



HAL
open science

Ischémie-reperfusion cérébrale : rôle de l'inflammation

Laura Mechtouff-Cimarelli

► **To cite this version:**

Laura Mechtouff-Cimarelli. Ischémie-reperfusion cérébrale : rôle de l'inflammation. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1290 . tel-03799573

HAL Id: tel-03799573

<https://theses.hal.science/tel-03799573>

Submitted on 6 Oct 2022

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.



N°d'ordre

Année 2020

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale N° 205

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie, biologie, santé

Soutenue publiquement le 1 décembre 2020

par

Laura Mechtouff

Ischémie-reperfusion cérébrale : rôle de l'inflammation

Jury

Pr Nathalie Kubis
Pr Mikael Mazighi

Rapporteur
Rapporteur

Pr Denis Angoulvant
Pr Jean-Claude Baron
Pr Sandra Vukusic

Examineur
Examineur
Examinatrice

Pr Emmanuelle Canet-Soulas
Pr Tae-Hee Cho

Co-directrice de thèse, examinateur
Co-directeur de thèse, examinateur

Dr Thomas Bochaton

Co-directeur de thèse, membre invité

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

REMERCIEMENTS

Aux rapporteurs de ce travail,

Madame le Professeur Nathalie Kubis, nous sommes très honorés de vous compter parmi nos juges et de soumettre ce travail ciblé sur la neuroinflammation post-ischémique à votre analyse. Avec nos sentiments les plus respectueux.

Monsieur le Professeur Mikael Mazighi, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail où l'évaluation de la thrombectomie mécanique est associée à l'étude de la réponse inflammatoire. Soyez assuré de notre respectueuse considération.

Aux examinateurs de ce travail,

Monsieur le Professeur Denis Angoulvant, nous sommes honorés de vous compter parmi les membres de notre jury quand on sait les liens de la cardiologie et de la neurologie vasculaire. Avec toute ma considération.

Monsieur le Professeur Jean-Claude Baron, vous avez de tous temps suivi les travaux de notre équipe. Votre expertise majeure dans le domaine neurovasculaire nous est précieuse. Votre présence nous oblige.

Madame le Professeur Sandra Vukusic, je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse de sciences. Cette thèse sur la neuroinflammation post-ischémique témoigne de notre proximité thématique.

A Madame le Professeur Emmanuelle Canet-Soulas, merci d'avoir accepté de diriger ce travail au sein de CarMeN. Je suis heureuse de poursuivre nos projets de recherche dans le cadre du projet européen STATEMENT.

A Monsieur le Professeur Tae-Hee Cho, son encadrement et son expertise en imagerie cérébrale ont largement contribué à l'aboutissement de ce travail.

A Monsieur le Docteur Thomas Bochaton, merci de m'avoir encadrée au sein de CarMeN et formée à l'exploration des marqueurs de l'inflammation.

J'adresse un remerciement particulier aux Professeurs Michel Ovize et Norbert Nighoghossian qui ont permis l'obtention et le développement du RHU MARVELOUS.

Je remercie sincèrement au sein de l'équipe 5 de CarMeN Alexandre Paccalet et Claire Crola Da Silva de m'avoir accueillie dans le laboratoire.

Un grand merci à l'équipe du CIC et en particulier à Marielle Buisson et Camille Amaz, pour leurs grandes qualités professionnelles, leur rigueur et leur disponibilité.

A mes collègues de l'Unité Neurovasculaire, Laurent Derex, Elodie Ong, Julia Fontaine, Lucie Rasle et Cécile Plumereau et aux équipes de neuroradiologie diagnostique et interventionnelle des Professeurs Yves Berthézène et Omer Eker. C'est un plaisir de travailler avec eux. Ce travail n'aurait pu être possible sans la contribution de chacun.

A Diane, mon amie de toujours, à mes amis lyonnais ou presque, Alexandra, Karen, Nathalie...

A mon Père, à ma Tante, à toute ma famille.

A mon époux Sébastien, et mes enfants Matthieu et Victor, pour leur soutien et leur patience tout au long de ce travail.

RESUME

La thrombolyse intraveineuse et, plus récemment la thrombectomie mécanique, ont bouleversé la prise en charge de l'infarctus cérébral. L'objectif de ces thérapeutiques est de restaurer la perfusion cérébrale et de préserver la pénombre ischémique et ainsi de réduire le handicap. Cependant en dépit d'une recanalisation artérielle précoce, l'évolution clinique demeure péjorative chez certains patients en partie en raison des lésions d'ischémie-reperfusion favorisées par la neuro-inflammation. A ce jour la dynamique de la réponse inflammatoire reste peu documentée, en particulier dans le cadre de la thrombectomie mécanique. Une meilleure connaissance de ce phénomène autoriserait une approche plus ciblée de la neuroprotection. Notre travail de thèse se propose d'étudier la relation entre les marqueurs sériques de l'inflammation et les facteurs clefs du pronostic clinique, c'est là, une approche inédite dans le contexte de la thrombectomie mécanique.

Dans cette perspective, nous avons couplé au sein de la cohorte HIBISCUS-STROKE (CoHort of Patients to Identify Biological and Imaging markerS of CardiovascUlar Outcomes in Stroke) l'analyse dynamique des marqueurs sériques de l'inflammation à l'évaluation séquentielle des lésions ischémiques en imagerie par résonance magnétique. Dans la première partie de ce travail nous nous sommes interrogés sur la relation entre la réponse inflammatoire et la qualité de la circulation collatérale, cette dernière étant impliquée dans la rapidité de progression des lésions et la réponse à la thrombectomie mécanique. Une circulation collatérale de bonne qualité était associée à des taux faibles de métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9) et à des taux élevés de Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) à l'admission. Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons évalué la relation entre la MMP-9, une enzyme protéolytique impliquée dans la dégradation de la barrière hémato-encéphalique, et la croissance des lésions et le risque de transformation hémorragique. Nous avons observé que le taux de MMP-9 était maximal à 6 heures et que celui-ci était associé à la croissance des lésions et à un risque accru de transformation hémorragique, le plus souvent mineure. Dans la troisième partie de notre travail, nous avons précisé la relation entre l'inflammation et la reperfusion dite « futile », c'est-à-dire sans bénéfice clinique, constatée chez la moitié des patients. Nous avons révélé que le taux d'interleukine 6 (IL-6), maximal 24 heures après l'admission, était un facteur prédictif de reperfusion dite « futile ».

