux marmousets de passer les bras pour atteindre les puits. Les objets servant à cacher les récompenses sont des jetons de poker.

Au cours de l'apprentissage de ce test, il a d'abord fallu apprendre aux animaux le lien entre le jeton et la récompense. Pour cela, l'expérimentateur commence par mettre un morceau de marshmallow dans un puits sans le recouvrir. Lorsque le marmouset vient spontanément chercher la friandise, l'expérimentateur la recouvre d'un jeton, sous les yeux de l'animal. Pour un marmouset, cacher un objet équivaut à le faire disparaître, mais petit à petit celui-ci parvient à comprendre qu'en poussant le jeton, la récompense se trouve toujours en dessous. L'étape suivante consiste à placer un deuxième jeton en même temps que le premier, toujours sous les yeux de l'animal, pour que celui-ci comprenne qu'un des deux puits est vide (Figure 81). Il a fallu environ 1 mois à chaque marmouset pour que cette phase initiale soit acquise. L'apprentissage du DMP incluant le travail de la mémoire a ensuite pu commencer.

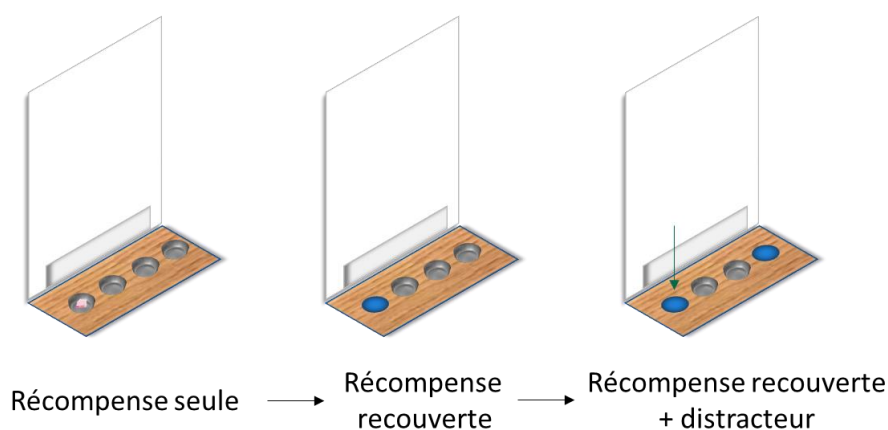


Figure 81 : Étapes initiales de l'apprentissage du DMP. La friandise est d'abord simplement déposée dans un puits pour être récupérée. Elle est ensuite recouverte d'un jeton sous les yeux de l'animal. Celui-ci doit le pousser pour récupérer la récompense. Enfin, avant que l'animal ne récupère la récompense sous le 1er jeton, un 2^{ème} est positionné afin que l'animal comprenne qu'un des jetons cache un puits vide.

Le principe du test est le suivant : dans un premier temps, un morceau de marshmallow est placé au fond d'un des 4 puits, puis un jeton est positionné par-dessus pour le cacher. L'animal récupère alors la friandise après avoir écarté le jeton. Un écran noir est ensuite positionné devant la vitre en plexiglas afin que le marmouset ne puisse plus voir les puits. Une nouvelle friandise, toujours recouverte d'un jeton, est alors placée au même endroit que la friandise précédente. Cependant cette fois-ci, un deuxième jeton, identique au premier, faisant office de distracteur, est positionné au-dessus d'un autre puits vide. L'écran noir est retiré, et le marmouset doit alors faire le bon choix entre les deux jetons pour obtenir la récompense. Pour cela, il doit se souvenir dans quel puits se trouvait la récompense qu'il a récupéré juste avant. Pour résumer, l'exercice se compose en 3 étapes : une étape d'acquisition pendant laquelle l'animal acquiert la connaissance de la position de la récompense, une étape de rétention (ou délais), pendant

laquelle l'animal ne voit plus et doit mémoriser la position de l'objet, puis une étape de choix entre la bonne réponse et un distracteur (Figure 82).

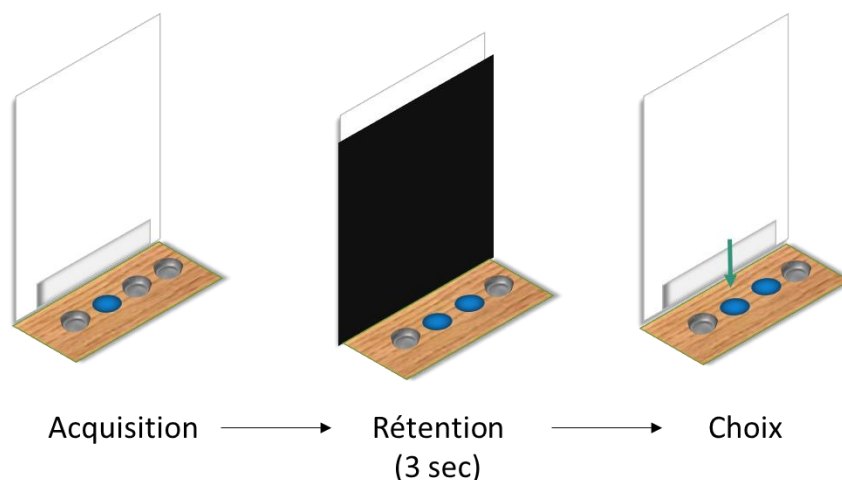


Figure 82 : Principes du DMP. Acquisition : le marmouset récupère une récompense placée sous un jeton. Rétention : Pendant 3 secondes, un écran noir bloque la vue au marmouset tandis qu'une nouvelle friandise recouverte d'un jeton est repositionnée au même endroit, cette fois-ci accompagnée d'un distracteur positionné sur un puits vide. Choix : L'écran noir est levé, et l'animal doit se souvenir de la position correcte de la récompense.

L'apprentissage est constitué de 20 essais par jour : 10 essais en condition facile le matin, et 10 essais en condition difficile l'après-midi. En condition facile, le choix de l'animal se porte sur les 2 puits situés aux extrémités du dispositif. En condition difficile, le choix se fait entre 2 puits voisins car la proximité des puits rend la tâche plus complexe pour le marmouset. Une session est considérée comme terminée lorsque tous les essais ont été réalisés, ou lorsque 30 minutes se sont écoulées depuis le début de l'exercice. A chaque session, l'expérimentateur note le nombre de bonnes réponses (c'est-à-dire lorsque le marmouset se souvient correctement de la position de la récompense). Le test est considéré comme appris lorsque l'animal réalise au moins 80% de bonnes réponses en condition difficile sur 3 sessions consécutives.

3 Résultats

3.1 Entraînement au CANTAB

L'apprentissage du CANTAB a nécessité au préalable en moyenne 20 ± 4 sessions quotidiennes d'habituation au passage dans la cage de travail, au transfert dans le box de comportement, à l'isolement, et aux différents sons de la machine. La phase de renforcement auditif a nécessité un peu plus de temps, en moyenne 32 ± 28 sessions. On remarque alors une

très forte variabilité entre les individus, certains nécessitant presque le double de sessions par rapport aux autres.

Durant la phase de touch-training, on constate là encore une grande hétérogénéité d'apprentissage entre les individus (Figure 83). Les marmousets 9291 et 9178 ont tous les deux eu une progression constante et ont réussi à atteindre le dernier niveau de difficulté après un nombre de sessions très proche (respectivement 31 et 33). Néanmoins, aucun des deux n'a réussi à achever ce niveau. Le marmouset 9238 a dans un premier temps progressé très rapidement avant de stagner au niveau 6. Cet animal avait fait un lien erroné entre le fait de toucher le centre de l'écran et l'obtention de la récompense, de ce fait, lorsque le carré devenait mobile, il échouait à chaque essai. Les deux derniers marmousets, 9081 et 9312, ont rencontré encore plus de difficulté dans la compréhension de la tâche en stagnant respectivement aux niveaux 3 et 4. Ainsi, tous les marmousets semblent atteindre une sorte de « plateau cognitif » et semblent de pas pouvoir progresser d'avantage malgré le nombre de sessions croissant.

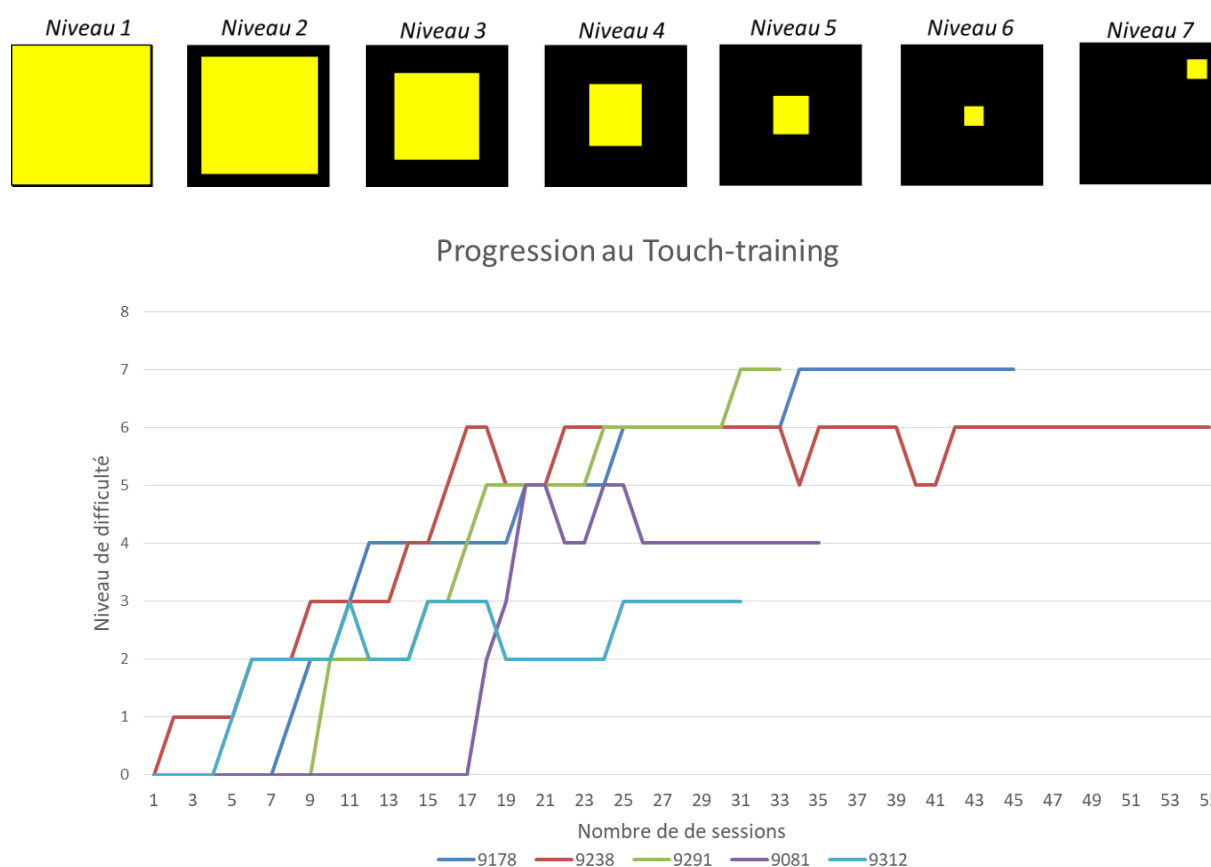


Figure 83 : Progression de chaque marmouset au touch-training. Les différents niveaux de difficulté sont représentés au-dessus du graphe.

3.2 Entraînement à l'ORD et au DMP

3.2.1 Progression à l'ORD

Initialement, 2 marmousets ont débuté l'apprentissage de ce test, mais après quelques sessions, l'un d'entre eux a dû intégrer un autre protocole et donc arrêter son entraînement. C'est pourquoi seules les données du marmouset restant sont montrées.

En condition facile, le marmouset remplit les critères de réussite (au moins 80 % d'essais parfaits sur 3 sessions consécutives) dès la 8^{ème} session. Les choses se compliquent en condition difficile puisque l'animal ne parvient pas à atteindre des critères de réussite en 15 sessions. Toutefois, on note une amélioration progressive des performances de la première à la dernière session d'apprentissage (Figure 84).

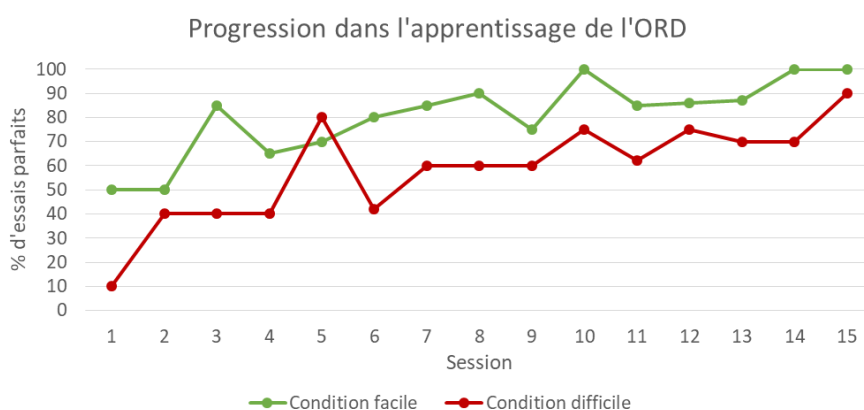


Figure 84 : Progression dans l'apprentissage de l'ORD. En condition facile, la récompense est située au centre du cube. En condition difficile, elle est placée au fond du cube.

3.2.2 Progression au DMP

Deux marmousets ont été entraînés à ce test. Tous deux ont au préalable réalisé l'apprentissage initial pendant environ 1 mois. En condition facile, on constate que le marmouset 2 remplit les critères de réussite dès les premières sessions d'apprentissage. Les performances sont un peu plus hétérogènes d'une session à l'autre pour le premier marmouset. A partir de la 10^{ème} session, les performances des 2 marmousets semble décroître. Ce phénomène peut être expliqué par la présence d'une femelle en chaleur dans le même box (Figure 85). En condition difficile, aucun des marmousets ne parvient à atteindre les critères de réussite en 15 sessions. De plus, il ne semble pas y avoir de progression dans les performances des animaux entre la première et la dernière session (Figure 86).

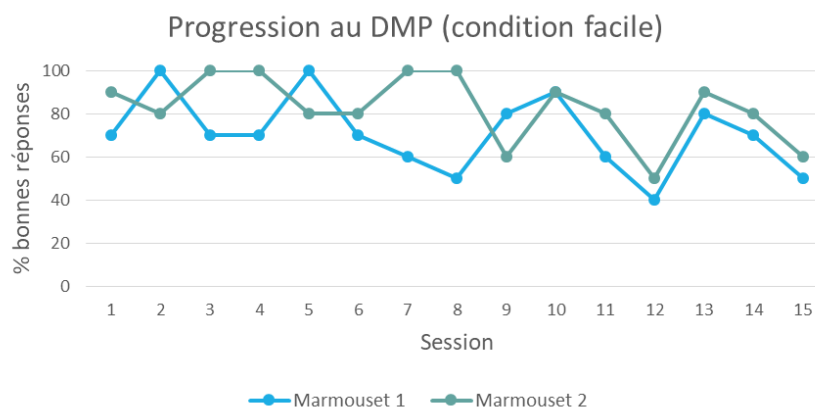


Figure 85 : Progression dans l'apprentissage du DMP en condition facile. Dans cette version, le choix de l'animal se porte sur 2 positions éloignées.

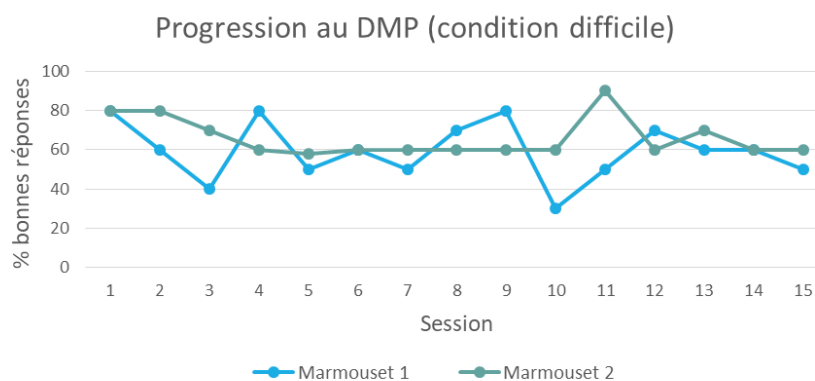


Figure 86 : Progression dans l'apprentissage du DMP en condition difficile. Dans cette version, le choix de l'animal se porte entre 2 positions voisines.

4 Discussion

Dans cette dernière étude, nous avons voulu mettre en place l'apprentissage de tests cognitifs chez le marmouset. Dans un premier temps, nous avons tenté de réaliser cet apprentissage au moyen du CANTAB. Le CANTAB est un outil d'évaluation des fonctions cognitives qui présente un grand intérêt pour les études translationnelles, car il est utilisé à la fois chez l'animal et chez l'Homme. De plus, comme tous les tests sont informatisés, il permet d'augmenter considérablement la précision des tests en se libérant des biais provoqués par le temps de réaction de l'expérimentateur. Toutefois, l'inconvénient majeur du CANTAB est qu'il nécessite généralement une période d'apprentissage beaucoup plus longue que les méthodes de test traditionnelles (Roque *et al.*, 2011). Chez l'animal, avant d'utiliser le CANTAB sur une

tâche cognitive donnée, plusieurs étapes d'apprentissage préliminaires sont nécessaires. La première étape consiste à habituer les animaux au dispositif et à son environnement de travail. La seconde étape permet de créer un renforcement auditif entre un signal sonore et l'attribution de la récompense. Ce signal sonore permettra ensuite de marquer avec précision les bonnes réponses de l'animal. Enfin, comme l'utilisation d'un écran tactile est loin d'être intuitive pour un animal, la dernière étape, appelée *touch-training*, consiste à leur apprendre à toucher un stimulus mobile à l'écran. Malheureusement, malgré un temps d'entraînement très conséquent, nos animaux ne sont jamais parvenus à maîtriser cette étape.

En débutant l'apprentissage du CANTAB, nous nous attendions à ce que le renforcement auditif soit assimilé en 3 ou 4 sessions maximum car il n'existe aucune information à ce sujet dans la littérature. Mais les marmousets ont mis énormément de temps avant de comprendre d'où sortait la récompense. En début de session, nous placions de la nourriture (morceaux de chamallow, de pomme ou de banane) juste à côté de la sortie de la récompense pour les attirer, mais dans la plupart des cas, les animaux récupéraient rapidement la friandise avant de s'éloigner aussitôt, sans prêter attention à la récompense liquide. De plus, il nous a fallu plusieurs sessions avant de trouver la récompense idéale. Le yaourt liquide, le sirop et le jus de fruit n'ont pas été très populaires. La compote était très appréciée mais avait tendance à rester bloquée dans le tube, même lorsqu'on la mélangeait à de l'eau. Finalement, le milkshake à la banane a fait l'unanimité. Il a tout de même fallu entre 1 et 2 mois de sessions quotidiennes pour que le renforcement auditif soit acquis.

Dans la littérature, il est décrit que le *touch-training* ne nécessite que 7 à 8 sessions d'apprentissage (Spinelli *et al.*, 2004). Dans le cas présent, seuls 2 marmousets sont parvenus à atteindre le dernier niveau de difficulté du *touch-training* après 33 et 35 sessions. Aucun des autres animaux n'a réussi à maîtriser cette étape. Cet écart de performance par rapport aux données de la littérature peut être expliqué par plusieurs facteurs. Tout d'abord, nos conditions de travail impliquaient un déplacement des animaux dans une cage de travail, ainsi qu'un isolement total vis-à-vis des congénères dans un box différent du box d'hébergement. Ce choix a initialement été fait afin d'éviter que les animaux reproduisent les erreurs des autres après les avoir observés. Cependant, ces conditions peuvent être anxiogènes pour les marmousets. Dans la littérature, le CANTAB est généralement présenté directement au niveau de la cage d'hébergement. Ainsi aucun déplacement des animaux n'est nécessaire, et ils restent à proximité des congénères, ce qui réduit leur niveau de stress (Spinelli *et al.*, 2004, 2006; Yamazaki *et al.*, 2016).

Les animaux inclus dans cette étude étaient également placés en hébergement individuel depuis leur arrivée dans l'animalerie de protocole, ces animaux étaient destinés à intégrer un protocole d'ischémie. Ils ont donc été placés en cage individuelle afin d'éviter tout désagrément de la part des congénères après la chirurgie. Mais le marmouset est un animal social, et l'isolement chronique peut mener au développement d'une dépression chez ces animaux (Galvão-Coelho *et al.*, 2017). Il est à noter que certains individus ont en effet développé des stéréotypies au cours de l'étude (balancement de la tête en arrière, épilation des poils de la queue...) pouvant refléter un état dépressif (Lutz, 2014). Or une dépression peut avoir pour conséquence l'apparition d'une anhédonie et de troubles de motivation, également chez le marmouset (Alexander *et al.*, 2019). Ceci pourrait en partie expliquer les mauvaises performances des animaux lors de l'entraînement au CANTAB. Pour tenter de limiter ce problème, nous avons enrichi le milieu de vie des marmousets. Des perches, des cordes, des miroirs, ainsi que des trapèzes ont été rajoutés dans les cages d'hébergement. Des bacs remplis de litière ont également été placés en dessous des cages afin de permettre aux animaux de fouiller et de récupérer la nourriture qui serait tombée par mégarde. Cet enrichissement a permis de limiter certaines stéréotypies, mais rien ne peut remplacer la stimulation d'une relation sociale. Dans la littérature, tous les marmousets dont les fonctions cognitives sont testées sont hébergés au minimum à 2 par cage (à l'exception des études sur la dépression) (Roberts & Wallis, 2000; Spinelli *et al.*, 2004; Lacreuse *et al.*, 2014; Yamazaki *et al.*, 2016; Sadoun *et al.*, 2019). Placer les animaux par paires suffit à éliminer l'apparition de comportements typiques de la dépression (Galvão-Coelho *et al.*, 2017).

Un autre paramètre ayant pu limiter les performances des marmousets lors de l'apprentissage est leur âge. En effet, tous les marmousets inclus dans cette étude étaient âgés de 7 ans. Or, dans une étude récente, Sadoun et collaborateurs ont démontré qu'un déclin cognitif lié au vieillissement apparaissait chez les marmousets (Sadoun *et al.*, 2019). Les performances au DMP sur le CANTAB de 35 marmousets âgés de 2 à 14 ans ont été mesurées. Leurs résultats indiquent que dès 4 ans, une baisse de motivation, une augmentation de la distractibilité ainsi qu'une augmentation de la frustration sont détectées. À partir de 6 ans, des déficits liés à l'application de stratégies apparaissent également. Il se pourrait donc que l'apprentissage du CANTAB fonctionne mieux avec des animaux âgés de moins de 4 ans.

Il semblerait donc que les conditions réunies dans cette étude ne soient pas optimales pour un apprentissage optimal du CANTAB. Afin de vérifier que les raisons exposées étaient bien en cause de l'échec d'apprentissage chez nos animaux, nous avons entamé l'apprentissage de

nouveaux tests cognitifs dans de nouvelles conditions. Cette fois-ci, pour limiter les déficits causés par le déclin cognitif lié au vieillissement, les animaux étaient tous âgés de 3 ans. De plus, afin de s'assurer que des troubles du comportement liés à l'isolement social chronique ne viennent biaiser l'apprentissage des tests, les animaux ont été hébergés par paire. Enfin, afin de limiter le stress provoqué par un isolement durant les sessions de travail, l'apprentissage des tests a été réalisé directement au niveau de la cage d'hébergement des animaux. Toutefois, les résultats obtenus ne sont que préliminaires, car faute de temps, l'apprentissage n'a pas pu aboutir. De plus les données méritent d'être complétées avec des animaux supplémentaires.

Les tests retenus, l'ORD et le DMP, sont des tests qui permettent d'évaluer des fonctions cognitives couramment atteintes après une ischémie cérébrale : les fonctions exécutives, et la mémoire de travail (Lacreuse *et al.*, 2014; Baba *et al.*, 2015).

Nos données indiquent que l'animal entraîné au test de l'ORD parvient à atteindre les critères de réussite fixés à partir de la 11^{ème} session en condition facile. Ce résultat est en accord avec ce qui peut être retrouvé dans la littérature (Murai *et al.*, 2013). Durant le temps imparti, les critères de réussite n'ont pas été atteints en condition difficile, mais étant donné la progression constante de l'animal au fur et à mesure des sessions, on peut supposer que l'apprentissage complet de ce test n'était qu'une question de temps.

L'apprentissage du DMP semble un peu plus complexe. Même si l'un des marmousets parvient rapidement à maîtriser ce test en condition facile, les deux animaux ne semblent pas progresser en condition difficile. De nombreuses études font usage de ce test pour évaluer la mémoire de travail des marmousets. Au moyen du DMP, Yamazaki et collaborateurs ont évalué jusqu'à quelle durée de rétention maximale les marmousets étaient capables de réussir l'exercice (Yamazaki *et al.*, 2016). Lorsque les animaux parvenaient à maîtriser la tâche pour un temps de mémorisation donné, celui-ci était augmenté à l'essai suivant. Ils ont ainsi démontré que le marmouset avait une mémoire de travail spatiale pouvant aller jusqu'à 116 secondes. Bien entendu, plus le délai est important, plus le nombre de sessions nécessaires pour que les animaux puissent atteindre des critères de réussite est élevé. Dans une étude de Lacreuse et collaborateurs, les marmousets ont pu remplir les critères de réussite du DMP en condition difficile en 60 sessions pour un délai de rétention de 6 secondes (Lacreuse *et al.*, 2014). Dans le cas présent, nous utilisons un délai d'1 seconde afin de ne pas rallonger le temps d'apprentissage. Nos animaux devraient donc pouvoir maîtriser l'exercice en moins de 60 sessions. Néanmoins, il semblerait que 15 sessions d'apprentissage ne soient pas suffisantes.

D'autre part, les performances des marmousets en condition facile semblent diminuer à partir de la 8^{ème} session, et ce jusqu'à la fin de la période de test. En effet, les 2 animaux entraînés à cet exercice sont des mâles, et il se trouve qu'une femelle du box était en chaleur durant cette période. Ce phénomène pointe du doigt l'inconvénient majeur des tests réalisés dans la cage d'hébergement car ce faisant, les congénères peuvent être une grande source de distraction pour les animaux en train de travailler. Toutefois comme nous l'avons vu plus tôt, l'isolement des marmousets pendant l'exercice n'est pas une solution. De plus, ce phénomène est amplifié par l'horaire de session imposée par l'expérimentateur. Puisque sa présence est nécessaire à la réalisation des tests, le marmouset n'a pas le loisir de pouvoir choisir le moment qui lui est le plus opportun pour travailler. Sous cette contrainte, il se peut que les animaux ne soient tout simplement pas enclins à travailler à ce moment donné. De plus, d'après des études du rythme circadien du marmouset, celui-ci connaît un creux d'activité dans la journée, entre 11 h et 14 h (Melo *et al.*, 2016). Or, lorsque plusieurs animaux doivent être testés dans la journée par l'expérimentateur, il arrive bien souvent que plusieurs d'entre eux aient à travailler durant ces heures, ce qui signifie que leurs performances peuvent être biaisées. Ainsi, pour une meilleure réalisation des tests, l'idéal serait que les marmousets puissent travailler en autonomie, sans programmation d'horaire. Pour cela il faudrait que les dispositifs de test soient fixés aux cages d'hébergement, accompagnés d'un système permettant d'automatiser la tâche et de recueillir les résultats grâce à un système de caméra, ou d'enregistrement numérique des données. Cette solution n'est pas applicable aux dispositifs d'ORD et de DMP dont nous disposons. Cependant, il existe désormais des dispositifs automatisés permettant aux singes de réaliser des tâches cognitives sans la présence de l'expérimentateur. Ces dispositifs sont constitués d'un écran tactile accompagné d'un système de reconnaissance des animaux grâce au scan de leur puce (Gazes *et al.*, 2013). Les animaux peuvent ainsi venir se placer devant l'écran pour travailler, sans contrainte, à la simple force de leur motivation.

Dans cette étude, nous avons posé les bases des conditions requises pour un apprentissage efficace de tests cognitifs sur le CANTAB. Avec nos conditions de travail actuelles, nous n'avons pas pu achever les premières phases de maîtrise de cet outil. Il serait désormais intéressant de renouveler l'expérience en réalisant les tests dans le box d'hébergement, sur des animaux jeunes et hébergés en groupes sociaux. Le CANTAB est un outil de recherche pertinent dans l'étude des déficits cognitifs post-ischémiques, mais qui, même dans des conditions optimales, demande un temps de mise en place très long qu'il est nécessaire de prévoir.

Même si nous n'avons pas pu achever l'apprentissage de l'ORD et du DMP faute de temps, les résultats préliminaires obtenus sont encourageants, et semblent indiquer que les conditions de travail étaient réunies pour un apprentissage de ces tests. Il faudrait désormais compléter ces données avec un nombre plus important d'animaux, et sur une plus longue période d'apprentissage. Néanmoins, moyennant un temps d'apprentissage suffisant, il semble tout à fait envisageable de pouvoir intégrer ces tests à un protocole d'ischémie cérébrale afin de pouvoir évaluer l'évolution des déficits cognitifs sous-jacents.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Malgré les nombreuses recherches précliniques et cliniques réalisées, les thérapies de revascularisation du tissu cérébral par thrombolyse ou thrombectomie demeurent les seuls traitements disponibles capables de limiter les séquelles d'un AVC (Ghobrial *et al.*, 2014; Spiotta *et al.*, 2015). Cependant, l'existence de nombreuses contre-indications ainsi que la fenêtre thérapeutique très étroite de ces thérapies limitent grandement leur utilisation (Craig *et al.*, 2019). De ce fait, l'AVC demeure la seconde pathologie la plus meurtrière au monde, ainsi que la première cause d'handicap acquis chez l'adulte (Ferro *et al.*, 2016; Kessner *et al.*, 2016; Thrift *et al.*, 2017). La recherche pharmaceutique actuelle se concentre tout d'abord sur des stratégies de neuroprotection, qui pourraient permettre d'augmenter la fenêtre d'action des thérapies de reperfusion en limitant l'expansion du foyer ischémique (Hankey, 2017). D'autre part, les thérapies permettant d'améliorer la régénération/plasticité tissulaire post-AVC, et donc la récupération fonctionnelle des patients, constituent également une piste thérapeutique largement étudiée.

Les travaux présentés dans cette thèse s'orientent principalement sur l'étude des effets neuroprotecteurs et régénérateurs post-ischémiques d'un agent de la matrice extracellulaire, le RGTA.

Le RGTA est un agent mimétique des HS qui constituent la MEC. Il possède ainsi les mêmes propriétés de liaison aux protéines structurelles de la MEC, ainsi qu'aux facteurs de croissance impliqués dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale comme le VEGF ou le FGF (Tardieu *et al.*, 1992; Rouet *et al.*, 2005a, 2006). Toutefois, contrairement aux HS, le RGTA est capable de résister aux attaques enzymatiques. Ainsi, à la suite d'une lésion tissulaire, le RGTA remplace les HS dégradés et ce faisant permet d'une part de stabiliser l'échafaudage de la matrice, mais également de maintenir la biodisponibilité des facteurs de croissance impliqués dans plusieurs processus de régénération tissulaire (Barritault *et al.*, 2017b). Les propriétés régénératrices du RGTA ont déjà été mises en avant chez l'animal comme chez l'Homme dans la réparation de tissus cutanés, osseux, oculaires, myocardiques, musculaire ou encore tendineux (Desgranges *et al.*, 1999; Yamauchi *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2009; Barritault *et al.*, 2017b). Le potentiel thérapeutique du RGTA à la suite d'une ischémie cérébrale a également été démontré récemment dans notre laboratoire, chez le rat soumis à une ischémie focale (Khelif *et al.*, 2018a). Ces travaux ont en effet permis de mettre en avant une neuroprotection ainsi qu'une amélioration de la récupération fonctionnelle chez les animaux

traités par le RGTA. Les effets optimaux en terme de neuroprotection et récupération fonctionnelle ont pu être obtenus avec une administration de 0.5 mg/kg de RGTA, 1 h après l'ischémie cérébrale. Toutefois, au cours de ces travaux, la détermination de la voie optimale d'administration n'avait pas été faite, et le traitement était systématiquement injecté par voie intraveineuse.

La première partie de mes travaux de thèse a donc consisté à évaluer l'efficacité d'une administration intra-artérielle de RGTA afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec une administration intraveineuse. La voie intraveineuse n'est que peu invasive, mais une grande quantité du produit injecté *via* cette voie se retrouve diluée dans la circulation systémique, si bien qu'une dose importante du traitement est nécessaire pour obtenir l'effet attendu. En comparaison, l'administration d'un produit par voie intra-artérielle, au niveau de la carotide interne, permet d'atteindre directement le tissu cible sans passer par la circulation systémique. De ce fait, la quantité de produit nécessaire pour atteindre l'effet pharmacologique souhaité peut être grandement diminuée, ce qui permet d'une part de réduire le coût du traitement, mais également de réduire les éventuels risques de toxicité liés au traitement. De plus, ce mode d'administration peut bénéficier des nouvelles méthodes de reperfusion par voie intra-artérielle et ainsi ne nécessiter aucune intervention supplémentaire pour obtenir l'accès artériel. Nos résultats indiquent que l'injection intra-artérielle de 2.22 µg de RGTA après une ischémie focale chez le rat permet d'obtenir les mêmes effets neuroprotecteurs qu'une injection intraveineuse de 0.5 mg/kg, soit 150 µg de RGTA pour un rat pesant 300 g. Si aucune toxicité du RGTA n'a été rapportée à la suite de ses utilisations cliniques dans des applications cutanées ou ophtalmiques (Barritault *et al.*, 2017b) il est important de noter qu'aucune de ces utilisations ne nécessitait une dose aussi importante que celle suggérée dans le traitement d'une ischémie cérébrale par voie intraveineuse. L'avantage d'une administration intra-artérielle apparaît donc clairement, car elle permet de réduire considérablement la quantité de RGTA injectée, et donc le risque d'effets secondaires, tout en maintenant son efficacité optimale. Des études complémentaires sont tout de même nécessaires afin de déterminer si la voie intra-artérielle permet d'obtenir les mêmes bénéfices sur la récupération fonctionnelle que ceux observés à la suite d'une injection intraveineuse.

Comme nous l'avons vu, le RGTA à lui seul offre un potentiel thérapeutique prometteur dans le traitement de l'ischémie cérébrale. Toutefois, ses propriétés ciblant la MEC pourraient également aider à potentialiser d'autres thérapies. En effet, il a été démontré que l'injection de CSMs après une ischémie cérébrale permettait de réduire le volume lésionnel et d'améliorer la

récupération fonctionnelle. Cependant la survie des CSMs dans un milieu ischémié est très limitée, et elles ne peuvent donc pas atteindre leur efficacité optimale. Or, il a été démontré que l'utilisation concomitante de CSMs et d'un hydrogel constitué de GAGs enrichis en HS permettait d'améliorer la survie des CSMs après ischémie focale chez la souris (Zhong *et al.*, 2010). Cet hydrogel constitue en effet un support favorable à la prolifération des CSMs. De la même façon, des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont permis de mettre en évidence une potentialisation des CSMs par le RGTA après ischémie focale chez le rat normotendu (Khelif *et al.*, soumis). En effet, l'injection de RGTA le jour de l'ischémie, suivie d'une co-administration de RGTA et de CSMs 24 h plus tard, a permis d'obtenir une réduction persistante du volume lésionnel, ainsi qu'une meilleure récupération fonctionnelle. Nous avons ensuite voulu vérifier si les effets bénéfiques de cette thérapie combinée étaient également retrouvés chez des rats atteints d'hypertension artérielle.

L'hypertension artérielle est le premier facteur de risque de l'AVC ainsi qu'un facteur aggravant de la pathologie (Letourneur *et al.*, 2011a). L'hypertension artérielle va entraîner un épaissement des parois des vaisseaux sanguins et donc un rétrécissement de la lumière. Ainsi, au cours d'une ischémie cérébrale, l'apport sanguin venant des vaisseaux collatéraux et permettant aux cellules de la pénombre de subsister est très fortement diminué (Bernard & Waeber, 2009). De ce fait, chez les individus hypertendus, les dommages irréversibles causés au tissu cérébral évoluent rapidement, sont plus importants et laissent une place limitée à une protection potentielle par des traitements. C'est pourquoi très peu de traitements efficaces chez des individus normotendus maintiennent leur efficacité en présence d'hypertension artérielle (O'Collins *et al.*, 2013). Nos résultats montrent d'ailleurs l'absence d'effet thérapeutique après injection de RGTA seul chez les animaux hypertendus, alors que des effets neuroprotecteurs et neurorégénérateurs étaient présents chez les animaux normotendus. Il faut toutefois souligner que la dose testée était 1,5 mg/kg, dose non optimale mais pour laquelle des effets bénéfiques avaient tout de même été retrouvés chez les animaux normotendus. Toutefois, l'administration de RGTA combiné aux CSMs permet de protéger le tissu cérébral et d'améliorer la récupération fonctionnelle même en cas d'hypertension artérielle. Des études complémentaires sont nécessaires afin de vérifier l'idée que des effets bénéfiques encore plus importants puissent être obtenus en utilisant 0.5 mg/kg de RGTA, dose optimale retenue chez le rat.

Ces résultats soulignent donc l'intérêt de combiner du RGTA aux CSMs comme traitement post-ischémique pertinent. En effet, comme nous l'avons spécifié plus tôt, le RGTA permet de remplacer les HS dégradés tout en résistant aux attaques enzymatiques, et ainsi, de

maintenir la structure de la MEC après une ischémie. De ce fait, les fonctions d'adhésion cellulaire de la MEC sont maintenues, ce qui favorise la survie des cellules transplantées. Par ailleurs, en présence de RGTA, les facultés d'écotaxie des CSMs dans la région péri-lésionnelle sont améliorées (Annexe 1). D'autre part, il a été prouvé que les effets bénéfiques attribués aux CSMs étaient liés à leur capacité à sécréter divers facteurs de croissance impliqués dans les mécanismes de neuroprotection et de réparation cellulaire. Or, il se trouve que le RGTA a également la capacité de se lier à ces facteurs, et de promouvoir leur biodisponibilité et leurs interactions avec leurs récepteurs respectifs. Néanmoins, la question du mécanisme d'action du RGTA permettant de potentialiser les effets des CSMs reste en suspens, et de nombreuses analyses supplémentaires sont nécessaires afin de connaître la biodistribution des facteurs de croissance impliqués dans les phénomènes de régénération tissulaire à la suite de ce traitement. Outre la possible amélioration de la biodisponibilité des facteurs trophiques sécrétés par les CSMs, l'action du RGTA pourrait également reposer sur une interaction avec les exosomes libérés par les CSMs. Au même titre que les facteurs de croissances libérés par les CSMs, il a été prouvé que la seule présence de ces exosomes permettait de protéger le tissu cérébral et d'améliorer la récupération fonctionnelle après une ischémie cérébrale chez le rat. (Xin *et al.*, 2013). On peut donc envisager de tester l'administration de ces exosomes, couplés au RGTA, afin d'évaluer si les effets bénéfiques observés se maintiennent.

Dans tous nos protocoles, le RGTA s'est avéré efficace après la reperfusion des animaux. Dans le cas d'une utilisation clinique, il faut donc envisager que le RGTA soit administré à la suite d'une thrombectomie ou d'une thrombolyse. De ce fait, le RGTA peut être amené à interagir avec le rt-PA. Malgré ses effets bénéfiques sur la recanalisation des vaisseaux, le rt-PA a également des effets neurotoxiques. Après son administration, il augmente notamment l'activation des MMPs, ce qui a pour conséquence de dégrader d'avantage la BHE (Tsuji *et al.*, 2005). Grâce à ses propriétés de restauration de la MEC, on peut supposer que le RGTA est en mesure de contrer les effets toxiques du rt-PA, et donc de potentialiser son action neuroprotectrice. Des études complémentaires visant à évaluer l'interaction du RGTA et du t-PA sont donc à envisager.

A travers ces études, nous avons pu mettre en avant le fort potentiel de la thérapie matricielle à base de RGTA combinée à une thérapie cellulaire à base de CSMs. En vue d'augmenter les chances de succès de cette thérapie en phase clinique, il faudrait désormais confirmer ces résultats chez une espèce plus proche de l'Homme comme le marmouset.