La cohorte HIBISCUS-STROKE nous a donc permis d'identifier les marqueurs sériques de l'inflammation associés aux facteurs clefs du pronostic clinique dans le cadre de la thrombectomie mécanique. Cette approche est susceptible de générer de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Mots-clés : Infarctus cérébral ; Thrombectomie mécanique ; IRM ; Lésions d'ischémie-reperfusion ; inflammation ; métalloprotéase matricielle-9 ; Monocyte Chemoattractant Protein-1 ; Interleukine-6

ABSTRACT

Intravenous thrombolysis and, more recently, mechanical thrombectomy have improved acute ischemic stroke management in improving restoration of brain perfusion and the preservation of the ischemic penumbra and thus functional outcome. Despite early recanalization, a poor clinical outcome likely related to ischemia-reperfusion damages is frequently observed. Post-ischemic inflammatory response may contribute to these damages. To date, little is known about the kinetics of this process, especially in the setting of mechanical thrombectomy, whereas a better understanding of this phenomenon would allow a more targeted neuroprotective approach. Here, we proposed to assess the relationship between serum markers of inflammation and key prognostic factors, through an original approach focused on patients treated with mechanical thrombectomy.

For this, we did a sequential assessment of both serum markers of inflammation and ischemic damages on magnetic resonance imaging within the HIBISCUS-STROKE cohort (CoHort of Patients to Identify Biological and Imaging markerS of CardiovascUlar Outcomes in Stroke). In the first part of our work, we aimed to clarify the relationship between post-ischemic inflammation and collateral circulation status, as the latter impacts the timing of tissue loss and response to reperfusion therapies in acute ischemic stroke. We have established that low Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) and high Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) levels were associated with good pretreatment collateral status. In the second part of our work, we assessed the relationship between MMP-9, a proteolytic enzyme involved in the breakdown of the blood-brain barrier, and lesion growth and the risk of hemorrhagic transformation. We have identified that MMP-9 peaked at 6 hours and that this level predicted lesion growth and hemorrhagic transformation, mainly minor. In the third part, we aimed to investigate the relationship between post-ischemic inflammation and futile reperfusion, defined as poor functional outcome despite successful reperfusion occurring in half of the patients. We observed that interleukin 6 (IL-6) peaked at 24 hours and was a marker of futile reperfusion.

HIBISCUS-STROKE cohort gave us the opportunity to assess the relationship between serum markers of inflammation and key prognostic factors in the setting of mechanical thrombectomy. This original approach paves the way for new perspectives in terms of neuroprotection.

Keywords : Ischemic stroke ; Mechanical thrombectomy ; MRI ; ischemia-reperfusion damages ; inflammation ; Matrix Metalloproteinase-9 ; Monocyte Chemoattractant Protein-1 ; Interleukin-6

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	7
PREAMBULE.....	12
INTRODUCTION : ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES	13
CHAPITRE 1 – L’infarctus cérébral.....	13
1. Définition, épidémiologie	13
2. Facteurs de risque et principales étiologies.....	14
3. Physiopathologie de l’infarctus cérébral.....	15
A. La réduction du débit sanguin cérébral : « core » et pénombre ischémique	15
a) Seuils d’ischémie.....	15
b) Dynamique de la pénombre ischémique et rôle de la circulation collatérale	16
c) Identification moléculaire de la pénombre	17
B. Les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire	17
a) Déplétion en énergie, excitotoxicité et stress oxydatif	20
b) Dépolarisation péri-infarctus.....	21
c) Inflammation.....	22
d) Apoptose.....	22
C. Les stratégies thérapeutiques actuelles	23
a) La prise en charge en unité neurovasculaire	23
b) La thrombolyse intraveineuse	23
c) La thrombectomie mécanique.....	25
CHAPITRE 2 – L’inflammation post-ischémique.....	26
1. Dynamique spatio-temporelle	26
A. Siège de l’inflammation et concept de « pénombre inflammatoire »	26
B. Dynamique dans le temps	27
2. Mécanismes.....	28
A. La nécrose cellulaire et l’activation de la microglie	28
B. La synthèse de cytokines/chimiokines	29
C. Le rôle des métalloprotéases matricielles.....	30
D. L’activation de l’endothélium et le rôle des molécules d’adhésion.....	33
E. La rupture de la barrière hémato-encéphalique.....	33
F. Le recrutement leucocytaire	34
G. L’activation plaquettaire.....	35
H. L’activation du complément.....	36
I. Le phénomène de « no-reflow » et la thromboinflammation de la microcirculation	37

J.	L'immunodépression systémique et les infections	38
3.	Biomarqueurs de l'inflammation chez l'Homme	39
A.	La nécessité d'explorer l'inflammation chez l'Homme	39
B.	Marqueurs biologiques.....	39
a)	Généralités.....	39
b)	En l'absence de traitement ou dans le cadre de la thrombolyse intraveineuse	40
c)	Dans le cadre de la thrombectomie mécanique.....	43
C.	Imagerie.....	45
4.	La neuroprotection par les traitements immunomodulateurs	47
A.	Les limites de la recherche translationnelle	47
B.	Les principales molécules évaluées chez l'Homme.....	47
a)	Antagoniste du récepteur de l'interleukin-1	47
b)	La minocycline.....	48
c)	L'enlimomab	49
d)	Le fingolimod	50
e)	Le Natalizumab	51
f)	Le Hu23F2G et UK-279,276.....	52
C.	Les perspectives à l'ère de la thrombectomie mécanique.....	52
	PROBLEMATIQUE - OBJECTIFS	54
	METHODE.....	56
	RESULTATS.....	58
	Etude 1 : Association entre les taux de marqueurs inflammatoires sériques et la qualité de la circulation collatérale	59
	Etude 2 : Association entre le taux sérique de MMP-9 et le risque de transformation hémorragique et de croissance des lésions à l'ère de la thrombectomie mécanique.....	61
	Etude 3 : Association entre le taux sérique d'interleukine-6 et le caractère futile de la reperfusion	63
	DISCUSSION	65
	Etude 1.....	65
	Etude 2.....	68
	Etude 3.....	71
	Forces et limites de la cohorte HIBISCUS-STROKE.....	73