Parmi les nombreuses approches thérapeutiques testées et efficaces chez l'animal, aucune n'a pour le moment passé le stade des essais cliniques. Cet échec de translation serait en partie causé par l'utilisation de modèles rongeurs, trop éloignés de l'Homme. Afin d'y remédier, le comité STAIR préconise l'utilisation de primates non-humains pour confirmer les résultats obtenus chez le rongeur, avant de passer en phase clinique. C'est dans le but de répondre à ces recommandations que nous avons cherché à valider les effets bénéfiques du RGTA chez le marmouset commun. Pour cela, nous nous sommes basés sur les résultats obtenus au cours de la première étude de cette thèse, et avons donc administré une dose de RGTA adaptée au marmouset de 8.88 μg par voie intra-artérielle. Malheureusement les résultats que nous avons obtenus ne nous permettent pas d'affirmer l'efficacité du traitement chez cette espèce. Toutefois, plusieurs facteurs peuvent expliquer ce manque de résultats. Tout d'abord, tandis qu'il est possible d'évaluer les effets de plusieurs doses chez le rat, il n'y a qu'une seule dose qui a été administrée chez le marmouset. On peut donc penser que celle-ci n'est pas la plus efficace pour cette espèce. De plus, dans cette étude, le RGTA a été administré à 3 h post-ischémie. Or nos données révèlent qu'à ce temps, il ne reste déjà plus de tissu pouvant être protégé. La fenêtre thérapeutique choisie ne semble donc pas adaptée au marmouset, et un temps d'administration plus précoce aurait peut-être rendu une neuroprotection possible. Cependant, bien que le seuil de significativité ne soit jamais atteint, certains tests comportementaux semblent révéler une légère tendance à une meilleure récupération fonctionnelle des animaux traités par le RGTA. Cette idée est par ailleurs renforcée par les corrélations obtenues entre les dommages cérébraux et les déficits comportementaux. En effet, chez les animaux contrôles, on retrouve des corrélations similaires aux cas cliniques. En revanche, quel que soit le test ou le type de valeur mesurée, ces corrélations disparaissent chez les animaux traités par le RGTA. On peut donc penser que ces animaux ont de meilleures performances aux tests, bien que trop subtiles pour pouvoir être détectées statistiquement. Cette étude n'a été réalisée que sur 10 animaux. Un échantillon plus important nous aurait peut-être permis de dégager statistiquement des différences entre les deux groupes. Ainsi, il serait intéressant dans un premier temps, de compléter nos données actuelles avec de nouveaux animaux, puis de renouveler l'étude en intégrant cette fois-ci de nouvelles doses de RGTA, et une fenêtre thérapeutique plus étroite. La dernière partie de ces travaux de thèse s'est penchée sur la mise en place de tests cognitifs chez le marmouset dans un contexte d'ischémie cérébrale. En effet, contrairement aux fonctions sensorimotrices qui sont couramment étudiées en recherche préclinique, les fonctions cognitives sont encore trop ignorées (Brainin *et al.*, 2015). De plus, les primates possèdent un éventail comportemental plus riche que les rongeurs, ce qui

rend possible la réalisation de tâches quasi similaires à celles retrouvées en clinique. Dans un premier temps, nous avons voulu exercer les marmousets à l'utilisation d'un outil permettant d'évaluer différentes fonctions cognitives au moyen d'un écran tactile : le CANTAB. Le but originel de cet apprentissage était de pouvoir entraîner les marmousets au DMP, un test qui permet d'évaluer la mémoire de travail, souvent impactée à la suite d'un AVC (Yamazaki *et al.*, 2016). Mais cet apprentissage n'a pas pu aboutir car les animaux ne sont pas parvenus à maîtriser les premières étapes d'apprentissage du CANTAB. Nous avons découvert par la suite que plusieurs facteurs pouvaient en être la cause. Le premier de ces facteurs se rapporte à l'environnement de travail des marmousets pendant les sessions de tests. En effet, les sessions d'entraînement se déroulaient toutes dans un box séparé du box d'hébergement. Les animaux étaient donc complètement isolés de leur congénère, ce qui peut générer un très grand stress chez ces animaux et ainsi impacter leurs performances. De plus, les animaux inclus dans ce protocole étaient tous hébergés en cage individuelle. Cet isolement chronique peut déclencher un état dépressif chez le marmouset qui a besoin de contacts sociaux de proximité pour un bien-être optimal (Galvão-Coelho *et al.*, 2017). L'état dépressif chez le marmouset, comme chez l'Homme, peut conduire à des troubles de la motivation ou du plaisir et donc avoir des répercussions négatives sur ses capacités à réaliser un test quel qu'il soit (Alexander *et al.*, 2019). Enfin, le dernier facteur pouvant limiter la réussite des animaux, est leur âge. Tous les animaux inclus dans cette étude avaient 7 ans. Or il a été prouvé qu'un déclin cognitif lié au vieillissement apparaissait dès l'âge de 4 ans chez le marmouset (Sadoun *et al.*, 2019). Dans la seconde partie de cette étude, nous avons donc démarré un nouvel apprentissage cognitif, en éliminant ces facteurs. Des animaux plus jeunes, et hébergés par deux, ont réalisé un apprentissage préliminaire aux tests de l'ORD et du DMP, au moyen de dispositifs plus classiques accolés à leur cage d'hébergement. Ces apprentissages n'ont pas pu aboutir faute de temps, et aucune conclusion ne peut être tirée compte tenu du très faible nombre d'animaux ayant participé, mais les résultats préliminaires obtenus sont encourageants. L'évaluation des fonctions cognitives est un pilier manquant aux études précliniques actuelles, et le marmouset paraît être le modèle animal idéal pour les étudier. Nous connaissons désormais les conditions nécessaires au bon apprentissage du CANTAB. Il serait donc envisageable de recommencer cet apprentissage en les prenant en compte afin d'intégrer l'évaluation cognitive aux futurs protocoles sur l'ischémie cérébrale. Toutefois, l'utilisation du CANTAB demande beaucoup de temps, même en conditions optimales (au minimum 4 mois une fois passées les phases de renforcement auditif et de *touch-training*). Les versions classiques des tests représentent donc une alternative tout autant réalisable dans les mêmes conditions, mais moins chronophages.

RÉFÉRENCES

- Abdullahi W, Tripathi D & Ronaldson PT (2018). Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection. *Am J Physiol, Cell Physiol* **315**, C343–C356.
- Abou-Chebl A (2013). Intra-Arterial Therapy for Acute Ischemic Stroke. *Interv Neurol* **1**, 100–108.
- Alawieh A, Zhao J & Feng W (2018). Factors affecting post-stroke motor recovery: Implications on neurotherapy after brain injury. *Behav Brain Res* **340**, 94–101.
- Albert ML (1973). A simple test of visual neglect. *Neurology* **23**, 658–664.
- Alegiani AC, MacLean S, Braass H, Siemonsen S, Gerloff C, Fiehler J, Cho T-H, Derex L, Hermier M, Berthezene Y, Nighoghossian N & Thomalla G (2017). Comprehensive analysis of early fractional anisotropy changes in acute ischemic stroke. *PLoS One*; DOI: 10.1371/journal.pone.0188318.
- Alexander L, Gaskin PLR, Sawiak SJ, Fryer TD, Hong YT, Cockcroft GJ, Clarke HF & Roberts AC (2019). Fractionating Blunted Reward Processing Characteristic of Anhedonia by Over-Activating Primate Subgenual Anterior Cingulate Cortex. *Neuron* **101**, 307-320.e6.
- Al-Qazzaz NK, Ali SH, Ahmad SA, Islam S & Mohamad K (2014). Cognitive impairment and memory dysfunction after a stroke diagnosis: a post-stroke memory assessment. *Neuropsychiatr Dis Treat* **10**, 1677–1691.
- Altman J (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* **135**, 1127–1128.
- Annett LE, Martel FL, Rogers DC, Ridley RM, Baker HF & Dunnett SB (1994). Behavioral assessment of the effects of embryonic nigral grafts in marmosets with unilateral 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* **125**, 228–246.
- Annett LE, Rogers DC, Hernandez TD & Dunnett SB (1992). Behavioural analysis of unilateral monoamine depletion in the marmoset. *Brain* **115** (Pt 3), 825–856.
- Anon (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* **333**, 1581–1587.
- Clinical Trials Registry | Internet Stroke Center. Available at: <http://www.strokecenter.org>
- Arba F, Quinn T, Hankey GJ, Inzitari D, Ali M, Lees KR & VISTA Collaboration (2017). Determinants of post-stroke cognitive impairment: analysis from VISTA. *Acta Neurol Scand* **135**, 603–607.

- Arboix A (2015). Cardiovascular risk factors for acute stroke: Risk profiles in the different subtypes of ischemic stroke. *World J Clin Cases* **3**, 418–429.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z & Lindvall O (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* **8**, 963–970.
- Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME & Lo EH (2000). Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 1681–1689.
- Asahi M, Sumii T, Fini ME, Itohara S & Lo EH (2001). Matrix metalloproteinase 2 gene knockout has no effect on acute brain injury after focal ischemia. *Neuroreport* **12**, 3003–3007.
- Ashish (2017). Circle Of Willis: Anatomy, Diagram And Functions » Science ABC. *Science ABC*. Available at: <https://www.scienceabc.com/humans/circle-of-willis-anatomy-diagram-and-functions.html> [Accessed July 22, 2019].
- Astrup J, Symon L, Branston NM & Lassen NA (1977). Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* **8**, 51–57.
- Baba S, Murai T, Nakako T, Enomoto T, Ono M, Shimizu I & Ikeda K (2015). The serotonin 5-HT_{1A} receptor agonist tandospirone improves executive function in common marmosets. *Behav Brain Res* **287**, 120–126.
- Bach-y-Rita P (1990). Brain plasticity as a basis for recovery of function in humans. *Neuropsychologia* **28**, 547–554.
- Bacigaluppi M, Comi G & Hermann DM (2010). Animal Models of Ischemic Stroke. Part Two: Modeling Cerebral Ischemia. *Open Neurol J* **4**, 34–38.
- Bandtlow CE & Zimmermann DR (2000). Proteoglycans in the Developing Brain: New Conceptual Insights for Old Proteins. *Physiological Reviews* **80**, 1267–1290.
- Banerjee C, Moon YP, Paik MC, Rundek T, Mora-McLaughlin C, Vieira JR, Sacco RL & Elkind MSV (2012). Duration of diabetes and risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Study. *Stroke* **43**, 1212–1217.
- Bang OY (2016). Clinical Trials of Adult Stem Cell Therapy in Patients with Ischemic Stroke. *Journal of Clinical Neurology* **12**, 14.
- Bang OY & Kim EH (2019). Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicle Therapy for Stroke: Challenges and Progress. *Front Neurol*; DOI: 10.3389/fneur.2019.00211.
- Barbosa I, Morin C, Garcia S, Duchesnay A, Oudghir M, Jenniskens G, Miao H-Q, Guimond S, Carpentier G, Cebrian J, Caruelle J-P, van Kuppevelt T, Turnbull J, Martelly I & Papy-Garcia D (2005). A synthetic glycosaminoglycan mimetic (RGTA) modifies natural glycosaminoglycan species during myogenesis. *Journal of Cell Science* **118**, 253–264.

- Bardutzky J, Shen Q, Henninger N, Bouley J, Duong TQ & Fisher M (2005). Differences in Ischemic Lesion Evolution in Different Rat Strains Using Diffusion and Perfusion Imaging. *Stroke* **36**, 2000–2005.
- Barritault D, Desgranges P, Meddahi-Pellé A, Denoix J-M & Saffar J-L (2017a). RGTA®-based matrix therapy – A new branch of regenerative medicine in locomotion. *Joint Bone Spine* **84**, 283–292.
- Barritault D, Gilbert-Sirieix M, Rice KL, Siñeriz F, Papy-Garcia D, Baudouin C, Desgranges P, Zakine G, Saffar J-L & van Neck J (2017b). RGTA® or ReGeneraTing Agents mimic heparan sulfate in regenerative medicine: from concept to curing patients. *Glycoconj J* **34**, 325–338.
- Barritault D, Gilbert-Sirieix M, Rice KL, Siñeriz F, Papy-Garcia D, Baudouin C, Desgranges P, Zakine G, Saffar J-L & van Neck J (2017c). RGTA® or ReGeneraTing Agents mimic heparan sulfate in regenerative medicine: from concept to curing patients. *Glycoconjugate journal* **34**, 325–338.
- Bartholomeusz B, Hardy KJ, Nelson AS & Phillips PA (1998). Modulation of nitric oxide improves cyclosporin A-induced hypertension in rats and primates. *J Hum Hypertens* **12**, 839–844.
- Beckett NS, Peters R, Fletcher AE, Staessen JA, Liu L, Dumitrascu D, Stoyanovsky V, Antikainen RL, Nikitin Y, Anderson C, Belhani A, Forette F, Rajkumar C, Thijs L, Banya W, Bulpitt CJ & HYVET Study Group (2008). Treatment of hypertension in patients 80 years of age or older. *N Engl J Med* **358**, 1887–1898.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL & Bartkowski H (1986). Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* **17**, 472–476.
- Beery AK (2018). Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies. *Current Opinion in Behavioral Sciences* **23**, 143–149.
- Beis J-M et al. (2004). Right spatial neglect after left hemisphere stroke: qualitative and quantitative study. *Neurology* **63**, 1600–1605.
- Bernard F & Waeber A (2009). Hypertension artérielle : macrocirculation et microcirculation. *Revue Médicale Suisse*. Available at: <https://www.revmed.ch/RMS/2009/RMS-216/Hypertension-arterielle-macrocirculation-et-microcirculation> [Accessed September 23, 2019].
- Bhagat Y (2007). *Diffusion Tensor Imaging of the Human Brain* (thesis).
- Bhagat YA, Hussain MS, Stobbe RW, Butcher KS, Emery DJ, Shuaib A, Siddiqui MM, Maheshwari P, Al-Hussain F & Beaulieu C (2008). Elevations of diffusion anisotropy are associated with hyper-acute stroke: a serial imaging study. *Magnetic Resonance Imaging* **26**, 683–693.
- Bhat VM, Cole JW, Sorkin JD, Wozniak MA, Malarcher AM, Giles WH, Stern BJ & Kittner SJ (2008). Dose-response relationship between cigarette smoking and risk of ischemic stroke in young women. *Stroke* **39**, 2439–2443.

- Bihel E, Pro-Sistiaga P, Letourneur A, Toutain J, Saulnier R, Insausti R, Bernaudin M, Roussel S & Touzani O (2010). Permanent or transient chronic ischemic stroke in the non-human primate: behavioral, neuroimaging, histological, and immunohistochemical investigations. *Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism: Official Journal Of The International Society Of Cerebral Blood Flow And Metabolism* **30**, 273–285.
- Bihel E, Roussel S, Toutain J, Bernaudin M & Touzani O (2011). Diffusion Tensor MRI Reveals Chronic Alterations in White Matter Despite the Absence of a Visible Ischemic Lesion on Conventional MRI. *Stroke* **42**, 1412–1419.
- Billings PC & Pacifici M (2015). Interactions of signaling proteins, growth factors and other proteins with heparan sulfate: Mechanisms and mysteries. *Connect Tissue Res* **56**, 272–280.
- Boehme AK, Esenwa C & Elkind MSV (2017). Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circ Res* **120**, 472–495.
- Bogousslavsky J, Victor SJ, Salinas EO, Pallay A, Donnan GA, Fieschi C, Kaste M, Orgogozo J-MM, Chamorro A, Desmet A & European-Australian Fibrinolytic (Trafermin) in Acute Stroke Group (2002). Fibrinolytic (trafermin) in acute stroke: results of the European-Australian phase II/III safety and efficacy trial. *Cerebrovasc Dis* **14**, 239–251.
- Bona M, Hvizdosova N, Jachova J, Bonova P & Kluchova D (2019). Response of distant regions affected by diaschisis commissuralis in one of the most common models of transient focal ischemia in rats. *J Chem Neuroanat* **101**, 101666.
- Bonnans C, Chou J & Werb Z (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 786–801.
- Bouët V, Freret T, Toutain J, Divoux D, Boulouard M & Schumann-Bard P (2007). Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Exp Neurol* **203**, 555–567.
- Brainin M, Tuomilehto J, Heiss W-D, Bornstein NM, Bath PMW, Teuschl Y, Richard E, Guekht A, Quinn T & the Post Stroke Cognition Study Group (2015). Post-stroke cognitive decline: an update and perspectives for clinical research. *Eur J Neurol* **22**, 229-e16.
- Brenneman M, Sharma S, Harting M, Strong R, Cox CS, Aronowski J, Grotta JC & Savitz SI (2010). Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **30**, 140–149.
- Burman KJ, Palmer SM, Gamberini M, Spitzer MW & Rosa MGP (2008). Anatomical and physiological definition of the motor cortex of the marmoset monkey. *J Comp Neurol* **506**, 860–876.
- Burman KJ, Reser DH, Yu H-H & Rosa MGP (2011). Cortical input to the frontal pole of the marmoset monkey. *Cereb Cortex* **21**, 1712–1737.
- Carmichael ST (2005). Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* **2**, 396–409.

- Carrion Jr R & Patterson JL (2012). An animal model that reflects human disease: the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Current Opinion in Virology* **2**, 357–362.
- Castro-Alamancos MA & Borrel J (1995). Functional recovery of forelimb response capacity after forelimb primary motor cortex damage in the rat is due to the reorganization of adjacent areas of cortex. *Neuroscience* **68**, 793–805.
- Chamberlain SR, Robbins TW, Winder-Rhodes S, Müller U, Sahakian BJ, Blackwell AD & Barnett JH (2011). Translational approaches to frontostriatal dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder using a computerized neuropsychological battery. *Biol Psychiatry* **69**, 1192–1203.
- Changyaleket B, Deliu Z, Chignalia AZ & Feinstein DL (2017). Heparanase: Potential roles in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* **310**, 72–81.
- Chaudhary G, Sharma U, Jagannathan NR & Gupta YK (2003). Evaluation of *Withania somnifera* in a middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **30**, 399–404.
- Chauhan G & Debette S (2016). Genetic Risk Factors for Ischemic and Hemorrhagic Stroke. *Curr Cardiol Rep*; DOI: 10.1007/s11886-016-0804-z.
- Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC & Chopp M (2003). Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* **73**, 778–786.
- Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M, Miyatake K & Kangawa K (2001). Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* **32**, 1005–1011.
- Cheng X, Wang H, Zhang X, Zhao S, Zhou Z, Mu X, Zhao C & Teng W (2017). The Role of SDF-1/CXCR4/CXCR7 in Neuronal Regeneration after Cerebral Ischemia. *Front Neurosci*; DOI: 10.3389/fnins.2017.00590.
- Chevalier F, Lavergne M, Negroni E, Ferratge S, Carpentier G, Gilbert-Sirieix M, Siñeriz F, Uzan G & Albanese P (2014). Glycosaminoglycan mimetic improves enrichment and cell functions of human endothelial progenitor cell colonies. *Stem cell research* **12**, 703–715.
- Chin Y, Sato Y, Mase M, Kato T, Herculano B, Sekino M, Ohsaki H, Ageyama N, Ono F, Terao K, Yoshikawa Y & Hisatsune T (2010). Transient decrease in cerebral motor pathway fractional anisotropy after focal ischemic stroke in monkey. *Neurosci Res* **66**, 406–411.
- Chun H-YY, Whiteley WN, Dennis MS, Mead GE & Carson AJ (2018). Anxiety After Stroke. *Stroke* **49**, 556–564.
- Chuquet J, Benchenane K, Toutain J, MacKenzie ET, Roussel S & Touzani O (2002). Selective blockade of endothelin-B receptors exacerbates ischemic brain damage in the rat. *Stroke* **33**, 3019–3025.

- Colbourne F, Corbett D, Zhao Z, Yang J & Buchan AM (2000). Prolonged but delayed postischemic hypothermia: a long-term outcome study in the rat middle cerebral artery occlusion model. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 1702–1708.
- Coleman ER, Moudgal R, Lang K, Hyacinth HI, Awosika OO, Kissela BM & Feng W (2017). Early Rehabilitation After Stroke: a Narrative Review. *Curr Atheroscler Rep* **19**, 59.
- Combs HL, Jones TA, Kozlowski DA & Adkins DL (2016). Combinatorial Motor Training Results in Functional Reorganization of Remaining Motor Cortex after Controlled Cortical Impact in Rats. *J Neurotrauma* **33**, 741–747.
- Craig LE, Middleton S, Hamilton H, Cudlip F, Swatzell V, Alexandrov AV, Lightbody E, Watkins DC, Philip S, Cadilhac DA, McInnes E, Dale S & Alexandrov AW (2019). Does the Addition of Non-Approved Inclusion and Exclusion Criteria for rtPA Impact Treatment Rates? Findings in Australia, the UK, and the USA. *INE* **8**, 1–12.
- Crowell RM, Olsson Y, Klatzo I & Ommaya A (1970). Temporary Occlusion of the Middle Cerebral Artery in the Monkey: Clinical and Pathological Observations. *Stroke* **1**, 439–448.
- Daubail B, Tissier C, Legris N, Hervieu-Begue M, Ricolfi F, Honnart D, Giroud M, Bejot Y & Freysz M (2015). Si j'avais un accident vasculaire cérébral aigu en 2015. *La Presse Médicale* **44**, 502–508.
- Davis S & Donnan GA (2014). Time Is Penumbra: Imaging, Selection and Outcome. *CED* **38**, 59–72.
- De Haan R, Horn J, Limburg M, Van Der Meulen J & Bossuyt P (1993). A comparison of five stroke scales with measures of disability, handicap, and quality of life. *Stroke* **24**, 1178–1181.
- De Pourville G (2016). Coût de la prise en charge des accidents vasculaires cérébraux en France. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements* **8**, 161–168.
- De Roquefeuil E, Molinier S & DOUSSET V (2014). *Neuro-imagerie de l'AVC*.
- Deb P, Sharma S & Hassan KM (2010). Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology* **17**, 197–218.
- Demaerschalk BM, Demchuk AM, Fugate JE, Grotta JC, Khalessi AA, Levy EI, Palesch YY & Prabhakaran S (2016). *AHA / ASA Scientific Statement Scientific Rationale for the Inclusion and Exclusion Criteria for Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke*.
- Demain B, Davoust C, Plas B, Bolan F, Boulanouar K, Renaud L, Darmana R, Vaysse L, Vieu C & Loubinoux I (2015). Corticospinal Tract Tracing in the Marmoset with a Clinical Whole-Body 3T Scanner Using Manganese-Enhanced MRI. *PLOS ONE* **10**, e0138308.
- Desgranges P, Barbaud C, Caruelle JP, Barritault D & Gautron J (1999). A substituted dextran enhances muscle fiber survival and regeneration in ischemic and denervated rat EDL muscle. *FASEB J* **13**, 761–766.

- Detante O, Jaillard A, Moisan A, Barbieux M, Favre IM, Garambois K, Hommel M & Remy C (2014). Biotherapies in stroke. *Revue Neurologique* **170**, 779–798.
- Diener H-C, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Shuaib A, Ashwood T, Wasiewski W, Alderfer V, Hårdemark H-G, Rodichok L & SAINT I and II Investigators (2008). NXY-059 for the treatment of acute stroke: pooled analysis of the SAINT I and II Trials. *Stroke* **39**, 1751–1758.
- DiLuca M & Olesen J (2014). The Cost of Brain Diseases: A Burden or a Challenge? *Neuron* **82**, 1205–1208.
- Dirnagl U, Iadecola C & Moskowitz MA (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**, 391–397.
- Drago D, Cossetti C, Iraci N, Gaude E, Musco G, Bachi A & Pluchino S (2013a). The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie* **95**, 2271–2285.
- Drago D, Cossetti C, Iraci N, Gaude E, Musco G, Bachi A & Pluchino S (2013b). The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie* **95**, 2271–2285.
- Dufrane D, van Steenberghe M, Guiot Y, Goebbels R-M, Saliez A & Gianello P (2006). Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity. *Transplantation* **81**, 36–45.
- Duverger D & MacKenzie ET (1988). The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age. *J Cereb Blood Flow Metab* **8**, 449–461.
- Eastwood JD, Engelter ST, MacFall JF, DeLong DM & Provenzale JM (2003). Quantitative Assessment of the Time Course of Infarct Signal Intensity on Diffusion-Weighted Images. *American Journal of Neuroradiology* **24**, 680–687.
- England TJ, Sprigg N, Alasheev AM, Belkin AA, Kumar A, Prasad K & Bath PM (2016). Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) for stroke: an individual patient data meta-analysis. *Sci Rep*; DOI: 10.1038/srep36567.
- Fan J, Li Y, Fu X, Li L, Hao X & Li S (2017). Nonhuman primate models of focal cerebral ischemia. *Neural Regen Res* **12**, 321–328.
- Feldman HM, Yeatman JD, Lee ES, Barde LHF & Gaman-Bean S (2010). Diffusion Tensor Imaging: A Review for Pediatric Researchers and Clinicians. *J Dev Behav Pediatr* **31**, 346–356.
- Ferrara A, El Bejaoui S, Seyen S, Tirelli E & Plumier J-C (2009). The usefulness of operant conditioning procedures to assess long-lasting deficits following transient focal ischemia in mice. *Behav Brain Res* **205**, 525–534.
- Ferro JM, Caeiro L & Figueira ML (2016). Neuropsychiatric sequelae of stroke. *Nat Rev Neurol* **12**, 269–280.
- Fischer KE & Austad SN (2011). The development of small primate models for aging research. *ILAR J* **52**, 78–88.

- Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH & STAIR Group (2009). Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke* **40**, 2244–2250.
- Folkman J & Klagsbrun M (1987). Vascular physiology. A family of angiogenic peptides. *Nature* **329**, 671–672.
- Frantz C, Stewart KM & Weaver VM (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* **123**, 4195–4200.
- Freret T, Bouet V, Leconte C, Roussel S, Chazalviel L, Divoux D, Schumann-Bard P & Boulouard M (2009). Behavioral deficits after distal focal cerebral ischemia in mice: Usefulness of adhesive removal test. *Behav Neurosci* **123**, 224–230.
- Freret T, Bouet V, Toutain J, Saulnier R, Pro-Sistiaga P, Bihel E, MacKenzie ET, Roussel S, Schumann-Bard P & Touzani O (2008). Intraluminal Thread Model of Focal Stroke in the Non-Human Primate. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**, 786–796.
- Frescaline G, Boudierlique T, Huynh MB, Papy-Garcia D, Courty J & Albanese P (2012a). Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res* **8**, 180–192.
- Frescaline G, Boudierlique T, Huynh MB, Papy-Garcia D, Courty J & Albanese P (2012b). Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research* **8**, 180–192.
- Frescaline G, Boudierlique T, Huynh MB, Papy-Garcia D, Courty J & Albanese P (2012c). Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research* **8**, 180–192.
- Frescaline G, Boudierlique T, Mansoor L, Carpentier G, Baroukh B, Sineriz F, Trouillas M, Saffar J-L, Courty J, Lataillade J-J, Papy-Garcia D & Albanese P (2013). Glycosaminoglycan mimetic associated to human mesenchymal stem cell-based scaffolds inhibit ectopic bone formation, but induce angiogenesis in vivo. *Tissue engineering Part A* **19**, 1641–1653.
- Fugate JE & Rabinstein AA (2015). Absolute and Relative Contraindications to IV rt-PA for Acute Ischemic Stroke. *Neurohospitalist* **5**, 110–121.
- Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T, Koziol JA, Eggleston LL & del Zoppo GJ (2004). Focal Cerebral Ischemia Induces Active Proteases That Degrade Microvascular Matrix. *Stroke* **35**, 998–1004.
- Fukuda S, Zoppo D & J G (2003). Models of Focal Cerebral Ischemia in the Nonhuman Primate. *ILAR J* **44**, 96–104.
- Gaede P, Lund-Andersen H, Parving H-H & Pedersen O (2008). Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med* **358**, 580–591.

- Galvão-Coelho NL, Galvão AC de M, da Silva FS & de Sousa MBC (2017). Common Marmosets: A Potential Translational Animal Model of Juvenile Depression. *Front Psychiatry*; DOI: 10.3389/fpsy.2017.00175.
- Gazes RP, Brown EK, Basile BM & Hampton RR (2013). Automated cognitive testing of monkeys in social groups yields results comparable to individual laboratory based testing. *Anim Cogn* **16**, 445–458.
- Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Kluge A, Bachmann A, Fisher M, Kaps M & Bachmann G (2004a). Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke* **35**, 566–571.
- Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Kluge A, Bachmann A, Fisher M, Kaps M & Bachmann G (2004b). Noninvasive Quantification of Brain Edema and the Space-Occupying Effect in Rat Stroke Models Using Magnetic Resonance Imaging. *Stroke* **35**, 566–571.
- Ghobrial GM, Chalouhi N, Zohra M, Dalyai RT, Ghobrial ML, Rincon F, Flanders AE, Tjoumakaris SI, Jabbour P, Rosenwasser RH & Fernando Gonzalez L (2014). Saving the ischemic penumbra: endovascular thrombolysis versus medical treatment. *J Clin Neurosci* **21**, 2092–2095.
- Ghuman H, Massensini AR, Donnelly J, Kim S-M, Medberry CJ, Badylak SF & Modo M (2016). ECM hydrogel for the treatment of stroke: Characterization of the host cell infiltrate. *Biomaterials* **91**, 166–181.
- Girard S, Murray KN, Rothwell NJ, Metz GAS & Allan SM (2014). Long-term functional recovery and compensation after cerebral ischemia in rats. *Behav Brain Res* **270**, 18–28.
- Giroud Marie, Delpont Benoit, Daubail Benoit, Blanc Christelle, Durier Jérôme, Giroud Maurice & Béjot Yannick (2017). Temporal Trends in Sex Differences With Regard to Stroke Incidence. *Stroke* **48**, 846–849.
- Grefkes C & Ward NS (2014). Cortical reorganization after stroke: how much and how functional? *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **20**, 56–70.
- Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC & Lipton SA (2002). S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* **297**, 1186–1190.
- Guibert R, Fonta C & Plouraboué F (2010). Cerebral blood flow modeling in primate cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* **30**, 1860–1873.
- Habegger S, Wiest R, Weder BJ, Mordasini P, Gralla J, Häni L, Jung S, Reyes M & McKinley R (2018). Relating Acute Lesion Loads to Chronic Outcome in Ischemic Stroke—An Exploratory Comparison of Mismatch Patterns and Predictive Modeling. *Front Neurol*; DOI: 10.3389/fneur.2018.00737.

- Haelewyn B, Freret T, Pacary E, Schumann-Bard P, Boulouard M, Bernaudin M & Bouët V (2007). Long-term evaluation of sensorimotor and mnesic behaviour following striatal NMDA-induced unilateral excitotoxic lesion in the mouse. *Behav Brain Res* **178**, 235–243.
- Hall J, D. H. Wood L & Schmidt G (2019). *Principles of critical care / editors Jesse B. Hall, Gregory A. Schmidt, Lawrence D. H. Wood.*
- Hankey GJ (2017). Stroke. *Lancet* **389**, 641–654.
- Hantson L, De Weerdts W, De Keyser J, Diener HC, Franke C, Palm R, Van Orshoven M, Schoonderwalt H, De Klippel N & Herroelen L (1994). The European Stroke Scale. *Stroke* **25**, 2215–2219.
- Hara Y (2015). Brain plasticity and rehabilitation in stroke patients. *J Nippon Med Sch* **82**, 4–13.
- Harrison TC, Silasi G, Boyd JD & Murphy TH (2013). Displacement of sensory maps and disorganization of motor cortex after targeted stroke in mice. *Stroke* **44**, 2300–2306.
- Hearn JP (2012). *Reproduction in New World Primates: New Models in Medical Science.* Springer Science & Business Media.
- Heiss WD, Huber M, Fink GR, Herholz K, Pietrzyk U, Wagner R & Wienhard K (1992). Progressive derangement of periinfarct viable tissue in ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **12**, 193–203.
- Heuer K, Gulban OF, Bazin P-L, Osoianu A, Valabregue R, Santin M, Herbin M & Toro R (2019). Evolution of neocortical folding: A phylogenetic comparative analysis of MRI from 34 primate species. *bioRxiv*; DOI: 10.1101/379750.
- Hikishima K, Quallo MM, Komaki Y, Yamada M, Kawai K, Momoshima S, Okano HJ, Sasaki E, Tamaoki N, Lemon RN, Iriki A & Okano H (2011). Population-averaged standard template brain atlas for the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neuroimage* **54**, 2741–2749.
- Hildebrandt H, Schütze C, Ebke M, Brunner-Beeg F & Eling P (2005). Visual search for item- and array-centered locations in patients with left middle cerebral artery stroke. *Neurocase* **11**, 416–426.
- Hill JJ, Jin K, Mao XO, Xie L & Greenberg DA (2012). Intracerebral chondroitinase ABC and heparan sulfate proteoglycan glypican improve outcome from chronic stroke in rats. *PNAS* **109**, 9155–9160.
- Hou S, Xu Q, Tian W, Cui F, Cai Q, Ma J & Lee I-S (2005). The repair of brain lesion by implantation of hyaluronic acid hydrogels modified with laminin. *J Neurosci Methods* **148**, 60–70.
- Hsu CC-T, Kwan GNC, Hapugoda S, Craigie M, Watkins TW & Haacke EM (2017). Susceptibility weighted imaging in acute cerebral ischemia: review of emerging technical concepts and clinical applications. *Neuroradiol J* **30**, 109–119.

- Huffman KJ & Krubitzer L (2001). Area 3a: topographic organization and cortical connections in marmoset monkeys. *Cereb Cortex* **11**, 849–867.
- Hung C-C, Yen CC, Ciuchta JL, Papoti D, Bock NA, Leopold DA & Silva AC (2015a). Functional MRI of visual responses in the awake, behaving marmoset. *Neuroimage* **120**, 1–11.
- Hung C-C, Yen CC, Ciuchta JL, Papoti D, Bock NA, Leopold DA & Silva AC (2015b). Functional MRI of visual responses in the awake, behaving marmoset. *Neuroimage* **120**, 1–11.
- Hung C-C, Yen CC, Ciuchta JL, Papoti D, Bock NA, Leopold DA & Silva AC (2015c). Functional Mapping of Face-Selective Regions in the Extrastriate Visual Cortex of the Marmoset. *J Neurosci* **35**, 1160–1172.
- Ikeda S, Harada K, Ohwatashi A, Kamikawa Y, Yoshida A & Kawahira K (2013). A New Non-Human Primate Model of Photochemically Induced Cerebral Infarction ed. Arumugam TV. *PLoS ONE* **8**, e60037.
- Johansson Barbro B. (2000). Brain Plasticity and Stroke Rehabilitation. *Stroke* **31**, 223–230.
- Jonasson O, Jones CW, Bauman A, John E, Manaligod J & Tso MO (1985). The pathophysiology of experimental insulin-deficient diabetes in the monkey. Implications for pancreatic transplantation. *Ann Surg* **201**, 27–39.
- Jones TA (2017). Motor compensation and its effects on neural reorganization after stroke. *Nat Rev Neurosci* **18**, 267–280.
- Joshi S, Ellis JA & Emala CW (2014). Revisiting intra-arterial drug delivery for treating brain diseases or is it “déjà-vu, all over again”? *J Neuroanaesth Crit Care* **1**, 108–115.
- Kaas JH (2012). The evolution of neocortex in primates. *Prog Brain Res* **195**, 91–102.
- Kaplan HA (1977). Blood supply of the brain. *Surgical neurology* **8**, 40.
- Karatas A, Yilmaz H, Coban G, Koker M & Uz A (2015). The anatomy of circulus arteriosus cerebri (circle of willis): a study in turkish population. *Turkish Neurosurgery*; DOI: 10.5137/1019-5149.JTN.13281-14.1.
- Kawabori M & Yenari MA (2015). Inflammatory Responses in Brain Ischemia. *Curr Med Chem* **22**, 1258–1277.
- Kehagia AA, Murray GK & Robbins TW (2010). Learning and cognitive flexibility: frontostriatal function and monoaminergic modulation. *Curr Opin Neurobiol* **20**, 199–204.
- Kenmuir CL & Wechsler LR (2017). Update on cell therapy for stroke. *Stroke Vasc Neurol* **2**, 59–64.
- Kernan Walter N., Inzucchi Silvio E., Sawan Carla, Macko Richard F. & Furie Karen L. (2013). Obesity. *Stroke* **44**, 278–286.

- Kessner SS, Bingel U & Thomalla G (2016). Somatosensory deficits after stroke: a scoping review. *Top Stroke Rehabil* **23**, 136–146.
- Khatri P, Wechsler LR & Broderick JP (2007). Intracranial hemorrhage associated with revascularization therapies. *Stroke* **38**, 431–440.
- Khelif Y, Toutain J, Quittet M-S, Chantepie S, Laffray X, Valable S, Divoux D, Sineriz F, Pascolo-Rebouillat E, Papy-Garcia D, Barritault D, Touzani O & Bernaudin M (2018a). A heparan sulfate-based matrix therapy reduces brain damage and enhances functional recovery following stroke. *Theranostics* **8**, 5814–5827.
- Khelif Y, Toutain J, Quittet M-S, Chantepie S, Laffray X, Valable S, Divoux D, Sineriz F, Pascolo-Rebouillat E, Papy-Garcia D, Barritault D, Touzani O & Bernaudin M (2018b). A heparan sulfate-based matrix therapy reduces brain damage and enhances functional recovery following stroke. *Theranostics* **8**, 5814–5827.
- Kilic E, Kilic U, Bacigaluppi M, Guo Z, Abdallah NB, Wolfer DP, Reiter RJ, Hermann DM & Bassetti CL (2008). Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res* **45**, 142–148.
- Kim HJ & Park J-S (2017). Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: Advantages and Disadvantages. *Development & reproduction* **21**, 1–10.
- Kim HY & Han S-H (2006). Matrix Metalloproteinases in Cerebral Ischemia. *J Clin Neurol* **2**, 163–170.
- King A (2018). The search for better animal models of Alzheimer’s disease. *Nature* **559**, S13.
- Kishi N, Sato K, Sasaki E & Okano H (2014). Common marmoset as a new model animal for neuroscience research and genome editing technology. *Develop Growth Differ* **56**, 53–62.
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T & Ooneda G (1986). Experimental studies of ischemic brain edema. *Nosotchu* **8**, 1–8.
- Komatsu K, Honmou O, Suzuki J, Houkin K, Hamada H & Kocsis JD (2010). Therapeutic time window of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after cerebral ischemia. *Brain Research* **1334**, 84–92.
- Krakauer JW, Carmichael ST, Corbett D & Wittenberg GF (2012). Getting Neurorehabilitation Right – What Can We Learn From Animal Models? *Neurorehabil Neural Repair* **26**, 923–931.
- Kramer J, Moeller EL, Hachey A, Mansfield KG & Wachtman LM (2009). Differential expression of GLUT2 in pancreatic islets and kidneys of New and Old World nonhuman primates. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **296**, R786–R793.
- Krause M, Phan TG, Ma H, Sobey CG & Lim R (2019). Cell-Based Therapies for Stroke: Are We There Yet? *Front Neurol*; DOI: 10.3389/fneur.2019.00656.

- Kumar S (2016a). Kumar S. Hypertension and Ischemic Stroke. *Hypertens J.* 2016;2:39-43. *Hypertension Journal* **2**, 39–43.
- Kumar S (2016b). Hypertension and Ischemic Stroke. *Hypertension Journal* **2**, 39–43.
- Kumita W, Sato K, Suzuki Y, Kurotaki Y, Harada T, Zhou Y, Kishi N, Sato K, Aiba A, Sakakibara Y, Feng G, Okano H & Sasaki E (2019). Efficient generation of Knock-in/Knock-out marmoset embryo via CRISPR/Cas9 gene editing. *Sci Rep* **9**, 12719.
- Kuroda S, Tsuchidate R, Smith M-L, Maples KR & Siesjö BK (1999). Neuroprotective Effects of a Novel Nitron, NXY-059, after Transient Focal Cerebral Ischemia in the Rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**, 778–787.
- Lacreuse A, Chang J, Metevier CM, LaClair M, Meyer JS & Ferris CM (2014). Oestradiol modulation of cognition in adult female marmosets (*Callithrix jacchus*). *J Neuroendocrinol* **26**, 296–309.
- Lau LW, Cua R, Keough MB, Haylock-Jacobs S & Yong VW (2013). Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. *Nat Rev Neurosci* **14**, 722–729.
- Lawes CMM, Bennett DA, Feigin VL & Rodgers A (2004). Blood pressure and stroke: an overview of published reviews. *Stroke* **35**, 1024.
- Le Gal R, Bernaudin M, Toutain J & Touzani O (2017). Assessment of behavioural deficits following ischaemic stroke in the marmoset. *Behavioural Brain Research*; DOI: 10.1016/j.bbr.2017.07.042.
- Lecoffre C, de Peretti C, Gabet A, Grimaud O, Woimant F, Giroud M, Béjot Y & Olié V (2017). National Trends in Patients Hospitalized for Stroke and Stroke Mortality in France, 2008 to 2014. *Stroke* **48**, 2939–2945.
- Leconte C, Tixier E, Freret T, Toutain J, Saulnier R, Boulouard M, Roussel S, Schumann-Bard P & Bernaudin M (2009). Delayed hypoxic postconditioning protects against cerebral ischemia in the mouse. *Stroke* **40**, 3349–3355.
- Lee JM, Kim BS, Lee H & Im G II (2012). In vivo tracking of mesenchymal stem cells using fluorescent nanoparticles in an osteochondral repair model. *Molecular Therapy* **20**, 1434–1442.
- Lee SH, Jin KS, Bang OY, Kim BJ, Park SJ, Lee NH, Yoo KH, Koo HH & Sung KW (2015). Differential migration of mesenchymal stem cells to ischemic regions after middle cerebral artery occlusion in rats. *PLoS ONE* **10**, 1–11.
- Lees KR et al. (2010). 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.
- Leker RR, Lasri V & Chernoguz D (2009). Growth factors improve neurogenesis and outcome after focal cerebral ischemia. *J Neural Transm* **116**, 1397–1402.

- Lerman LO, Chade AR, Sica V & Napoli C (2005). Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med* **146**, 160–173.
- Letourneur A, Roussel S, Toutain J, Bernaudin M & Touzani O (2011a). Impact of Genetic and Renovascular Chronic Arterial Hypertension on the Acute Spatiotemporal Evolution of the Ischemic Penumbra: A Sequential Study with MRI in the Rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **31**, 504–513.
- Letourneur A, Roussel S, Toutain J, Bernaudin M & Touzani O (2011b). Impact of genetic and renovascular chronic arterial hypertension on the acute spatiotemporal evolution of the ischemic penumbra: A sequential study with MRI in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **31**, 504–513.
- Li J, Li J, Zhang X, Lu Z, Ping S & Wei L (2011). Expression of heparanase in vascular cells and astrocytes of the mouse brain after focal cerebral ischemia. *Brain Research* **1433**, 137–144.
- Li J, Li J-P, Zhang X, Lu Z, Yu SP & Wei L (2012). Expression of heparanase in vascular cells and astrocytes of the mouse brain after focal cerebral ischemia. *Brain Res* **1433**, 137–144.
- Li Y & Chopp M (1999). Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res* **838**, 1–10.
- Liang D, Bhatta S, Gerzanich V & Simard JM (2007). Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg Focus* **22**, E2.
- Lim JY, Jeong CH, Jun JA, Kim SM, Ryu CH, Hou Y, Oh W, Chang JW & Jeun S-S (2011). Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia. *Stem Cell Res Ther* **2**, 38.
- Lin G, Zhuang C, Shen Z, Xiao G, Chen Y, Shen Y, Zong X & Wu R (2018). APT Weighted MRI as an Effective Imaging Protocol to Predict Clinical Outcome After Acute Ischemic Stroke. *Front Neurol*; DOI: 10.3389/fneur.2018.00901.
- Lin X (2004). Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* **131**, 6009–6021.
- Lindner MD, Gribkoff VK, Donlan NA & Jones TA (2003). Long-lasting functional disabilities in middle-aged rats with small cerebral infarcts. *J Neurosci* **23**, 10913–10922.
- Lindvall O & Kokaia Z (2015). Neurogenesis following Stroke Affecting the Adult Brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; DOI: 10.1101/cshperspect.a019034.
- Liu C, Ye FQ, Yen CC-C, Newman JD, Glen D, Leopold DA & Silva AC (2018). A digital 3D atlas of the marmoset brain based on multi-modal MRI. *NeuroImage* **169**, 106–116.
- Liu C, Yen CC-C, Szczupak D, Ye FQ, Leopold DA & Silva AC (2019). Anatomical and functional investigation of the marmoset default mode network. *Nat Commun* **10**, 1–8.

- Liu J, Solway K, Messing RO & Sharp FR (1998). Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* **18**, 7768–7778.
- Liu JV, Hirano Y, Nascimento GC, Stefanovic B, Leopold DA & Silva AC (2013). fMRI in the awake marmoset: Somatosensory-evoked responses, functional connectivity, and comparison with propofol anesthesia. *Neuroimage* **78**, 186–195.
- Liu L, Yu Q, Lin J, Lai X, Cao W, Du K, Wang Y, Wu K, Hu Y, Zhang L, Xiao H, Duan Y & Huang H (2011). Hypoxia-Inducible Factor-1 α Is Essential for Hypoxia-Induced Mesenchymal Stem Cell Mobilization into the Peripheral Blood. *Stem Cells and Development* **20**, 1961–1971.
- 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.
- Liu Y, D’Arceuil HE, Westmoreland S, He J, Duggan M, Gonzalez RG, Pryor J & de Crespigny AJ (2007). Serial diffusion tensor MRI after transient and permanent cerebral ischemia in nonhuman primates. *Stroke* **38**, 138–145.
- Lo EH, Dalkara T & Moskowitz MA (2003). Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* **4**, 399–415.
- Löfmark U & Hammarström A (2007). Evidence for age-dependent education-related differences in men and women with first-ever stroke. Results from a community-based incidence study in northern Sweden. *Neuroepidemiology* **28**, 135–141.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S & Cummins R (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* **20**, 84–91.
- Loubinoux I, Brihmat N, Castel-Lacanal E & Marque P (2017). Cerebral imaging of post-stroke plasticity and tissue repair. *Rev Neurol (Paris)* **173**, 577–583.
- Lu B, Nagappan G & Lu Y (2014). BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb Exp Pharmacol* **220**, 223–250.
- Lutz CK (2014). Stereotypic Behavior in Nonhuman Primates as a Model for the Human Condition. *ILAR J* **55**, 284–296.
- Lyden P, Brott T, Tilley B, Welch KM, Mascha EJ, Levine S, Haley EC, Grotta J & Marler J (1994). Improved reliability of the NIH Stroke Scale using video training. NINDS TPA Stroke Study Group. *Stroke* **25**, 2220–2226.
- Ma Y, Zechariah A, Qu Y & Hermann DM (2012). Effects of vascular endothelial growth factor in ischemic stroke. *J Neurosci Res* **90**, 1873–1882.
- Macrae IM (2011). Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia. *Br J Pharmacol* **164**, 1062–1078.
- Malek AM, Cushman M, Lackland DT, Howard G & McClure LA (2015). Secondhand Smoke Exposure and Stroke: The Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke (REGARDS) Study. *Am J Prev Med* **49**, e89–97.

- Malykhina AP, Lei Q, Erickson CS, Epstein ML, Saban MR, Davis CA & Saban R (2012). VEGF induces sensory and motor peripheral plasticity, alters bladder function, and promotes visceral sensitivity. *BMC Physiol* **12**, 15.
- Mandeville ET, Ayata C, Zheng Y & Mandeville JB (2017). Translational MR Neuroimaging of Stroke and Recovery. *Transl Stroke Res* **8**, 22–32.
- Maniskas M, Bix G & Fraser J (2015). Selective intra-arterial drug administration in a model of large vessel ischemia. *J Neurosci Methods* **240**, 22–27.
- Mansfield K (2003). Marmoset models commonly used in biomedical research. *Comp Med* **53**, 383–392.
- Markus R, Reutens DC, Kazui S, Read S, Wright P, Pearce DC, Tochon-Danguy HJ, Sachinidis JI & Donnan GA (2004). Hypoxic tissue in ischaemic stroke: persistence and clinical consequences of spontaneous survival. *Brain* **127**, 1427–1436.
- Marshall JW, Duffin KJ, Green AR & Ridley RM (2001). NXY-059, a free radical--trapping agent, substantially lessens the functional disability resulting from cerebral ischemia in a primate species. *Stroke* **32**, 190–198.
- Marshall JWB, Cross AJ, Jackson DM, Green AR, Baker HF & Ridley RM (2000). Clomethiazole protects against hemineglect in a primate model of stroke. *Brain Research Bulletin* **52**, 21–29.
- Marshall JWB, Cross AJ & Ridley RM (1999). Functional Benefit from Clomethiazole Treatment after Focal Cerebral Ischemia in a Nonhuman Primate Species. *Experimental Neurology* **156**, 121–129.
- Marshall JWB, Green AR & Ridley RM (2003a). Comparison of the neuroprotective effect of clomethiazole, AR-R15896AR and NXY-059 in a primate model of stroke using histological and behavioural measures. *Brain Research* **972**, 119–126.
- Marshall JWB & Ridley RM (1996). Assessment of Functional Impairment Following Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in a Non-Human Primate Species. *Neurodegeneration* **5**, 275–286.
- Marshall JWB & Ridley RM (2003). Assessment of Cognitive and Motor Deficits in a Marmoset Model of Stroke. *ILAR J* **44**, 153–160.
- Marshall JWB, Ridley RM, Baker HF, Hall LD, Carpenter TA & Wood NI (2003b). Serial MRI, functional recovery, and long-term infarct maturation in a non-human primate model of stroke. *Brain Research Bulletin* **61**, 577–585.
- Marti HH & Risau W (1999). Angiogenesis in ischemic disease. *Thromb Haemost* **82 Suppl 1**, 44–52.
- Marti S (2016). *Comprendre les circuits cérébraux de l'attention visuelle et leur importance en radiologie.*

- Martí-Fàbregas J, Romaguera-Ros M, Gómez-Pinedo U, Martínez-Ramírez S, Jiménez-Xarrié E, Marín R, Martí-Vilalta J-L & García-Verdugo J-M (2010). Proliferation in the human ipsilateral subventricular zone after ischemic stroke. *Neurology* **74**, 357–365.
- Mazzaglia G, Britton AR, Altmann DR & Chenet L (2001). Exploring the relationship between alcohol consumption and non-fatal or fatal stroke: a systematic review. *Addiction* **96**, 1743–1756.
- Melo PR, Gonçalves BSB, Menezes AAL & Azevedo CVM (2016). Circadian activity rhythm in pre-pubertal and pubertal marmosets (*Callithrix jacchus*) living in family groups. *Physiology & Behavior* **155**, 242–249.
- Mergenthaler P & Meisel A (2012). Do stroke models model stroke? *Disease Models & Mechanisms* **5**, 718–725.
- Merriman NA, Sexton E, McCabe G, Walsh ME, Rohde D, Gorman A, Jeffares I, Donnelly N-A, Pender N, Williams DJ, Horgan F, Doyle F, Wren M-A, Bennett KE & Hickey A (2019). Addressing cognitive impairment following stroke: systematic review and meta-analysis of non-randomised controlled studies of psychological interventions. *BMJ Open* **9**, e024429.
- Metz GA, Antonow-Schlorke I & Witte OW (2005). Motor improvements after focal cortical ischemia in adult rats are mediated by compensatory mechanisms. *Behav Brain Res* **162**, 71–82.
- Minnerup J, Sutherland BA, Buchan AM & Kleinschnitz C (2012a). Neuroprotection for Stroke: Current Status and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* **13**, 11753–11772.
- Minnerup J, Sutherland BA, Buchan AM & Kleinschnitz C (2012b). Neuroprotection for Stroke: Current Status and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 11753–11772.
- Mirza S & Gokhale S (2016). Neuroimaging in Acute Stroke. 38.
- Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P & Hodges H (2000). Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods* **104**, 99–109.
- Mohamadpour M, Whitney K & Bergold PJ (2019). The Importance of Therapeutic Time Window in the Treatment of Traumatic Brain Injury. *Front Neurosci*; DOI: 10.3389/fnins.2019.00007.
- Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, González MA & Monasterio J (2001). Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* **32**, 1759–1766.
- Montoya CP, Campbell-Hope LJ, Pemberton KD & Dunnett SB (1991). The “staircase test”: a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods* **36**, 219–228.

- Moon S-K, Alaverdashvili M, Cross AR & Whishaw IQ (2009). Both compensation and recovery of skilled reaching following small photothrombotic stroke to motor cortex in the rat. *Exp Neurol* **218**, 145–153.
- Mori S, Oishi K & Faria AV (2009). White matter atlases based on diffusion tensor imaging. *Curr Opin Neurol* **22**, 362–369.
- Moulton E, Amor-Sahli M, Perlberg V, Pires C, Crozier S, Galanaud D, Valabregue R, Yger M, Baronnet-Chauvet F, Samson Y, Dormont D & Rosso C (2015). Axial Diffusivity of the Corona Radiata at 24 Hours Post-Stroke: A New Biomarker for Motor and Global Outcome. *PLOS ONE* **10**, e0142910.
- Mukherjee D & Patil CG (2011). Epidemiology and the Global Burden of Stroke. *World Neurosurgery* **76**, S85–S90.
- Muñoz Maniega S, Bastin ME, Armitage PA, Farrall AJ, Carpenter TK, Hand PJ, Cvorovic V, Rivers CS & Wardlaw JM (2004). Temporal evolution of water diffusion parameters is different in grey and white matter in human ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **75**, 1714–1718.
- Murai T, Nakako T, Ikejiri M, Ishiyama T, Taiji M & Ikeda K (2013). Effects of lurasidone on executive function in common marmosets. *Behavioural Brain Research* **246**, 125–131.
- Murphy TH & Corbett D (2009). Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci* **10**, 861–872.
- Nakamura Kuniyuki, Ikeuchi Tomoko, Zhang Peipei, Rhodes Craig, Chiba Yuta, Ago Tetsuro, Mukoyama Yoh-suke & Yamada Yoshihiko (2017). Abstract TP276: Perlecan Is Required for the Maintenance of the Blood-Brain Barrier through the Interaction with Pericytes in a Mouse Ischemic Stroke Model. *Stroke* **48**, ATP276–ATP276.
- Neumann-Haefelin T., Kastrup A., de Crespigny A., Yenari M. A., Ringer T., Sun G. H. & Moseley M. E. (2000). Serial MRI After Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke* **31**, 1965–1973.
- Nishibe M, Urban ETR, Barbay S & Nudo RJ (2015). Rehabilitative training promotes rapid motor recovery but delayed motor map reorganization in a rat cortical ischemic infarct model. *Neurorehabil Neural Repair* **29**, 472–482.
- Nudo RJ (2007). Postinfarct cortical plasticity and behavioral recovery. *Stroke* **38**, 840–845.
- Nudo RJ & Milliken GW (1996). Reorganization of movement representations in primary motor cortex following focal ischemic infarcts in adult squirrel monkeys. *J Neurophysiol* **75**, 2144–2149.
- O'Collins VE, Donnan GA, Macleod MR & Howells DW (2013). Hypertension and experimental stroke therapies. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **33**, 1141–1147.

- O'Donnell MJ et al. (2010). Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *The Lancet* **376**, 112–123.
- O'Donnell MJ et al. (2016). Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *The Lancet* **388**, 761–775.
- Ogden JA (1985). Anterior-posterior interhemispheric differences in the loci of lesions producing visual hemineglect. *Brain Cogn* **4**, 59–75.
- Ohira K, Hagihara H, Miwa M, Nakamura K & Miyakawa T (2019). Fluoxetine-induced dematuration of hippocampal neurons and adult cortical neurogenesis in the common marmoset. *Mol Brain* **12**, 69.
- Okano H, Hikishima K, Iriki A & Sasaki E (2012). The common marmoset as a novel animal model system for biomedical and neuroscience research applications. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* **17**, 336–340.
- Ozsunar Y, Grant PE, Huisman TAGM, Schaefer PW, Wu O, Sorensen AG, Koroshetz WJ & Gonzalez RG (2004). Evolution of water diffusion and anisotropy in hyperacute stroke: significant correlation between fractional anisotropy and T2. *AJNR Am J Neuroradiol* **25**, 699–705.
- Ozturk ED & Tan CO (2018). Human cerebrovascular function in health and disease: insights from integrative approaches. *J Physiol Anthropol*; DOI: 10.1186/s40101-018-0164-z.
- Papy-Garcia D & Albanese P (2017). Heparan sulfate proteoglycans as key regulators of the mesenchymal niche of hematopoietic stem cells. *Glycoconjugate Journal* **34**, 377–391.
- Papy-Garcia D, Barbosa I, Duchesnay A, Saadi S, Caruelle J-P, Barritault D & Martelly I (2002). Glycosaminoglycan mimetics (RGTA) modulate adult skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro. *J Biomed Mater Res* **62**, 46–55.
- Pariante J, Loubinoux I, Carel C, Albucher JF, Leger A, Manelfe C, Rascol O & Chollet F (2001). Fluoxetine modulates motor performance and cerebral activation of patients recovering from stroke. *Ann Neurol* **50**, 718–729.
- Péron S & Berninger B (2015). Imported Stem Cells Strike against Stroke. *Cell Stem Cell* **17**, 501–502.
- Perrine A-L (n.d.). L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE EN FRANCE : PRÉVALENCE, TRAITEMENT ET CONTRÔLE EN 2015 ET ÉVOLUTIONS DEPUIS 2006 / HYPERTENSION IN FRANCE: PREVALENCE, TREATMENT AND MANAGEMENT IN 2015 AND TEMPORAL TRENDS SINCE 2006. 10.
- Pires PW, Dams Ramos CM, Matin N & Dorrance AM (2013). The effects of hypertension on the cerebral circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **304**, H1598–H1614.
- Pomberger T, Risueno-Segovia C, Gultekin YB, Dohmen D & Hage SR (2019). Cognitive control of complex motor behavior in marmoset monkeys. *Nat Commun* **10**, 3796.

- Puentes S, Kaido T, Hanakawa T, Ichinohe N, Otsuki T & Seki K (2015). Internal capsule stroke in the common marmoset. *Neuroscience* **284**, 400–411.
- Qiang B, Lim SY, Lekas M, Kuliszewski MA, Wolff R, Osherov AB, Rudenko D, Leong-Poi H, Noyan H, Husain M, Tran K, Tryggvason K, Hedin U, Tran-Lundmark K & Strauss BH (2014). Perlecan heparan sulfate proteoglycan is a critical determinant of angiogenesis in response to mouse hind-limb ischemia. *Can J Cardiol* **30**, 1444–1451.
- Qin D, Trenkwalder T, Lee S, Chillo O, Deindl E, Kupatt C & Hinkel R (2013). Early Vessel Destabilization Mediated by Angiopoietin-2 and Subsequent Vessel Maturation via Angiopoietin-1 Induce Functional Neovasculature after Ischemia. *PLOS ONE* **8**, e61831.
- Quaney BM, Perera S, Maletsky R, Luchies CW & Nudo RJ (2005). Impaired grip force modulation in the ipsilesional hand after unilateral middle cerebral artery stroke. *Neurorehabil Neural Repair* **19**, 338–349.
- Quittet M-S, Touzani O, Sindji L, Cayon J, Fillesoye F, Toutain J, Divoux D, Marteau L, Lecocq M, Roussel S, Montero-Menei CN & Bernaudin M (2015a). Effects of mesenchymal stem cell therapy, in association with pharmacologically active microcarriers releasing VEGF, in an ischaemic stroke model in the rat. *Acta Biomaterialia* **15**, 77–88.
- Quittet M-S, Touzani O, Sindji L, Cayon J, Fillesoye F, Toutain J, Divoux D, Marteau L, Lecocq M, Roussel S, Montero-Menei CN & Bernaudin M (2015b). Effects of mesenchymal stem cell therapy, in association with pharmacologically active microcarriers releasing VEGF, in an ischaemic stroke model in the rat. *Acta biomaterialia* **15**, 77–88.
- Rastogi R, Ding Y, Xia S, Wang M, Luo Y, Choi HS, Fan Z, Li M, Kwiecien TD & Haacke EM (2015). Recent advances in magnetic resonance imaging for stroke diagnosis. *Brain Circulation* **1**, 26.
- Raychev R & Saver JL (2012). Mechanical thrombectomy devices for treatment of stroke. *Neurol Clin Pract* **2**, 231–235.
- Ridley RM & Baker HF (1991). A critical evaluation of monkey models of amnesia and dementia. *Brain Research Reviews* **16**, 15–37.
- Ridley RM, Baker HF & Murray TK (1988). Basal nucleus lesions in monkeys: recognition memory impairment or visual agnosia? *Psychopharmacology* **95**, 289–290.
- Rist PM, Chalmers J, Arima H, Anderson C, Macmahon S, Woodward M, Kurth T & Tzourio C (2013). Baseline cognitive function, recurrent stroke, and risk of dementia in patients with stroke. *Stroke* **44**, 1790–1795.
- Rivera S, Jourquin J, Ogier C, Bernard A, Charton G, Tremblay É & Khrestchatisky M (2004). Le système MMP/TIMP dans le système nerveux. *Med Sci (Paris)* **20**, 55–60.
- Roberts AC, Robbins TW, Everitt BJ & Muir JL (1992). A specific form of cognitive rigidity following excitotoxic lesions of the basal forebrain in marmosets. *Neuroscience* **47**, 251–264.

- Roberts AC & Wallis JD (2000). Inhibitory Control and Affective Processing in the Prefrontal Cortex: Neuropsychological Studies in the Common Marmoset. *Cereb Cortex* **10**, 252–262.
- Roldan-Valadez E & Lopez-Mejia M (2014). Current concepts on magnetic resonance imaging (MRI) perfusion-diffusion assessment in acute ischaemic stroke: a review & an update for the clinicians. *Indian J Med Res* **140**, 717–728.
- Roque DT, Teixeira RAA, Zachi EC & Ventura DF (2011). The use of the Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB) in neuropsychological assessment: application in Brazilian research with control children and adults with neurological disorders. *Psychology & Neuroscience* **4**, 255–265.
- Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J, Alexander S, Estrada EY, Grossetete M, Razhagi A, Miller K & Gearing A (2001). Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Res* **893**, 104–112.
- Rosso C, Colliot O, Pires C, Delmaire C, Valabrègue R, Crozier S, Dormont D, Baillet S, Samson Y & Lehericy S (2011). Early ADC changes in motor structures predict outcome of acute stroke better than lesion volume. [/data/revues/01509861/v38i2/S0150986110001057/](https://www.em-consulte.com/en/article/288165). Available at: <https://www.em-consulte.com/en/article/288165> [Accessed September 26, 2019].
- Rothwell PM, Coull AJ, Silver LE, Fairhead JF, Giles MF, Lovelock CE, Redgrave JNE, Bull LM, Welch SJV, Cuthbertson FC, Binney LE, Gutnikov SA, Anslow P, Banning AP, Mant D, Mehta Z & Oxford Vascular Study (2005). Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet* **366**, 1773–1783.
- Rouet V, Hamma-Kourbali Y, Petit E, Panagopoulou P, Katsoris P, Barritault D, Caruelle J-P & Courty J (2005a). A Synthetic Glycosaminoglycan Mimetic Binds Vascular Endothelial Growth Factor and Modulates Angiogenesis. *J Biol Chem* **280**, 32792–32800.
- Rouet V, Hamma-Kourbali Y, Petit E, Panagopoulou P, Katsoris P, Barritault D, Caruelle JP & Courty J (2005b). A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 32792–32800.
- Rouet V, Meddahi-pelle A, Miao H, Vlodaysky I & Caruelle J (n.d.). Heparin-like synthetic polymers , named RGTAs , mimic biological effects of heparin in vitro. ; DOI: 10.1002/jbm.a.
- Rouet V, Meddahi-Pellé A, Miao H-Q, Vlodaysky I, Caruelle J-P & Barritault D (2006). Heparin-like synthetic polymers, named RGTAs, mimic biological effects of heparin in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **78A**, 792–797.
- Rousselet E, Kriz J & Seidah NG (2012). Mouse Model of Intraluminal MCAO: Cerebral Infarct Evaluation by Cresyl Violet Staining. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*e4038.

- Sadagopan S, Temiz-Karayol NZ & Voss HU (2015). High-field functional magnetic resonance imaging of vocalization processing in marmosets. *Sci Rep*; DOI: 10.1038/srep10950.
- Sadoun A, Rosito M, Fonta C & Girard P (2019). Key periods of cognitive decline in a nonhuman primate model of cognitive aging, the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neurobiol Aging* **74**, 1–14.
- Sammali E, Alia C, Vegliante G, Colombo V, Giordano N, Pischiutta F, Boncoraglio GB, Barilani M, Lazzari L, Caleo M, De Simoni MG, Gaipa G, Citerio G & Zanier ER (2017). Intravenous infusion of human bone marrow mesenchymal stromal cells promotes functional recovery and neuroplasticity after ischemic stroke in mice. *Scientific Reports* **7**, 1–13.
- Sarikaya H, Mattle H, Michel P, Nedeltchev K, Kägi G, Mono M-L, Cereda C, Sztajzel R, Fandino J, Nyffeler T, Luft A, Tettenborn B, Bonati L, Lyrer P & Arnold M (2014). La prévention secondaire de l'accident vasculaire cérébral. *Forum Médical Suisse – Swiss Medical Forum*; DOI: 10.4414/fms.2014.01760.
- Sasaki E et al. (2009). Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature* **459**, 523–527.
- Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL & Bland ST (2000). CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* **39**, 777–787.
- Schallert T, Upchurch M, Lobaugh N, Farrar SB, Spirduso WW, Gilliam P, Vaughn D & Wilcox RE (1982). Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage. *Pharmacol Biochem Behav* **16**, 455–462.
- Schallert T, Upchurch M, Wilcox RE & Vaughn DM (1983). Posture-independent sensorimotor analysis of inter-hemispheric receptor asymmetries in neostriatum. *Pharmacol Biochem Behav* **18**, 753–759.
- Schallert T, Woodlee MT, Fleming SM & Schallert T, Woodlee MT FS (2002). Disentangling multiple types of recovery from brain injury recovery of function. *Pharmacology of Cerebral Ischemia* 201–216.
- Schatz P (2011). Double Simultaneous Stimulation. In *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology*, ed. Kreutzer JS, DeLuca J & Caplan B, pp. 894–895. Springer New York. Available at: http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-0-387-79948-3_174 [Accessed January 6, 2017].
- Schell RM, Kern FH, Greeley WJ, Schulman SR, Frasco PE, Croughwell ND, Newman M & Reves JG (1993). Cerebral blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass. *Anesthesia and analgesia* **76**, 849–865.
- Schiemanck SK, Post MWM, Kwakkel G, Witkamp TD, Kappelle LJ & Prevo AJH (2005). Ischemic lesion volume correlates with long-term functional outcome and quality of life of middle cerebral artery stroke survivors. *Restor Neurol Neurosci* **23**, 257–263.

- Schifffrin EL (2004). Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens* **17**, 1192–1200.
- Schmid-Brunclik N, Bürgi-Taboada C, Antoniou X, Gassmann M & Ogunshola OO (2008). Astrocyte responses to injury: VEGF simultaneously modulates cell death and proliferation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **295**, R864–R873.
- Schneider CA, Rasband WS & Eliceiri KW (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9**, 671–675.
- Seitz RJ, Azari NP, Knorr U, Binkofski F, Herzog H & Freund HJ (1999). The role of diaschisis in stroke recovery. *Stroke* **30**, 1844–1850.
- Sen S, Chini EN & Brown MJ (2005). Complications After Unintentional Intra-arterial Injection of Drugs: Risks, Outcomes, and Management Strategies. *Mayo Clinic Proceedings* **80**, 783–795.
- Shahjouei S, Cai PY, Ansari S, Sharififar S, Azari H, Ganji S & Zand R (2016). Middle Cerebral Artery Occlusion Model of Stroke in Rodents: A Step-by-Step Approach. *J Vasc Interv Neurol* **8**, 1–8.
- Shinozuka K, Dailey T, Tajiri N, Ishikawa H, Kaneko Y & Borlongan CV (2013). Stem Cell Transplantation for Neuroprotection in Stroke. *Brain Sci* **3**, 239–261.
- Silva AC (2016). Anatomical and functional neuroimaging in awake, behaving marmosets. *Devel Neurobiol/a-n/a*.
- Silva AC (2017). Anatomical and functional neuroimaging in awake, behaving marmosets. *Devel Neurobio* **77**, 373–389.
- Smajlović D (2015). Strokes in young adults: epidemiology and prevention. *Vasc Health Risk Manag* **11**, 157–164.
- Spinelli S, Ballard T, Feldon J, Higgins GA & Pryce CR (2006). Enhancing effects of nicotine and impairing effects of scopolamine on distinct aspects of performance in computerized attention and working memory tasks in marmoset monkeys. *Neuropharmacology* **51**, 238–250.
- Spinelli S, Pennanen L, Dettling AC, Feldon J, Higgins GA & Pryce CR (2004). Performance of the marmoset monkey on computerized tasks of attention and working memory. *Cognitive Brain Research* **19**, 123–137.
- Spiotta AM, Chaudry MI, Hui FK, Turner RD, Kellogg RT & Turk AS (2015). Evolution of thrombectomy approaches and devices for acute stroke: a technical review. *Journal of neurointerventional surgery* **7**, 2–7.
- Stevenson MF & Poole TB (1976). An ethogram of the common marmoset (*Calithrix jacchus jacchus*): general behavioural repertoire. *Anim Behav* **24**, 428–451.

- Stone SP, Halligan PW & Greenwood RJ (1993). The incidence of neglect phenomena and related disorders in patients with an acute right or left hemisphere stroke. *Age Ageing* **22**, 46–52.
- Stone SP, Wilson B, Wroot A, Halligan PW, Lange LS, Marshall JC & Greenwood RJ (1991). The assessment of visuo-spatial neglect after acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* **54**, 345–350.
- Stonesifer C, Corey S, Ghanekar S, Diamandis Z, Acosta SA & Borlongan C V. (2017). Stem cell therapy for abrogating stroke-induced neuroinflammation and relevant secondary cell death mechanisms. *Progress in Neurobiology* **158**, 94–131.
- Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) (1999). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* **30**, 2752–2758.
- Sun J-H, Tan L & Yu J-T (2014). Post-stroke cognitive impairment: epidemiology, mechanisms and management. *Ann Transl Med*; DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.08.05.
- Sun PZ, Copen WA, Benner T & Sorensen AG (2010). Early Experience of translating pH-weighted MRI to image human subjects at 3 Tesla. *Stroke* **41**, S147–S151.
- Sunderland A, Tinson DJ, Bradley EL, Fletcher D, Hewer RL & Wade DT (1992). Enhanced physical therapy improves recovery of arm function after stroke. A randomised controlled trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **55**, 530–535.
- Sweeney EA, Lortat-Jacob H, Priestley GV, Nakamoto B & Papayannopoulou T (2002). Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood* **99**, 44–51.
- Sydserrff SG, Cross AJ, Murray TK, Jones JA & Green AR (2000). Clomethiazole is neuroprotective in models of global and focal cerebral ischemia when infused at doses producing clinically relevant plasma concentrations. *Brain Res* **862**, 59–62.
- Tagaya M, Liu KF, Copeland B, Seiffert D, Engler R, Garcia JH & del Zoppo GJ (1997). DNA scission after focal brain ischemia. Temporal differences in two species. *Stroke* **28**, 1245–1254.
- Takahashi H, Matsumoto H, Kumon Y, Ohnishi T, Freeman C, Imai Y & Tanaka J (2007). Expression of heparanase in nestin-positive reactive astrocytes in ischemic lesions of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. **417**, 250–254.
- Tardieu M, Gamby C, Avramoglou T, Jozefonvicz J & Barritault D (1992). Derivatized dextrans mimic heparin as stabilizers, potentiators, and protectors of acidic or basic FGF. *Journal of Cellular Physiology* **150**, 194–203.
- Tardif SD, Power ML, Ross CN, Rutherford JN, Layne-Colon DG & Paulik MA (2009). Characterization of obese phenotypes in a small nonhuman primate, the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Obesity (Silver Spring)* **17**, 1499–1505.
- Teasdale G & Jennett B (1974). Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* **2**, 81–84.

- Themes UFO (2016). Systemic Hypertension. *Thoracic Key*. Available at: <https://thoracickey.com/systemic-hypertension-2/> [Accessed July 16, 2019].
- Thrift AG, Thayabaranathan T, Howard G, Howard VJ, Rothwell PM, Feigin VL, Norrving B, Donnan GA & Cadilhac DA (2017). Global stroke statistics. *Int J Stroke* **12**, 13–32.
- Tokuno H, Moriya-Ito K & Tanaka I (2012). Experimental Techniques for Neuroscience Research Using Common Marmosets. *Experimental Animals* **61**, 389–397.
- Tong M, Tuk B, Hekking JM, Hovius SER & van Neck JW (2009). RGTA OTR4120, a heparan sulfate mimetic, improves wound regeneration of rat ischemic wounds. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* **62**, 834S-835S.
- Toyoshima A, Yasuhara T & Date I (2017). Mesenchymal Stem Cell Therapy for Ischemic Stroke. *Acta Med Okayama* **71**, 263–268.
- Toyoshima A, Yasuhara T, Kameda M, Morimoto J, Takeuchi H, Wang F, Sasaki T, Sasada S, Shinko A, Wakamori T, Okazaki M, Kondo A, Agari T, Borlongan C V. & Date I (2015). Intra-arterial transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells mounts neuroprotective effects in a transient ischemic stroke model in rats: Analyses of therapeutic time window and its mechanisms. *PLoS ONE* **10**, 1–17.
- Trejo-Gabriel-Galan JM, Rogel-Melgosa V, Gonzalez S, Sedano J, Villar JR & Arenaza-Basterrechea N (2016). Rehabilitation of hemineglect of the left arm using movement detection bracelets activating a visual and acoustic alarm. *J Neuroeng Rehabil* **13**, 79.
- Tromp D (2016). DTI Scalars (FA, MD, AD, RD) - How do they relate to brain structure? *The Winnower*; DOI: 10.15200/winn.146119.94778.
- Tsuji K, Aoki T, Tejima E, Arai K, Lee S-R, Atochin DN, Huang PL, Wang X, Montaner J & Lo EH (2005). Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke* **36**, 1954–1959.
- Varona JF (2010). Long-Term Prognosis of Ischemic Stroke in Young Adults. *Stroke Res Treat*; DOI: 10.4061/2011/879817.
- de Vasconcelos dos Santos A, da Costa Reis J, Diaz Paredes B, Moraes L, Jasmin, Giraldi-Guimarães A & Mendez-Otero R (2010). Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. *Brain Research* **1306**, 149–158.
- Virley D, Hadingham SJ, Roberts JC, Farnfield B, Elliott H, Whelan G, Golder J, David C, Parsons AA & Hunter AJ (2004). A New Primate Model of Focal Stroke: Endothelin-1—Induced Middle Cerebral Artery Occlusion and Reperfusion in the Common Marmoset. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**, 24–41.
- Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J & Perez-Fernandez R (2017). Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*; DOI: 10.3390/ijms18091852.
- Vu Q, Xie K, Eckert M, Zhao W & Cramer SC (2014). Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells for ischemic stroke. *Neurology* **82**, 1277–1286.

- Wachtman LM, Kramer JA, Miller AD, Hachey AM, Curran EH & Mansfield KG (2011). Differential contribution of dietary fat and monosaccharide to metabolic syndrome in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Obesity (Silver Spring)* **19**, 1145–1156.
- Wahlgren NG, Ranasinha KW, Rosolacci T, Franke CL, van Erven PM, Ashwood T & Claesson L (1999). Clomethiazole acute stroke study (CLASS): results of a randomized, controlled trial of clomethiazole versus placebo in 1360 acute stroke patients. *Stroke* **30**, 21–28.
- Wakabayashi K, Nagai A, Sheikh AM, Shiota Y, Narantuya D, Watanabe T, Masuda J, Kobayashi S, Kim SU & Yamaguchi S (2010). Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *J Neurosci Res* **88**, 1017–1025.
- 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.
- Wei YT, Tian WM, Yu X, Cui FZ, Hou SP, Xu QY & Lee I-S (2007). Hyaluronic acid hydrogels with IKVAV peptides for tissue repair and axonal regeneration in an injured rat brain. *Biomed Mater* **2**, S142–146.
- White JA, Bolstridge MC, Downing HJ, Helm EH & Klomfass HJ (1974). Diabetogenic drugs in the vervet monkey. *S Afr Med J* **48**, 273–276.
- Williams DS, Detre JA, Leigh JS & Koretsky AP (1992). Magnetic resonance imaging of perfusion using spin inversion of arterial water. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 212–216.
- Wood JM, Gulati N, Michel JB & Hofbauer KG (1986). Two-kidney, one clip renal hypertension in the marmoset. *J Hypertens* **4**, 251–254.
- WRITING GROUP MEMBERS et al. (2010). Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **121**, e46–e215.
- Wu A, Lauschke J, Morris R & Waite P (2009). Characterization of Rat Forepaw Function in Two Models of Cervical Dorsal Root Injury. *Journal of neurotrauma* **26**, 17–29.
- Xavier AR, Qureshi AI, Kirmani JF, Yahia AM & Bakshi R (2003). Neuroimaging of stroke: a review. *South Med J* **96**, 367–379.
- Xin H, Li Y, Cui Y, Yang JJ, Zhang ZG & Chopp M (2013). Systemic Administration of Exosomes Released from Mesenchymal Stromal Cells Promote Functional Recovery and Neurovascular Plasticity After Stroke in Rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **33**, 1711–1715.
- Xing C, Arai K, Lo EH & Hommel M (2012). Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke* **7**, 378–385.
- Yamauchi H, Desgranges P, Lecerf L, Papy-Garcia D, Tournaire MC, Moczar M, Loisanse D & Barritault D (2000). New agents for the treatment of infarcted myocardium. *FASEB J* **14**, 2133–2134.

- Yamazaki Y, Saiki M, Inada M, Watanabe S & Iriki A (2016). Sustained performance by common marmosets in a delayed matching to position task with variable stimulus presentations. *Behavioural Brain Research SreeTestContent1* **297**, 277–284.
- Yasuhara T, Borlongan CV & Date I (2006). Ex vivo gene therapy: transplantation of neurotrophic factor-secreting cells for cerebral ischemia. *Front Biosci* **11**, 760–775.
- Zarruk JG, Garcia-Yebenes I, Romera VG, Ballesteros I, Moraga A, Cuartero MI, Hurtado O, Sobrado M, Pradillo JM, Fernandez-Lopez D, Serena J, Castillo-Melendez M, Moro MA & Lizasoain I (2011). Neurological tests for functional outcome assessment in rodent models of ischaemic stroke. *Rev Neurol* **53**, 607–618.
- Zhang H lian, Xie X fang, Xiong Y qiong, Liu S min, Hu G zhu, Cao W feng & Wu X mu (2018a). Comparisons of the therapeutic effects of three different routes of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in cerebral ischemic rats. *Brain Research* **1680**, 143–154.
- Zhang H, Xie X, Xiong Y, Liu S, Hu G, Cao W & Wu X (2018b). Comparisons of the therapeutic effects of three different routes of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in cerebral ischemic rats. *Brain Research* **1680**, 143–154.
- Zhang L, Wang L, Chen W, Ma Z, Han X, Liu C, Cheng X, Shi W, Guo J, Qin J, Yang X, Jin G & Zhang X (2017). Neural differentiation of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells improves the recovery of neurological function after transplantation in ischemic stroke rats. *Neural Regeneration Research* **12**, 1103.
- Zhong J, Chan A, Morad L, Kornblum HI, Fan G & Carmichael ST (2010). Hydrogel Matrix to Support Stem Cell Survival After Brain Transplantation in Stroke. *Neurorehabil Neural Repair* **24**, 636–644.
- Zinkova NN, Gilerovitch EG, Sokolova IB, Shvedova E V., Bilibina AA, Kruglyakov P V. & Polyntsev DG (2007). Dynamics of morphological changes after transplantation of mesenchymal stem cells in rat brain provoked by stroke. *Cell and Tissue Biology* **1**, 482–490.

Annexe 1 : Khelif et al., 2019

L'étude suivante contient les résultats présentés en étude 2 de cette thèse.

Cet article a été soumis au journal Acta Biomaterialia.

Combining a heparan sulfate mimetic with mesenchymal stem cells enhances neuroprotection and functional recovery following ischemic stroke

Yacine KHELIF¹, Rozenn LEGAL¹, Charlène RENOULT¹, Jérôme TOUTAIN¹, Marie-Sophie QUITTET¹, Carole BRUNAUD¹, Laurent CHAZAVIEL¹, Didier DIVOUX¹, Xavier LAFFRAY², Nina HENRY³, Franck CHIAPPINI³, Jérôme LEVALLET¹, Dulcé PAPY-GARCIA², Denis BARRITAU^{2,3}, Omar TOUZANI^{1*}, Myriam BERNAUDIN^{1*}

¹ Normandie Université, UNICAEN, CNRS, CEA, ISTCT/CERVOxy group, GIP CYCERON, 14000 Caen, France

² CRRET (EA 4397/ERL CNRS 9215), Université Paris-Est, Université Paris Est Créteil, 94010 Créteil, France.

³ Société OTR3, 4 rue Française, 75001 PARIS, France.

*Authors contributed equally to this work

Corresponding author: bernaudin@cyceron.fr

Abstract

Stroke is a devastating neurological disease worldwide. One of the main deleterious events during stroke is the alteration of the extracellular matrix (ECM). Heparan sulfate mimetics (HSm) are synthetic polysaccharides that bind matrix proteins and growth factors, increasing their bioavailability, thereby ameliorating the cellular environment and promoting tissue repair. Following stroke, although mesenchymal stem cells (MSCs) are able to protect the brain tissue and enhance recovery, their actions are limited by the hostile environment in the damaged tissue. Here, we evaluated the ability of HSm to potentiate the beneficial effects of MSCs after stroke, in normotensive and hypertensive rats, as hypertension is the major risk factor of stroke. We show that combining treatment with HSm and MSCs after ischemic stroke conferred a long-lasting neuroprotection and reduced functional deficits in normotensive and hypertensive rats. Data from MSCs subjected *in vitro* to oxygen-glucose deprivation (OGD) stress and from *ex-vivo* RT-PCR and immunohistochemistry ECM-related analyses, show that the HSm/MSCs beneficial effects are due to preservation of the microenvironment and/or increased migration of MSCs to the ischemic hemisphere. In conclusion, HSm represent a promising ECM-based therapeutic strategy, enhancing the protection and repair of the brain by MSCs, and improving functional recovery after a stroke.

Keywords: Neuroprotection, functional recovery, stroke, heparan sulfate, chronic arterial hypertension, mesenchymal stem cells.