Synthèse.....	74
CONCLUSIONS et PERSPECTIVES	76
BIBLIOGRAPHIE.....	78

LISTE DES ABREVIATIONS

ADAMTS-13 : *a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif 13*

AMPA : *a-amino-3-hydroxy-5- méthyl-4-isoxazole propionate*

ATP : *adénosine triphosphate*

BBB : *blood-brain barrier*

CarMeN : *Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition*

CIC : *centre d'investigation Clinique*

CRP : *C-reactive protein*

DAMPS: *danger-associated molecular patterns*

DSC : *dynamic susceptibility contrast*

DWI : *diffusion-weighted imaging*

ECM : *extracellular matrix*

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

ESUS : *embolic source of unknown source*

FLAIR : *fluid attenuation inversion recovery*

HARM : *hyperintense acute reperfusion injury marker*

HIBISCUS-STROKE : *CoHort of Patients to Identify Biological and Imaging markerS of CardiovasCular Outcomes in Stroke*

HIF : *hypoxia-inducible factor*

HMGB1 : *high-mobility group box 1*

Hsp70 : *heat shock protein 70*

HTN: *hypertension*

ICAM-1: *InterCellular Adhesion Molecule-1*

ICP : *intracranial pressure*

IFN- γ : *interferon-gamma*

IL-6 : *interleukin-6*

IRF-1 : *interferon regulatory factor 1*

LFA-1 : *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*

MAC : *membrane attack complex*

MadCAM-1 : *mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1*

MAP: *mean arterial pressure*

MBL : *mannose-binding lectin*

MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein-1*

MMP : *matrix metalloproteinase*

MMP-9 : *matrix metalloproteinase-9*

mRS : *modified rankin scale*

NET : *neutrophil extracellular trap*
NF- κ B : *nuclear factor- κ B*
NK : *natural killer*
NMDA : *N-methyl-D- aspartate*
NO : *nitric oxide*
PBMC : *peripheral blood mononuclear cells*
PECAM-1 : *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*
TEP : *tomographie par émission de positons*
RBC : *red blood cell*
RHU : *recherche hospitalo-universitaire*
ROS : *reactive oxygen species*
rt-PA : *recombinant tissue plasminogen activator*
ST2: *suppression of tumorigenicity 2*
STAT3 : *signal transducer and activator of transcription 3*
TGF- β : *transforming growth factor- β*
TICI : *thrombolysis in cerebral infarction*
TIMP : *tissue inhibitor of metalloproteinase*
TLR : *toll-like receptor*
TNF- α : *tumor necrosis factor-alpha*
TNF-RI: *tumor necrosis factor receptor 1*
TOF : *time of flight*
tPA : *tissue plasminogen activator*
TSPO : *translocator protein*
uPA : *urokinase-type plasminogen activator*
USPIO : *ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide*
VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule-1*

PREAMBULE

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition (CarMeN), avec le soutien méthodologique du Centre d'Investigation Clinique (CIC) des Hospices Civils de Lyon.

Il s'inscrit dans le projet Recherche hospitalo-universitaire (RHU) MARVELOUS (ANR-16-RHUS-0009) de l'Université de Lyon financé dans le cadre du programme Investissements d'Avenir obtenu par les Professeurs Michel OVIZE et Norbert NIGHOGHOSSIAN.

La cohorte HIBISCUS-STROKE (CoHort of Patients to Identify Biological and Imaging markerS of CardiovascUlar Outcomes in Stroke) constituée de patients admis pour un infarctus cérébral en rapport avec une occlusion artérielle proximale traitée par thrombectomie mécanique s'inscrit dans ce projet de recherche. Les patients inclus ont fait l'objet d'une analyse dynamique de marqueurs biologiques de l'inflammation doublée d'une analyse séquentielle de l'imagerie. L'objectif est de déterminer la valeur pronostique des marqueurs biologiques et de l'imagerie et de mieux caractériser les mécanismes de la réponse inflammatoire post-ischémique.

INTRODUCTION : ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 1 – L'infarctus cérébral

1. Définition, épidémiologie

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont dans 85% des cas de nature ischémique (infarctus cérébral) et dans 15% des cas de nature hémorragique (hématome intracérébral et hémorragie sous-arachnoidienne) (Feigin *et al.*, 2019; Virani *et al.*, 2020). L'infarctus cérébral est défini comme une zone de nécrose attribuable à l'ischémie dont le diagnostic repose sur des signes cliniques de dysfonction cérébrale persistants plus de 24 heures et/ou la présence de signes d'ischémie sur l'imagerie cérébrale ou l'analyse anatomo-pathologique (Sacco *et al.*, 2013)

Les AVC sont un enjeu majeur de santé publique. L'étude Global Burden of Disease a recensé, en 2016, 13,7 millions de nouveaux cas d'AVC (cas incidents) et 80,1 millions de patients survivants à un AVC (cas prévalents) (Feigin *et al.*, 2019). Le risque cumulé d'AVC à partir de l'âge de 25 ans était estimé à 24,9% en 2016 (The GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators, 2018). La figure 1 illustre les disparités géographiques du risque cumulé d'AVC au cours de la vie à partir de l'âge de 25 ans. Les AVC constituent la deuxième cause de handicap acquis de l'adulte et de mortalité dans le Monde.

Bien que l'incidence, le taux d'années de vie perdues ajustées sur l'incapacité et le taux de mortalité standardisés sur l'âge aient diminué entre 1990 et 2016, le nombre de cas incidents a augmenté du fait de la croissance démographique et du vieillissement de la population (Feigin *et al.*, 2019).