Introduction

Stroke is one of the most devastating neurological diseases, with 5.5 million deaths worldwide occurring every year (Mukherjee & Patil, 2011). Currently, thrombolysis and thrombectomy are the only available treatments during the acute stage of an ischemic stroke, and aside from thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA), there is no other pharmacological treatment available. Furthermore, due to the narrow therapeutic window, several potential side effects, and contraindications of rt-PA, only a minority of patients receives rt-PA as treatment (Demaerschalk *et al.*, 2016). Therefore, there is an urgent need to develop new treatments for ischemic stroke.

The extracellular matrix (ECM) is a complex network of macromolecules, including heparan sulfate proteoglycans (HSPG) that support the surrounding cells. HSPG, composed of heparan sulfate (HS), *i.e.*, disaccharide polymer chains linked to a core protein, are known to be involved in tissue homeostasis, and in the regulation of cell-cell communication in stem cell niches that include mesenchymal stem cells (MSCs) (Papy-Garcia & Albanese, 2017).

MSCs are multipotent stem cells that have been widely investigated in preclinical (Zinkova *et al.*, 2007; Kim & Park, 2017) and clinical (Bang, 2016) studies for their neuroprotective and regenerative potential in ischemic stroke. MSCs secrete protective factors that play a key role in immunomodulation and brain plasticity after ischemic stroke (Drago *et al.*, 2013a; Vizoso *et al.*, 2017). However, in stroke where

tissues are in an inflammatory state and the ECM is degraded, it is possible that MSCs survival is reduced along with their neuroprotective and/or regenerative potential. Indeed, it has been shown that MSCs survival is limited in the damaged tissues due to loss of cell adhesion and to the inflammatory environment (Lee *et al.*, 2012).

ECM degradation following stroke leads to HSPG degradation, preventing tissue repair and functional recovery. To promote ECM regeneration after tissue damage, HS mimetics (HSm) have been designed to act as an endogenous HS, and include RGTA[®] (ReGeneraTive Agent)-4131 (HSm4131), a HSm made of synthetic polymers of disaccharides. HSm have been shown to bind ECM proteins and several growth factors, serving as a reservoir and protecting them from proteolysis (Barritault *et al.*, 2017c). Moreover, HSm are resistant to enzymatic degradation (Barritault *et al.*, 2017c). Thus, HSm can restore the ECM architecture and tissue homeostasis of damaged tissues by protecting and regulating the bioavailability of heparin-binding growth factors (*e.g.* VEGF, TGF- β , FGF-2, BDNF) (Rouet *et al.*, 2005b; Frescaline *et al.*, 2012b; Chevalier *et al.*, 2014). We have previously shown that HS4131 protects brain tissue, repairs the ECM, and promotes functional recovery in animals after ischemic stroke (Khelif *et al.*, 2018b). Moreover, we have shown that HS4131 enhances post-ischemic regenerative processes such as angiogenesis and neurogenesis in association with increased

expression of trophic factors such as VEGF and angiopoietin-2 (Ang-2) (Khelif *et al.*, 2018b).

HSm have also been shown to potentiate proliferation, migration, and differentiation of human MSCs *in vitro*, and to modulate the inflammatory response and the stimulation of peri-implant vascularization *in vivo* (Frescaline *et al.*, 2013). Moreover, as MSCs demonstrate regenerative potential after a stroke, mainly by secreting neuroprotective, neurotrophic and regenerative growth factors (Chen *et al.*, 2001), we hypothesized that HSm4131 could emphasize the beneficial effects of MSCs on brain tissue and improve functional recovery after a stroke.

Material and methods

Animals

All experimental procedures were approved by the regional committee on animal ethics (APAFiS#4410), and were performed at the CYCERON platform (Caen, France, agreement number: FA-118-001) on 300-350g male Sprague Dawley (SD) rats (CERJ, France) or spontaneously hypertensive male rats (SHR) (CURB, France). All experiments and data analyses were performed in a blind and randomized manner according to the ARRIVE guidelines.

Induction of brain ischemia

During the surgical procedure, the temperature of the animals was measured and maintained at 37°C by a heating blanket. Rats were anesthetized with isoflurane (2-2.5%) in a mixture of 30% of O₂ and 70% of N₂O.

Transient cerebral ischemia was induced by intraluminal occlusion of the middle cerebral artery (MCAo) (Chuquet *et al.*, 2002; Quittet *et al.*, 2015b). Briefly, a nylon filament (0.18 mm diameter) with a distal cylinder (0.39 mm diameter x 3 mm length) (Doccol, Sharon, MA, USA) was introduced into the lumen of the right external carotid, advanced through the internal carotid, and gently pushed up to the origin of the middle cerebral artery (MCA). One hour after the occlusion, rats were anesthetized again and the filament was withdrawn to allow cerebral reperfusion. Analgesic treatment (buprecare 0.05 mg/kg, s.c.) and hydration (6 ml of saline i.p.) were delivered every day for three days following the surgical procedure.

HSm4131 administration

HSm4131 also known as OTR4132 (CAS-RN 2342614-00-8) was obtained from OTR3 (OTR3 S.A.S., Paris, France). In all studies, HSm4131 was administered intravenously (i.v.) at a dose of 1.5 mg/kg (11.3 nmol/kg). The control group received physiological serum (0.9 % NaCl) (300 µl, i.v.) (Figure 1A, 1B).

Cell culture and administration

MSCs were isolated from the bone marrow of SD male rats, after their euthanasia under deep anesthesia and cultured as follows. The femoral and tibia bone marrow were extracted and cultured

in an alpha modified Eagle's minimal essential medium (αMEM) (Sigma Aldrich), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM of glutamine and 1% penicillin/streptomycin. MSCs were incubated

at 37 °C in 5% CO₂. After 3 cell passages, cells were trypsinized, counted, and conditioned in phosphate-buffered saline (PBS) complemented with 2 mM glutamine.

MSCs were administered intravenously (i.v.) at 3×10^6 cells in 300 μ l PBS solution through the tail vein, either alone or combined with HSm4131. Six treatment groups were included,

i.e., (1) vehicle/vehicle, (2) HSm4131/vehicle, (3) HSm4131/vehicle + HSm4131, (4) vehicle/MSCs, (5) HSm4131/MSCs + vehicle, and (6) HSm4131/MSCs + HSm4131; where vehicle or the first dose of HSm4131 were administered at D0 during reperfusion 1 hr after MCAo, and MSCs +/- HSm4131 were given at D1 (Figure 1A, 1B).

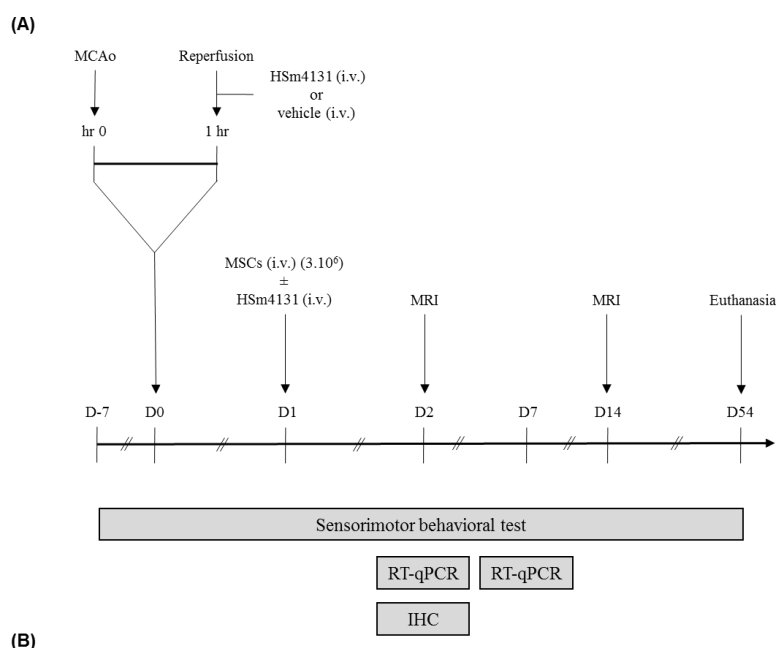


Figure 1: Experimental protocol.

(A) The experimental protocol was designed to examine the effects of combining HSm4131 with MSCs on neuroprotection and functional recovery in rats. The figures indicate the timing of administration and of the various tests in the 6 groups of animals (see Methods). Using a second cohort, heparanase gene expression was studied by RT-qPCR. A last cohort was used to study heparan sulfate distribution and MSCs homing by IHC. (B) Table of the different groups used in the experimental protocol. HSm4131: heparan sulfate mimetic 4131; IHC: immunohistochemistry; i.v.: intravenous; MCAo: middle cerebral artery occlusion; MRI: magnetic resonance imaging; MSCs: mesenchymal stem cells; RT-qPCR: real time quantitative polymerase chain reaction.

added daily for 3 days to the MSCs culture medium. Labelled MSCs were then infused i.v. through the tail vein (3×10^6 cells in 300 μ l) alone or combined with HSm4131.

Oxygen/glucose deprivation

MSCs were seeded at 4×10^4 per well in a 6-well plate and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). To mimic ischemia conditions *in vitro*, MSCs were subjected to oxygen glucose deprivation (OGD). MSCs were first plated and allowed to grow in control conditions for 24-48 hr, and then transferred to a tri-gas incubator flushed with a humidified gas mixture (1% O₂- 5% CO₂- 93% N₂) (Invivo500, Ruskinn, ABE) and the culture medium was replaced with glucose-free DMEM medium supplemented with 2mM L-glutamine, 10% FCS (Sigma Aldrich) and 1% penicillin/streptomycin. In OGD or normoxia conditions, cells were treated with 10 ng/ml or 100 ng/ml of HSm4131, as described by Frescaline *et al.* (Frescaline *et al.*, 2012c). Following 24 hr cell incubation, pictures of the adherent cells were taken with an inverted Zeiss microscope (Zeiss, Primo Vert. Germany), then analyzed using trypan blue and crystal violet viability assays.

Trypan Blue solution was used after 24 hr cell incubation in normoxia or OGD conditions. Following trypsin digestion, cells were centrifuged at 300 rpm for 5 min, suspended in 50 μ l of PBS and trypan blue staining was used to evaluate cell survival rates. The experiment was carried out three times in triplicate for each condition.

For the crystal violet staining, after 24 hr cell incubation in normoxia or OGD conditions, cells were incubated for 30 min with a crystal violet solution, then a 10% acetic acid solution was added after a PBS wash. Finally, the absorbance was measured at 600 nm with a spectrophotometer (SPARK, Tecan, Switzerland). The experiment was carried out four times in triplicate for each condition. Quantification of brain damage by magnetic resonance imaging

Two and fourteen days (D2/D14) after ischemia induction, animals were anesthetized as described before, and subjected to magnetic resonance imaging (MRI) examinations (7T, PharmaScan®, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany at the CYCERON imaging platform, Caen, France). After a scout view, T2w imaging was performed using the rapid acquisition with refocused echoes (RARE) sequence (RARE factor of 8; TR/TE = 5000/16.25 ms; number of experiments (NEX) = 2; 20 contiguous slices of 0.75 mm; acquisition time = 4 min; nominal resolution = 0.15 x 0.15 x 0.75 mm³). All MRI images were analyzed with the ImageJ® software (Schneider *et al.*, 2012) (Wayne Rasband, NIMH, Maryland, USA). Brain lesions were manually delineated on the MRI images. At D2 after cerebral ischemia, the volume of infarction was corrected for edema, as described by Gerriets and colleagues (Gerriets *et al.*, 2004b). At D14 after ischemic stroke, the cerebral atrophy (i.e., the difference between the remaining healthy ipsilateral hemisphere and the contralateral one expressed as a percentage of the contralateral healthy

hemispheric volume) was measured as previously described by Leconte and colleagues (Leconte *et al.*, 2009).

Behavioral test (Cylinder test)

The forelimb use asymmetry was assessed according to Schallert and colleagues (Schallert *et al.*, 2002). The ipsilateral, contralateral or bilateral forelimb activity to explore the cylinder by rearing was recorded 20 times.

Reverse transcription and real-time quantitative PCR

On D2 and D7 after MCAo, rats were euthanized under deep anesthesia and the brain tissues were collected. Total RNA from brain tissues was extracted and purified using the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). RNA concentration was measured with the NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). RNA was reverse-transcribed with the AMV® reverse transcriptase (Promega), and the cDNA was amplified with the Applied Biosystems QuantStudio™ 6 & 7 Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, USA) and the Takyon™ Low Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Belgium) with primers designed by Eurogentec (Supplementary data 1). GAPDH was used as an endogenous RNA control (housekeeping gene). Primer sequences for heparanase were purchased from Eurogentec, Belgium. Samples were run in triplicates with the following amplification protocol: 95°C for 3 min followed by 40 cycles at 95°C for 3 sec and at 60°C for 30 sec. Expression levels were calculated using the

comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) after normalization to GAPDH and results were represented as the mean values.

Immunohistochemistry

BrdU-labeled MSCs were infused on D1, and rats were euthanized on D2 after MCAo. Briefly, under deep anesthesia, animals underwent trans-cardiac perfusion of heparinized saline (10 IU/mL) followed by a 4% paraformaldehyde (PFA) perfusion (Sigma, France). Brains were placed for 48 hr in a 4% PFA solution, then transferred into a 30% sucrose solution. Cryosections (50 µm) were obtained in the coronal plane using a microtome (HM 450 Sliding Microtome, Thermo Scientific™).

Sections were washed in PBS, incubated in 2N HCl at 37°C for 1 hr, followed by a 10 min incubation in 0.1 M boric acid. Sections were then blocked in 3% BSA for 2 hr at room temperature and stained with a polyclonal rat anti-BrdU antibody (Roche 0.2 µg/mL) overnight at 4°C. Sections were then washed with PBS followed by 2 hr incubation with secondary Alexa Fluor® 488 antibody (4 µg/ml, Invitrogen) and the nuclear marker, Hoechst 33342 (1/5000, Sigma Aldrich) at room temperature.

HS distribution following ischemic stroke was performed on D2 after MCAo, as previously described (Khelif *et al.*, 2018b). Briefly, tissue cryosections were washed and incubated for 2 min with 50 mM NH₄Cl in PBS and washed again before blocking with a solution of 3% BSA for 1hr at room temperature. HS was

stained with the 10E4 antibody (1:100), which recognizes HS chains in HSPG, followed by incubation of tissue sections with a donkey anti-mouse secondary antibody conjugated to the Alexa-488 fluorophore (Molecular Probes, 1:200). Images were obtained with a confocal microscope (IX81 DSU Olympus, 60 N.A. 1.35) coupled to an Orca Hamamatsu RCCD camera (Olympus®). All image processing and analysis were performed using the ImageJ® software (Wayne Rasband, NIMH, Maryland, USA) (Schneider *et al.*, 2012).

Statistical analyses

Data were analyzed using a two-tailed Student *t*-test or an analysis of variance (one or two-way ANOVA) followed by a Tukey HSD test or a Dunnett test (JMP® program, SAS Institute, Cary, NC, USA) when appropriate. Data are expressed as mean ± standard deviation (SD) or median ± interquartile range (IQR). Statistical significance for all analyses was set with a type I error $\alpha = 0.05$.

Results

Combining HSm4131 with MSCs offers sustained neuroprotection and better functional recovery after a stroke

When HSm4131 (1.5 mg/kg) was given either at 1 hr, or at 1 hr and 24 hr after MCAo, there was no significant reduction in the volume of ischemic lesion as quantified by MRI at D2 (Figure 2A, 2B). The same result was observed with administration of MSCs alone or combined with a single administration of HSm4131 (Figure 2A, 2B). However, when HSm4131 was re-injected at 24 hr together with MSCs (i.e.,

HSm4131/MSCs + HSm4131 group), a robust early neuroprotection at D2 after cerebral ischemia was seen, with an infarct volume reduction of 58% compared to vehicle group (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test $p < 0.05$) (Figure 2A, 2B). MRI images taken at D14 after cerebral ischemia showed that all groups treated with MSCs demonstrated a significant reduction in the ischemic lesion volume compared to vehicle group (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test; $p < 0.05$) (Figure 2A, bottom), with a decrease of the infarct volume up to 48% compared to the vehicle group (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test $p < 0.05$) (Figure 2C), demonstrating that the neuroprotection was maintained for 14 days after MCAo.

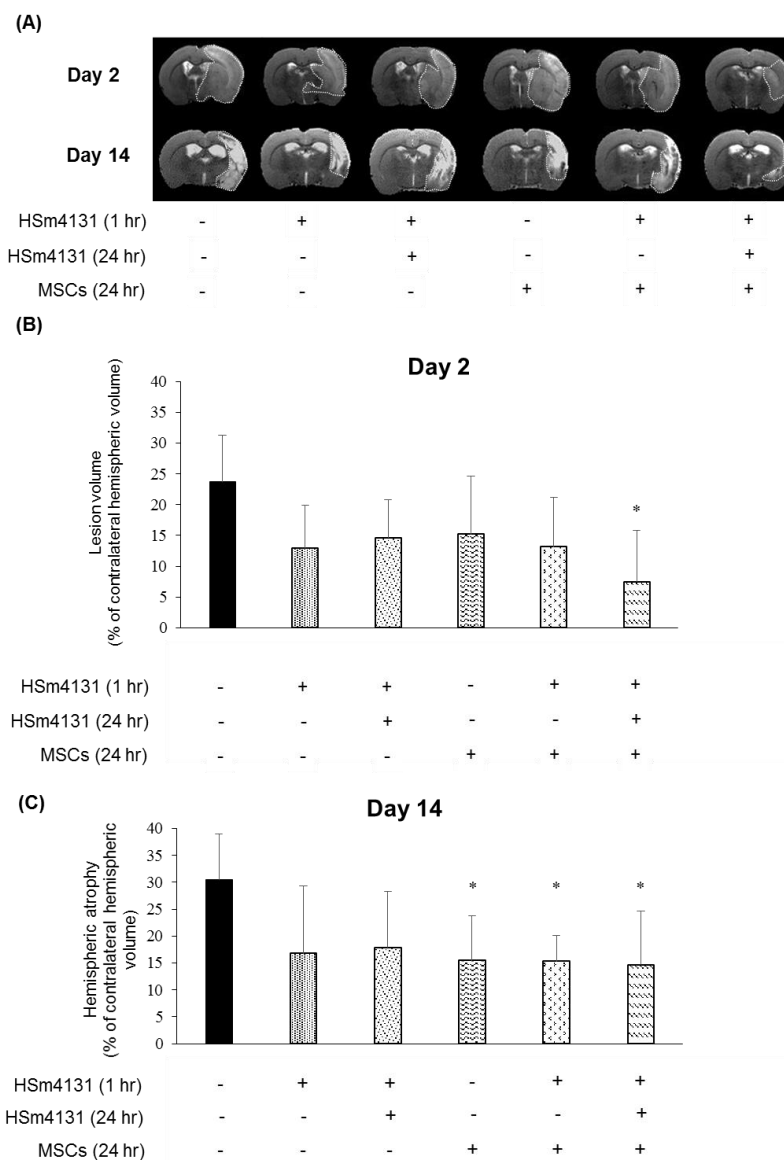


Figure 2: Effects of combining administration of HSm4131 (i.v.) and MSCs (i.v.) on the lesion volume.

(A) Representative MRI at D2 and D14 post-MCAo; (B) Quantitative analysis of infarct volumes at D2 post-MCAo and (C) at D14 post-MCAo (mean \pm SD) (vehicle/vehicle n=6; HSm4131/vehicle n=7; HSm4131/vehicle + HSm4131 n=5; vehicle/MSCs n=9; HSm4131/MSCs n=8; and HSm4131/MSCs + HSm4131 n=8). *Statistically different from the vehicle group (one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey HSD test $p < 0.05$).

The sensorimotor deficits were assessed using the cylinder test where the use of the contralateral forepaw was monitored during the 6 weeks after MCAo. Compared to the vehicle group, only the HSm4131/MSCs + HSm4131 group exhibited a significantly higher percentage of contralateral forelimb use during the test period, which was maintained for 6 weeks (two-way ANOVA p group = 0.0091; p time < 0.0001; p group * time = 0.2798; followed by HSD of Tukey p = 0.016) (Figure

3; Supplementary data 2). These results highlight the ability of HSm4131 co-administration to potentiate the protective effects of MSCs. Giving HSm4131 at 1 hr and at the same time as MSCs provided the best early and long-lasting neuroprotection and the best functional recovery in the sensorimotor test. Thus, the HSm4131/MSCs + HSm4131 treatment combination was used for the remaining of the studies.

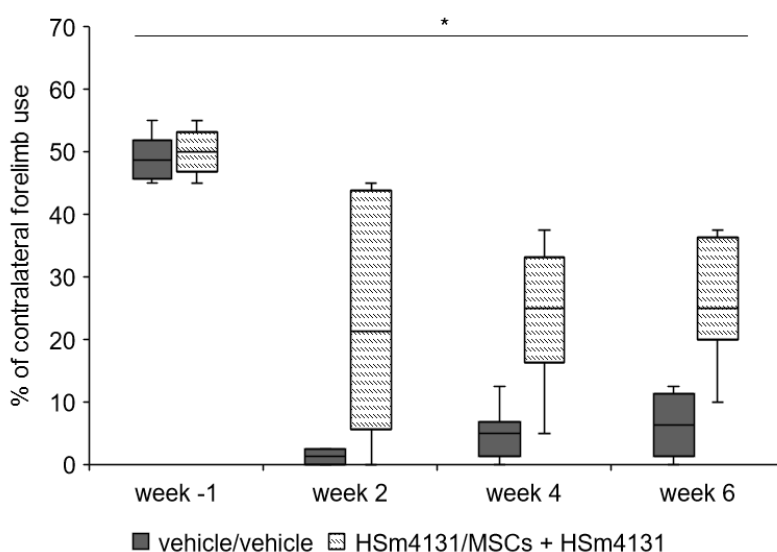


Figure 3: Effects of combining administration of HSm4131 (i.v.) and MSCs (i.v.) on functional recovery. Cylinder test (median \pm IQR) *HSm4131/MSCs + HSm4131 treated group different from vehicle/vehicle group (two-way ANOVA, p group = 0.0091; p time < 0.0001; p group * time = 0.2798 followed by a post-hoc

HSm4131 increases the number of MSCs in the ischemic hemisphere

To better understand the outcome of MSCs after intravenous infusion, MSCs were pre-labeled with BrdU, administered as in Figure 1, and quantified by immunohistochemistry in the whole brain at D2 after the ischemic stroke. Clusters of MSCs were found predominantly in the ipsilateral hemisphere in the vicinity of the

greater in the HSm4131/MSCs + HSm4131-treated rats compared to the group treated with MSCs alone (Student t -test p < 0.05) (Figure 4B, 4C), demonstrating potentiation of MSCs homing by HSm4131.

HSm4131 does not protect MSCs subjected to OGD-stress

To evaluate if HSm4131 could have a direct effect on MSCs viability under *in vitro* ischemic-like conditions, i.e., OGD conditions,

we assessed cell viability using the crystal violet and trypan blue assays. A significant reduction of MSCs viability of nearly 50% was observed under OGD conditions compared to normoxia conditions (Student *t*-test $p < 0.05$) (Figure 5A-C). However, no difference in cell viability was observed between the control- and HSm4131-treated cells under normoxia or OGD conditions with both tests (two-way ANOVA $p > 0.05$) (Figure 5A-C).

HSm4131 reduces the ischemia-induced increase in heparanase gene expression and preserves HS distribution

To evaluate if HSm4131 might modulate the microenvironment of MSCs, heparanase gene expression following MCAo was analyzed at D2 and D7 after MCAo. Heparanase expression in the ipsilateral hemisphere compared to the contralateral one was increased in the vehicle group at D7 (*two-way ANOVA; $p_{\text{day}} = 0.0124$; $p_{\text{group}} = 0.0265$; $p_{\text{day} * \text{group}} = 0.0392$; followed by post-hoc Tukey HSD test $p < 0.05$) (Figure 6A). Remarkably, HSm4131 significantly reduced heparanase expression in the ipsilateral hemisphere at D7 after MCAo compared to the vehicle group (*two-way ANOVA; $p_{\text{day}} = 0.0124$; $p_{\text{group}} = 0.0265$; $p_{\text{day} * \text{group}} = 0.0392$; followed by a post-hoc Tukey HSD test $p < 0.05$) (Figure 6A). In addition, to further investigate the ECM brain tissue, HS distribution 48 hr after ischemic stroke was analyzed by immunohistochemistry using the HS antibody 10E4. Noticeably, HS staining was higher in the striatum of the ipsilateral hemisphere of animals treated with HSm4131/MSCs + HSm4131 compared to

animals treated with MSCs alone (Figure 6B), suggesting efficient glycanic ECM and cell protection by HSm4131.

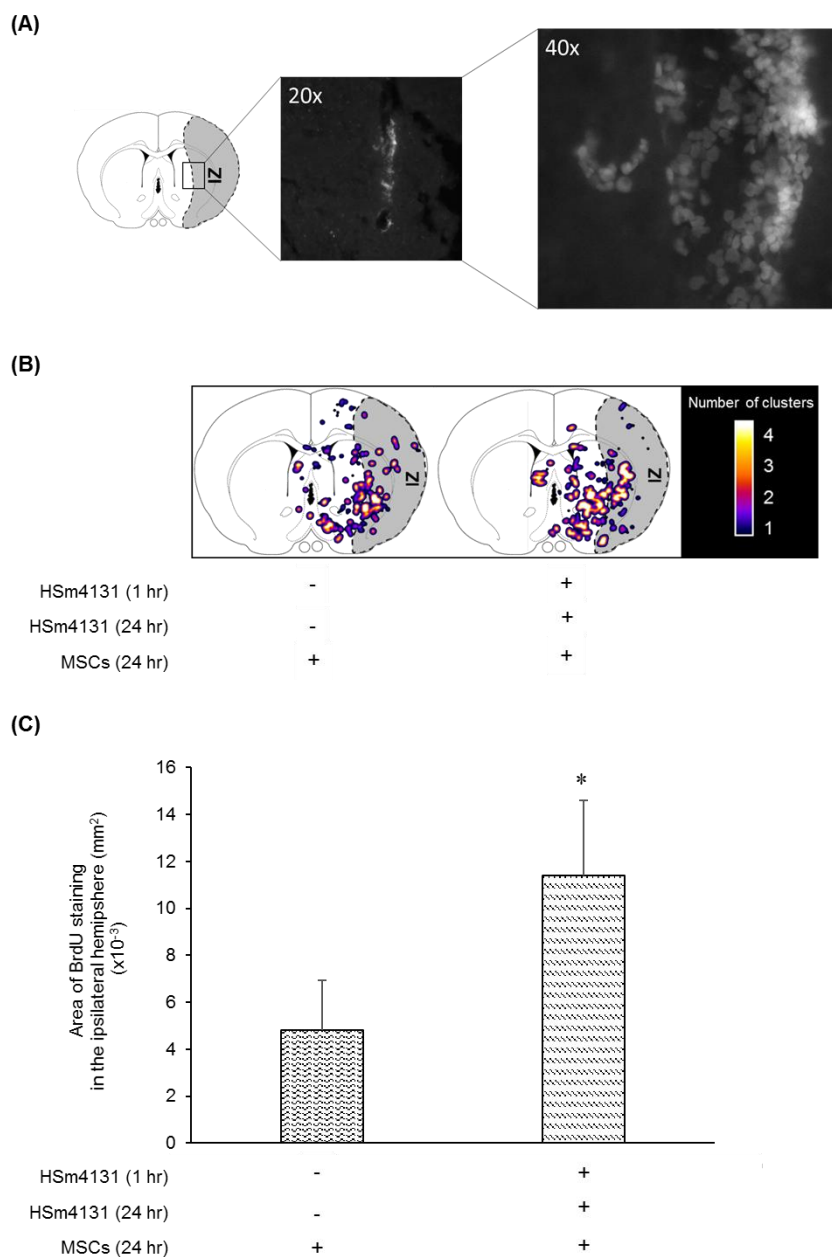


Figure 4: Effect of HSm4131 on MSCs homing to the ipsilateral hemisphere after MCAo.

(A) Representative images of BrdU-prelabeled MSCs stained with anti-BrdU antibody in the ipsilateral hemisphere. (B) Heat map representing MSCs cluster distribution in the coronal plane of a rat brain template after MCAo. (C) Quantification of MSCs in the ipsilateral hemisphere after administration of BrdU-prelabeled MSCs (i.v.) (mean \pm SD) (4-5 slices per animal were analyzed) (vehicle/MSCs n=6; HSm4131/HSm4131 + MSCs n=5; *Student *t*-test $p < 0.05$). IZ: ischemic zone.

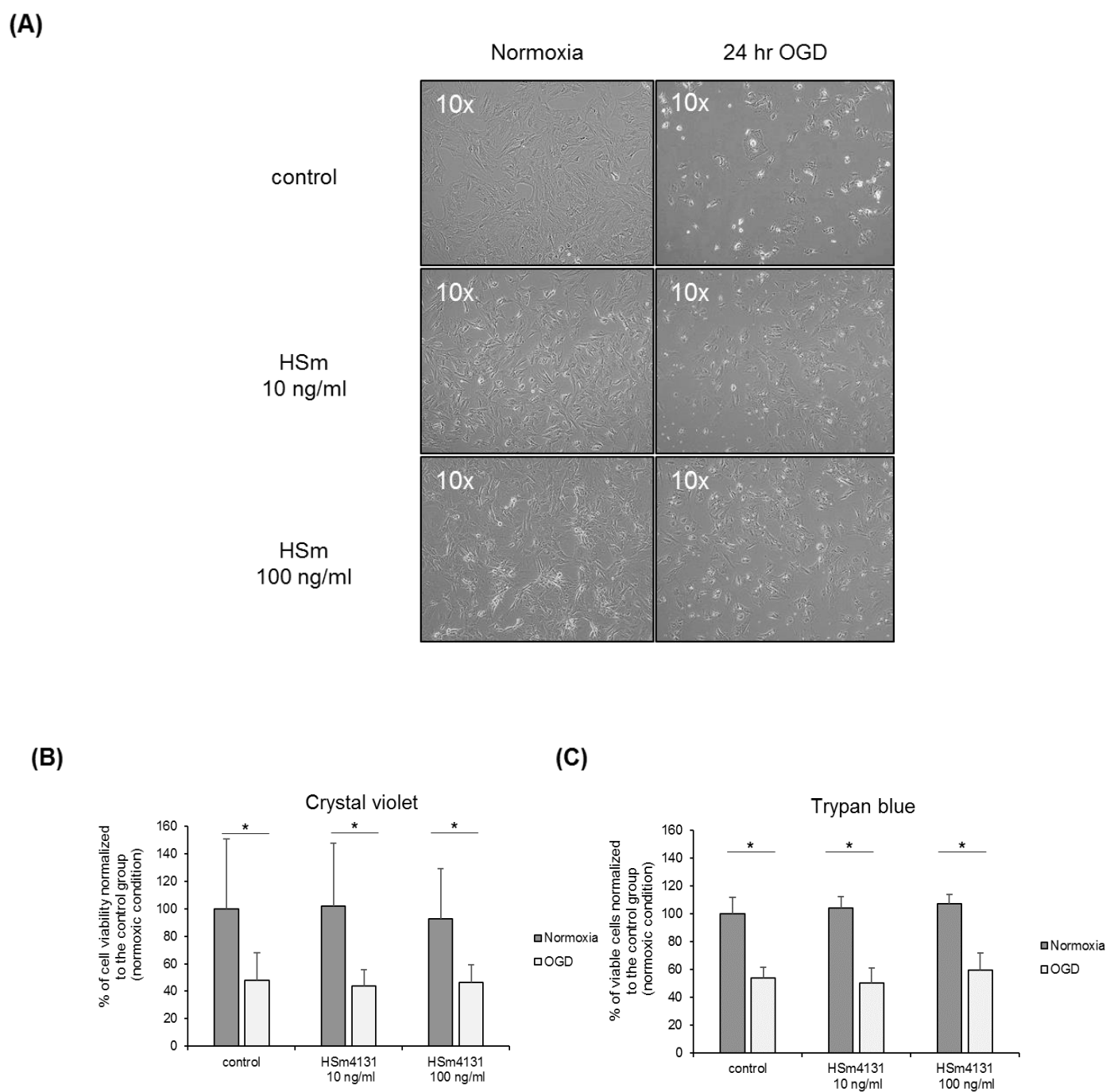


Figure 5: Effect of HSm4131 on MSCs viability after 24 hr oxygen/glucose deprivation (OGD).

(A) Representative images of control or treated (HSm 10 ng/ml or 100 ng/ml) MSCs cell culture under normoxia or OGD conditions. **(B)** Quantification of MSCs viability under normoxia or OGD conditions using crystal violet or **(C)** Trypan blue (mean \pm SD) (*Student *t*-test $p < 0.05$). IZ: ischemic zone.

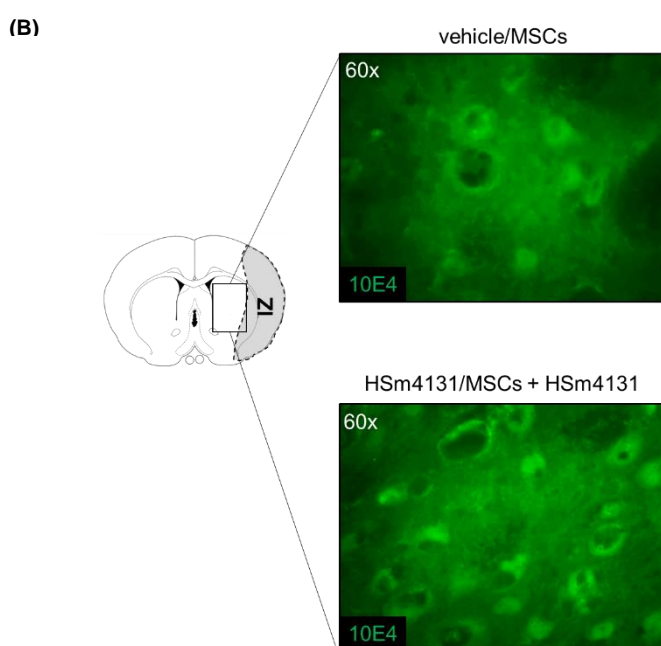
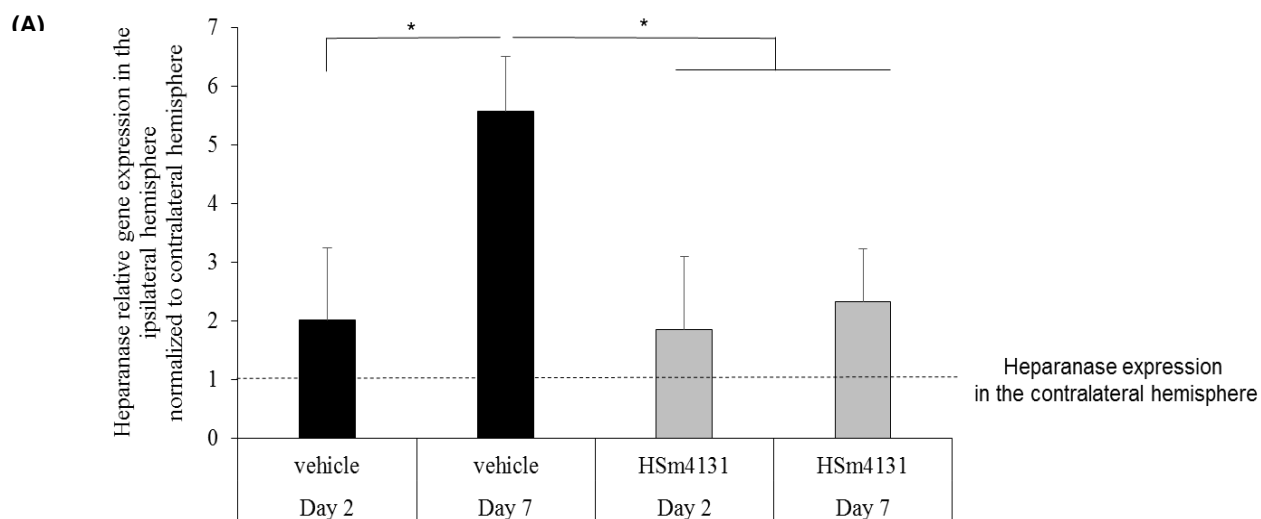


Figure 6: Effect of HSm4131 on heparanase gene expression and HS distribution.

(A) Heparanase gene expression on D2 and D7 after MCAo in the ipsilateral hemisphere of vehicle- and HSm4131-treated animals. Results are expressed as gene expression relative to the GAPDH housekeeping gene normalized to contralateral hemisphere (mean \pm SD) (vehicle $n=3$; HSm4131 $n=3$) (*two-way ANOVA; p day = 0.0124, p group = 0.0265, p day * group = 0.0392; followed by a post-hoc Tukey HSD test $p < 0.05$); **(B)** Representative images of HS distribution in the striatum of the ipsilateral hemisphere in the vehicle/MSCs ($n=6$)- and HSm4131/MSCs + HSm4131 ($n=5$)-treated groups. IZ: ischemic zone.

Combining HSm4131 with MSCs is also neuroprotective in hypertensive animals

To analyze whether the beneficial effects of combining MSCs and HSm4131 treatments is sustained even in presence of chronic arterial hypertension (CAH), considered to be the major risk factor of stroke, the effects of HSm4131 administered alone or in combination with MSCs were evaluated in spontaneously hypertensive rats (Figure 1).

Mean arterial blood pressure in hypertensive and normotensive rats was 200 ± 5 mmHg and 120 ± 8 mmHg, respectively (Supplementary data 3).

In hypertensive animals, MRI images did not show any neuroprotection of single administration of HSm4131 compared to vehicle group at D2 (Figure 7A, 7C) and D14 (Figure 7A, 7E) after MCAo. However, the HSm4131/MSCs + HSm4131 group demonstrated a persistent reduction in the ischemic volume lesion of 19% at D2 (Figure 7B, 7D) and 18% at D14 (Figure 7B, 7F) compared to vehicle group (Student *t*-test $p < 0.05$).

Sensorimotor deficits were also assessed in SHR rats after cerebral ischemia using the cylinder test. Vehicle animals and those treated only with HSm4131 did not show an increase of the contralateral forepaw (Figure 8A, 8B). However, animals treated with HSm4131 co-administered with MSCs displayed a higher rate of use of the contralateral forepaw demonstrating a reduced lateralization compared to the vehicle group (two-way

ANOVA; p group = 0.0241; p time = 0.2235; p time * group = 0.8356; followed by a Dunnett test $p = 0.0241$) (Figure 8B).

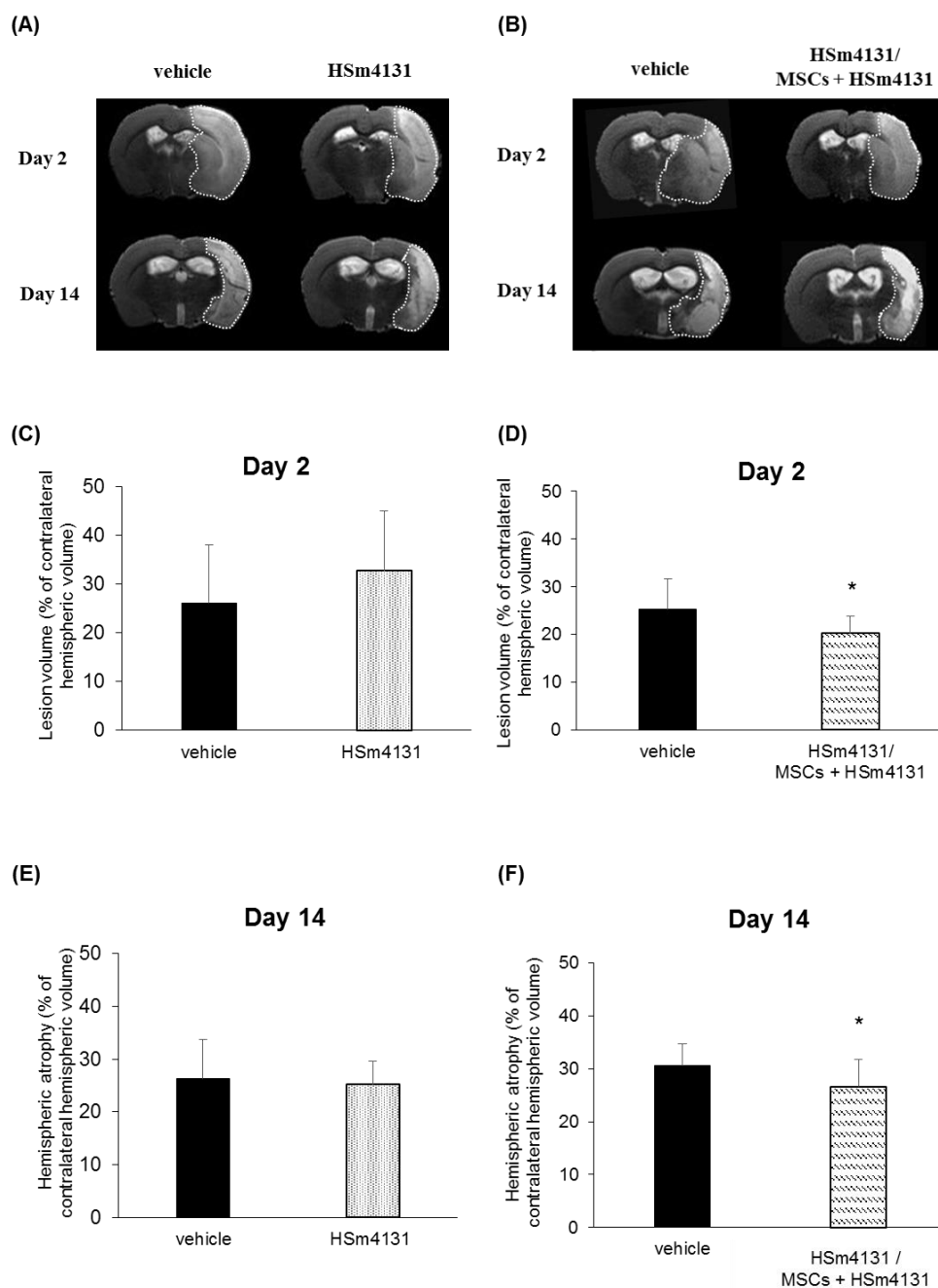


Figure 7: Effects of combining administration of HSm4131 and MSCs on lesion volume in hypertensive (SHR) rats.

(A) Representative MRI at D2 and **(B)** D14 post-MCAo. Infarct volumes at D2 post-MCAo **(C)** vehicle n=13, HSm4131 n=13 **(D)** vehicle n=10, HSm4131/MSCs + HSm4131 n=9 (mean \pm SD). Infarct volumes at D14 post-MCAo **(E)** vehicle n=13, HSm4131 n=13 **(F)** vehicle n=10, HSm4131/MSCs + HSm4131 n=9 (mean \pm SD).

*Statistically different from other groups (Student *t*-test $p < 0.05$).

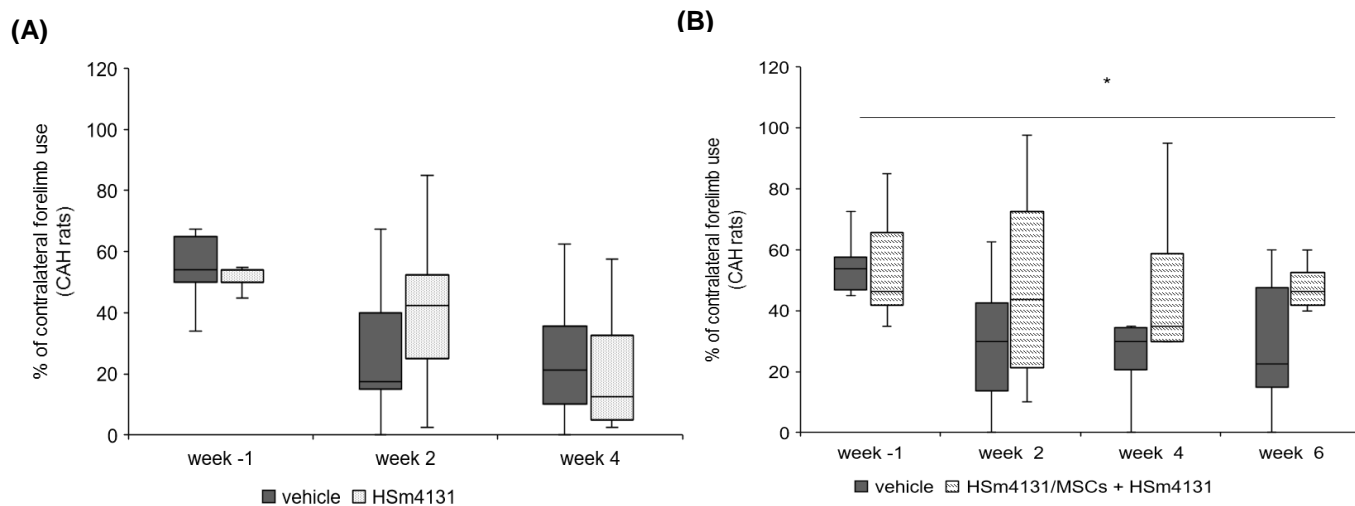


Figure 8: Effects of combining administration of HSm4131 and MSCs on functional recovery in hypertensive rats.

Assessment of the contralateral forepaw use by the cylinder test (A) in vehicle $n=12-13$; HSm4131 $n=13$; and (B) in vehicle $n=10$, HSm4131/MSCs+ HSm4131 $n=8$ (median \pm IQR); *HSm4131/MSCs+ HSm4131-treated group different from vehicle group period (two-way ANOVA, p group = 0.0241; p time = 0.2235; p time * group = 0.8356 followed by a post-hoc Dunnett test $p < 0.05$).

Discussion

In the present study, we have shown that systemic (i.v.) administration of HSm4131 enhances the beneficial effects of the administered MSCs in an ischemic stroke model in rats. The effect on neuroprotection and functional recovery was observed at the acute (D2) and chronic (D14) stages, and was maintained for at least 6 weeks after ischemic stroke. Moreover, co-administration (i.v.) of MSCs with HSm4131 resulted in better neuroprotection and functional recovery, not only in normotensive but also in hypertensive animals. This potentiated effect could be related to the preserved HS distribution in the brain tissue, and the increased number of MSCs in the ischemic hemisphere when animals are treated with HSm4131.

HSm have proven their efficacy in the repair of many tissue lesions, including ischemia-induced lesions in the heart and brain tissues (Barritault *et al.*, 2017a; Khelif *et al.*, 2018b). HSm are thought to promote tissue repair through remodeling of the degraded ECM, and through the binding, protection, and potentiation of multiple growth factors (Barritault *et al.*, 2017a). On the other hand, many studies have shown that MSCs have the ability to protect the brain tissue against ischemic lesion, inflammation and cell death, and to improve tissue repair (Drago *et al.*, 2013b; Detante *et al.*, 2014; Péron & Berninger, 2015; Stonesifer *et al.*, 2017). The repair mechanisms and protection by MSCs involve the secretion of neurotrophic factors, the promotion of angiogenesis, neurogenesis,

synaptic plasticity, and the modulation of the immune reaction (Detante *et al.*, 2014; Sammali *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017).

In our study, MSCs were administered 24 hr after ischemic stroke induction. This time window has been shown to be efficient in reducing ischemic infarct volume and sensorimotor deficits after cerebral ischemia in rodents in many preclinical studies (de Vasconcelos dos Santos *et al.*, 2010; Komatsu *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2015; Toyoshima *et al.*, 2015). Regarding the delivery route of MSCs, the present study shows that i.v. administration of MSCs, and combined administration of HSm4131, resulted in long-lasting neuroprotection and functional recovery. These results are in accordance with those obtained by Zhang and collaborators (Zhang *et al.*, 2018a). In their study, MSCs were administered via i.v., intra-cerebrally, or intra-arterially, and the results showed that the functional recovery and the increased brain plasticity induced by MSCs after a transient focal cerebral ischemia were independent of the delivery route (Zhang *et al.*, 2018b). However, previous studies have raised issues about the i.v. MSCs administration. Because of an anoikis cell death (death due the loss of matrix adhesion) and migration limitations, only a few number of MSCs reach the ischemic hemisphere following an i.v. administration. Since HSm4131 is a matrix-based molecule that has been also shown to promote MSCs proliferation and migration [5], we studied the neuroprotective potential of the co-administration of HSm4131 and MSCs following an ischemic stroke. While the optimal

timing and delivery route of MSCs continue to be investigated, many preclinical studies have shown MSCs neuroprotective effects (Kim & Park, 2017). Our study shows that the neuroprotective potential of MSCs can be significantly expanded by a combined administration with HSm4131, resulting in a greater neuroprotection and better functional recovery. These effects could be partly explained by the increase of MSCs proliferation and/or survival induced by HSm4131. In 2012, we reported *in vitro* studies showing that HSm can enhance the proliferation, migration and differentiation of MSCs (Frescaline *et al.*, 2012b). To investigate whether HSm4131 can also affect these functions *in vivo*, we used BrdU-labeled MSCs to follow their migration into the rat brains. Our results demonstrate that HSm4131 increases the survival and/or migration of MSCs towards the ischemic lesion. To further investigate the effect of HSm4131 on MSCs survival in ischemic-like conditions, MSCs were subjected to a 24 hr OGD, and co-incubated or not with HSm4131 at doses similar to those used in the previously mentioned study (Frescaline *et al.*, 2012b). Interestingly, HSm4131 did not improve MSCs survival under OGD conditions. Therefore, the increase in MSCs homing when co-administered with HSm4131 cannot be explained by a protective effect of HSm4131 on MSCs cell death during stroke. However, a direct effect of HSm4131 on rat MSCs migration has been previously reported by Frescaline *et al.* (2012), it is possible that HSm4131 could facilitate MSCs migration towards the ischemic hemisphere (Frescaline *et al.*, 2012c).

As HSm are known to restore ECM architecture, we sought to investigate changes in the MSCs microenvironment, particularly regarding HS distribution. Our results demonstrate that HSm4131 prevents the increase in heparanase gene expression induced by ischemia in the ipsilateral hemisphere, as confirmed by immunohistochemistry. These results are in accordance with several studies reporting an increase of heparanase expression in the ipsilateral hemisphere 3 to 7 days after ischemia (Takahashi *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011; Changyaleket *et al.*, 2017). In our previous studies, we have shown that an analogue of HSm4131 inhibits heparanase activity and decreases its expression *in vitro* in two different cell culture models (Rouet *et al.*, n.d.; Barbosa *et al.*, 2005). Moreover, in a previous study using the same ischemic stroke model, we have shown that HSm4131 protects HS biodistribution following ischemic stroke (Khelif *et al.*, 2018b). In this study, HS distribution was also preserved in the ipsilateral hemisphere in animals treated with MSCs + HSm4131 compared to animals treated only with MSCs. All together, these results suggest that HSm4131 protects against HS destruction, maintaining ECM architecture, and could thereby favor the formation of a niche for MSCs homing.

Few studies take into account stroke risk factors, particularly CAH, which is an aggravating risk factor that increases the infarct volume (Kumar, 2016b). Furthermore, very few treatments (less than 10%) remain effective in the presence of co-morbidity factors such as

CAH, despite showing efficacy in ischemic normotensive rats (O'Collins *et al.*, 2013). In this study, we show that the combination of HSm4131 and MSCs also protects the brain of hypertensive rats against cerebral ischemia. Nevertheless, although the combination of HSm4131 and MSCs reduced the infarct volume, the neuroprotection was not as marked in hypertensive as in normotensive rats. This result might be explained by the smaller volume of penumbra following ischemic stroke in hypertensive rats compared to normotensive rats, as penumbra is the main target of neuroprotective treatments (Letourneur *et al.*, 2011b).

Stroke comorbidities such as hypertension are a major source of failure in the translation of neuroprotection strategies from animal models to human clinical trials (Minnerup *et al.*, 2012b). Using a clinically relevant rat model of cerebral ischemia, this study investigated the benefits of co-administering HSm4131 and MSCs, demonstrating sustained neuroprotective effects and functional recovery. HSm-based products have been used to heal chronic skin wounds and corneal ulcers in over 100,000 patients, without any reported side effect (Barritault *et al.*, 2017a). On the other hand, several clinical studies have shown the safety and feasibility of MSCs-based therapy for ischemic stroke (Bang, 2016). As both HSm and MSCs have already undergone extensive clinical trials or use, a therapy combining HSm with MSCs may be quickly transferred to stroke patients without major issues. Therefore, the

long-lasting ischemic volume reduction and improvement of functional recovery observed in both normotensive and hypertensive rats highlight the potential of combined administration of HSm and MSCs as a novel promising therapeutic strategy in patients with ischemic stroke.

Declaration of interest

This study was in part supported by OTR3 S.A.S, the manufacturer of RGTA[®] (HSm4131). NH and FC are employed by OTR3, DB is a significant OTR3 shareholder, RGTA[®] patent inventor and OTR3 co-owner. All provided technical guidance for these experiments as members of the project steering committee. However, the funding body had no influence on data acquisition, evaluation or data presentation. MB, OT, MSQ, JT and DB, are patent inventors of the interest of RGTA[®] (HSm4131) in combination with MSCs for stroke.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS, the Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche, the University of Normandy, OTR3 S.A.S, the ANR (Agence Nationale de la Recherche, ANR-15-CE18-0029-01-« MAESTRO »), the Région Normandie, and the European Regional Development Fund (ERDF) (3R project). The authors wish to thank Dr. Martine Torres for her critical reading and editing of the manuscript.

References

- [1] D. Mukherjee, C.G. Patil, Epidemiology and the Global Burden of Stroke, *World Neurosurg.* 76 (2011) S85–S90. doi:10.1016/j.wneu.2011.07.023.
- [2] B.M. Demaerschalk, A.M. Demchuk, J.E. Fugate, J.C. Grotta, A.A. Khalessi, E.I. Levy, Y.Y. Palesch, S. Prabhakaran, AHA / ASA Scientific Statement Scientific Rationale for the Inclusion and Exclusion Criteria for Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke, 2016. doi:10.1161/STR.0000000000000086.
- [3] D. Papy-Garcia, P. Albanese, Heparan sulfate proteoglycans as key regulators of the mesenchymal niche of hematopoietic stem cells, *Glycoconj. J.* 34 (2017) 377–391. doi:10.1007/s10719-017-9773-8.
- [4] N.N. Zinkova, E.G. Gilerovitch, I.B. Sokolova, E. V. Shvedova, A.A. Bilibina, P. V. Kruglyakov, D.G. Polyntsev, Dynamics of morphological changes after transplantation of mesenchymal stem cells in rat brain provoked by stroke, *Cell Tissue Biol.* 1 (2007) 482–490. doi:10.1134/S1990519X0706003X.
- [5] H.J. Kim, J.-S. Park, Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: Advantages and Disadvantages., *Dev. Reprod.* 21 (2017) 1–10. doi:10.12717/DR.2017.21.1.001.
- [6] O.Y. Bang, Clinical Trials of Adult Stem Cell Therapy in Patients with Ischemic Stroke, *J. Clin. Neurol.* 12 (2016) 14. doi:10.3988/jcn.2016.12.1.14.
- [7] D. Drago, C. Cossetti, N. Iraci, E. Gaude, G. Musco, A. Bachi, S. Pluchino, The stem cell secretome and its role in brain repair, *Biochimie.* 95 (2013) 2271–2285. doi:10.1016/j.biochi.2013.06.020.
- [8] F.J. Vizoso, N. Eiro, S. Cid, J. Schneider, R. Perez-Fernandez, Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017). doi:10.3390/ijms18091852.
- [9] J.M. Lee, B.S. Kim, H. Lee, G. Il Im, In vivo tracking of mesenchymal stem cells using fluorescent nanoparticles in an osteochondral repair model, *Mol. Ther.* 20 (2012) 1434–1442. doi:10.1038/mt.2012.60.
- [10] D. Barritault, M. Gilbert-Sirieix, K.L. Rice, F. Siñeriz, D. Papy-Garcia, C. Baudouin, P. Desgranges, G. Zakine, J.-L. Saffar, J. van Neck, RGTA® or ReGeneraTing Agents mimic

heparan sulfate in regenerative medicine: from concept to curing patients., *Glycoconj. J.* 34 (2017) 325–338. doi:10.1007/s10719-016-9744-5.

[11] G. Frescaline, T. Boudierlique, M.B. Huynh, D. Papy-Garcia, J. Courty, P. Albanese, Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells, *Stem Cell Res.* 8 (2012) 180–192. doi:10.1016/j.scr.2011.09.005.

[12] V. Rouet, Y. Hamma-Kourbali, E. Petit, P. Panagopoulou, P. Katsoris, D. Barritault, J.P. Caruelle, J. Courty, A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 32792–32800. doi:10.1074/jbc.M504492200.

[13] F. Chevalier, M. Lavergne, E. Negroni, S. Ferratge, G. Carpentier, M. Gilbert-Sirieix, F. Siñeriz, G. Uzan, P. Albanese, Glycosaminoglycan mimetic improves enrichment and cell functions of human endothelial progenitor cell colonies., *Stem Cell Res.* 12 (2014) 703–15. doi:10.1016/j.scr.2014.03.001.

[14] Y. Khelif, J. Toutain, M.-S. Quittet, S. Chantepie, X. Laffray, S. Valable, D. Divoux, F. Sineriz, E. Pascolo-Rebouillat, D. Papy-Garcia, D. Barritault, O. Touzani, M. Bernaudin, A heparan sulfate-based matrix therapy reduces brain damage and enhances functional recovery following stroke, *Theranostics.* 8 (2018) 5814–5827. doi:10.7150/thno.28252.

[15] Y. Khelif, J. Toutain, M.-S. Quittet, S. Chantepie, X. Laffray, S. Valable, D. Divoux, F. Sineriz, E. Pascolo-Rebouillat, D. Papy-Garcia, D. Barritault, O. Touzani, M. Bernaudin, A heparan sulfate-based matrix therapy reduces brain damage and enhances functional recovery following stroke, *Theranostics.* 8 (2018) 5814–5827. doi:10.7150/thno.28252.

[16] G. Frescaline, T. Boudierlique, L. Mansoor, G. Carpentier, B. Baroukh, F. Sineriz, M. Trouillas, J.-L. Saffar, J. Courty, J.-J. Lataillade, D. Papy-Garcia, P. Albanese, Glycosaminoglycan mimetic associated to human mesenchymal stem cell-based scaffolds inhibit ectopic bone formation, but induce angiogenesis in vivo., *Tissue Eng. Part A.* 19 (2013) 1641–53. doi:10.1089/ten.TEA.2012.0377.

[17] J. Chen, Y. Li, L. Wang, Z. Zhang, D. Lu, M. Lu, M. Chopp, K. Miyatake, K. Kangawa, Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats., *Stroke.* 32 (2001) 1005–11. doi:10.1161/01.str.32.4.1005.

- [18] J. Chuquet, K. Benchenane, J. Toutain, E.T. MacKenzie, S. Roussel, O. Touzani, Selective blockade of endothelin-B receptors exacerbates ischemic brain damage in the rat, *Stroke*. 33 (2002) 3019–3025. doi:10.1161/01.STR.0000039401.48915.9F.
- [19] M.-S. Quittet, O. Touzani, L. Sindji, J. Cayon, F. Fillesoye, J. Toutain, D. Divoux, L. Marteau, M. Lecocq, S. Roussel, C.N. Montero-Menei, M. Bernaudin, Effects of mesenchymal stem cell therapy, in association with pharmacologically active microcarriers releasing VEGF, in an ischaemic stroke model in the rat., *Acta Biomater*. 15 (2015) 77–88. doi:10.1016/j.actbio.2014.12.017.
- [20] G. Frescaline, T. Boudierlique, M.B. Huynh, D. Papy-Garcia, J. Courty, P. Albanese, Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells, *Stem Cell Res*. 8 (2012) 180–192. doi:10.1016/j.scr.2011.09.005.
- [21] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis., *Nat. Methods*. 9 (2012) 671–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930834> (accessed April 6, 2018).
- [22] T. Gerriets, E. Stolz, M. Walberer, C. Müller, A. Kluge, A. Bachmann, M. Fisher, M. Kaps, G. Bachmann, Noninvasive Quantification of Brain Edema and the Space-Occupying Effect in Rat Stroke Models Using Magnetic Resonance Imaging, *Stroke*. 35 (2004) 566–571. doi:10.1161/01.STR.0000113692.38574.57.
- [23] C. Leconte, E. Tixier, T. Freret, J. Toutain, R. Saulnier, M. Boulouard, S. Roussel, P. Schumann-Bard, M. Bernaudin, Delayed hypoxic postconditioning protects against cerebral ischemia in the mouse, *Stroke*. 40 (2009) 3349–3355. doi:10.1161/STROKEAHA.109.557314.
- [24] T. Schallert, M.T. Woodlee, S.M. Fleming, F.S. Schallert T, Woodlee MT, Disentangling multiple types of recovery from brain injury recovery of function, *Pharmacol. Cereb. Ischemia*. (2002) 201–216. <http://homepage.psy.utexas.edu/HomePage/Group/SchallertLAB/Marburg.pdf>.
- [25] D. Barritault, P. Desgranges, A. Meddahi-Pellé, J.-M. Denoix, J.-L. Saffar, RGTA®-based matrix therapy – A new branch of regenerative medicine in locomotion, *Jt. Bone Spine*. 84 (2017) 283–292. doi:10.1016/j.jbspin.2016.06.012.

- [26] D. Drago, C. Cossetti, N. Iraci, E. Gaude, G. Musco, A. Bachi, S. Pluchino, The stem cell secretome and its role in brain repair, *Biochimie*. 95 (2013) 2271–2285. doi:10.1016/J.BIOCHI.2013.06.020.
- [27] S. Péron, B. Berninger, Imported Stem Cells Strike against Stroke, *Cell Stem Cell*. 17 (2015) 501–502. doi:10.1016/j.stem.2015.10.006.
- [28] C. Stonesifer, S. Corey, S. Ghanekar, Z. Diamandis, S.A. Acosta, C. V. Borlongan, Stem cell therapy for abrogating stroke-induced neuroinflammation and relevant secondary cell death mechanisms, *Prog. Neurobiol.* 158 (2017) 94–131. doi:10.1016/j.pneurobio.2017.07.004.
- [29] O. Detante, A. Jaillard, A. Moisan, M. Barbieux, I.M. Favre, K. Garambois, M. Hommel, C. Remy, Biotherapies in stroke, *Rev. Neurol. (Paris)*. 170 (2014) 779–798. doi:10.1016/j.neurol.2014.10.005.
- [30] E. Sammali, C. Alia, G. Vegliante, V. Colombo, N. Giordano, F. Pischietta, G.B. Boncoraglio, M. Barilani, L. Lazzari, M. Caleo, M.G. De Simoni, G. Gaipa, G. Citerio, E.R. Zanier, Intravenous infusion of human bone marrow mesenchymal stromal cells promotes functional recovery and neuroplasticity after ischemic stroke in mice, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–13. doi:10.1038/s41598-017-07274-w.
- [31] L. Zhang, L. Wang, W. Chen, Z. Ma, X. Han, C. Liu, X. Cheng, W. Shi, J. Guo, J. Qin, X. Yang, G. Jin, X. Zhang, Neural differentiation of human Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells improves the recovery of neurological function after transplantation in ischemic stroke rats, *Neural Regen. Res.* 12 (2017) 1103. doi:10.4103/1673-5374.211189.
- [32] A. de Vasconcelos dos Santos, J. da Costa Reis, B. Diaz Paredes, L. Moraes, Jasmin, A. Giral-di-Guimarães, R. Mendez-Otero, Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats, *Brain Res.* 1306 (2010) 149–158. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.094.
- [33] K. Komatsu, O. Honmou, J. Suzuki, K. Houkin, H. Hamada, J.D. Kocsis, Therapeutic time window of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after cerebral ischemia, *Brain Res.* 1334 (2010) 84–92. doi:10.1016/j.brainres.2010.04.006.
- [34] S.H. Lee, K.S. Jin, O.Y. Bang, B.J. Kim, S.J. Park, N.H. Lee, K.H. Yoo, H.H. Koo, K.W. Sung, Differential migration of mesenchymal stem cells to ischemic regions after middle cerebral artery occlusion in rats, *PLoS One*. 10 (2015) 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0134920.

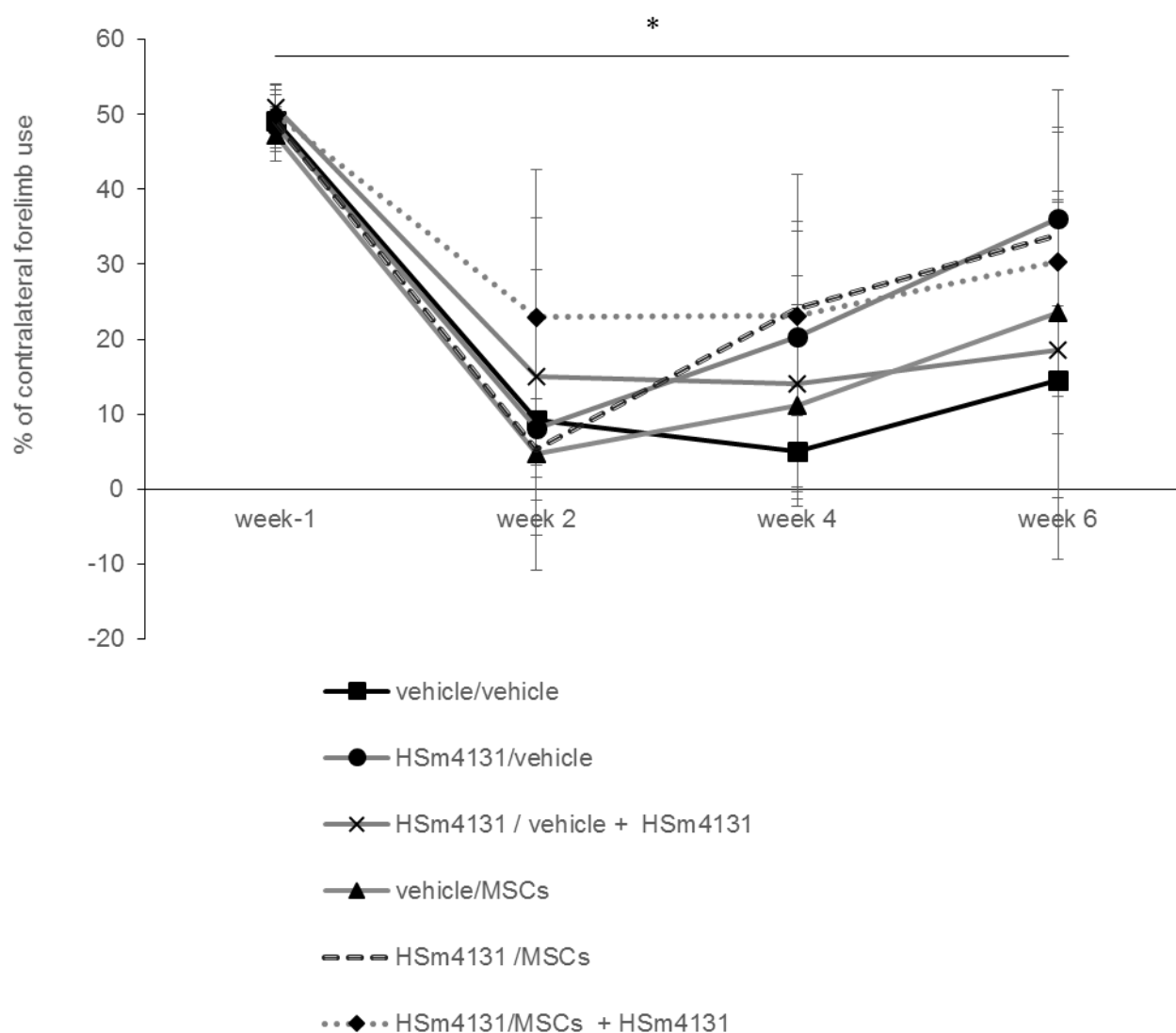
- [35] A. Toyoshima, T. Yasuhara, M. Kameda, J. Morimoto, H. Takeuchi, F. Wang, T. Sasaki, S. Sasada, A. Shinko, T. Wakamori, M. Okazaki, A. Kondo, T. Agari, C. V. Borlongan, I. Date, Intra-arterial transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells mounts neuroprotective effects in a transient ischemic stroke model in rats: Analyses of therapeutic time window and its mechanisms, *PLoS One*. 10 (2015) 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0127302.
- [36] H. Lian Zhang, X. Fang Xie, Y. Qiong Xiong, S. Min Liu, G. Zhu Hu, W. Feng Cao, X. Mu Wu, Comparisons of the therapeutic effects of three different routes of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in cerebral ischemic rats, *Brain Res*. 1680 (2018) 143–154. doi:10.1016/j.brainres.2017.12.017.
- [37] H. Zhang, X. Xie, Y. Xiong, S. Liu, G. Hu, W. Cao, X. Wu, Comparisons of the therapeutic effects of three different routes of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in cerebral ischemic rats, *Brain Res*. 1680 (2018) 143–154. doi:10.1016/j.brainres.2017.12.017.
- [38] B. Changyaleket, Z. Deliu, A.Z. Chignalia, D.L. Feinstein, Heparanase: Potential roles in multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol*. 310 (2017) 72–81. doi:10.1016/j.jneuroim.2017.07.001.
- [39] J. Li, J. Li, X. Zhang, Z. Lu, S. Ping, L. Wei, Expression of heparanase in vascular cells and astrocytes of the mouse brain after focal cerebral ischemia, *Brain Res*. 1433 (2011) 137–144. doi:10.1016/j.brainres.2011.11.032.
- [40] H. Takahashi, H. Matsumoto, Y. Kumon, T. Ohnishi, C. Freeman, Y. Imai, J. Tanaka, Expression of heparanase in nestin-positive reactive astrocytes in ischemic lesions of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion, *417* (2007) 250–254. doi:10.1016/j.neulet.2007.02.075.
- [41] V. Rouet, A. Meddahi-pelle, H. Miao, I. Vlodaysky, J. Caruelle, Heparin-like synthetic polymers, named RGTAs, mimic biological effects of heparin in vitro, (n.d.). doi:10.1002/jbm.a.
- [42] I. Barbosa, C. Morin, S. Garcia, A. Duchesnay, M. Oudghir, G. Jenniskens, H.-Q. Miao, S. Guimond, G. Carpentier, J. Cebrian, J.-P. Caruelle, T. van Kuppevelt, J. Turnbull, I. Martelly, D. Papy-Garcia, A synthetic glycosaminoglycan mimetic (RGTA) modifies natural glycosaminoglycan species during myogenesis., *J. Cell Sci*. 118 (2005) 253–264. doi:10.1242/jcs.01607.

-
- [43] S. Kumar, Hypertension and Ischemic Stroke, *Hypertens. J.* 2 (2016) 39–43. doi:10.5005/jp-journals-10043-0028.
- [44] V.E. O’Collins, G.A. Donnan, M.R. Macleod, D.W. Howells, Hypertension and experimental stroke therapies., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33 (2013) 1141–7. doi:10.1038/jcbfm.2013.88.
- [45] A. Letourneur, S. Roussel, J. Toutain, M. Bernaudin, O. Touzani, Impact of genetic and renovascular chronic arterial hypertension on the acute spatiotemporal evolution of the ischemic penumbra: A sequential study with MRI in the rat, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31 (2011) 504–513. doi:10.1038/jcbfm.2010.118.
- [46] J. Minnerup, B.A. Sutherland, A.M. Buchan, C. Kleinschnitz, Neuroprotection for Stroke: Current Status and Future Perspectives, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 11753–11772. doi:10.3390/ijms130911753.

Supplementary data

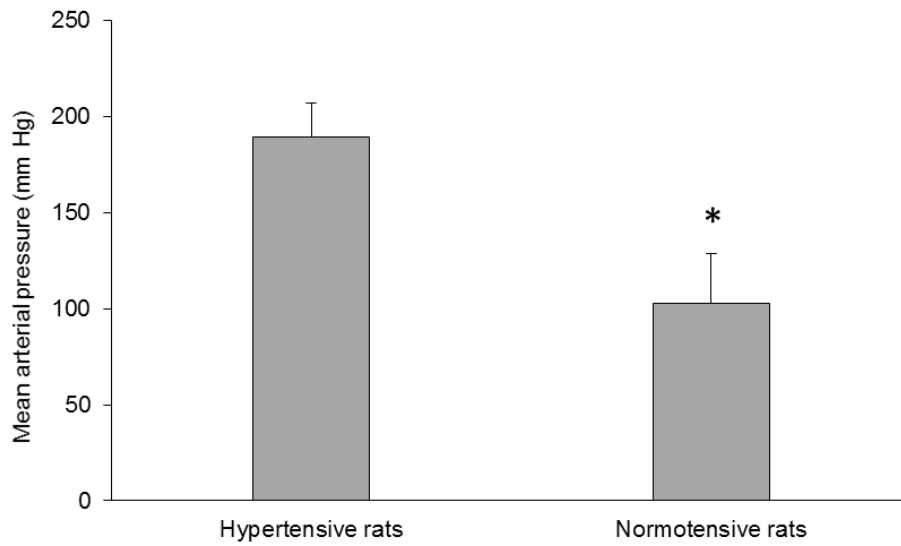
Gene full name	Left primer	Right primer
GAPDH	5'- CATCAAGAAGGTGGTGAAGC - 3'	5'- ACCACCCTGTTGCTGTAG -3'
Heparanase	5'- CGGTTCTGACGGACTGCTT -3'	5'- AAAACCCATAGGAAAAGGCG -3'

Supplementary data 1: Primers sequences used for RT-qPCR.



Supplementary data 2: Effects of combining administration of HSm4131 and MSCs on functional recovery (cylinder test).

Percentage of the contralateral forepaw use assessed by the cylinder test (mean \pm SD) (vehicle/ vehicle n=6; HSm4131/vehicle n=7; HSm4131/vehicle + HSm4131 n=5; vehicle/MSCs n=9; HSm4131/MSCs n=8; and HSm4131/MSCs + HSm4131 n=8). * Two-way ANOVA: p time < 0.0001, p group = 0.0091, p time*group = 0.2798; followed by HSD of Tukey (group) HSm4131/MSCs + HSm4131 vs vehicle: p = 0.0169.



Supplementary data 3: Measure of the mean arterial pressure

Measure of the mean arterial pressure (Mean \pm SD) (Hypertensive n=12, Normotensive n=10).

* Student *t*-test $p < 0.05$

Annexe 2 : Khelif et al., 2019

La revue suivante sera soumise au Journal of Cerebral Blood Flow.

Interest of combining extracellular matrix and mesenchymal stem cells-based therapies for ischemic stroke: a focus on heparan sulfate proteoglycans

Authors: Yacine KHELIF¹, Rozenn LE GAL¹, Jérôme LEVALLET¹, Charlène RENOULT¹, Denis BARRITAU², Omar TOUZANI[#], Myriam BERNAUDIN^{1#}

¹ Normandie Univ, UNICAEN, CNRS, CEA, ISTCT/CERVOxy group, GIP CYCERON, 14000 Caen, France

² Société OTR3, 4 rue Française, 75001 PARIS, France.

Authors contributed equally to the work

Corresponding author: bernaudin@cyceron.fr

Running headline: Interest of ECM/MSCs combined therapy for stroke

Funding: This study was in part supported by CNRS, the Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche, the Université de Caen Normandie, the ANR (Agence Nationale de la Recherche, ANR-15-CE18-0029-01- « MAESTRO »), the Conseil Régional de Normandie, and OTR3 S.A.S.

Declaration of interest: This study was in part supported by OTR3 S.A.S, the manufacturer of RGTA® (HSm4131). This study was in part supported by OTR3 S.A.S, the manufacturer of RGTA® (HSm4131).

Abstract

As the first leading cause of acquired disability worldwide, stroke is a major societal, health and economic burden. Ischemic stroke, the most prevalent form of stroke, has a very complex pathophysiology. The destruction of the extracellular matrix (ECM) is an important event that is associated to stroke-induced cell death. It is recognized that following stroke, spontaneous attempts of tissue repair take place; nonetheless, these are in most cases ineffective to overcome the neurological disorders. Therefore several therapeutic strategies aim to protect and restore the ECM in order to enhance brain tissue plasticity and functional recovery. In this review we highlight the role of extracellular matrix mimetics and mesenchymal stem cells (MSCs) in post-stroke recovery. We focus on the importance of heparan sulfate proteoglycans, a major component of the ECM, in brain tissue repair and the benefits of their association with a MSCs-based therapeutic strategy for ischemic stroke.

Key words: Brain tissue repair, Extracellular matrix, Heparan sulfate, Ischemic stroke, Mesenchymal stem cells.

Introduction

Stroke is a major economic and health problem worldwide, as it is one of the most devastating neurological diseases. Approximately 56 million deaths occur annually worldwide, where stroke accounts for approximately 5.5 million representing 9.7% of all deaths worldwide (Mukherjee & Patil, 2011). The pathophysiology of stroke has been extensively described (Dirnagl et al., 1999b; Moustafa & Baron, 2008; Deb et al., 2010b; Dirnagl, 2012; George & Steinberg, 2015; Tiwari et al., 2019). In this review, we will focus on the role of the extracellular matrix and its components during the ischemic stroke pathogenesis.

The Extracellular matrix (ECM)

The ECM represents about 10% to 20% of brain tissue volume (Lau et al., 2013b). It is a mix of a non-cellular macromolecules structure that plays a role of a scaffold of the tissue architecture, and a role in cellular reactions involved in tissue morphogenesis, differentiation and homeostasis (Frantz et al., 2010b). These macromolecules are connected with several molecules as well as with surrounding cells, creating a 3-dimensional

network. The ECM is a dynamic structure in close interaction with the adjacent cells, their intracellular cytoskeletal and nuclear elements (Badylak, 2002). Among the ECM macromolecules, one cites collagens, elastin, proteoglycans, and non-collagenous glycoproteins (Järveläinen et al., 2009).

Brain parenchyma is mostly made up of proteoglycans, which are biological molecules composed of a specific core protein substituted with covalently linked glycosaminoglycans (GAGs) chains (Schaefer & Schaefer, 2010; Lau et al., 2013b). GAGs are linear, sulfated, negatively charged polysaccharides, whose disaccharide building blocks consist of an amino sugar (N-acetylglucosamine, glucosamine that is variously N-substituted, or N-acetylgalactosamine) and a uronic acid (glucuronic acid or iduronic acid) or galactose (Varki, 2009). GAGs can be divided into two classes, namely (1) sulfated GAGs comprising chondroitin sulfate, dermatan sulfate, keratan sulfate, heparin, and heparan sulfate (HS), and (2) non-sulfated GAGs such as hyaluronan (Schaefer & Schaefer, 2010) (Figure 1).

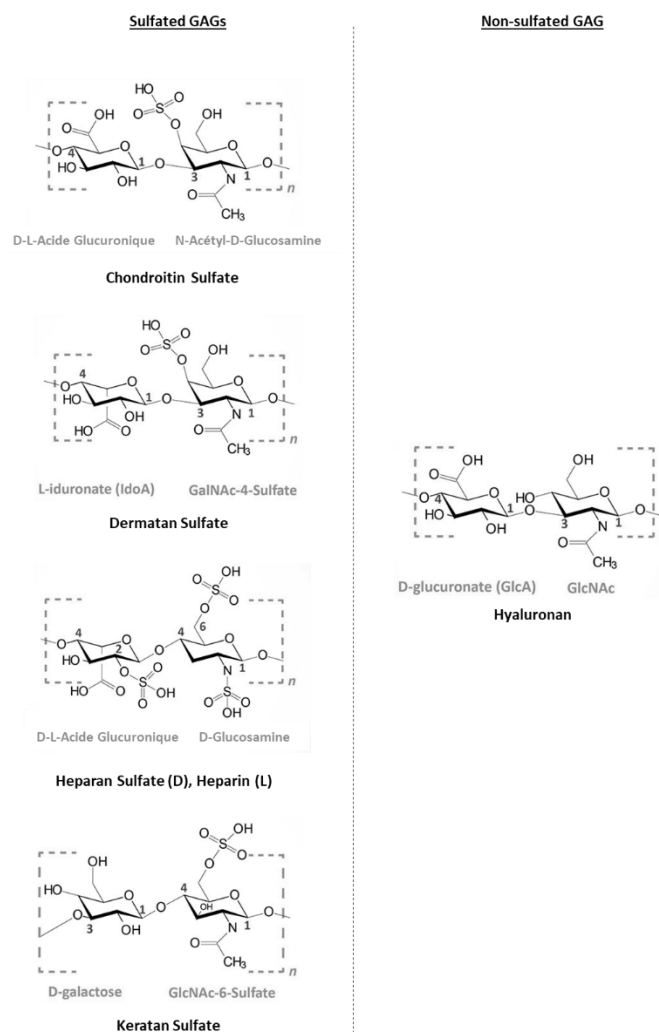


Figure 1: The main glycosaminoglycans' structures and composition.

Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs)

HSPGs are glycoproteins composed of one or many HS chains O-linked to core-protein serine residues (Sarrazin et al., 2011; Schwartz & Domowicz, 2018). There are three subfamilies of HSPGs: the first is composed of membrane

spanning proteoglycans (syndecans, betaglycan, CD44v3...); the second is glycosphosphatidylinositol (GPI)-linked proteoglycans known as glypicans; and the last are the secreted proteoglycans (agrin, collagen XVIII, perlecan,...) (Bishop et al., 2007) (Figure 2).