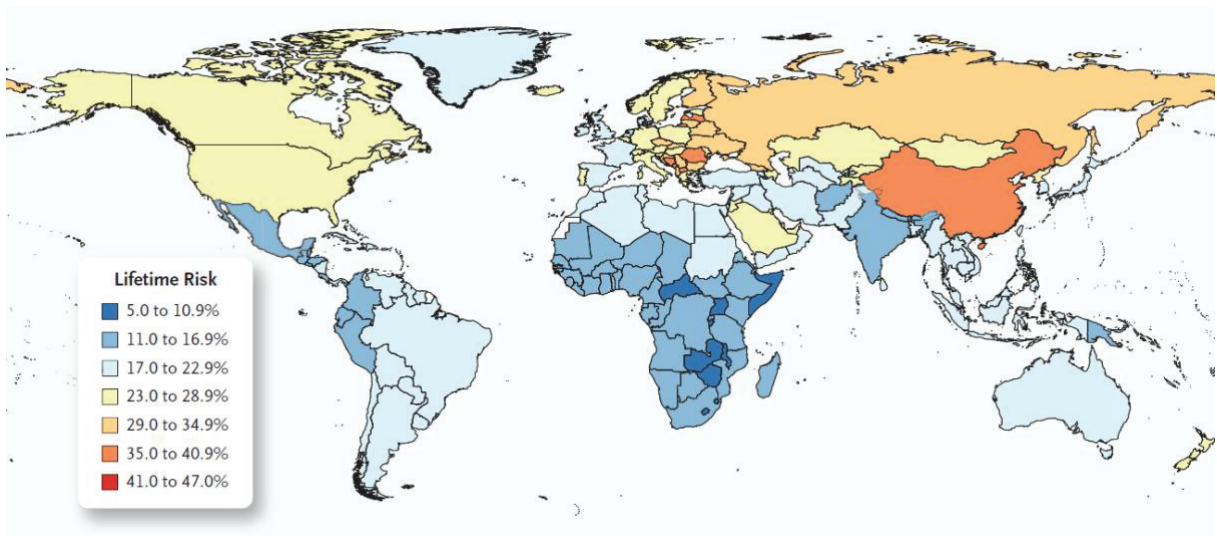


Figure 1 : Risque cumulé d'AVC au cours de la vie à partir de l'âge de 25 ans, 2016, à partir des données du Global Burden of Disease (The GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators, 2018)

2. Facteurs de risque et principales étiologies

Les trois principales causes d'infarctus cérébral sont l'athérosclérose des artères cervicales, intracrâniennes et de l'aorte, les embolies d'origine cardiaque et les maladies des petites artères cérébrales le plus souvent liés à l'hypertension artérielle, responsables des infarctus lacunaires (Adams *et al.*, 1993). D'autres causes plus rares peuvent être rencontrées telles que les dissections des artères cervicales ou intracrâniennes. Environ 25 à 30% des infarctus cérébraux sont de cause indéterminée, en dépit d'un bilan étiologique exhaustif (Ornello *et al.*, 2018). Parmi eux, on distingue les infarctus emboliques de source indéterminée (ESUS : Embolic source of unknown source) lorsque l'imagerie est en faveur d'un infarctus non lacunaire (infarctus cortical ou sous-cortical > 15 mm) (Hart *et al.*, 2014).

Environ 90% des cas d'infarctus cérébral sont attribuables à des facteurs de risque potentiellement modifiables, en particulier l'hypertension artérielle, la dyslipidémie et les

pathologies cardiaques incluant la fibrillation atriale (O'Donnell *et al.*, 2016; Feigin *et al.*, 2019).

3. Physiopathologie de l'infarctus cérébral

A. La réduction du débit sanguin cérébral : « core » et pénombre ischémique

a) *Seuils d'ischémie*

Les études expérimentales ont identifié trois compartiments tissulaires distincts dans les heures qui suivent une occlusion artérielle, en fonction de l'importance de la réduction du débit sanguin cérébral :

- la zone d'oligémie: où le débit sanguin cérébral est modérément diminué (20-50 ml/100g/min), et ne compromet pas l'intégrité fonctionnelle et structurelle cérébrale
- la pénombre ischémique: où la diminution du débit sanguin cérébral (10-20 ml/100g/min) affecte l'activité fonctionnelle cérébrale comme en témoigne l'abolition des réponses corticales évoquées, mais sans impact sur l'intégrité structurelle. Cette zone, viable, mais en état de sidération fonctionnelle, est susceptible d'être épargnée par le traitement de reperfusion. La préservation de la pénombre est un élément clé de la récupération neurologique.
- le « core » : où la réduction du débit sanguin cérébral (8-10 ml/100g/min) compromet l'intégrité structurelle avec une augmentation massive du potassium dans l'espace extracellulaire et une acidose correspondant à la mort cellulaire (Astrup *et al.*, 1977; Astrup, Siesjö and Symon, 1981).

b) Dynamique de la pénombre ischémique et rôle de la circulation collatérale

En cas d'occlusion artérielle persistante, la nécrose s'étend au sein de la pénombre ischémique au cours des premières heures, bien qu'une fraction de la pénombre persiste jusqu'à 24-48 heures chez certains patients (Baron, 1999; Darby *et al.*, 1999). La vitesse de « consommation » de la pénombre ischémique est extrêmement variable d'un patient à l'autre et dépend de différents facteurs au premier rang desquels figure la qualité de la circulation collatérale (figure 2) (Liebeskind, 2003; Campbell *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2013; Vagal *et al.*, 2018). La mise en jeu et le maintien de ces anastomoses, notamment leptoméningées, sont vraisemblablement sous la dépendance de l'âge, de facteurs génétiques, hémodynamiques et neuraux et de la configuration du polygone de Willis (van Raamt *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Menon *et al.*, 2013).

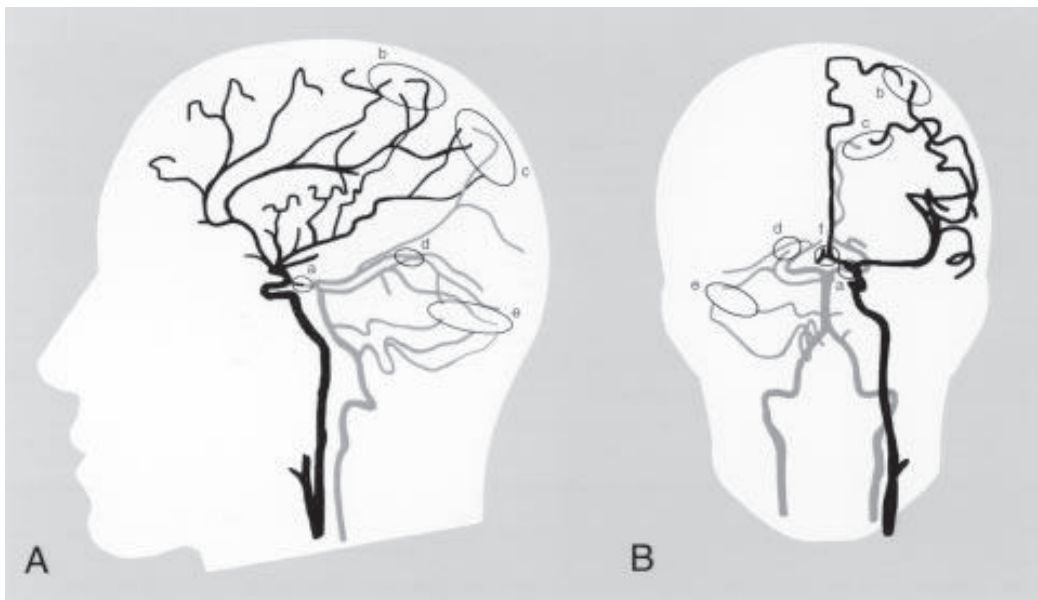


Figure 2 : Circulation collatérale intracrânienne; a: artère communicante postérieure; b: anastomoses leptoméningées entre les branches corticales de l'artère cérébrale moyenne et de l'artère cérébrale antérieure ; c : anastomoses leptoméningées entre l'artère cérébrale moyenne et l'artère cérébrale postérieure; d : plexus tectal entre l'artère cérébrale postérieure et l'artère cérébelleuse supérieure ; e : anastomoses entre les branches distales des artères cérébelleuses ; f : artère communicante antérieure (Liebeskind, 2003).