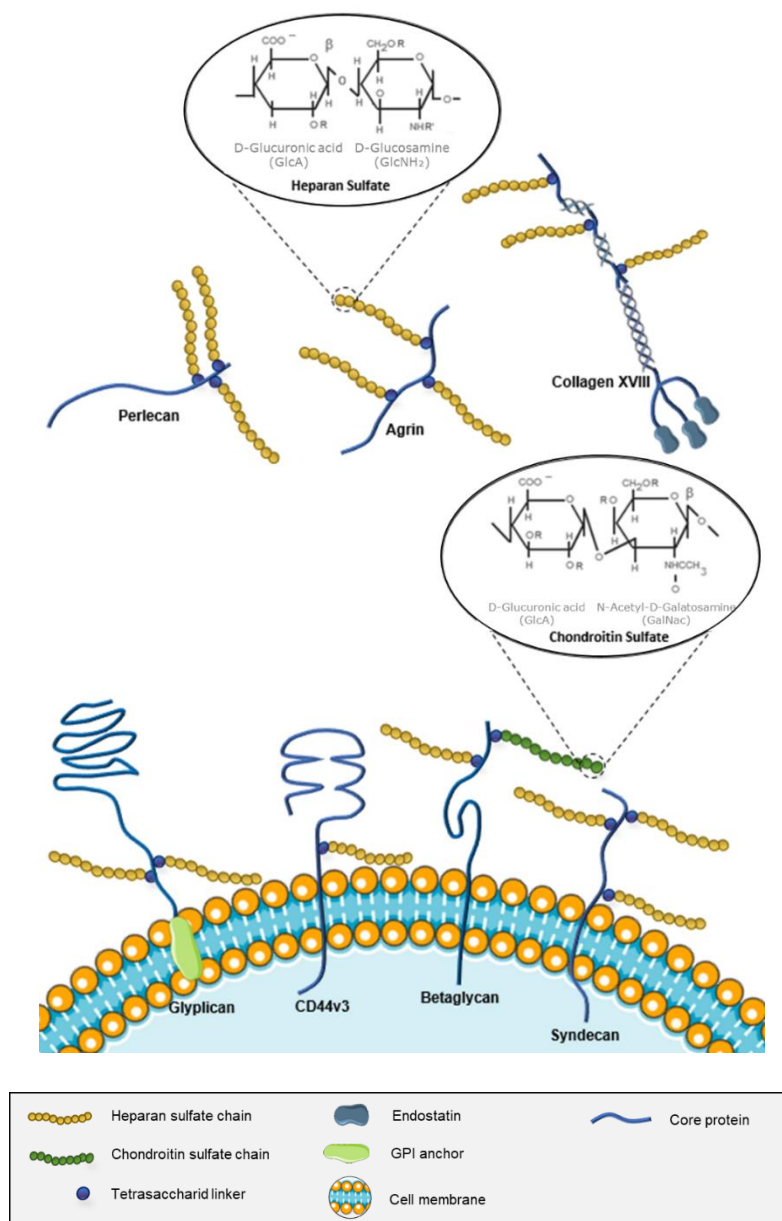


Figure 2: Brain's tissue ECM HSPGs.

HSPGs are composed of a specific core protein substituted with covalently linked Heparan sulfate chains. There are three subfamilies of HSPGs: the first is composed of syndecans, betaglycan and CD44v3, which are membrane spanning proteoglycans; the second is glycosphosphatidylinositol (GPI)-linked proteoglycans known as glypicans; and the last is composed of agrin, collagen XVIII and perlecan.

During HS biosynthesis, their disaccharides are sulfated at the N, 6-O, and 3-O positions of the glucosamine and the 2-O position of the uronic acid residues by actions of the HS sulfotransferases (Yue et al., 2008). The amount and the position of the O-sulfate groups, specifically the 6-O sulfates groups, regulate the

capacity of the HSPG to bind several proteins (Nakato & Kimata, 2002). Moreover, HS 6-O-sulfation is dynamically regulated during numerous physiological and pathological processes including embryonic development, aging, and carcinogenesis (Kalus et al., 2015; Yue et al., 2008).

HSPG are found at the cell surface and in the ECM, where they interact with multiple ligands. They can bind cytokines, chemokines, and growth factors, protecting them against proteolysis (Billings & Pacifici, 2015) (Figure 3A). HSPG provide then regulatory factors that can be released after the degradation of HS chains (Jin & Zhou, 2017; Masola et al., 2018). They also facilitate the formation of chemokine gradients involved in leukocyte recruitment and homing (Sarrazin et al., 2011). Indeed, because of their high negative charge, the HS chains can bind to several proteins such as fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors, transforming growth factors (TGFs), bone morphogenetic proteins (BMPs), Wnt proteins,

chemokines and interleukins, enzymes and enzyme inhibitors, lipases and apolipoproteins, ECM and plasma proteins (Sarrazin et al., 2011; Xie & Li, 2019).

As an example, the interaction of HSPG with the FGFs has been well studied, and is required for FGF signaling. HS are supposed to stabilize and protect FGFs from thermal, proteolytic, or pH-dependent degradation. HSPG function as storage reservoirs where FGFs can be released to interact with FGF receptors (FGFRs) and thus facilitate FGF-FGFR encounter (Mohammadi, Olsen, & Ibrahimi, 2005) (Figure 3B).

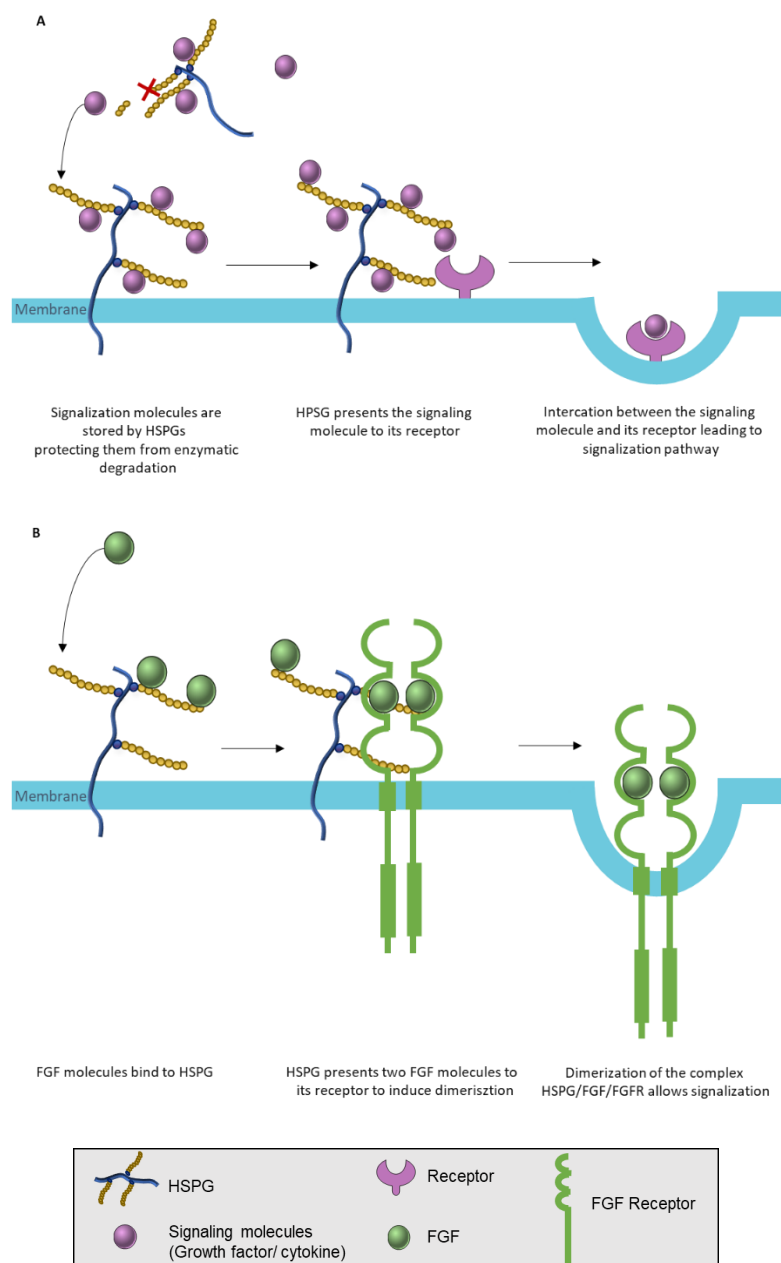


Figure 3: HSPG functions.

A. Storage and presentation to receptors of signaling molecules by HSPG. **B.** Interactions between HSPG, FGF and FGF receptors, required for receptor signaling. HSPG: Hepran Sulfate Proteoglycan; FGF: Fibroblast Growth Factor; FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor

HSPG in ischemic stroke

During the ischemic cascade, excitotoxicity, oxidative stress and inflammation lead the alteration of the ECM. Indeed, during stroke, along with cell death, the ECM and its components, including HSPG, are degraded (Fukuda et al., 2004). The impairment of the

blood-brain barrier (BBB) leads to a vasogenic edema, by the leaking of proteins in the parenchyma which the most common is the albumin. Brain edema is an important determinant of the patients' survival beyond the first few hours after stroke. The opening of the BBB could have a deleterious clinical outcome,

by the increase of both the intracranial pressure, and the risk of hemorrhagic transformation associated with tissue plasminogen activators therapy (Jeong-Hyeon Kim, Byun, Chung, Chung, & Bae, 2013).

The inflammatory response triggers the glial reaction, characterized by the microglia and astrocytes activation and proliferation. These cells, can migrate towards the lesion site and form the glial scar. The scar protects the healthy cerebral parenchyma by limiting the extent of the inflammatory reaction from the ischemic tissue. However, the glial scar acts as a mechanical barrier for neurites regrowth thereby inhibiting the regeneration process (Bao et al., 2012). In 2012, Hill and colleagues, have demonstrated that the ECM have a key role in the development of the glial scar and in the brain post-ischemic regeneration. In this study, HSPG (glypicans) infused intracerebrally during 7 days following stroke onset in rats, elicited a beneficial effect on the brain tissue regeneration and functional recovery, by reducing the thickness of the glial scar, increasing neurite outgrowth and the expression of FGF-2 (Hill, Jin, Mao, Xie, & Greenberg, 2012). These data highlight the key role of the ECM in the glial cell reactions but also in brain tissue repair after stroke onset.

HSPG loss in ischemic stroke

Following ischemic stroke, major enzyme families as the serine protease, the matrix metalloproteinases (MMPs), and the heparanases participate to the ECM degradation (Bonneh-Barkay & Wiley, 2009; Li et al.,

2011). As mentioned above, the ECM is composed of structural proteins susceptible to enzyme degradation (Khatri, McKinney, Swenson, & Janardhan, 2012). After stroke induction in primates, HSPG decreased by 43% to 63% concomitantly with the increase of vascular permeability (Fukuda et al., 2004). In this study, baboons submitted to middle cerebral artery occlusion (MCAo) did not demonstrate any changes in the expression of laminin and perlecan around the ischemic region. However, in the ischemic core region, after 2 h MCAo, the perlecan expression significantly decreased compared to laminin expression (Fukuda et al., 2004). As a consequence of the ECM breakdown after stroke, the endothelial tight cell junctions are lost, the basement membrane (BM) of the BBB becomes thinner, the contact between the astrocytes endfeet and the surrounding vessels is lost, resulting in the BBB leakage (Baeten & Akassoglou, 2011).

After stroke onset, the heparanase which is an endo- β -glucuronidase cleaving the β (1,4)-glycosidic between glucosamine residue and glucuronic acid of HS, is activated, hence participating in ECM remodeling. However, its role in stroke-induced tissue damage is not fully understood. In 2007, Takahashi and colleagues, have shown that the expression of heparanase after a MCAo, is correlated with activated astrocytes resulting in a glial scar formation (Takahashi et al., 2007). More recently, Changyaleket and colleagues (2017) reported the role of the heparanase in stroke where it is expressed in astrocytes and endothelial cells

(Changyaleket, Deliu, Chignalia, & Feinstein, 2017). By cleaving HSPG, the heparanase reduces leukocyte tissue invasion, and its late expression in astrocytes could participate to tissue repair (Changyaleket et al., 2017).

These results highlight the importance of HSPG during stroke pathogenesis, and pave the way to the study of new stroke neuroprotective therapies by targeting the brain's HSPG.

HSPG and HS mimetics benefits in ischemic stroke

Since loss of HSPG during stroke could lead to deleterious consequences, the role of an HS biomimetic, called RGTA® (ReGeneraTing Agents) or HSm, has been recently explored in a preclinical ischemic stroke model. RGTA® are chemically engineered polysaccharide that binds to extracellular structural proteins, designed to replace, structurally and functionally the degraded HS in the injured matrix compartment (Barritault et al., 2017). The most important feature of RGTA® is their ability to resist to enzymatic degradation allowing the RGTA® to retain their structure and activity even in a hostile microenvironment as found in chronic wounds (Barritault et al., 2017).

Recently, we have demonstrated that administration of RGTA® to rats after a 1 h MCAo reduced the lesion volume by nearly 50% (Khelif et al., 2018). Strikingly, this neuroprotection was accompanied by a preservation and/or restoration of ECM structure, an increase in expression of angiogenic and neurogenic factors (VEGF and

angiopoietin-2) translated by an increase of post-ischemic angiogenesis and neurogenesis (Khelif et al., 2018). Since RGTA® mimics the HSPG functions, these results are in accordance with previous studies showing the benefits of HSPG after stroke. Indeed, HSPG are known to interact with different angiogenic factors following stroke, including VEGF (Chiodelli et al., 2015). More precisely, VEGF was shown to be involved in neuroprotection, angiogenesis, neurogenesis, neuronal migration and survival, and axon guidance following MCAo in a rat model (Y. Sun et al., 2003). Other studies have shown that in a VEGF-dependent manner, HSPG, particularly the C-terminal protein fragment domain V of the perlecan, is neuroprotective (Bix, Gowing, & Clarkson, 2013; B. Lee et al., 2011). Other HSPG and more specifically glypican, has been shown to have multiple benefits following MCAo. Indeed, glypican administration not only reduced the glial fibrillary acidic protein but also increased the microtubule-associated protein-2 in the peri-infarct region, improved animals' behavior, increased the expression of FGF-2, and finally increased neurite extension in cortical neuron cultures (Hill et al., 2012). HSPG increase the expression of FGF-2, but might also act as a direct receptor for FGF-2 activation (Chua, Rahimi, Forsten-Williams, & Nugent, 2004).

HSPG effect on brain tissue after stroke could also be mediated by its interaction with the TGF- β . TGF- β exhibits neuroprotective function following MCAo in animal models (Dobolyi, Vincze, Pál, & Lovas, 2012). The

TGF- β 's neuroprotective effect could be supported by its induction of anti-inflammatory, -apoptotic and -excitotoxic actions along with the induction of angiogenesis, neuroregeneration and glial scar in the early phase of stroke (Dobolyi et al., 2012). TGF- β action is potentiated by its interaction with HSPG. In particular, HSPG are thought to interact only with the TGF- β 1 and 2 isoforms but not the TGF- β 3 (Rider, 2006). However, the potentiation of TGF- β following stroke could be a double edged sword since TGF- β by its action on astrocytes promotes the glial scar, and this last is associated with an inhibition of tissue regeneration and neurites outgrowth (Hill et al., 2012).

Following stroke HSPG have an essential role in brain neuroprotection mediated by the BBB protection (Yao, 2019). Indeed, the BBB's basal membrane contains several ECM components: fibronectin, laminin, collagen IV, and HSPG with the perlecan and the collagen type XVIII (Roberts, Kahle, & Bix, 2012). The stability of BBB and its impermeability requires an intact vascular basal membrane, which depends strongly on the integrity of the perlecan (Thomsen, Birkelund, Burkhart, Stensballe, & Moos, 2017). Following ischemic stroke, Fukuda et al. (2004) have shown that the perlecan is one of the ECM components most sensitive to enzyme degradation (Fukuda et al., 2004). In a review, published in 2012 by Roberts et al., the authors hypothesized that the proteolysis of the BM's perlecan following stroke onset, could benefit to the brain neuroprotection by the generation of ECM

fragments containing the domain V of the perlecan (Roberts et al., 2012). This hypothesis was expressed on the basis of two experiments. The first, demonstrated that stroke induced larger infarcts in mice that express only 10% of total normal perlecan levels compared to wild type mice. The second, experiment demonstrated that the administration of perlecan fragments; the domain V of the perlecan, resulted in several benefits: neuroprotection, functional recovery, modulation of astrocytic activity thereby the reduction of the glial scar, and the initiation of angiogenesis (Roberts et al., 2012).

Altogether, the available data show that HSPG exert beneficial actions in CNS lesions. More studies are needed to clearly elucidate the role of HSPG in stroke pathogenesis. HSPG' effects may occur through their interaction with a plethora of growth factors, and stem cells niches, which raises the interest of HSPG-stem cells combined therapies for ischemic stroke. Moreover, a HSPG-based therapy could favor the formation of a niche for resident or therapeutic cell homing to altered tissues as a brain ischemic tissue.

Combination of mesenchymal stem cells and ECM-based therapy in stroke

Brief Background knowledge on MSCs

Stem cells are studied in regenerative medicine in various pathologies: myocardial infarction, tissue fibrosis, musculoskeletal injuries (Cianca & Jayaram, 2017; El Sayed Shafei et al., 2017; R. Lim, Ricardo, & Sievert, 2017). Among the different stem cells that are under investigation

in regenerative medicine, there are embryonic stem cells, tissue specific progenitor stem cells, MSCs, umbilical cord stem cells, bone marrow stem cells and induced pluripotent stem cells (Mahla, 2016). To achieve a tissue regeneration, transplanted stem cells have to survive, proliferate, integrate into the targeted tissue and differentiate in site specific manner (Ning et al., 2016). MSCs express a low major histocompatibility complex, but to avoid a host-versus-graft rejection, tissue typing of human leucocyte antigens for tissue and organ transplant as well as use of immune suppressant is recommended (Mahla, 2016).

Stem cells are known for their self-renewal and differentiation capacity into at least one specialized cell type. There are two major stem cells types in the bone marrow: hematopoietic stem cells, which differentiate into white and red blood cells, and MSCs, which at least in vitro differentiate into osteoblast, osteoclasts, adipocytes, and chondrocytes (Sousa et al., 2014). MSCs are a promising cell type for treatment of neurodegenerative diseases, and tissue repair. These multipotent cells are present in nearly all tissues and located in most part in perivascular niches and have migration abilities (Hass, Kasper, Böhm, & Jacobs, 2011). More interestingly, MSCs are able to secrete growth factors that act in tissue regeneration and inflammatory modulation (Hass et al., 2011).

Since MSCs have several properties, such as inflammatory modulation, regeneration and potential differentiation into nervous system cells, and they are easily harvested from patients (Borlongan et al., 2008), they have been under

investigation for neuroprotective and neuroregenerative therapies in stroke.

MSCs benefits in ischemic stroke

One of the most important and interesting features of MSCs is their ability to migrate towards the site of the ischemic lesion. The mobilization of MSCs in the peripheral vessels has been a subject of great interest in the last years. Many studies have tried in vain to attract MSCs in the peripheral blood using growth factors like the granulocyte-colony stimulating factor (Wexler et al., 2003). However, the mobilization of MSCs has been achieved in vivo in animals undergoing hypoxia (L. Liu et al., 2011), but also in animals subjected to ischemic brain damage (Yu et al., 2015) which suggest that this phenomenon could also occur in animals subjected to an ischemic stroke.

A major factor that seems to be implicated in the mobilization of MSCs in conditions where hypoxia reigns is the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) (L. Liu et al., 2011). HIF-1 is known to promote the synthesis of several angiogenic factors including the stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and VEGF (Krock, Skuli, & Simon, 2011; Marti et al., 2000). VEGF promotes vasodilatation, vascular permeability and angiogenesis. These effects could facilitate the MSCs migration which is induced by the interaction of SDF-1 with its cellular receptor CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) expressed on different cells including MSCs (X. Liu et al., 2011).

Another major concern in cellular therapy of stroke is the faith and the homing of

transplanted MSCs after stroke. This issue comes along with several concerns that need to be addressed among which the safety of the allogenic and the autologous MSCs transplantation; but also the route, the time, the dose and the frequency of MSCs transplantation.

All these raised points are under preclinical and clinical investigations. In 2014, Isakova et al. have studied the allo-reactivity after an intracranial administration of allogeneic or autologous MSCs in rhesus macaques. Only a moderate immune reaction has been observed following the administration of allogeneic MSCs. More importantly, infusion of allogeneic MSCs did not affect the body temperature and did not alter motor and social behaviors of the animals (Isakova et al., 2014). In another study using a rat model of stroke, Omori and collaborators (2008) showed that a single high dose (3x10⁶ cells) administration of human MSCs 6 hr post ischemia demonstrate more benefits than multiple lower doses (1x10⁶ cells) administrations (Omori et al., 2008). These studies show the feasibility of allogeneic transplantation but this issue needs more investigations for human trials.

Even if there are many ongoing clinical trials using MSCs as a therapy for stroke, little is known about the optimal time window and the delivery route of these cells. De Vasconcelos Dos santos and colleagues (2010) have studied the administration of MSCs at different time points after stroke in a thermocoagulation-induced ischemic stroke rat model. After an intra-arterial (i.a.) administration of MSCs

(3.10⁶ cells), 1 day following stroke, this study has shown a motor functional recovery only in animals treated with MSCs (de Vasconcelos dos Santos et al., 2010). Moreover, another study have shown that even 1 month after stroke, MSCs could improve functional recovery (Shen et al., 2007). These results point out the potential of MSCs in promoting functional recovery when administered at the acute or the chronic stage of ischemic stroke.

To our knowledge, there are few studies investigating, in the same operational conditions the effect of several routes delivery of MSCs after ischemic stroke. Zhang and collaborators (2018) compared the therapeutic effects of three different routes of MSCs transplantation in cerebral ischemic rats (Zhang et al., 2018). In a MCAo model, Zhang and collaborators investigated the therapeutic effects of an intravenous (i.v.) (3. 10⁶), i.a. (3. 10⁶), or intracerebral (i.c.) (5. 10⁵) MSCs administration. The results of this study showed that irrespective of the administration route, MSCs promoted functional recovery and brain plasticity after ischemic stroke. However, i.a. MSCs administration seemed to promote a faster functional recovery, and a superior cell proliferation, neurite outgrowth, and angiogenesis compared to other administration routes (Zhang et al., 2018).

Other delivery routes have also been investigated such as the intrathecal administration by lumbar puncture (J. Y. Lim et al., 2011), or intranasal delivery of MSCs (J. Sun et al., 2015), but the most studied routes are i.c., i.v., or i.a. For an optimal cell engraftment

and replacement i.c. and i.a. are thought to be more effective than i.v. route. However i.a. administration may present side effects like vascular occlusion and additional cerebral damage (Detante, Rome, & Papassin, 2017).

Unlike molecular neuroprotective agents that have to be administered in an ultra-acute stage of stroke, the major benefit of cell therapy is the possibility to be used during the acute, subacute and chronic stages of stroke with neuroprotective and neurorestorative effects thereby extending the time window of current therapies.

Many clinical studies have assessed and confirmed the feasibility and the safety of autologous MSCs administration after stroke onset (Prasad et al., 2014; Shichinohe et al., 2017). However, in a cell environment affected by stroke the MSCs' survival is limited due to the loss of cell adhesion and the inflammatory tissue state (J. M. Lee, Kim, Lee, & Im, 2012). Therefore, the emergent therapies are focusing on combining ECM-based agents and MSCs to improve cell faith and functional recovery.

Combination of MSCs therapy with ECM components in tissue repair

Several therapeutic strategies aim to enhance the MSCs therapeutic potential by its combination with an ECM-based therapy to act on the MSCs microenvironment. These strategies consist of a co-administration of MSCs with a hydrogel ECM-based scaffold, or with an ECM targeting drug. Combining MSCs with an ECM-based scaffolds aims to protect and extend the survival the grafted cells

(Detante et al., 2014). Kim and collaborators (2014) have shown that ECM proteins (fibronectin and collagen) mimetics can enhance the MSCs adherence to an ECM coated surface and their proliferation (Ji-Hyun Kim et al., 2014).

Hyaluronic Acid (HA)-based hydrogels have also been used in vitro and in vivo to promote cell survival and proliferation (Liang, Walczak, & Bulte, 2013; Zhong et al., 2010). HA is a linear polysaccharide (i.e. a GAG) abundant in the brain's tissue ECM, and plays critical roles in ECM stabilization, and cell functions regulation. It is one of the most common GAG used in hydrogels (Liang, Walczak, & Bulte, 2013; Zhong et al., 2010). In 2010, Zhong and collaborators, have combined a HA hydrogel cross-linked with heparin sulfate, to transplant stem/progenitor neural cells after stroke. The HA-heparin sulfate biopolymer hydrogel promoted the survival of neural progenitors in vitro and in vivo in the infarct core, with a reduction of inflammatory cell infiltration (Zhong et al., 2010).

The HSPG are an interesting tool to potentiate MSCs. As a matter of fact, HSPG (i.e perlecan, agrin, perlecan, syndecan) interact closely with MSCs and the hematopoietic niches; and are key factors for MSCs functions (Papy-Garcia & Albanese, 2017). Following tissue injury, the destruction of the ECM by different proteases during the inflammatory response is a major inhibitor event for tissue repair and regeneration (Hill et al., 2012). The ECM destruction leads to the liberation and the consequent degradation of the growth factors stored by HSPG.

Moreover, a proper ECM remodeling is inhibited by the tissue inflammation leading to the continuous activation of different proteases: MMPs, endopeptidases, and glycanases (Barritault, Desgranges, Meddahi-Pellé, Denoix, & Saffar, 2017). The destruction of growth factors can alter the tissue homeostasis, cell communications, and the stem cells engagement for the tissue repair. The HS mimetic RGTA®, has been shown to resist to glycanases thereby serving as a growth factor reservoir by storing and protecting the tissue's growth (Ikeda et al., 2011). The synergetic action of the HS mimetic RGTA® and MSCs could be of a great interest in tissue repair and regeneration. Indeed, a major process in brain tissue repair is angiogenesis. On the one hand RGTA® have been shown to restore the ECM structure and to potentiate the affinity of the angiogenic factor the VEGF for its receptor (Barritault, Desgranges, et al., 2017; Khelif et

al., 2018; Rouet et al., 2005). On the other hand, MSCs have also been shown to promote angiogenesis after stroke onset by inducing the expression of VEGF and its receptor (Zacharek et al., 2007). Thus, RGTA® may enhance MSCs beneficial effects by remodeling the ECM, storing and potentiating the growth factors, thereby creating a stem cell niche (Figure 4).

Frescaline et al. have also reported the benefits of associating the HS mimetic RGTA® to MSCs in order to potentiate their proliferation, migration and differentiation in vitro (Frescaline et al., 2012). These effects are dependent on the interaction of FGF-2 and FGFR activation. This study concludes that the RGTA®, beside its tissue repair priorities, can optimize the therapeutic and homing proprieties of MSCs' (Frescaline et al., 2012) (Figure 4).

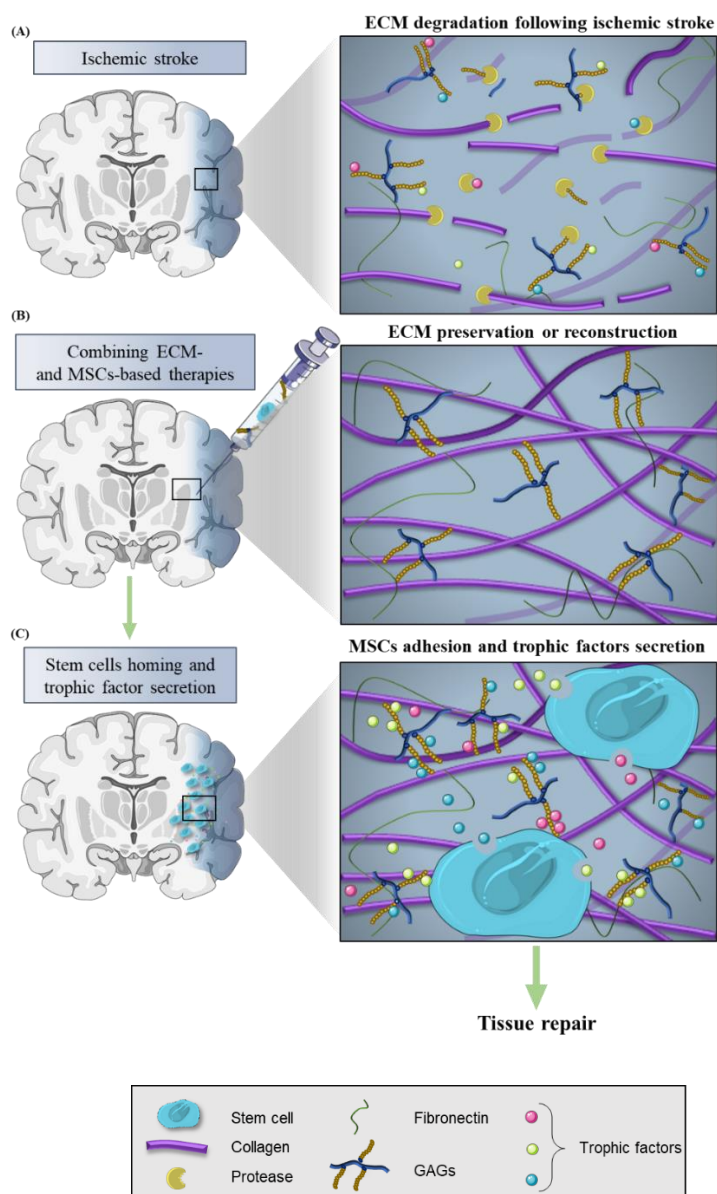


Figure 4: ECM and MSCs interactions following ischemic stroke

(A) Following stroke, the ECM and the associated growth factors are degraded inhibiting the tissue regeneration. (B) In their natural environment, stem cells are surrounded by extracellular matrix and interact closely with its components. Following a stroke, a co-administration of mesenchymal stem cells and sulfated proteoglycans or glycans mimetics will lead to the reconstruction of the matrix, and thus favors the creation of a stem cell niche. (C) As a result, this association potentiates stem cells' homing in the vicinity of the lesion and their beneficial effect in tissue repair. The migration of these stem cells, combined with their ability to secrete trophic factors, leads to more effective regenerative effects.

FGF-2 and SDF-1 are of a great interest in recruiting endogenous stem cells in the CNS. Using In vitro, and in vivo models, a HS-based hydrogel encapsulated with polyelectrolyte complex nanoparticles, effectively delivered

FGF-2 and SDF-1 promoting neuroprotection and animals' behavior improvement (Jian et al. 2018). The HS-based hydrogel, loaded with FGF-2 and SDF-1 and gradually released; modulate the CNS environment and regulate

and enhanced the neural stem cell enhanced the presence of neural cells precursors and neural stem cells homing from the SVZ to both the peri-infarction tissue and core area of stroke (Jian et al. 2018).

The beneficial effects of sulfated polysaccharides could also be explained by SDF-1-induced stem cell mobilization. In 2000, Frenette and Weiss demonstrated that the administration of sulfated polysaccharides induces a rapid hematopoietic progenitor cells (HPCs) mobilization (Frenette & Weiss, 2000). Later in 2002, Sweeney and collaborators have shown in monkeys and mice, an increase of plasmatic level of SDF-1 induced by sulfated polysaccharides (Sweeney, Lortat-Jacob, Priestley, Nakamoto, & Papayannopoulou, 2002). Moreover, in 2007, Irhimeh and collaborators (2007) demonstrated an increase of CXCR4+ HPCs human CD34+ cells after sulfated polysaccharides administration (Irhimeh, Fitton, & Lowenthal, 2007). Finally, Bang et al. (2017) showed that stem cell migration towards the infarct area is favored by CXCR4 expression and is linked to better

functional recovery in a rat stroke model (Bang et al., 2017). These results have a clinically relevant importance since it was shown that an increase of CD34+/CXCR4+ cells correlates with a better neurological and status in acute stroke patients after a 6-month follow-up (Gójska-Grymajło, Nyka, Zieliński, & Jakubowski, 2012).

Conclusion

Growing research interest is focusing on the role of the ECM in several pathologies such as cancer, neurodegenerative, or cardiovascular pathologies but also on the role of ECM in regenerative therapies. The ECM plays a complementary and an essential role with stem cells to enhance regenerative therapies efficiency. With its reservoir function, the ECM constitutes a complex microenvironment enriched with cell signaling molecules that interact closely with the surrounding cells to permit a fine regulation of the cell fate, and function. Therefore, the ECM-cell interaction is a finely regulated physiological process that has to be restored to ensure an optimal tissue regeneration process.

References

- Badylak, S. F. (2002). The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 13(5), 377–383. <http://doi.org/10.1016/S1084952102000940>
- Baeten, K. M., & Akassoglou, K. (2011). Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. *Developmental Neurobiology*, 71(11), 1018–39. <http://doi.org/10.1002/dneu.20954>
- Bang, O. Y., Moon, G. J., Kim, D. H., Lee, J. H., Kim, S., Son, J. P., ... investigators, the S-2 trial. (2017). Stroke Induces Mesenchymal Stem Cell Migration to Infarcted Brain Areas Via CXCR4 and C-

Met Signaling. *Translational Stroke Research*, 8(5), 449–460. <http://doi.org/10.1007/s12975-017-0538-2>

Bao, Y., Qin, L., Kim, E., Bhosle, S., Guo, H., Febbraio, M., ... Cho, S. (2012). CD36 is involved in astrocyte activation and astroglial scar formation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(8), 1567–77. <http://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.52>

Barritault, D., Desgranges, P., Meddahi-Pellé, A., Denoix, J.-M., & Saffar, J.-L. (2017). RGTA®-based matrix therapy – A new branch of regenerative medicine in locomotion. *Joint Bone Spine*, 84(3), 283–292. <http://doi.org/10.1016/j.jbspin.2016.06.012>

Barritault, D., Gilbert-Sirieix, M., Rice, K. L., Siñeriz, F., Papy-Garcia, D., Baudouin, C., ... van Neck, J. (2017). RGTA® or ReGeneraTing Agents mimic heparan sulfate in regenerative medicine: from concept to curing patients. *Glycoconjugate Journal*, 34(3), 325–338. <http://doi.org/10.1007/s10719-016-9744-5>

Billings, P. C., & Pacifici, M. (2015). Interactions of signaling proteins, growth factors and other proteins with heparan sulfate: mechanisms and mysteries. *Connective Tissue Research*, 56(4), 272–280. <http://doi.org/10.3109/03008207.2015.1045066>

Bishop, J. R., Schuksz, M., & Esko, J. D. (2007). Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*, 446(7139), 1030–1037. <http://doi.org/10.1038/nature05817>

Bix, G. J., Gowing, E. K., & Clarkson, A. N. (2013). Perlecan Domain V Is Neuroprotective and Affords Functional Improvement in a Photothrombotic Stroke Model in Young and Aged Mice. *Translational Stroke Research*, 4(5), 515–523. <http://doi.org/10.1007/s12975-013-0266-1>

Bonneh-Barkay, D., & Wiley, C. A. (2009). Brain extracellular matrix in neurodegeneration. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 19(4), 573–85. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00195.x>

Borlongan, C. V., Chopp, M., Steinberg, G. K., Bliss, T. M., Li, Y., Lu, M., ... Kondziolka, D. (2008). Potential of stem/progenitor cells in treating stroke: the missing steps in translating cell therapy from laboratory to clinic. *Regenerative Medicine*, 3(3), 249–250. <http://doi.org/10.2217/17460751.3.3.249>

Changyaleket, B., Deliu, Z., Chignalia, A. Z., & Feinstein, D. L. (2017). Heparanase: Potential roles in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 310(February), 72–81. <http://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.07.001>

Chiodelli, P., Bugatti, A., Urbinati, C., Rusnati, M., Chiodelli, P., Bugatti, A., ... Rusnati, M. (2015). Heparin/Heparan Sulfate Proteoglycans Glycomic Interactome in Angiogenesis: Biological Implications and Therapeutical Use. *Molecules*, 20(4), 6342–6388. <http://doi.org/10.3390/molecules20046342>

Chua, C. C., Rahimi, N., Forsten-Williams, K., & Nugent, M. A. (2004). Heparan Sulfate Proteoglycans Function as Receptors for Fibroblast Growth Factor-2 Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2. *Circulation Research*, 94(3), 316–323. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000112965.70691.AC>

Cianca, J. C., & Jayaram, P. (2017). Musculoskeletal Injuries and Regenerative Medicine in the Elderly Patient. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 28(4), 777–794. <http://doi.org/10.1016/j.pmr.2017.06.010>

de Vasconcelos dos Santos, A., da Costa Reis, J., Diaz Paredes, B., Moraes, L., Jasmin, Giraldi-Guimarães, A., & Mendez-Otero, R. (2010). Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. *Brain Research*, 1306, 149–158. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.094>

Deb, P., Sharma, S., & Hassan, K. M. (2010). Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology*, 17(3), 197–218. <http://doi.org/10.1016/j.pathophys.2009.12.001>

Detante, O., Jaillard, A., Moisan, A., Barbieux, M., Favre, I. M., Garambois, K., ... Remy, C. (2014). Biotherapies in stroke. *Revue Neurologique*, 170(12), 779–798. <http://doi.org/10.1016/j.neurol.2014.10.005>

Detante, O., Rome, C., & Papassin, J. (2017). How to use stem cells for repair in stroke patients. *Revue Neurologique*, 173(9), 572–576. <http://doi.org/10.1016/j.neurol.2017.09.003>

Dirnagl, U. (2012). Pathobiology of injury after stroke: The neurovascular unit and beyond. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1268(1), 21–25. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06691.x>

Dirnagl, U., Iadecola, C., & Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 22(9), 391–397. [http://doi.org/10.1016/S0166-2236\(99\)01401-0](http://doi.org/10.1016/S0166-2236(99)01401-0)

Dobolyi, A., Vincze, C., Pál, G., & Lovas, G. (2012). The Neuroprotective Functions of Transforming Growth Factor Beta Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 8219–8258. <http://doi.org/10.3390/ijms13078219>

El Sayed Shafei, A., Ali, M. A., Ghanem, H. G., Shehata, A. I., Abdelgawad, A. ., Handal, H. R., ... El-Shal, A. S. (2017). Mesenchymal stem cells therapy: a promising cell based therapy for treatment of myocardial infraction. *The Journal of Gene Medicine*, e2995. <http://doi.org/10.1002/jgm.2995>

Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 24), 4195–200. <http://doi.org/10.1242/jcs.023820>

- Frenette, P. S., & Weiss, L. (2000). Sulfated glycans induce rapid hematopoietic progenitor cell mobilization: evidence for selectin-dependent and independent mechanisms. *Blood*, 96(7), 2460–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001898>
- Frescaline, G., Boudierlique, T., Huynh, M. B., Papy-Garcia, D., Courty, J., & Albanese, P. (2012). Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research*, 8(2), 180–192. <http://doi.org/10.1016/j.scr.2011.09.005>
- Fukuda, S., Fini, C. A., Mabuchi, T., Koziol, J. A., Eggleston, L. L., & del Zoppo, G. J. (2004). Focal Cerebral Ischemia Induces Active Proteases That Degrade Microvascular Matrix. *Stroke*, 35(4), 998–1004. <http://doi.org/10.1161/01.STR.0000119383.76447.05>
- George, P. M., & Steinberg, G. K. (2015). Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments. *Neuron*, 87(2), 297–309. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.041>
- Gójska-Grymajło, A., Nyka, W. M., Zieliński, M., & Jakubowski, Z. (2012). CD34/CXCR4 stem cell dynamics in acute stroke patients. *Folia Neuropathologica*, 50(2), 140–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22773459>
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 9, 12. <http://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
- Hill, J. J., Jin, K., Mao, X. O., Xie, L., & Greenberg, D. A. (2012). Intracerebral chondroitinase ABC and heparan sulfate proteoglycan glypican improve outcome from chronic stroke in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(23), 9155–60. <http://doi.org/10.1073/pnas.1205697109>
- Ikeda, Y., Charef, S., Ouidja, M. O., Barbier-Chassefière, V., Sineriz, F., Duchesnay, A., ... Papy-Garcia, D. (2011). Synthesis and biological activities of a library of glycosaminoglycans mimetic oligosaccharides. *Biomaterials*, 32(3), 769–776. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.043>
- Irhimeh, M. R., Fitton, J. H., & Lowenthal, R. M. (2007). Fucoidan ingestion increases the expression of CXCR4 on human CD34+ cells. *Experimental Hematology*, 35(6), 989–994. <http://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2007.02.009>
- Isakova, I. A., Lanclos, C., Bruhn, J., Kuroda, M. J., Baker, K. C., Krishnappa, V., & Phinney, D. G. (2014). Allo-reactivity of mesenchymal stem cells in rhesus macaques is dose and haplotype dependent and limits durable cell engraftment in vivo. *PLoS ONE*, 9(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0087238>

- Järveläinen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T. N., & Penttinen, R. (2009). Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, 61(2), 198–223. <http://doi.org/10.1124/pr.109.001289>
- Jin, H., & Zhou, S. (2017). The Functions of Heparanase in Human Diseases. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 17(6), 541–548. <http://doi.org/10.2174/1389557516666161101143643>
- Kalus, I., Rohn, S., Puvirajesinghe, T. M., Guimond, S. E., Eyckerman-Kölln, P. J., ten Dam, G., ... Dierks, T. (2015). Sulf1 and Sulf2 Differentially Modulate Heparan Sulfate Proteoglycan Sulfation during Postnatal Cerebellum Development: Evidence for Neuroprotective and Neurite Outgrowth Promoting Functions. *PLOS ONE*, 10(10), e0139853. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0139853>
- Khatri, R., McKinney, A. M., Swenson, B., & Janardhan, V. (2012). Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Neurology*, 79(13 Suppl 1), S52-7. <http://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182697e70>
- Khelif, Y., Toutain, J., Quittet, M.-S., Chantepie, S., Laffray, X., Valable, S., ... Bernaudin, M. (2018). A heparan sulfate-based matrix therapy reduces brain damage and enhances functional recovery following stroke. *Theranostics*, 8(21), 5814–5827. <http://doi.org/10.7150/thno.28252>
- Kim, J.-H., Byun, H.-M., Chung, E.-C., Chung, H.-Y., & Bae, O.-N. (2013). Loss of Integrity: Impairment of the Blood-brain Barrier in Heavy Metal-associated Ischemic Stroke. *Toxicological Research*, 29(3), 157–64. <http://doi.org/10.5487/TR.2013.29.3.157>
- Kim, J.-H., Jekarl, D. W., Kim, M., Oh, E.-J., Kim, Y., Park, I. Y., & Shin, J. C. (2014). Effects of ECM protein mimetics on adhesion and proliferation of chorion derived mesenchymal stem cells. *International Journal of Medical Sciences*, 11(3), 298–308. <http://doi.org/10.7150/ijms.6672>
- Krock, B. L., Skuli, N., & Simon, M. C. (2011). Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes & Cancer*, 2(12), 1117–33. <http://doi.org/10.1177/1947601911423654>
- Lau, L. W., Cua, R., Keough, M. B., Haylock-Jacobs, S., & Yong, V. W. (2013). Pathophysiology of the brain extracellular matrix: A new target for remyelination. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(10), 722–729. <http://doi.org/10.1038/nrn3550>
- Lee, B., Clarke, D., Al Ahmad, A., Kahle, M., Parham, C., Auckland, L., ... Bix, G. J. (2011). Perlecan domain V is neuroprotective and proangiogenic following ischemic stroke in rodents. *Journal of Clinical Investigation*, 121(8), 3005–3023. <http://doi.org/10.1172/JCI46358>
- Lee, J. M., Kim, B. S., Lee, H., & Im, G. Il. (2012). In vivo tracking of mesenchymal stem cells using fluorescent nanoparticles in an osteochondral repair model. *Molecular Therapy*, 20(7), 1434–1442. <http://doi.org/10.1038/mt.2012.60>

- Li, J., Li, J., Zhang, X., Lu, Z., Ping, S., & Wei, L. (2011). Expression of heparanase in vascular cells and astrocytes of the mouse brain after focal cerebral ischemia. *Brain Research*, 1433, 137–144. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.11.032>
- Liang, Y., Walczak, P., & Bulte, J. W. M. (2013). The survival of engrafted neural stem cells within hyaluronic acid hydrogels. *Biomaterials*, 34(22), 5521–5529. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.095>
- Lim, J. Y., Jeong, C. H., Jun, J. A., Kim, S. M., Ryu, C. H., Hou, Y., ... Jeun, S. S. (2011). Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia. *Stem Cell Res Ther*, 2(5), 38. <http://doi.org/scrt79> [pii]\r10.1186/scrt79
- Lim, R., Ricardo, S. D., & Sievert, W. (2017). Cell-Based Therapies for Tissue Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 633. <http://doi.org/10.3389/fphar.2017.00633>
- Liu, L., Yu, Q., Lin, J., Lai, X., Cao, W., Du, K., ... Huang, H. (2011). Hypoxia-Inducible Factor-1 α Is Essential for Hypoxia-Induced Mesenchymal Stem Cell Mobilization into the Peripheral Blood. *Stem Cells and Development*, 20(11), 1961–1971. <http://doi.org/10.1089/scd.2010.0453>
- Liu, X., Duan, B., Cheng, Z., Jia, X., Mao, L., Fu, H., ... Kong, D. (2011). SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion. *Protein & Cell*, 2(10), 845–854. <http://doi.org/10.1007/s13238-011-1097-z>
- Mahla, R. S. (2016). Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. *International Journal of Cell Biology*, 2016, 6940283. <http://doi.org/10.1155/2016/6940283>
- Marti, H. J., Bernaudin, M., Bellail, A., Schoch, H., Euler, M., Petit, E., & Risau, W. (2000). Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *The American Journal of Pathology*, 156(3), 965–76. [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64964-4](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64964-4)
- Masola, V., Bellin, G., Gambaro, G., Onisto, M., Masola, V., Bellin, G., ... Onisto, M. (2018). Heparanase: A Multitasking Protein Involved in Extracellular Matrix (ECM) Remodeling and Intracellular Events. *Cells*, 7(12), 236. <http://doi.org/10.3390/cells7120236>
- Mohammadi, M., Olsen, S. K., & Ibrahimi, O. A. (2005). Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(2), 107–137. <http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.008>
- Moustafa, R. R., & Baron, J.-C. (2008). Pathophysiology of ischaemic stroke: insights from imaging, and implications for therapy and drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 153 Suppl 1(Suppl 1), S44-54. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707530>

- Nakato, H., & Kimata, K. (2002). Heparan sulfate fine structure and specificity of proteoglycan functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1573(3), 312–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12417413>
- Ning, B., Cheuk, D. K.-L., Chiang, A. K.-S., Lee, P. P.-W., Ha, S.-Y., & Chan, G. C. (2016). Autologous cord blood transplantation for metastatic neuroblastoma. *Pediatric Transplantation*, 20(2), 290–296. <http://doi.org/10.1111/ptr.12647>
- Omori, Y., Honmou, O., Harada, K., Suzuki, J., Houkin, K., & Kocsis, J. D. (2008). Optimization of a therapeutic protocol for intravenous injection of human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Research*, 1236, 30–38. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.07.116>
- Papy-Garcia, D., & Albanese, P. (2017). Heparan sulfate proteoglycans as key regulators of the mesenchymal niche of hematopoietic stem cells. *Glycoconjugate Journal*, 34(3), 377–391. <http://doi.org/10.1007/s10719-017-9773-8>
- Prasad, K., Sharma, A., Garg, A., Mohanty, S., Bhatnagar, S., Johri, S., ... InveST Study Group. (2014). Intravenous Autologous Bone Marrow Mononuclear Stem Cell Therapy for Ischemic Stroke. *Stroke*, 45(12), 3618–3624. <http://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.007028>
- Rider, C. C. (2006). Heparin/heparan sulphate binding in the TGF- β cytokine superfamily. *Biochemical Society Transactions*, 34(Pt 3), 458–60. <http://doi.org/10.1042/BST0340458>
- Roberts, J., Kahle, M. P., & Bix, G. J. (2012). Perlecan and the blood-brain barrier: beneficial proteolysis? *Frontiers in Pharmacology*, 3, 155. <http://doi.org/10.3389/fphar.2012.00155>
- Rouet, V., Hamma-Kourbali, Y., Petit, E., Panagopoulou, P., Katsoris, P., Barritault, D., ... Courty, J. (2005). A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(38), 32792–32800. <http://doi.org/10.1074/jbc.M504492200>
- Sarrazin, S., Lamanna, W. C., & Esko, J. D. (2011). Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), a004952–a004952. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a004952>
- Schaefer, L., & Schaefer, R. M. (2010). Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell and Tissue Research*, 339(1), 237–246. <http://doi.org/10.1007/s00441-009-0821-y>
- Schwartz, N. B., & Domowicz, M. S. (2018). Proteoglycans in brain development and pathogenesis. *FEBS Letters*, 592(23), 3791–3805. <http://doi.org/10.1002/1873-3468.13026>
- Shen, L. H., Li, Y., Chen, J. L., Zacharek, A., Gao, Q., Kapke, A., ... Chopp, M. (2007). Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(1), 6–13. <http://doi.org/DOI 10.1038/sj.jcbfm.9600311>

- Shichinohe, H., Kawabori, M., Iijima, H., Teramoto, T., Abumiya, T., Nakayama, N., ... Houkin, K. (2017). Research on advanced intervention using novel bone marrow stem cell (RAINBOW): a study protocol for a phase I, open-label, uncontrolled, dose-response trial of autologous bone marrow stromal cell transplantation in patients with acute ischemic stroke. *BMC Neurology*, 17(1), 179. <http://doi.org/10.1186/s12883-017-0955-6>
- Sousa, B. R., Parreira, R. C., Fonseca, E. A., Amaya, M. J., Tonelli, F. M. P., Lacerda, S. M. S. N., ... Resende, R. R. (2014). Human adult stem cells from diverse origins: An overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry Part A*, 85(1), 43–77. <http://doi.org/10.1002/cyto.a.22402>
- Sun, J., Wei, Z. Z., Achory, Gu, X., Zhang, J. Y. a, Zhang, Y., Li, J., & Wei, L. (2015). Intranasal delivery of hypoxia-preconditioned bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced regenerative effects after intracerebral hemorrhagic stroke in mice. *Experimental Neurology*, 272, 78–87. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.011>
- Sun, Y., Jin, K., Xie, L., Childs, J., Mao, X. O., Logvinova, A., & Greenberg, D. A. (2003). VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(12), 1843–51. <http://doi.org/10.1172/JCI17977>
- Sweeney, E. A., Lortat-Jacob, H., Priestley, G. V, Nakamoto, B., & Papayannopoulou, T. (2002). Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood*, 99(1), 44–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756151>
- Takahashi, H., Matsumoto, H., Kumon, Y., Ohnishi, T., Freeman, C., Imai, Y., & Tanaka, J. (2007). Expression of heparanase in nestin-positive reactive astrocytes in ischemic lesions of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience Letters*, 417(3), 250–254. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.02.075>
- Thomsen, M. S., Birkelund, S., Burkhart, A., Stensballe, A., & Moos, T. (2017). Synthesis and deposition of basement membrane proteins by primary brain capillary endothelial cells in a murine model of the blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry*, 140(5), 741–754. <http://doi.org/10.1111/jnc.13747>
- Tiwari, S. K., Mishra, P., & Rajavashisth, T. (2019). Advancement in the Pathophysiology of Cerebral Stroke. *Advancement in the Pathophysiology of Cerebral Stroke*, 11–21. <http://doi.org/10.1007/978-981-13-1453-7>

- Tselnicker, I. F., Boisvert, M. M., & Allen, N. J. (2014). The role of neuronal versus astrocyte-derived heparan sulfate proteoglycans in brain development and injury. *Biochemical Society Transactions*, 42(5), 1263–1269. <http://doi.org/10.1042/BST20140166>
- Varki, A. (2009). Glossary. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301236>
- Wexler, S. A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B., & Hows, J. M. (2003). Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal “stem” cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British Journal of Haematology*, 121(2), 368–374. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04284.x>
- Xie, M., & Li, J. (2019). Heparan sulfate proteoglycan – A common receptor for diverse cytokines. *Cellular Signalling*, 54, 115–121. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.022>
- Yao, Y. (2019). Basement membrane and stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 39(1), 3–19. <http://doi.org/10.1177/0271678X18801467>
- Yu, Q., Zhou, L., Liu, L., Cong, L., Wang, Y., Ge, T., & Lin, D. (2015). Stromal cell-derived factor-1 alpha alleviates hypoxic-ischemic brain damage in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464(2), 447–452. <http://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.06.135>
- Yue, X., Li, X., Nguyen, H. T., Chin, D. R., Sullivan, D. E., & Lasky, J. A. (2008). Transforming growth factor-beta1 induces heparan sulfate 6-O-endosulfatase 1 expression in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(29), 20397–407. <http://doi.org/10.1074/jbc.M802850200>
- Zacharek, A., Chen, J., Li, A., Cui, X., Li, Y., Roberts, C., ... Chopp, M. (2007). Angiotensin II/TIE2 and VEGF/FLK1 Induced by MSC Treatment Amplifies Angiogenesis and Vascular Stabilization after Stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 27(10), 1684–1691. <http://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600475>
- Zhang, H., Xie, X., Xiong, Y., Liu, S., Hu, G., Cao, W., & Wu, X. (2018). Comparisons of the therapeutic effects of three different routes of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in cerebral ischemic rats. *Brain Research*, 1680, 143–154. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.12.017>
- Zhong, J., Chan, A., Morad, L., Kornblum, H. I., Guoping Fan, & Carmichael, S. T. (2010). Hydrogel Matrix to Support Stem Cell Survival After Brain Transplantation in Stroke. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 24(7), 636–644. <http://doi.org/10.1177/1545968310361958>

Annexe 3 : Lange et al., Neurosci Biobehav Rev, 2019

L'article suivant a été publié dans le journal Neuroscience and Biobehavioural Reviews en Septembre 2019.

DOI : [10.1016/j.neubiorev.2019.09.028](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.09.028)

Review article

How to assess and manage cognitive impairment induced by treatments of non-central nervous system cancer

Marie Lange^{1,2,3}, Hélène Castel^{3,4}, Johan Le Fel⁵, Laure Tron^{3,6}, Didier Maillet^{7,8}, Myriam Bernaudin⁹, Omar Touzani⁹, Joy Perrier¹⁰, Mathieu Boone¹¹, Idlir Licaj^{2,3}, B enedicte Giffard^{3,10}, Martine Dubois⁴, Olivier Rigal^{5,12}, Thomas Durand¹³, Catherine Belin⁷, Damien Ricard¹³, Rozenn Le Gal⁹, V eronique Pancr e¹⁴, Isabelle Hardy-L eger¹⁵, Florence Joly*^{1,2,3,16}

¹ Clinical Research Department, Centre François Baclesse, 14000 Caen, France

² INSERM, U1086, ANTICIPE, 14000 Caen, France

³ Cancer & Cognition Platform, Ligue Contre le Cancer, 14000 Caen, France

⁴ Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, DC2N, 76000 Rouen, France, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France

⁵ Care Support Department, Centre Henri-Becquerel, 76000 Rouen, France

⁶ University Hospital of Caen, 1400 Caen, France

⁷ Neurology Department, Hôpital Saint Louis, 75000 Paris, France

⁸ Laboratoire PSITEC, EA 4072, UFR de Psychologie, Université de Lille, 59000 Villeneuve d'Ascq, France

⁹ Normandie Université, UNICAEN, CEA, CNRS, ISTCT/CERVOxy Group, GIP Cyceron, 14000 Caen, France

¹⁰ Normandie Univ, UNICAEN, PSL Research University, EPHE, INSERM, U1077, CHU de Caen, Neuropsychologie et Imagerie de la Mémoire Humaine, 14000 Caen, France

¹¹ Medical Oncology Department, University Hospital, 80000 Amiens, France

¹² Medical Oncology Department, Centre Henri-Becquerel, 76000 Rouen, France

¹³ UMR MD4 8257 CNRS, University of Paris Descartes, SSA, 75006 Paris, France

¹⁴ Cancéropôle Nord-Ouest, 59000 Lille, France

¹⁵ NeuroHIV Rehabilitation Unit, CHU de Bicêtre, APHP, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France

¹⁶ Medical Oncology Department, CHU de Caen, 14000 Caen, France

*Corresponding author: Pr Florence Joly, Clinical Research Department, Centre François Baclesse, 3 avenue du Général Harris, F-14076 Caen Cedex 05, Phone: +33 231 45 53 97, Fax: +33 231 45 50 97, E-mail: f.joly@baclesse.unicancer.fr

Financial support:

None

Conflict of interest:

None

Word count:

4477

Abstract

A number of neurotoxicity associated with oncological treatments has been reported in non-central nervous system cancers, including mainly studies on breast cancer. What we learnt from these studies is that a multidisciplinary approach is essential to allow progress in the understanding and optimal assessment of cognitive dysfunctions during the course of a cancer history.

An expert group from the International Cancer and Cognition Platform, Reflection Group on Cognitive Evaluations in Oncology (GREC-ONCO) and the French-speaking association of Neuro-oncologists (ANOCEF) present the state of the art and a guide to help the choice of appropriated tools to assess patient cognition in studies on oncology and neurobehavior in animal models. In addition, current cognitive rehabilitation programs currently under evaluation are also discussed.

Oncologists should be aware that cognitive assessments in oncology depend on the research question, study design, cognitive domains, patients' characteristics, psychometric properties of the tests, and whether the tests are supervised or not by a neuropsychologist. In routine, batteries of electronic tests can be proposed, but several of them are characterized by weak psychometric developments and show poor convergent validity when compared with standard pencil-and-paper tests. In order to improve the comprehension on the impact of cancer treatments on cognition, new animal models are in development, and would in the future include non-human primate models.

By bringing together the skills and practices of oncologists, neurologists, neuropsychologists, neuroscientists, we propose a series of specific tools and tests that accompany the cognitive management of non-CNS cancer patients.

Keywords: Cognition, cancer treatments, cancer patients, electronic cognitive tests, animal model, behavior, management of cognitive impairment

1. Background

Neurotoxicities associated with oncological treatments are frequently observed even in non-central nervous system (CNS) cancers. Chemotherapy, hormonal therapies and targeted therapies can induce cognitive impairment in some populations of cancer patients. These alterations, subtle or moderate in most cases, mainly concern memory, executive functions, attention and information processing speed and can have a negative impact on patient's quality of life (Joly *et al.* 2015). This phenomenon, also named cancer-related or chemotherapy-related cognitive impairment (CRCI), has been mainly studied in breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy (Ahles *et al.* 2012) and some clinical guidelines for survivorship including cognitive difficulties care have been recently proposed (Runowicz *et al.* 2016).

In cancer patients, cognitive functioning can be assessed subjectively with self-report questionnaires and objectively with neuropsychological tests. In most clinical trials, objective cognition has been evaluated with pencil-and-paper cognitive tests and in 2011, the International Cognition and Cancer Task Force (ICCTF) published guidelines on minimal battery of pencil-and-paper tests usable in standard clinical protocols (Wefel *et al.* 2011). These standardized tests, requiring the presence of a neuropsychologist, have been shown sometimes to be replaced by electronic tests whose some can be performed by the patient himself. Nevertheless, some of these electronic batteries do not show currently robust psychometric properties. It appears important to

developed their use and assess their robustness, notably by comparing them with traditional pencil-and-paper tests, by a neuropsychologist who remains the validated way to get a diagnosis.

Due to the potential impact on social, professional and/or quality of life (Boykoff *et al.* 2009), the management of these disorders is essential. Among existing approaches, the non-pharmacological one, mainly cognitive rehabilitation, appears the most promising method (Chan *et al.* 2015) among various cognitive programs which have not yet been compared with each other's.

Experimental works performed in animal models are complementary to clinical studies and especially useful to assess the direct impact of anticancer agents on cognition regardless of the cancer itself, the surgery, anxiety/depression and/or additional co-morbidities. It should help investigating underlying neurobiological mechanisms and the influence of some parameters such as stress, mood and aging on potential therapy-induced cognitive dysfunctions (Dubois *et al.* 2014; Seigers and Fardell, 2011; Winocur *et al.* 2018).

In this context, an expert group of neuropsychologists, oncologists, geriatrics, neurologists, neuroscientists and biostatisticians, from the International Cancer and Cognition Platform, the Reflection Group on Cognitive Evaluations in Oncology (GREC-ONCO) and/or the French speaking association of Neuro-oncologists (ANOCEF), present the CRCI state of the art and a guide to help the

choice of appropriated tools to assess cognition in oncology studies in patients and animal models. Cognitive rehabilitation programs were discussed and the main propositions of the expert groups are presented hereafter.

2. Cognitive assessment in cancer patients

Cognitive assessment and interpretation of results in oncology are challenging due to various factors and co-morbidities that may impact cognitive functioning, such as anxiety/depression and fatigue (Lange *et al.* 2014).

The choice of the tests and its' modalities depends on the presence of a neuropsychologist, the research question, the study design (control group or normative data; study design longitudinal or not \pm alternate test forms...) (Wefel *et al.* 2011), the assessed cognitive domains (e.g. visuospatial abilities with androgenic deprivation therapy), the patients' characteristics (e.g. lack of familiarization of elderly patient with electronic tools), but also the psychometric test properties such as reliability and validity.

2.1. Standard pencil-and-paper tests

Cognitive assessment in oncology studies needs the use of standardized tests, available and validated for each language and including normative data among the age group of the population studied. In complement and based on the ICCTF recommendations (Wefel *et al.*

2011), the GREC-ONCO proposed, according to normative data, to use a more extensive battery composed by a core battery of cognitive tests and optional tests (Taillia *et al.* 2015) (Table 1). Additional tests or tests varying from those proposed by the ICCTF are presented below.

The National Adult Reading test adapted for instance in French (fNART) (Mackinnon, 2005), the Wide Range Achievement Test also adapted (WRAT) (Wilkinson and Robertson, 2006), which is a marker of the pre-morbid cognitive level and a proxy of cognitive reserve, can be used at study enrollment. The global cognitive functioning test Montreal Cognitive Assessment (MoCA) is also advocated (Nasreddine *et al.* 2005).

To assess verbal memory, two tests can be used depending on the patients' age, the follow-up, and/or the time available for cognitive assessment, e.g. the RL/RI-16 items (Grober *et al.* 1988) or the Hopkins Verbal Learning test (HVLN) (Brandt, 1991). The last one, recommended by the ICCTF, has few normative data in French as in other languages. The Rey's figure delayed recall can be used to assess visual memory (Rey, 1959).

Concerning attention and executive tests, the Computerized Speed Cognitive Test (CSCT) (Ruet *et al.* 2013) is recommended. The paper version (Digit Symbol) can also be used (Wechsler, 2008). The GREC-ONCO proposed two verbal fluency tasks (animals and letter P) (Godefroy and the Reflection Group on the Evaluation of Executive Functions (GREFEX),

2008) instead of the Controlled Oral Word Association (COWA) - rarely used in France for lexical reasons - questioning the necessity of adaptation depending on the country.

The ICCTF also recommends assessing working memory. In this situation, the GREC-ONCO proposes to use digit and spatial spans (Wechsler, 2008; Wechsler, 2009).

2.2. Electronic cognitive tests

2.2.1. Electronic cognitive tests used in oncology

Among electronic batteries of cognitive tests used in oncology studies with adult patients excluding CNS cancer (Table 2), the most frequently used are CogTrack, the Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB), CNS Vital Signs, CogState and BrainBaseline. They assess various cognitive domains pertinent in oncology such as attention, processing speed and memory. For each of them, patient can perform the assessment without professional assistance.

The Cognitive Drug Research System (CDR), or **CogTrack**, was developed to assess cognition in clinical trials. The normative data are based on a large sample size (Wesnes *et al.* 2016). Psychometric properties have recently been described (Wesnes *et al.* 2017) and this battery showed a beneficial effect of modafinil on memory speed, episodic memory and attention in breast cancer survivors (Kohli *et al.* 2009).

CANTAB was used in neuroscience research in multiple neurological patient populations. Moderate correlations with paper-pencil tests and low test-retest reliability were found (Lowe and Rabbitt, 1998). Some authors concluded that there is an adequate assessment of an underlying “general” cognitive factor, but that measurement of specific constructs, such as memory, must be approached with caution (Smith *et al.* 2013). A weak association was observed between global deficit score (pencil-and-paper tests) and CANTAB in colorectal cancer patients treated by chemotherapy (Vardy *et al.* 2014).

CNS Vital Signs includes familiar cognitive tests. Test-retest reliability, concurrent validity with traditional tests and discriminating validity were assessed and showed similar characteristics than the traditional neuropsychological tests (Gualtieri and Johnson, 2006). Nevertheless, compared with other electronic batteries including CogState, the proportion of scores that met at least adequate reliability seems to be lower (Cole *et al.* 2013). CNS Vital Signs should not replace the comprehensiveness of traditional neuropsychological tests but it can play a role in screening or serial assessment (Gualtieri and Johnson, 2008). This battery has been used in breast cancer patients and in lymphoma survivors, showing cognitive functioning worsening over the course of chemotherapy (Collins *et al.* 2013) and impaired attention, respectively (Krolak *et al.* 2017).

CogState was used in phase I to phase IV trials. High test-retest reliability was found when

participants were assessed over 3 months (Fredrickson et al. 2010; Lim et al. 2013). Compared with 3 other electronic batteries, Cog-State had the highest proportion of scores that met adequate reliability (Cole *et al.* 2013). In breast cancer survivors a trend towards significance for validity criterion related to working memory among 4 assessed domains was found (Patel *et al.* 2017). No statistical significance correlation was observed with traditional tests (Patel *et al.* 2017). These results could be partly explained by the few cognitive impairment found and the small sample size (n=26). In breast cancer, during the 5th year of treatment, the overall cognitive scores of patients receiving tamoxifen had worsened compared with those treated with aromatase inhibitors (Phillips *et al.* 2010). A second study showed no significant impact of ovarian function suppression on breast cancer patients' cognition while a third one assessed the effect of cognitive rehabilitation program and showed no difference between groups (Bray *et al.* 2017; Phillips *et al.* 2016).

BrainBaseline is difficult to evaluate the usefulness of this tool due to little information available on website. Nonetheless, a study in breast cancer survivors showed an association between physical activity and executive and working memory functioning (Ehlers *et al.* 2017).

2.2.2. Electronic cognitive tests used in other pathologies

Other cognitive tests or batteries are frequently used notably in clinical context in various patient populations. Often presented as electronic versions of traditional pencil-and-paper tests they require professional assistance (Table 3, non-exhaustive list).

Several Wechsler batteries, such as the Wechsler Adult Intelligence Scale-IV (**WAIS-IV** (Wechsler, 2008)) and the Wechsler Memory Scale (**WMS-IV** (Wechsler, 2009)), are available in a digital platform, Q-interactive. The WAIS-IV was developed to provide a measure of cognitive ability (4 scales) and the WMS-IV focuses on the assessment of memory (various indexes, Table 3). Equivalence studies between the traditional and electronic versions were conducted in healthy subjects (Daniel, 2012; Daniel, 2013) but there is no data in patients.

The electronic version of the MoCA (Nasreddine *et al.* 2005), a cognitive screening test, is available. **eMoCA** is very similar to the paper version with some additional features (instructions of presented onscreen, computation of the execution time, etc.). The comparison between electronic and paper version is ongoing.

The d2 is a test frequently used to assess attention (Brickenkamp, 1998). An electronic version of the revised version (**d2-R**) is available. Normative data of this test exist on a large sample however the electronic version did not include subjects aged ≥ 55 years (Brickenkamp *et al.* 2015). The manual of the

editor contains reliability data but not validated data (Brickenkamp *et al.* 2015).

The Computerized Speed Cognitive Test (CSCT) assesses processing speed similar to the digit/symbol substitution of the WAIS Digit Symbol or the Symbol Digit Modalities test (Ruet *et al.* 2013). It allows limited effect related to practice due to the generation of new keys and forms at each session and to instant classification of scores according to normative values.

2.3. Phone based cognitive assessment

Recently, a study on cognitive training in breast cancer patients used a phone based cognitive assessment testing (Damholdt *et al.* 2016). Phone based tests are usually completed with the supervision of a professional (paced auditory serial addition test, Rey auditory verbal learning test, digit span forwards, digit span backwards, digit ordering, letter fluency, etc.). To reduce risk of cheating, the participants were instructed not to take notes, and the assessors registered any signs of cheating.

3. Cognitive assessment in animal models

Although clinical observations are essential for establishing the role of combinatorial chemotherapy and new anti-cancer therapy, they will not make it possible to establish a direct physiopathological link of causality between chemotherapeutic molecules and the appearance of the cognitive dysfunctions

observed during longitudinal follow-up of patients. The use of animal models allowed evaluation of the direct impact of cancer therapy on cognitive functions and its interaction with factors such as aging and emotional status (Dubois *et al.* 2014; Lee *et al.* 2006; Reiriz *et al.* 2006).

Thus, the behavioral approach used corresponds to selected behavioral tests focusing on tasks dependent on the hippocampus and the prefrontal cortex, in addition to the spontaneous activity and emotional reactivity (supplementary material).

The open field test assesses rat or mouse spontaneous activity through recording of their natural behavior towards an inherent fear of empty, new and open space. This test helps detecting potential toxicity and well-being, evaluating anxiety-like behavior.

3.1. Hippocampus and prefrontal cortical cognitive tests

Cognitive assessment in chemotherapy-treated animals involves standardized cognitive tests evaluating cognitive functions related to the hippocampus and the prefrontal cortex. The recent ICCTF preclinical recommendations proposed battery of standard operating Procedures for behavioral tests in rodents (Winocur *et al.* 2018).

The **Morris water maze** (MWM) addresses context-dependent spatial learning and memory (de Toledo-Morrell *et al.* 1984), but also behavioral flexibility (Morris, 1984).

The **contextual fear conditioning test** assesses non-spatial memory through the ability to learn basic associations involving the functioning of the hippocampal memory (contextual fear conditioning), basic conditioning related to the amygdala (cued fear conditioning), and the learning of suppressing a fear response once it has been learned (Anagnostaras *et al.* 1999).

The **novel object recognition test** (NOR) is also used to assess short-term and long-term memory (working or prefrontal or hippocampal memory function) (Ennaceur and Delacour, 1988). This task measures the preference of animals to detect and explore a new object compared with familiar ones in their environment.

3.2. Emotional reactivity tests

Preclinical research should help to take-into account co-occurring symptoms associated with chemotherapy, and their relationship to cognitive performance. In rodents, emotionality, stress-related responses, motivation or impulsivity/risk assessment have been tested reliably in the neuroscience field. The **elevated plus maze** evaluates anxiety-like behaviors (in a forced situation) (Lister, 1987) by requiring the animal to choose between secure parts of the maze (two enclosed arms) and aversive parts of the maze (open arms).

Other reliable tests for measuring aspects of emotional reactivity in rodents include the **forced swim test** (FST) (Castagne *et al.* 2009), which measures immobility in inescapable stressful situations and models depressive-like

behavior or the **tail suspension test** (TST) (Steru *et al.* 1985) an alternative to the forced swimming test in mice.

3.3. Non-human primate model

Non-human primates might be considered the species of choice to study anticancer therapy-induced cognitive deficits because of similarities with human in terms of general physiology, brain structure and metabolism, grey to white matter ratio, immune system, and behavioural repertoire. Complex cognitive behaviours in the marmoset (*Callithrix jacchus*) have been investigated, using manual (Marshall *et al.* 2003; Roberts and Wallis, 2000) as well as automated touch screen systems such as the CANTAB (Spinelli *et al.* 2004). As a result, it has been shown that marmosets are able to be trained at a high and stable level of performances on a variety of cognitive tasks (Le Gal *et al.* 2017), thus sustaining future development with these non-human primate models.

4. Cognitive training in cancer patients and other pathologies

Although there are still no preventive interventions, different methods of managing cognitive impairment are being assessed: pharmacological, physical, behavioral and cognitive ones. Among these approaches, cognitive rehabilitation appears most promising (Chan *et al.* 2015). Cognitive management exists both through electronic programs (which can be performed by the patient alone) or *via*

internet platforms providing cognitive training at home and enabling to be coached by a professional. Overall, the first outcomes of cognitive management studies based on small cancer patient samples, showed an improvement of cognitive complaints rather than performances on cognitive tests (Table 4).

4.1. Cognitive training based on electronic program

The use of electronic cognitive training programs makes it possible to have a precise follow-up of the patient performances and to be able to standardize the support. Among the tools available, the most common are BrainHQ/InSight®, LUMOSITY® and HAPPYNeuron®. All are available in several languages, allowing cross-language comparisons.

4.1.1. Electronic training in oncology

BrainHQ/InSight® is a learning program based on the neuroplasticity model to improve processing speed. It has been mainly used in healthy adults, elderly adults and schizophrenia patients. These benefits were assessed in a large randomized study in cancer survivors showing a decrease in cognitive complaints without benefits on objective tests (Bray *et al.* 2017).

LUMOSITY® has been developed partly from neuropsychological tasks. It has been mainly used in older adults. First results have also been published in breast cancer survivors and showed improvement of executive functions, processing

speed and executive complaints (Kesler *et al.* 2013a).

HAPPYNeuron® program has been developed by a team of neurologist, speech therapists and psychiatrics and proposed varied exercises. A study in breast cancer survivors did not show significant effect on cognitive complaints but objective performances of verbal learning and working memory improved from 5 months after training (Damholdt *et al.* 2016).

Other electronic trainings were currently proposed in other pathologies including **RehaCom®** or Cogmed but not yet in oncology.

4.2. Cognitive training in oncology without electronic program

Regarding the non-electronic cognitive rehabilitation programs used in oncology, the problem resides in the small sample of cancer patients, even if they allow improving cognitive complaints and objective performances for at least one score or one domain.

The **Memory and Attention Adaptation Training (MAAT)** was based on cognitive-behavioral therapy and aimed to enhance cancer patients' skills for self-managing and coping with cognitive impairment in daily life. Results showed that patients improved in verbal memory performances and some aspects of quality of life after intervention (Ferguson *et al.* 2007; Ferguson *et al.* 2012).

A second program **Promoting Cognitive Health Program** consists in individualized

face-to-face education and focused on changing dysfunctional cognition and maladaptive behaviors and on developing problem-solving and coping skills, to play a role in the prevention of cognitive decline. A pilot study showed benefits in breast cancer patients undergoing chemotherapy on objective and subjective cognition (Park *et al.* 2017).

Programs of **group-based cognitive rehabilitation** also exist. The one used by Cherrier and colleagues (, 2013) included consecutive workshop sessions which included memory aids as well as development of memory skills and one session on mindfulness meditation. In cancer survivors, improvement on attention and cognitive complaints were observed after intervention.

A second program, Responding to Cognitive Concerns (**ReCog**), was based on a group of self-regulatory cognitive rehabilitation (Schuurs and Green, 2013). The program was composed by sessions focusing on psychoeducation, and followed by a thematic group discussion. The second half of each session emphasized developing and applying skills. A feasibility study in cancer survivors was followed by a randomized trial showing that the rehabilitation group increased only performance in TMT A and in one subscale of cognitive complaints questionnaire (King and Green, 2015).

Another program was based on **psychoeducation and home cognitive exercises** (Ercoli *et al.* 2013). It includes group session of education, technique instruction, in-

class and homework exercises and goal setting. In breast cancer survivors, a significant effect was observed on cognitive complaints and memory functioning (Ercoli *et al.* 2015).

Advanced Cognitive Training for Independent and Vital Elderly (**ACTIVE®**) consisted in a memory training (Jobe *et al.* 2001) based on memory strategies and exercises on small group dedicated to elderly. A randomized study in breast cancer survivors compared the use of ACTIVE and INSIGHT program (processing speed training only) and showed broader benefits on cognitive complaints, memory and processing speed performance with the latter program (Von Ah *et al.* 2012).

5. Contributions of the cognitive training with animal model

The current core of data obtained in preclinical models should help testing and investigating strategies of intervention and prevention of cancer therapy-induced cognitive deficits. For example, based on the clinical studies previously showing that physical activity improves quality of life and cognitive functioning, two main studies demonstrated in rats that physical exercise improves neurogenesis and cognitive functions altered by chemotherapy (Fardell *et al.* 2012; Winocur *et al.* 2014).

6. Propositions for cognitive study in oncology

The multidisciplinary group aimed at discussing and proposing the most relevant tools including the use of new electronic batteries of tests to apply to cancer patients and to use in animal models to assess cognitive dysfunctions induced by treatments.

6.1. Cognitive assessment in patients

Cognitive assessment in oncology studies depends on the research question, the study design, the cognitive domains, patients' characteristics, the psychometric properties of the tests but also the presence of a neuropsychologist, essential to make the interpretation of results. The propositions are presented as followed:

a) Memory, processing speed and executive functions, which are most impaired domains after cancer treatments (Joly *et al.* 2015), should be evaluated systematically.

b) Cognitive assessment should as far as possible be performed by a neuropsychologist, using validated and standardized cognitive tests, able to make appropriate feedback to patients and potentially dissociating cognitive impairment due to cancer treatments to those related to different etiology.

c) For the use of pencil-and-paper tests, tests should be available and validated in each national language and exhibit normative data. For example, for patients speaking French, the first choice should be the battery proposed by the GREC-ONCO, based on ICCTF's recommendations (Wefel *et al.* 2011) and according to normative data. The electronic versions of traditional pencil-and-paper tests can also be used (Table 3), with the advantage

to have a more precise measure of the reaction time and an automatic calculation of raw scores or even z-scores.

d) In the absence of a neuropsychologist, studies can include a screening cognitive assessment and an evaluation of cognitive complaints (Figure 1). Some batteries of electronic tests could also be proposed. Some of them are relatively weak in terms of psychometric development but some have been used in cancer clinical trials, from which CogState has been validated in oncology. More studies using these electronic batteries should be conducted to assess their sensitivity and specificity and to assess relationship with standard neuropsychological tests. With the self-administration of tests, feedbacks to patients are necessary with a suitable manner. This approach also needs follow-up screening of cognitive difficulties. The disadvantages to these batteries also include the lack of familiarization for some patients with electronic tools, especially older patients. Even so, these electronic cognitive batteries (Table 2) could be used for large database implementation. They present the advantage of having little verbal material, thus reducing the impact of the practice in longitudinal studies with repeated assessment.

e) Cognitive assessment performed by phone, based on tests with known psychometric properties, could be an alternative to electronic tests performed without a neuropsychologist, even if cautions should be taken to reduce the risk of cheating by taking notes.

f) Cognitive complaints are not always related to performances in cognitive tests, but

they are frequently associated with psychological factors (Hutchinson *et al.* 2012). For this reason, these factors should be systematically assessed among patients with cognitive complaints to better identify the origin of the difficulties and potentially propose specific care.

6.2. Cognitive training in cancer patients

Among the methods of management of cognitive difficulties, the non-pharmacological approach shows the best benefit (Chan *et al.* 2015). All interventional studies reported in this review demonstrated cognitive complaints improvement; however their effect in objective cognitive performances is less clear. Cognitive management studies should include a control group with a different kind of cognitive training, or combine alternative approaches like physical activity, mindfulness based cognitive therapy or programs used in other diseases.

Further research is needed about the length of training program, to question whether the duration of 4-12 weeks is sufficient to maintain benefit on cognition. All these programs need standardization, more specifically when non-electronic ones are used.

In any case, professional assistance is strongly encouraged. Indeed, if patients with difficulties are following the program alone, some exercises could spark off stress or decrease self-confidence. Furthermore, for studies focusing on elderly patients, who are less familiar with electronic tools, feasibility and acceptance rate

on cognitive training with electronic interface need to be assessed.

6.3. Cognitive assessment with animal model

To explore and verify potential cognitive impacts of cancer treatments in animal models, a battery of cognitive and emotional tests are likely recommended (Winocur *et al.* 2018). It should include reliable tests of memory and executive functions related to hippocampal and prefrontal cortex dysfunctions, e.g. MWM and NOR (Table 4). The NOR appears interesting in the sense that it can be used to evaluate the impact of cancer/treatments in a longitudinal way, without bias due to test and retest procedures on the same animals. Anxiety-like and resigned-depressive like behaviors should be tested systematically, such as elevated plus maze and FST (Table 4), to evaluate cancer therapy because emotional status i) may be directly impaired by the neurobiological mechanism of chemotherapy and thus consequently would interfere with cognitive test evaluations and ii) can constitute a risk factor predictive of chemotherapy-induced cognitive dysfunctions.

Thus more studies should be directed to better adapt the dose of chemotherapy regimen, the combination of diverse chemotherapy currently in use in clinical protocols (FOLFOX, Folfiri, FEC, etc...), potential toxicities in animals and also to adjust the delay between last treatment injection and the behavioral experiments. Thus, it is likely that investigation of learning memory

or behavioral flexibility should be investigated at different time post-treatment corresponding to different mature status of new produced neurons.

Until now, it is interesting to note that from the animal model literature, few evidence indicate that anxiety and depressive-like behaviours can be directly affected by chemotherapy, but some confounding factors such as age should be taken into consideration. In addition, new targeted therapy such as kinase inhibitors or new hormone therapy, may interfere with emotional reactivity, and as a consequence, impact the results of cognitive tests. For instance, patients treated with some hormone therapy may suffer from fatigue, while cognitive impairment is currently assessed in clinical trials (Lange *et al.* 2017). A pre-clinical study can be proposed by adapting the animal model by working on aged animals, bearing a tumor and treated by hormonotherapy after surgery, to better understand the physiopathology of “fatigue” or cognitive impairment, in side of the cancer itself and/or the co-morbidities, confounding aspects in clinical trials.

According to research question, if the animal model should assess higher-order executive functions, the non-human primate model, such as the marmoset model, have the advantage to have cognitive skills which cannot be evaluated in other species. Moreover, the pharmacokinetics and pharmacodynamics in primates are often very different from those in rodents, thus placing marmoset as a reasonable intermediate model to examine the effects of anticancer therapies on cognitive performances

on brain functions with the same noninvasive neuroimaging techniques used in the clinic.

6.4. Perspectives

In addition to development of cognitive assessment with electronic battery of tests, virtual reality is another promising approach for assessment and training because it is more ecological. Since cognitive complaints are frequent, some other cognitive domains than those monitored by ICCTF and GREC-ONCO batteries can be investigated such as prospective memory or social cognition.

Methodological quality of clinical trial on cognitive management could be improved by comparing cognitive programs and different management approaches, such as cognitive training and physical activity or multimodal approaches.

The recommendation is to favor more sophisticated preclinical animal models mimicking the longitudinal course of the cancer treated patients should now include stress and anxiety prior to tumor transplantation/development, anesthesia and surgery, and then chemotherapy and/or new cancer therapy administration, also based on different development stages (juvenile, young and aged), including both sex. It will greatly help to understand and evaluate the transitory or long-term impact on cognition of the cancer situation and to test and evaluate pharmacological or ecological rehabilitation strategies.