c) Identification moléculaire de la pénombre ischémique

La diminution voire l'arrêt de la synthèse protéique est l'une des réponses les plus précoces et les plus sensibles à l'ischémie, et peut être réversible dans la zone de pénombre ischémique échappant à l'infarctus. Ce phénomène survient lorsque le débit sanguin cérébral est réduit d'au moins 50% par rapport à la normale et ne dépend pas seulement de la déplétion en adénosine triphosphate (ATP) qui n'est observée qu'en cas d'abaissement du débit sanguin cérébral en dessous de 20% (Hossmann, 1994; Hata *et al.*, 2000) mais également de modifications géniques. La zone de pénombre se caractérise aussi par l'activation du gène de « stress » Hsp70 (heat shock protein 70) (Hata *et al.*, 2000; Sharp *et al.*, 2000). Des modifications de l'expression du facteur de transcription HIF (Hypoxia-Inducible Factor), impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes dans des conditions d'hypoxie, et de gènes à expression précoce immédiate, tels que c-fos et JunB ont également été rapportées. Ces dernières modifications, sans colocalisation stricte avec la pénombre ischémique définie par les critères hémodynamiques évoqués précédemment, ont conduit au concept de pénombres «moléculaires» (Sharp *et al.*, 2000). Chez l'Homme, les études se limitent à des corrélations entre le volume de la pénombre ischémique et des dosages réalisés dans le sang veineux périphérique. Dans une étude clinique pilote récente, réalisée sur un nombre limité de patients pris en charge pour un infarctus cérébral de moins de 12 heures, l'étude du transcriptome a révélé que le volume de la pénombre ischémique mesuré sur l'IRM était corrélé à l'expression de 34 gènes impliqués dans l'inflammation, la SUMOylation, et la coagulation; possiblement via l'inhibition des lipopolysaccharides (Nadareishvili *et al.*, 2019).

B. Les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire

Les dommages d'ischémie-reperfusion résultent d'une cascade d'évènements cellulaires et moléculaires déclenchés par l'interruption brutale du flux sanguin suivie d'une reperfusion, comme illustré dans la figure 3 (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999; Bai and Lyden, 2015). Les neurones sont plus vulnérables à l'ischémie que les cellules gliales et vasculaires. Au sein du « core », la réduction importante du débit sanguin cérébral est responsable des phénomènes d'excitotoxicité qui conduisent en quelques minutes à la nécrose cellulaire. En revanche, la zone de pénombre ischémique, et plus largement la région péri-infarctus, qui est moins sévèrement touchée, semble être le siège d'une cascade d'évènements, déclenchés par l'excitotoxicité, qui pourraient contribuer à l'extension secondaire des lésions.

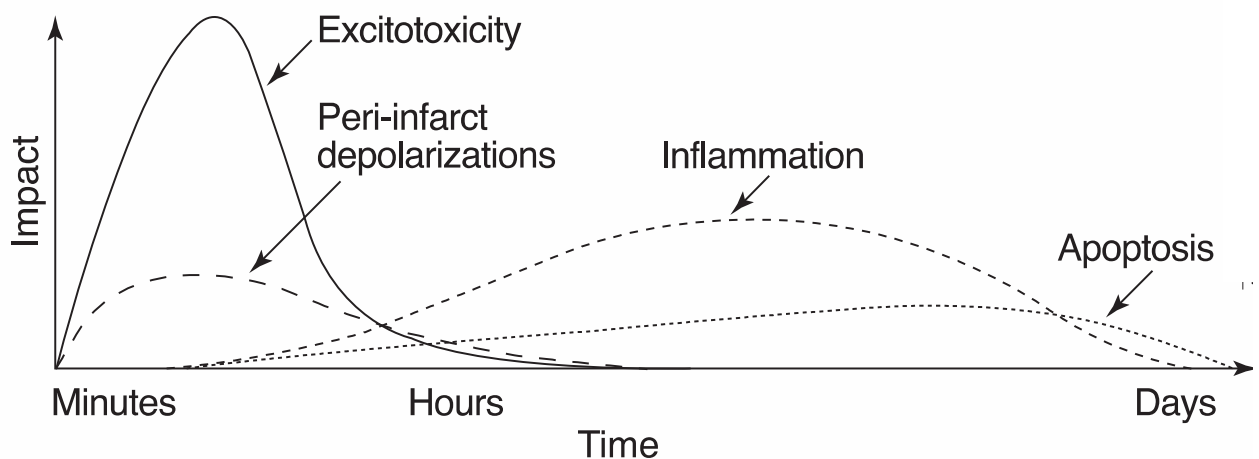


Figure 3: Cascade supposée d'évènements déclenchés par l'ischémie cérébrale (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999)

Ces phénomènes sont également illustrés au sein de l'unité neurovasculaire, qui est constituée des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses, des péricytes, des astrocytes, de la microglie et des neurones (figure 4) (del Zoppo, 2010; Bai and Lyden, 2015; Iadecola, 2017). Cette unité fonctionnelle reflète l'interconnexion entre le système vasculaire et le système nerveux.

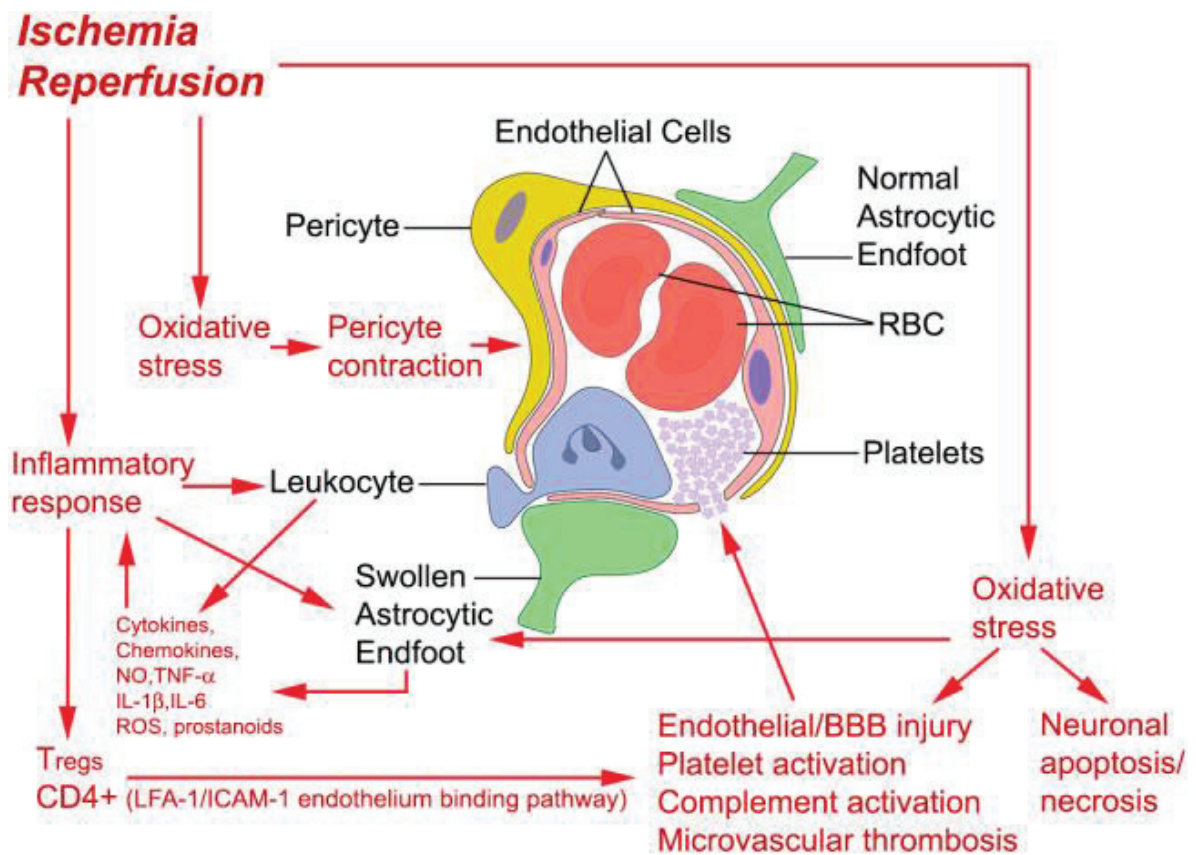


Figure 4: Unité neurovasculaire et mécanismes impliqués dans les lésions d'ischémie-reperfusion (Bai and Lyden, 2015) (RBC : red blood cell; NO : nitric oxide; TNF- α : tumor necrosis factor-alpha; IL : interleukin; ROS : reactive oxygen species; LFA-1 : Lymphocyte Function-Associated Antigen-1; ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1; BBB : blood-brain barrier)

a) Déplétion en énergie, excitotoxicité et stress oxydatif

Le tissu cérébral a une forte consommation en glucose et en oxygène et sa production d'énergie dépend presque exclusivement de la phosphorylation oxydative. Il est donc particulièrement sensible à l'ischémie résultant d'une occlusion artérielle, qui s'accompagne d'une privation en oxygène et en glucose, et ce d'autant plus qu'il ne dispose pas de réserve in situ de glucose ou de glycogène. Cette déplétion énergétique conduit à une défaillance des pompes ATP dépendantes telles que la Na^+ / K^+ adénosine triphosphatase (ATPase), de l'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ et de la Ca^{2+} ATPase au sein de la membrane plasmique. Le dysfonctionnement de ces pompes associé à l'ouverture des canaux voltage dépendants est responsable d'une augmentation de la concentration intra-cellulaire de calcium, de sodium et de chlore et de l'augmentation de la concentration extracellulaire de potassium. Le pH diminue également du fait de l'activité glycolytique anaérobie et de l'augmentation de l'acide lactique. La perte de l'homéostasie ionique concourt à une dépolarisation de la membrane et un œdème intra-cellulaire (Lee *et al.*, 2000).

La dépolarisation membranaire entraîne, par le biais de l'activation des canaux calciques voltage-dépendants, la libération de glutamate dans la fente synaptique. La recapture présynaptique du glutamate via le transporteur du glutamate est également diminuée. Ces deux phénomènes concourent à l'accumulation de glutamate dans l'espace extracellulaire. Ce neurotransmetteur exciteur se fixe sur 2 types de récepteurs pré et post-synaptiques: les récepteurs ionotropiques le N-méthyl-D- aspartate (NMDA), l'a-amino-3-hydroxy-5- méthyl-4-isoxazole propionate (AMPA) et le kainate et les récepteurs métabotropiques, couplés à une protéine G. L'activation de ceux-ci majorent à leur tour l'entrée de sodium et de calcium dans la cellule accentuant ainsi la dépolarisation membranaire et l'œdème cellulaire cytotoxique

(Scanziani *et al.*, 1997; Nicoletti *et al.*, 2011). L'influx massif de calcium active différents processus cataboliques médiés par différentes protéases, lipases, phosphatases et endonucléases qui vont entraîner la surproduction de radicaux libres, des dommages mitochondriaux et membranaires, et une fragmentation de l'ADN qui vont endommager la structure cellulaire et conduire à la mort cellulaire (Szydłowska and Tymianski, 2010; Lai, Zhang and Wang, 2014; Rama and García, 2016). L'activation de la phospholipase A2 et de la cyclo-oxygénase génère des espèces de radicaux libres (ROS : reactive oxygen species) qui dépassent les capacités antioxydantes endogènes et conduisent à la peroxydation des lipides et à l'oxydation des protéines.