Supplementary material: Table: Common cognitive/emotional test in rodent animal models. Modified and adapted from Winocur et al., 2018

Acknowledgements: The Northwest Canceropole and the Ligue Nationale contre le Cancer

Author Contributions Statement:

ML, HC, JLF, MB, OT, JP, MD, RLG and IsL, have provided review of the literature. ML, HC, JLF, DM, MB, OT, JP, IdL and FJ wrote the article. LT, IL, BG, CB and DR edited the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Reference List

- Ahles, T. A., Root, J. C. & Ryan, E. L.** (2012). Cancer- and cancer treatment-associated cognitive change: an update on the state of the science. *Journal of Clinical Oncology* **30**, 3675-3686.
- Anagnostaras, S. G., Maren, S. & Fanselow, M. S.** (1999). Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J Neurosci.* **19**, 1106-1114.
- Boykoff, N., Moieni, M. & Subramanian, S. K.** (2009). Confronting chemobrain: an in-depth look at survivors' reports of impact on work, social networks, and health care response. *Journal of Cancer Survivorship : research and practice* **3**, 223-232.
- Brandt, J.** (1991). The Hopkins Verbal Learning Test: Development of a new memory test with six equivalent forms. *Clinical Neuropsychologist* **5**, 125-142.
- Bray, V. J., Dhillon, H. M., Bell, M. L., Kabourakis, M., Fiero, M. H., Yip, D., Boyle, F., Price, M. A. & Vardy, J. L.** (2017). Evaluation of a Web-Based Cognitive Rehabilitation Program in Cancer Survivors Reporting Cognitive Symptoms After Chemotherapy. *J Clin Oncol* **35**, 217-225.
- Brickenkamp, R.** (1998). *The d2 test of attention*. Hogrefe & Huber Publishing.
- Brickenkamp, R., Schmidt-Atzert, L. S. & Liepmann, D.** (2015). d2 Test of Attention - Revised. Supplement for online version. In (Anonymous), pp. 1-23. Hogrefe: Göttingen.
- Castagne, V., Porsolt, R. D. & Moser, P.** (2009). Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. *Eur J Pharmacol* **616**, 128-133.
- Chan, R. J., McCarthy, A. L., Devenish, J., Sullivan, K. A. & Chan, A.** (2015). Systematic review of pharmacologic and non-pharmacologic interventions to manage cognitive alterations after chemotherapy for breast cancer. *European Journal of Cancer* **51**, 437-450.
- Cherrier, M. M., Anderson, K., David, D., Higano, C. S., Gray, H., Church, A. & Willis, S. L.** (2013). A randomized trial of cognitive rehabilitation in cancer survivors. *Life Sciences* **93**, 617-622.
- Cole, W. R., Arrieux, J. P., Schwab, K., Ivins, B. J., Qashu, F. M. & Lewis, S. C.** (2013). Test-retest reliability of four computerized neurocognitive assessment tools in an active duty military population. *Arch Clin Neuropsychol.* **28**, 732-742.

- Collins, B., Mackenzie, J., Tasca, G. A., Scherling, C. & Smith, A.** (2013). Cognitive effects of chemotherapy in breast cancer patients: a dose-response study. *Psychooncology*, **22**, 1517-1527.
- Cromer, J. A., Harel, B. T., Yu, K., Valadka, J. S., Brunwin, J. W., Crawford, C. D., Mayes, L. C. & Maruff, P.** (2015). Comparison of Cognitive Performance on the Cogstate Brief Battery When Taken In-Clinic, In-Group, and Unsupervised. *Clin Neuropsychol*, **29**, 542-558.
- Damholdt, M. F., Mehlsen, M., O'Toole, M. S., Andreassen, R. K., Pedersen, A. D. & Zachariae, R.** (2016). Web-based cognitive training for breast cancer survivors with cognitive complaints-a randomized controlled trial. *Psychooncology*.
- Daniel, M. H.** (2012). Equivalence of Q-interactive - Administered Cognitive Tasks: WAIS-IV®. In (Anonymous), pp. 1-20. Pearson.
- Daniel, M. H.** (2013). Equivalence of Q-interactive and Paper Administration of WMS®-IV Cognitive Tasks. In (Anonymous), pp. 1-15. Pearson.
- de Toledo-Morrell, L., Morrell, F. & Fleming, S.** (1984). Age-dependent deficits in spatial memory are related to impaired hippocampal kindling. *Behav. Neurosci*, **98**, 902-907.
- Dubois, M., Lapinte, N., Villier, V., Lecointre, C., Roy, V., Tonon, M. C., Gandolfo, P., Joly, F., Hilber, P. & Castel, D. H.** (2014). Chemotherapy-induced long-term alteration of executive functions and hippocampal cell proliferation: Role of glucose as adjuvant. *Neuropharmacology* **79**, 234-248.
- Egerhazi, A., Berecz, R., Bartok, E. & Degrell, I.** (2007). Automated Neuropsychological Test Battery (CANTAB) in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry* **31**, 746-751.
- Ehlers, D. K., Aguinaga, S., Cosman, J., Severson, J., Kramer, A. F. & McAuley, E.** (2017). The effects of physical activity and fatigue on cognitive performance in breast cancer survivors. *Breast Cancer Research and Treatment*.
- Ennaceur, A. & Delacour, J.** (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* **31**, 47-59.
- Ercoli, L. M., Castellon, S. A., Hunter, A. M., Kwan, L., Kahn-Mills, B. A., Cernin, P. A., Leuchter, A. F. & Ganz, P. A.** (2013). Assessment of the feasibility of a rehabilitation intervention program for breast cancer survivors with cognitive complaints. *Brain Imaging and Behavior* **7**, 543-553.
- Ercoli, L. M., Petersen, L., Hunter, A. M., Castellon, S. A., Kwan, L., Kahn-Mills, B. A., Embree, L. M., Cernin, P. A., Leuchter, A. F. & Ganz, P. A.** (2015). Cognitive rehabilitation group intervention for breast cancer survivors: results of a randomized clinical trial. *Psychooncology*, **24**, 1360-1367.
- Fardell, J. E., Vardy, J., Shah, J. D. & Johnston, I. N.** (2012). Cognitive impairments caused by oxaliplatin and 5-fluorouracil chemotherapy are ameliorated by physical activity. *Psychopharmacology* **220**, 183-193.
- Ferguson, R. J., Ahles, T. A., Saykin, A. J., McDonald, B. C., Furstenberg, C. T., Cole, B. F. & Mott, L. A.** (2007). Cognitive-behavioral management of chemotherapy-related cognitive change. *Psycho-Oncology* **16**, 772-777.
- Ferguson, R. J., McDonald, B. C., Rocque, M. A., Furstenberg, C. T., Horrigan, S., Ahles, T. A. & Saykin, A. J.** (2012). Development of CBT for chemotherapy-related cognitive change: results of a waitlist control trial. *Psycho-Oncology* **21**, 176-186.

- Fredrickson, J., Maruff, P., Woodward, M., Moore, L., Fredrickson, A., Sach, J. & Darby, D.** (2010). Evaluation of the usability of a brief computerized cognitive screening test in older people for epidemiological studies. *Neuroepidemiology* **34**, 65-75.
- Godefroy, O. & and the Reflection Group on the Evaluation of Executive Functions (GREFEX)** (2008). *[Executive functions and neurological and psychiatric pathologies]*. Marseille.
- Godefroy, O., Leclercq, C., Roussel, M., Moroni, C., Quaglino, V., Beaunieux, H., Tallia, H., Nedelec-Cicéri, C., Bonnin, C., Thomas-Anterion, C., Varvat, J., Aboulafia-Brakha, T. & Assal, F.** (2012). French adaptation of the vascular cognitive impairment harmonization standards: the GRECOG-VASC study. *Int. J Stroke* **7**, 362-363.
- Goncalves, M. M., Pinho, M. S. & Simoes, M. R.** (2016). Test-retest reliability analysis of the Cambridge Neuropsychological Automated Tests for the assessment of dementia in older people living in retirement homes. *Appl Neuropsychol. Adult.* **23**, 251-263.
- Grober, E., Buschke, H., Crystal, H., Bang, S. & Dresner, R.** (1988). Screening for dementia by memory testing. *Neurology* **38**, 900-903.
- Gualtieri, C. T. & Johnson, L. G.** (2006). Reliability and validity of a computerized neurocognitive test battery, CNS Vital Signs. *Arch Clin Neuropsychol.* **21**, 623-643.
- Gualtieri, C. T. & Johnson, L. G.** (2008). A computerized test battery sensitive to mild and severe brain injury. *Medscape. J Med* **10**, 90.
- Harrington, K. D., Lim, Y. Y., Ames, D., Hassenstab, J., Rainey-Smith, S., Robertson, J., Salvado, O., Masters, C. L. & Maruff, P.** (2017). Using Robust Normative Data to Investigate the Neuropsychology of Cognitive Aging. *Arch Clin Neuropsychol.* **32**, 142-154.
- Hutchinson, A. D., Hosking, J. R., Kichenadasse, G., Mattiske, J. K. & Wilson, C.** (2012). Objective and subjective cognitive impairment following chemotherapy for cancer: a systematic review. *Cancer Treatment Reviews* **38**, 926-934.
- Jobe, J. B., Smith, D. M., Ball, K., Tennstedt, S. L., Marsiske, M., Willis, S. L., Rebok, G. W., Morris, J. N., Helmers, K. F., Leveck, M. D. & Kleinman, K.** (2001). ACTIVE: a cognitive intervention trial to promote independence in older adults. *Control Clin Trials* **22**, 453-479.
- Joly, F., Giffard, B., Rigal, O., de Ruitter, M. B., Small, B. J., Dubois, M., LeFel, J., Schagen, S. B., Ahles, T. A., Wefel, J. S., Vardy, J. L., Pancre, V., Lange, M. & Castel, H.** (2015). Impact of Cancer and Its Treatments on Cognitive Function: Advances in Research From the Paris International Cognition and Cancer Task Force Symposium and Update Since 2012. *Journal of Pain and Symptom Management* **50**, 830-841.
- Kesler, S., Hadi Hosseini, S. M., Heckler, C., Janelins, M., Palesh, O., Mustian, K. & Morrow, G.** (2013a). Cognitive training for improving executive function in chemotherapy-treated breast cancer survivors. *Clinical Breast Cancer* **13**, 299-306.
- Kesler, S., Hadi Hosseini, S. M., Heckler, C., Janelins, M., Palesh, O., Mustian, K. & Morrow, G.** (2013b). Cognitive training for improving executive function in chemotherapy-treated breast cancer survivors. *Clinical Breast Cancer* **13**, 299-306.
- King, S. & Green, H. J.** (2015). Psychological intervention for improving cognitive function in cancer survivors: a literature review and randomized controlled trial. *Front Oncol* **5**, 72.

- Kohli, S., Fisher, S. G., Tra, Y., Adams, M. J., Mapstone, M. E., Wesnes, K. A., Roscoe, J. A. & Morrow, G. R.** (2009). The effect of modafinil on cognitive function in breast cancer survivors. *Cancer* **115**, 2605-2616.
- Krolak, D., Collins, B., Weiss, L., Harris, C. & Van der Jagt, R.** (2017). Cognitive function and its relationship to other psychosocial factors in lymphoma survivors. *Supportive Care in Cancer* **25**, 905-913.
- Lange, M., Laviec, H., Castel, H., Heutte, N., Leconte, A., Leger, I., Giffard, B., Capel, A., Dubois, M., Clarisse, B., Coquan, E., Di, F. F., Gouerant, S., Bartelemy, P., Pierard, L., Fizazi, K. & Joly, F.** (2017). Impact of new generation hormone-therapy on cognitive function in elderly patients treated for a metastatic prostate cancer: Cog-Pro trial protocol. *BMC. Cancer* **17**, 549.
- Lange, M., Rigal, O., Clarisse, B., Giffard, B., Sevin, E., Barillet, M., Eustache, F. & Joly, F.** (2014). Cognitive dysfunctions in elderly cancer patients: A new challenge for oncologists. *Cancer Treatment Reviews* **40**, 810-817.
- Le Gal, R., Bernaudin, M., Toutain, J. & Touzani, O.** (2017). Assessment of behavioural deficits following ischaemic stroke in the marmoset. *Behav. Brain Res.*
- Lee, G. D., Longo, D. L., Wang, Y., Rifkind, J. M., Abdul-Raman, L., Mamczarz, J. A., Duffy, K. B., Spangler, E. L., Taub, D. D., Mattson, M. P. & Ingram, D. K.** (2006). Transient improvement in cognitive function and synaptic plasticity in rats following cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res.* **12**, 198-205.
- Lim, Y. Y., Jaeger, J., Harrington, K., Ashwood, T., Ellis, K. A., Stoffler, A., Szoeki, C., Lachovitzki, R., Martins, R. N., Villemagne, V. L., Bush, A., Masters, C. L., Rowe, C. C., Ames, D., Darby, D. & Maruff, P.** (2013). Three-month stability of the CogState brief battery in healthy older adults, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease: results from the Australian Imaging, Biomarkers, and Lifestyle-rate of change substudy (AIBL-ROCS). *Arch Clin Neuropsychol.* **28**, 320-330.
- Lister, R. G.** (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* **92**, 180-185.
- Lowe, C. & Rabbitt, P.** (1998). Test/re-test reliability of the CANTAB and ISPOCD neuropsychological batteries: theoretical and practical issues. Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery. International Study of Post-Operative Cognitive Dysfunction. *Neuropsychologia* **36**, 915-923.
- Mackinnon, A.** (2005). Estimation of pre-morbid intelligence in Francophones. *L'Encéphale* **31**, 31-43.
- Marshall, J. W., Ridley, R. M., Baker, H. F., Hall, L. D., Carpenter, T. A. & Wood, N. I.** (2003). Serial MRI, functional recovery, and long-term infarct maturation in a non-human primate model of stroke. *Brain Res. Bull.* **61**, 577-585.
- Maruff, P., Thomas, E., Cysique, L., Brew, B., Collie, A., Snyder, P. & Pietrzak, R. H.** (2009). Validity of the CogState brief battery: relationship to standardized tests and sensitivity to cognitive impairment in mild traumatic brain injury, schizophrenia, and AIDS dementia complex. *Arch Clin Neuropsychol.* **24**, 165-178.
- McBride, S. J., Szoeki, C. E., Good, N. M., Ames, D., Martins, R. N., Masters, C. L., Maruff, P. T., Rowe, C. C., Savage, G. & Ellis, K. A.** (2011). A web-based normative data tool for assessing cognitive performance in healthy older Australians. *Med J Aust* **194**, S12-S14.
- Morris, R.** (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci. Methods* **11**, 47-60.

- Morris, R. G., Downes, J. J., Sahakian, B. J., Evenden, J. L., Heald, A. & Robbins, T. W.** (1988). Planning and spatial working memory in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* **51**, 757-766.
- Nasreddine, Z. S., Phillips, N. A., Bedirian, V., Charbonneau, S., Whitehead, V., Collin, I., Cummings, J. L. & Chertkow, H.** (2005). The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *Journal of the American Geriatrics Society* **53**, 695-699.
- O'Connell, H., Coen, R., Kidd, N., Warsi, M., Chin, A. V. & Lawlor, B. A.** (2004). Early detection of Alzheimer's disease (AD) using the CANTAB paired Associates Learning Test. *International Journal of Geriatric Psychiatry* **19**, 1207-1208.
- Park, J. H., Jung, Y. S., Kim, K. S. & Bae, S. H.** (2017). Effects of compensatory cognitive training intervention for breast cancer patients undergoing chemotherapy: a pilot study. *Support. Care Cancer* **25**, 1887-1896.
- Patel, S. K., Meier, A. M., Fernandez, N., Lo, T. T. Y., Moore, C. & Delgado, N.** (2017). Convergent and criterion validity of the CogState computerized brief battery cognitive assessment in women with and without breast cancer. *Clin Neuropsychol.* 1-12.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. & Briley, M.** (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci. Methods* **14**, 149-167.
- Phillips, K. A., Regan, M. M., Ribí, K., Francis, P. A., Puglisi, F., Bellet, M., Spazzapan, S., Karlsson, P., Budman, D. R., Zaman, K., Abdi, E. A., Domchek, S. M., Feng, Y., Price, K. N., Coates, A. S., Gelber, R. D., Maruff, P., Boyle, F., Forbes, J. F., Ahles, T., Fleming, G. F. & Bernhard, J.** (2016). Adjuvant ovarian function suppression and cognitive function in women with breast cancer. *British Journal of Cancer* **114**, 956-964.
- Phillips, K. A., Ribí, K., Sun, Z., Stephens, A., Thompson, A., Harvey, V., Thurlimann, B., Cardoso, F., Pagani, O., Coates, A. S., Goldhirsch, A., Price, K. N., Gelber, R. D. & Bernhard, J.** (2010). Cognitive function in postmenopausal women receiving adjuvant letrozole or tamoxifen for breast cancer in the BIG 1-98 randomized trial. *Breast* **19**, 388-395.
- Porsolt, R. D., Le, P. M. & Jalfre, M.** (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* **266**, 730-732.
- Reiriz, A. B., Reolon, G. K., Preissler, T., Rosado, J. O., Henriques, J. A., Roesler, R. & Schwartzmann, G.** (2006). Cancer chemotherapy and cognitive function in rodent models: memory impairment induced by cyclophosphamide in mice. *Clinical Cancer Research* **12**, 5000-5001.
- Rey, A.** (1959). [*Manual of copy and memory reproduction test of complexe geometric figures*]. Paris : Éditions Centre de psychologie appliquée.
- Rieu, D., Bachoud-Levi, A. C., Laurent, A., Jurion, E. & Dalla, B. G.** (2006). [French adaptation of the Hopkins Verbal Learning Test]. *Revue Neurologique* **162**, 721-728.
- Robbins, T. W., James, M., Owen, A. M., Sahakian, B. J., Lawrence, A. D., McInnes, L. & Rabbitt, P. M.** (1998). A study of performance on tests from the CANTAB battery sensitive to frontal lobe dysfunction in a large sample of normal volunteers: implications for theories of executive functioning and cognitive aging. Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery. *J Int Neuropsychol. Soc* **4**, 474-490.

- Roberts, A. C. & Wallis, J. D.** (2000). Inhibitory control and affective processing in the prefrontal cortex: neuropsychological studies in the common marmoset. *Cerebral Cortex (New York, N. Y. : 1991)* **10**, 252-262.
- Ruet, A., Deloire, M. S., Charre-Morin, J., Hamel, D. & Brochet, B.** (2013). A new computerised cognitive test for the detection of information processing speed impairment in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **19**, 1665-1672.
- Runowicz, C. D., Leach, C. R., Henry, N. L., Henry, K. S., Mackey, H. T., Cowens-Alvarado, R. L., Cannady, R. S., Pratt-Chapman, M. L., Edge, S. B., Jacobs, L. A., Hurria, A., Marks, L. B., LaMonte, S. J., Warner, E., Lyman, G. H. & Ganz, P. A.** (2016). American Cancer Society/American Society of Clinical Oncology Breast Cancer Survivorship Care Guideline. *J Clin Oncol* **34**, 611-635.
- Schuurs, A. & Green, H. J.** (2013). A feasibility study of group cognitive rehabilitation for cancer survivors: enhancing cognitive function and quality of life. *Psycho-Oncology* **22**, 1043-1049.
- Seigers, R. & Fardell, J. E.** (2011). Neurobiological basis of chemotherapy-induced cognitive impairment: a review of rodent research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **35**, 729-741.
- Smith, P. J., Need, A. C., Cirulli, E. T., Chiba-Falek, O. & Attix, D. K.** (2013). A comparison of the Cambridge Automated Neuropsychological Test Battery (CANTAB) with "traditional" neuropsychological testing instruments. *J Clin Exp Neuropsychol.* **35**, 319-328.
- Spinelli, S., Pennanen, L., Dettling, A. C., Feldon, J., Higgins, G. A. & Pryce, C. R.** (2004). Performance of the marmoset monkey on computerized tasks of attention and working memory. *Brain Res. Cogn Brain Res.* **19**, 123-137.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B. & Simon, P.** (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* **85**, 367-370.
- Taillia, H., Léger, I., Moroni, C., Boone, M., Belin, C., Maillet, D. & Lange, M.** (2015). [The battery of the GREC-ONCO (Reflection Group on Cognitive Evaluations in ONCOlogy)]. In *GREMOIRE 2. Tests and scales of neurological diseases with cognitive symptomatology*, (ed. L. Hugonot-Diener, C. Thomas-Antérion and F. Sellal), pp. 33-37. De Boeck/Solal: Paris.
- Van der Linden, M., Adam, S., Agniel, A., Antérion-Thomas, C., Baisset-Mouly, C., Coyette, F., Desgranges, B., Deweer, B., Ergis, A.-M., Gély-Nargeot, M.-C., Grimonprez, L., Juillerat, A.-C., Kalafat, M., Poitrenaud, J. & Sellal, F.** (2004). [Assessment of memory impairment]. Solal: Marseille.
- Vardy, J., Dhillon, H. M., Pond, G. R., Rourke, S. B., Xu, W., Dodd, A., Renton, C., Park, A., Bekele, T., Ringash, J., Zhang, H., Burkes, R., Clarke, S. J. & Tannock, I. F.** (2014). Cognitive function and fatigue after diagnosis of colorectal cancer. *Annals of Oncology* **25**, 2404-2412.
- Vardy, J. L., Dhillon, H. M., Pond, G. R., Rourke, S. B., Bekele, T., Renton, C., Dodd, A., Zhang, H., Beale, P., Clarke, S. & Tannock, I. F.** (2015). Cognitive Function in Patients With Colorectal Cancer Who Do and Do Not Receive Chemotherapy: A Prospective, Longitudinal, Controlled Study. *J Clin Oncol* **33**, 4085-4092.
- Von Ah, D., Carpenter, J. S., Saykin, A., Monahan, P., Wu, J., Yu, M., Rebok, G., Ball, K., Schneider, B., Weaver, M., Tallman, E. & Unverzagt, F.** (2012). Advanced cognitive training for breast cancer survivors: a randomized controlled trial. *Breast Cancer Research and Treatment* **135**, 799-809.

- Von, A. D., Carpenter, J. S., Saykin, A., Monahan, P., Wu, J., Yu, M., Rebok, G., Ball, K., Schneider, B., Weaver, M., Tallman, E. & Unverzagt, F.** (2012). Advanced cognitive training for breast cancer survivors: a randomized controlled trial. *Breast Cancer Res Treat* **135**, 799-809.
- Wechsler, D.** (2008). *Administration and scoring manual for the Wechsler Adult Intelligence. 4th ed. (WAIS-IV)*. Pearson: San Antonio.
- Wechsler, D.** (2009). *Administration and scoring manual for the Wechsler Memory Scale. 4th ed.* Pearson: San Antonio.
- Wefel, J. S., Vardy, J., Ahles, T. & Schagen, S. B.** (2011). International Cognition and Cancer Task Force recommendations to harmonise studies of cognitive function in patients with cancer. *The Lancet. Oncology* **12**, 703-708.
- Wesnes, K. A., Brooker, H., Ballard, C., McCambridge, L., Stenton, R. & Corbett, A.** (2017). Utility, reliability, sensitivity and validity of an online test system designed to monitor changes in cognitive function in clinical trials. *International Journal of Geriatric Psychiatry* .
- Wesnes, K. A., McNamara, C. & Annas, P.** (2016). Norms for healthy adults aged 18-87 years for the Cognitive Drug Research System: An automated set of tests of attention, information processing and memory for use in clinical trials. *J Psychopharmacol.* **30**, 263-272.
- Wilkinson, G. S. & Robertson, G.** (2006). *WRAT4: Wide Range Achievement Test professional manual (4th ed.)*. Pearson.
- Winocur, G., Johnston, I. & Castel, H.** (2018). Chemotherapy and cognition: International cognition and cancer task force recommendations for harmonising preclinical research. *Cancer Treatment Reviews* **69**, 72-83.
- Winocur, G., Wojtowicz, J. M., Huang, J. & Tannock, I. F.** (2014). Physical exercise prevents suppression of hippocampal neurogenesis and reduces cognitive impairment in chemotherapy-treated rats. *Psychopharmacology* **231**, 2311-2320.

Annexe 4 : Curriculum Vitae

Rozenn LE GAL

01/12/1992



EXPÉRIENCES PROFESSIONNELLES

2016 – 2019

Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé - en collaboration avec OTR3 S.A.S

Équipe CERVOxy ISTCT UMR 6030, CNRS, Université de Normandie

Projet : Développement d'une thérapie moléculaire pour l'AVC ischémique. Étude préclinique chez le rat et le marmouset commun.

Objectifs :

- Évaluation de la neuroprotection et de la récupération fonctionnelle après un AVC ischémique chez le rat atteint ou non d'hypertension artérielle, en combinaison ou non avec des cellules souches mésenchymateuses.
- Évaluation de la neuroprotection et de la récupération fonctionnelle après un AVC ischémique chez le marmouset.
- Mise en place de tests cognitifs chez le marmouset permettant d'évaluer des déficits liés à une ischémie cérébrale.

Janvier – Juin 2016 **Assistant de recherche**

Équipe Psychiatrie Neurofonctionnelle, Imagerie et Cerveau U1253, Inserm Université de Tours

Projet : Étude chez la souris du potentiel thérapeutique des antidépresseurs et des anti-inflammatoires dans le traitement de la neuroinflammation et de l'amyloïdogénèse de la maladie d'Alzheimer

Objectifs :

- Semi-quantification *ex vivo* des marqueurs de la neuroinflammation dans différentes régions cérébrales chez des souris traités aux anti-dépresseurs ou aux anti-inflammatoires

- Quantification *ex vivo* des plaques amyloïdes chez des souris traités aux anti-dépresseurs ou aux anti-inflammatoires

Mars – Juillet 2015 **Assistant de recherche**

Laboratoire de Neurosciences Intégratives et Cliniques EA 481, Université de Franche-Comté

Projet : Influence de la modalité sensorielle sur la régulation émotionnelle : comparaison en IRMf de stimulations visuelles et olfactives. Étude chez l'Homme.

Objectifs :

- Acquisition et analyse de signaux IRMf pour caractériser les aires cérébrales impliquées dans la régulation émotionnelle
- Identification des zones cérébrales activées lors de la tâche de réinterprétation émotionnelle
- Comparaison des aires cérébrales recrutées en fonction des différentes modalités sensorielles (visuelle ou olfactive)

FORMATIONS UNIVERSITAIRES

2016-2019 **Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé**

Université de Caen – Normandie

2015-2016 **Master Cognition, Neurosciences et Psychologie**

Université de Tours

2014-2015 **Master Comportement Animal et Humain**

Université de Rennes 1

2011-2014 **Licence Biologie Cellulaire, Génétique, Microbiologie et Physiologie**

Université de Rennes 1

FORMATIONS DOCTORALES

- Expérimentation animale appliquée à la recherche biomédicale – Niveau 1
- Intégrité scientifique
- Anesthésie et analgésie

COMPÉTENCES DÉTAILLÉES

In vivo : Modèle animal et humain

➤ **MANIPULATIONS ANIMALES ET ANALYSES COMPORTEMENTALES**

Souches animales utilisées :

- Souris transgéniques APP^{swe}/PS1^{de9}
- Souris Wild Type (C57J, BALB/c)
- Rats Sprague Dawley
- Rats SHR (Spontaneously Hypertensive Rats)
- Rats Wistar Kyoto
- Marmouset Commun (*Callithrix jacchus*)

Techniques :

- Anesthésie par inhalation d'isoflurane
- Administration de traitement par injection : voie intrapéritonéale, intramusculaire, sous-cutanée
- Méthodes de mise à mort : surdose d'anesthésique (pentobarbital, isoflurane), inhalation de CO₂

Tests comportementaux :

Chez le rongeur :

- Mesure de la **Résignation** : Test de suspension par la queue
- Mesure de l'**Anxiété** : Labyrinthe en croix surélevé, Boîte claire-obscur
- Mesure de l'**Exploration** : Open Field, Planche à trous
- Mesure de la **Mémoire** : Labyrinthe en Y
- Mesure des **Comportements sociaux** : Nouveauté sociale
- Mesure de la **Motricité** : Rotarod
- Mesure de l'**Anhédonie** : Cookie test, Splash test
- Mesure de la **Latéralisation** : Corner test, Test du cylindre
- Mesure de l'**Extinction tactile** : Test de l'adhésif
- Mesure de la **Fatigue musculaire** : Test de la planche inclinée

Chez le marmouset :

- Mesure de **Déficits sensori-moteurs** : Score neurologique, Test de l'escalier
- Mesure de **Déficits sensitifs** : Test de stimulation tactile
- Mesure de la **Mémoire de travail** : Delayed Matching to Position
- Mesure des **Fonctions exécutives** : Test du contournement d'objet
- Mesure de l'**Héminégligence** : Six tubes choice test

- Mesure de l'**Extinction tactile** : Test de l'adhésif
- Initiation au **Monkey CANTAB** (Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery)

Échelles psychométriques chez l'Homme :

- Mesure du **seuil olfactif** et des capacités d'identification d'odeurs: Test des Sniffin' Sticks
- Mesure de l'**Anxiété** : échelle STAI-Y (State-Trait Anxiety Inventory) A et B (État et Trait)
- Mesure de l'**Alexithymie** : échelle TAS-20 (Toronto Alexithymia Scale)
- Mesure du niveau de **Dépression** : échelle de Beck (BDI-II : Beck Depression Inventory)
- Mesure de préférence de **Régulation émotionnelle** spontanée : questionnaire ERQ (Emotion Regulation Questionnaire)
- Mesure du **ressenti subjectif** de la régulation émotionnelle : échelle du SAM (Self Assessment Manikin)

➤ **IMAGERIE CEREBRALE**

Imageurs :

- Imageur petit animal 7-Tesla (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) (rat et marmouset)
- Imageur 3-Tesla (GE Healthcare Signa, Milwaukee, États-Unis) (Homme)

Séquences utilisées :

- Diffusion Tensor Imaging (marmouset)
- Angiographie (TOF 2D FLASH) (marmouset)
- Séquence anatomique T2 (rat et marmouset)
- T2* (marmouset)
- IRMf (Homme)
-

Ex vivo : Analyse du tissu cérébral

Fixation des tissus et prélèvements :

- Perfusion intra-cardiaque pour fixation des tissus au paraformaldehyde
- Prélèvement de cerveaux
- Prélèvement sanguin intra-cardiaque

Biochimie/Western Blot :

- Semi-quantification du peptide β -amyloïde et de la microglie dans ses différents états d'activation :
 - Microglie active et quiescente (marqueur Iba1)
 - État d'activation M1 pro-inflammatoire (marqueur CD-68)
 - État d'activation M2 anti-inflammatoire (marqueur CD-206)

Microscope à épifluorescence avec ApoTome et Immunofluorescence:

- Étude des plaques amyloïdes (marquage des peptides β -amyloïde)
- Étude de la neuroinflammation (marquage des cellules microgliales avec Iba1)
- Étude la la neurogenèse (marquer DCX doublecortine)
- Étude l'activité neuronale (marqueur *c-Fos*)

In silico : Logiciels scientifiques

✓ **Image J | Analyse et traitement des acquisitions en microscopie et en IRM:**

Colocalisation de triple marquage, prise de cliché en profondeur dans l'axe-z, amélioration du contraste et de la visibilité, comptage et calculs volumétriques des cellules marquées.

Compilation des images IRM, seuillage et création de masques, extraction d'images, calculs volumétriques et d'intensité de gris de régions d'intérêts.

✓ **Ethovision™ | Enregistrement, localisation et analyse des comportements animaux (Noldus)**

Conception de modèles d'expérimentations, de localisation et d'analyse pour mesurer des comportements d'intérêt (latence, freezing, activité....)

✓ **R, Statistica | Logiciels de traitements statistiques**

Vérification des paramètres de normalité des données, tests paramétriques et non-paramétriques, corrections post-hoc, corrélations...

✓ **BrainVoyager QX 2.8.4™, SPM™ | Traitement et analyse des données IRMf**

Traitement des images cérébrales (lissage, corrections de mouvements...), adaptation des données anatomiques et fonctionnelles aux coordonnées Talairach, *pre-processing*, analyses statistiques (t-map, contrastes, anova)

✓ **Talairach Client**

Identification des régions cérébrales à partir de leurs coordonnées Talairach

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications

- *Revue en premier auteur publiée en Juillet 2017 dans Behavioural Brain Research :*

Assessment of behavioural deficits following ischaemic stroke in the marmoset

Rozenn Le Gal^a, Myriam Bernaudin^a, Jérôme Toutain^a, Omar Touzani^{a,*}

^aNormandie-Univ, UNICAEN, CEA, CNRS, ISTCT/CERVOxy group, Caen, France.

*Corresponding author: Omar Touzani, ISTCT, CYCERON, Bd Becquerel, BP5229, F-14074 CAEN, France.
Phone: 33-2-31-47-02-73; fax: 33-2-31-47-02-22. E-mail: touzani@cyceron

- *Article en co-auteur soumis à Acta Biomaterialia :*

Combining a heparan sulfate mimetic with mesenchymal stem cells enhances neuroprotection and functional recovery following ischemic stroke

Yacine KHELIF¹, **Rozenn LE GAL¹**, Charlène RENOULT¹, Jérôme TOUTAIN¹, Marie-Sophie QUITTET¹, Carole BRUNAUD¹, Laurent CHAZAVIEL¹, Didier DIVOUX¹, Xavier LAFFRAY², Nina HENRY³, Franck CHIAPPINI³, Jérôme LEVALLET¹, Dulcé PAPY-GARCIA², Denis BARRITAU^{2,3}, Omar TOUZANI^{1*}, Myriam BERNAUDIN^{1*}

¹ Normandie Université, UNICAEN, CNRS, CEA, ISTCT/CERVOxy group, GIP CYCERON, 14000 Caen, France

² CRRET (EA 4397/ERL CNRS 9215), Université Paris-Est, Université Paris Est Créteil, 94010 Créteil, France.

³ Société OTR3, 4 rue Française, 75001 PARIS, France.

*Authors contributed equally to this work

Corresponding author: bernaudin@cyceron.fr

- *Revue en co-auteur pour soumission à Journal of Cerebral Blood Flow :*

Interest of combining extracellular matrix and mesenchymal stem cells-based therapies for ischemic stroke: a focus on heparan sulfate proteoglycans

Yacine KHELIF¹, **Rozenn LE GAL¹**, Jérôme LEVALLET¹, Charlène RENOULT¹, Denis BARRITAU², Omar TOUZANI^{1#}, Myriam BERNAUDIN^{1#}

¹ Normandie Univ, UNICAEN, CNRS, CEA, ISTCT/CERVOxy group, GIP CYCERON, 14000 Caen, France

² Société OTR3, 4 rue Française, 75001 PARIS, France.

Authors contributed equally to the work

Corresponding author: bernaudin@cyceron.fr

- Revue en co-auteur publiée en Septembre 2019 dans *Biobehavioural Review* :

How to assess and manage cognitive impairment induced by treatments of non-central nervous system cancer

Marie Lange^{1,2,3}, Hélène Castel^{3,4}, Johan Le Fel⁵, Laure Tron^{3,6}, Didier Maillat^{7,8}, Myriam Bernaudin⁹, Omar Touzani⁹, Joy Perrier¹⁰, Mathieu Boone¹¹, Idir Licaj^{2,3}, Bénédicte Giffard^{3,10}, Martine Dubois⁴, Olivier Rigal^{5,12}, Thomas Durand¹³, Catherine Belin⁷, Damien Ricard¹³, **Rozenn Le Gal**⁹, Véronique Pancré¹⁴, Isabelle Hardy-Léger¹⁵, Florence Joly*^{1,2,3,16}

¹Clinical Research Department, Centre François Baclesse, 14000 Caen, France

²INSERM, U1086, ANTICIPE, 14000 Caen, France

³Cancer & Cognition Platform, Ligue Contre le Cancer, 14000 Caen, France

⁴Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, DC2N, 76000 Rouen, France, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France

⁵Care Support Department, Centre Henri-Becquerel, 76000 Rouen, France

⁶University Hospital of Caen, 1400 Caen, France

⁷Neurology Department, Hôpital Saint Louis, 75000 Paris, France

⁸Laboratoire PSITEC, EA 4072, UFR de Psychologie, Université de Lille, 59000 Villeneuve d'Ascq, France

⁹Normandie Université, UNICAEN, CEA, CNRS, ISTCT/CERVOxy Group, GIP Cyceron, 14000 Caen, France

¹⁰Normandie Univ, UNICAEN, PSL Research University, EPHE, INSERM, U1077, CHU de Caen, Neuropsychologie et Imagerie de la Mémoire Humaine, 14000 Caen, France

¹¹Medical Oncology Department, University Hospital, 80000 Amiens, France

¹²Medical Oncology Department, Centre Henri-Becquerel, 76000 Rouen, France

¹³UMR MD4 8257 CNRS, University of Paris Descartes, SSA, 75006 Paris, France

¹⁴Cancéropôle Nord-Ouest, 59000 Lille, France

¹⁵NeuroHIV Rehabilitation Unit, CHU de Bicêtre, APHP, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France

¹⁶Medical Oncology Department, CHU de Caen, 14000 Caen, France

*Corresponding author: Pr Florence Joly, Clinical Research Department, Centre François Baclesse, 3 avenue du Général Harris, F-14076 Caen Cedex 05, Phone: +33 231 45 53 97, Fax: +33 231 45 50 97, E-mail: f.joly@baclesse.unicancer.fr

Vulgarisation scientifique

- Fête de la science, Caen, octobre 2016
- Fête de la science, Caen, octobre 2017
- Fête de la science, Caen, octobre 2018
- Festival de l'excellence normande (FENO), avril 2019

Congrès et rassemblements scientifiques

- Journées de l'école doctorale – Le Havre, mars 2017
- Journées de l'école doctorale – Caen, mars 2019
- 4th INT international conference : "The Marmoset in Neurosciences " –
Marseille, mars 2018
- École thématique TRANSMEM : Cerveau et mémoire, concepts et approches
transdisciplinaires – Porquerolles, avril 2017

Communication affichée :

- Présentation de poster aux journées de l'école doctorale 2019 :
The common marmoset as a relevant model for ischemic stroke studies
Rozenn Le Gal, Jérôme Toutain, Myriam Bernaudin, Omar Touzani
⇒ **Premier prix du public**

L'AVC ischémique est un problème de santé publique majeur, représentant la première cause d'handicap acquis chez l'adulte ainsi que la deuxième cause de mortalité dans le monde. A ce jour, les seuls traitements disponibles sont la thrombolyse et la thrombectomie, mais appliqués à une minorité de patients. En dépit de nombreuses études réalisées chez l'animal et chez l'Homme, la recherche de nouvelles thérapies neuroprotectrices et neurorégénératrices pour l'AVC accumule les échecs. Pour augmenter les chances de translation, des comités d'experts incitent la recherche préclinique à intégrer des facteurs de risques de l'AVC aux études. Ils encouragent également l'utilisation de primates non-humains afin de valider les résultats obtenus au préalable chez le rongeur avant toute tentative de translation chez l'Homme.

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés aux effets thérapeutiques du RGTA (ReGeneraTing Agent) chez divers modèles animaux : le rat normo- et hypertendu, ainsi que chez le marmouset commun.

Les résultats obtenus indiquent que le RGTA permet de protéger le tissu cérébral à la suite d'une ischémie chez le rat normotendu. De plus, lorsque ce traitement est combiné à une thérapie cellulaire à base de cellules souches mésenchymateuses, il offre également une neuroprotection et une amélioration de la récupération fonctionnelle chez le rat atteint d'hypertension artérielle. Toutefois, la dose du RGTA testée chez le marmouset ne nous a pas permis de valider son efficacité après ischémie cérébrale chez cette espèce. Des études supplémentaires avec de nouveaux paramètres sont donc nécessaires.

Cerebral ischemic stroke is a devastating neurovascular disease worldwide. It is the leading cause of adult disability and the second cause of mortality in the world, making this pathology a public health priority. Nowadays, only thrombolysis and thrombectomy therapies are available to reduce ischemic outcome. However, they are applied to a minority of patients. So far, many therapeutic approaches to ameliorate ischemic stroke have been promising in animal studies but failed when transferred to the clinical situation. In order to improve successful translation from bench to bed, comity experts encourage the integration of comorbidity factors, such as arterial hypertension, in preclinical studies, as well as the use of higher order species such as non-human primates.

Here, we have evaluated the therapeutic effects of a matrix-based therapy, RGTA (ReGeneraTing Agent) on several animal models: normo- and hypertensive rats, together with common marmoset.

The results demonstrate that RGTA protects brain tissue in normotensive rats following ischemic stroke. Moreover, when this treatment is combined with a cellular therapy based on mesenchymal stem cells, it confers a neuroprotection accompanied with a better functional recovery in rats with arterial hypertension. However, the therapeutic potential of RGTA, at the dose tested, was not successfully validated in common marmoset. Thus, further investigations with new parameters are required.

MOTS CLEFS : Ischémie cérébrale, RGTA, Matrice extracellulaire, Marmouset, Cellules souches mésenchymateuses, Neuroprotection, Récupération fonctionnelle, Hypertension artérielle, Cognition

ADRESSE DU LABORATOIRE : ISTCT UMR 6030, équipe CERVOxy
GIP CYCERON
Boulevard Henri Becquerel, BP 5229
14074 Caen Cedex 5