b) Dépolarisation péri-infarctus

La dépolarisation des cellules est liée à la déplétion en énergie et l'accumulation du potassium et du glutamate dans l'espace extracellulaire. Alors que la dépolarisation anoxique des cellules au sein du « core » est irréversible, la dépolarisation des cellules au sein de la pénombre ischémique peut être compensée au prix d'une consommation énergétique importante. Ce phénomène de repolarisation peut être suivi d'une nouvelle dépolarisation. Ces épisodes de dépolarisation répétés au sein de la zone de pénombre ischémique ont été observés plusieurs fois par heure chez l'animal et sont associés à la croissance des lésions (Iijima, Mies and Hossmann, 1992; Mies, Iijima and Hossmann, 1993; Hossmann, 1996). Les rares données disponibles chez l'Homme, dans le cadre d'infarctus malins traités par craniectomie décompressive, semblent confirmer la présence de ce phénomène chez l'Homme (Dohmen *et al.*, 2008).

c) Inflammation

L'inflammation est générée localement en réponse à l'ischémie et se propage secondairement à l'ensemble de l'organisme par le biais des médiateurs inflammatoires (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999; Iadecola and Anrather, 2011; Bai and Lyden, 2015; De Meyer *et al.*, 2016). Cette réponse inflammatoire, mettant en jeu à la fois le système immunitaire inné et adaptatif, semble contribuer aux lésions à la phase aiguë alors qu'elle pourrait être bénéfique à une phase plus tardive en participant à la résolution de l'inflammation, à la clairance des débris, au remodelage et à la régénération tissulaire. L'immunodépression systémique secondaire est considérée comme un mécanisme adaptatif destiné à minimiser l'inflammation cérébrale. Les mécanismes mis en jeu dans l'inflammation post-ischémique sont détaillés dans le chapitre 2.

d) La mort neuronale sélective

Les cellules endommagées par l'activation excessive des récepteur glutamate, l'excès de calcium intra-cellulaire, les radicaux libres oxygénés ou les lésions de la mitochondrie ou de l'ADN peuvent mourir par nécrose ou apoptose (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999). Alors que la nécrose survient essentiellement au sein du « core », les phénomènes de mort cellulaire programmée (apoptose, nécroptose, ferroptose...) prédominent au sein de la pénombre ischémique non-infarctée mais ont également été observés à distance, en particulier dans le thalamus et le mésencéphale (Kristián and Siesjö, 1998, Zhang *et al.*, 2012, Baron *et al.*, 2014, Datta *et al.*, 2020;).

C. Les stratégies thérapeutiques actuelles

a) *La prise en charge en unité neurovasculaire*

Les unités neurovasculaires sont des structures spécialisées composées d'une équipe pluri-professionnelle expérimentée et spécialisée dans la prise en charge de l'AVC, adossées à un plateau technique et situées au centre d'une filière complète (neuroréanimation, neurochirurgie, neuroradiologie, cardiologie, chirurgie vasculaire...). Elles constituent un lieu privilégié pour sélectionner en urgence les patients susceptibles de bénéficier d'un traitement de reperfusion. Elles assurent également une surveillance rapprochée, un bilan étiologique et la mise en place de traitements médicaux de façon à réduire les complications et les récives. L'hospitalisation en unité neurovasculaire réduit d'environ 25% le taux de décès ou de dépendance au décours d'un AVC par rapport à une prise en charge en unité conventionnelle (Stroke Unit Trialists' Collaboration, 1997; Langhorne, Ramachandra and Stroke Unit Trialists' Collaboration, 2020).

b) *La thrombolyse intraveineuse*

La thrombolyse par l'activateur tissulaire recombinant du plasminogène (rt-PA : recombinant tissue plasminogen activator) est née des travaux de Désiré Collen et a été validée par les travaux expérimentaux de Justin A. Zivin (*Zivin et al.*, 1985). Dès 1995, la thrombolyse intraveineuse a fait la preuve de son efficacité dans l'infarctus cérébral dans un délai de 3 heures suivant l'installation des symptômes (NINDS rt-PA Stroke Study Group, 1995). La fenêtre thérapeutique a été secondairement élargie à 4h30 (*Hacke et al.*, 2008). Les patients avec un déficit d'heure de début indéterminée (« AVC du réveil ») ont été exclus de ces essais cliniques. L'étude WAKE-UP a évalué spécifiquement le rt-PA chez ces patients, à condition que l'IRM soit compatible avec un infarctus de moins de 4h30 (*Thomalla et al.*, 2018). Ce

dernier élément reposait sur la présence d'un « mismatch » entre une séquence de diffusion « positive », c'est-à-dire montrant un hypersignal, et une séquence FLAIR (Fluid Attenuation Inversion Recovery) « négative » c'est-à-dire sans lésion visible. Les résultats positifs de cette étude ont permis d'élargir l'indication de la thrombolyse intraveineuse à ces patients. Plus récemment, un changement de paradigme s'est opéré : au critère temporel s'est substitué le critère tissulaire. La thrombolyse intraveineuse a été évaluée au-delà de la fenêtre horaire de 4h30, sur la base d'une imagerie multimodale montrant la présence de tissu à risque résiduel, c'est-à-dire d'une pénombre ischémique. La méta-analyse réalisée à partir des trois études publiées EPITHET, ECASS4-EXTEND et EXTEND montre que la thrombolyse intraveineuse tardive améliore le pronostic fonctionnel à 3 mois chez ces patients (Davis *et al.*, 2008; Campbell *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2019; Ringleb *et al.*, 2019). Il faut néanmoins souligner qu'environ 2/3 des patients avaient une occlusion artérielle proximale, et relèveraient aujourd'hui d'une indication de thrombectomie mécanique.

D'autres agents thrombolytiques, en particulier la tenecteplase, suscite un intérêt croissant. Les données de plusieurs études, dont EXTEND-IA TNK, compilées dans une métaanalyse récente montrent qu'elle est non-inférieure à l'alteplase (Logallo *et al.*, 2017; Campbell *et al.*, 2018, 2020; Burgos and Saver, 2019). Elle a l'avantage de s'administrer sous la forme d'un seul bolus.

La thrombolyse intraveineuse a néanmoins des limites : le risque d'hémorragie intracrânienne symptomatique évalué à 6-8% et sa faible efficacité en cas d'occlusion artérielle proximale (NINDS rt-PA Stroke Study Group, 1995; Wahlgren *et al.*, 2008; Bhatia *et al.*, 2010).

c) La thrombectomie mécanique

Pour pallier la faible efficacité de la thrombolyse intraveineuse en cas d'occlusion artérielle proximale, la thrombectomie mécanique a été proposée. Cette procédure consiste à désobstruer l'artère à l'aide d'un dispositif mécanique par voie endovasculaire sous contrôle radioscopique. En 2015, la prise en charge de l'infarctus cérébral a connu un bouleversement avec la démonstration de l'efficacité de la thrombectomie mécanique dans les 6 heures suivant un infarctus cérébral en rapport avec une occlusion artérielle proximale (Berkhemer *et al.*, 2015; Campbell *et al.*, 2015; Goyal *et al.*, 2015; Jovin *et al.*, 2015; Saver *et al.*, 2015; Bracard *et al.*, 2016). Il suffisait de traiter cinq patients pour éviter à un patient de perdre son autonomie (Goyal *et al.*, 2016). Sur le plan angiographique, la reperfusion, qui est un déterminant majeur du pronostic fonctionnel, a été jugée satisfaisante (Thrombolysis in Cerebral Infarction (TICI) 2b/3) chez environ 70% des patients (Inoue *et al.*, 2013; Manning *et al.*, 2014; Goyal *et al.*, 2016; Chamorro *et al.*, 2017). La fenêtre thérapeutique a été secondairement élargie jusqu'à 24h chez des patients sélectionnés sur la base d'une imagerie avancée montrant la présence de tissu à risque résiduel (Albers *et al.*, 2018; Nogueira *et al.*, 2018).

CHAPITRE 2 – L'inflammation post-ischémique

1. Dynamique spatio-temporelle

A. Siège de l'inflammation et concept de « pénombre inflammatoire »

La réaction inflammatoire générée par l'ischémie a été décrite initialement comme survenant au sein de la pénombre ischémique (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999). Mais la colocalisation de la réaction inflammatoire avec la zone de pénombre ischémique définie selon les critères hémodynamiques évoqués précédemment est incertaine. Le concept de « pénombre inflammatoire » a été proposé pour désigner la zone où siège la réaction inflammatoire, en périphérie de l'infarctus (figure 5) (Liesz *et al.*, 2011; Gauberti, Lizarrondo and Vivien, 2016). Le recrutement de cette zone pourrait expliquer la croissance secondaire des lésions et serait la cible des stratégies de neuroprotection ciblant l'inflammation au même titre que la pénombre ischémique est la cible des traitements de reperfusion. Ce phénomène a été observé chez l'animal mais son importance chez l'homme reste incertaine (Liesz *et al.*, 2011). La croissance des lésions entre l'admission et 24 heures après la reperfusion semble être limitée chez les patients pris en charge pour un infarctus cérébral en rapport avec une occlusion artérielle proximale traités par thrombectomie et pour lesquels une reperfusion complète (TICI 3) est obtenue (Gauberti *et al.*, 2018). En revanche, elle a été observée de façon subaiguë entre 24h et 7 jours chez des patients traités par thrombolyse intraveineuse quel que soit le site de l'occlusion artérielle, mais sans données propres au sous-groupe des patients recanalisés (Zhu *et al.*, 2015).

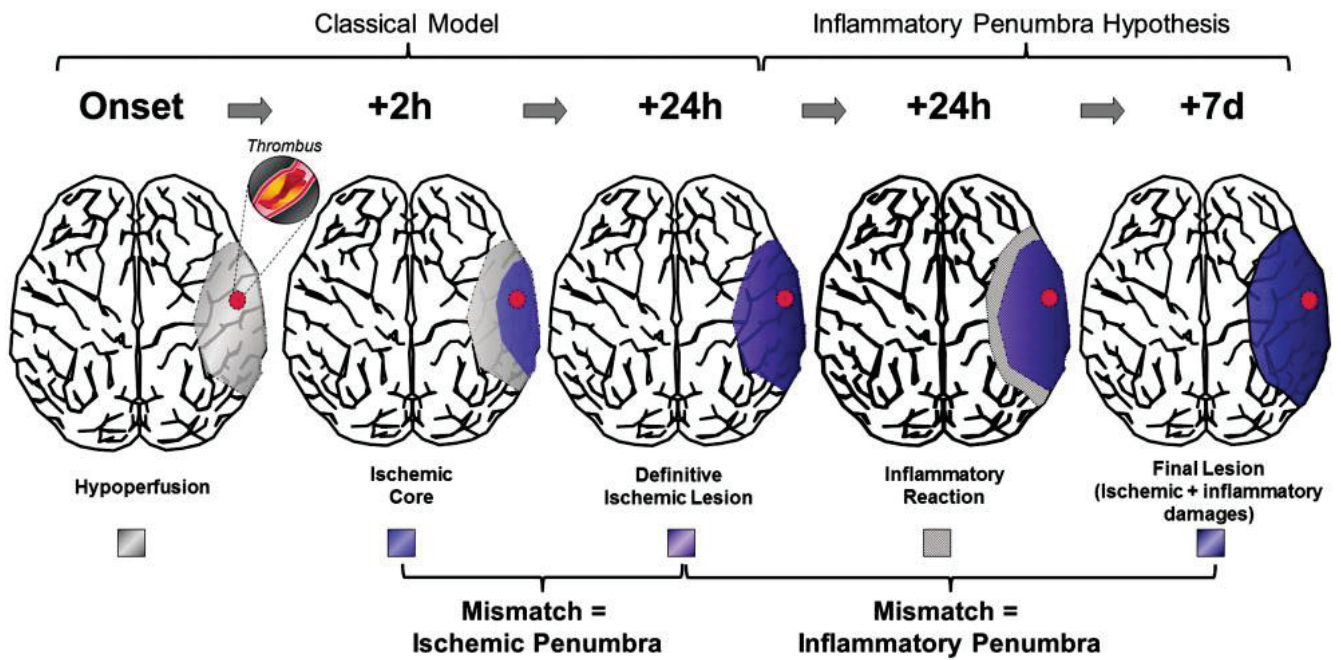


Figure 5 : Concept de pénombre inflammatoire (Gauberti, De Lizarrondo and Vivien, 2016)

B. Dynamique dans le temps

L'inflammation générée par l'ischémie débute quelques minutes après l'ischémie et perdure plusieurs semaines ou mois (Gelderblom *et al.*, 2009). Cette réponse inflammatoire évolue au fil du temps. Elle semble délétère à la phase aigüe alors qu'elle pourrait être bénéfique à une phase plus tardive en participant à la résolution de l'inflammation, à la clairance des débris, au remodelage et à la régénération tissulaire (figure 6) (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999; Iadecola and Anrather, 2011; Bai and Lyden, 2015).

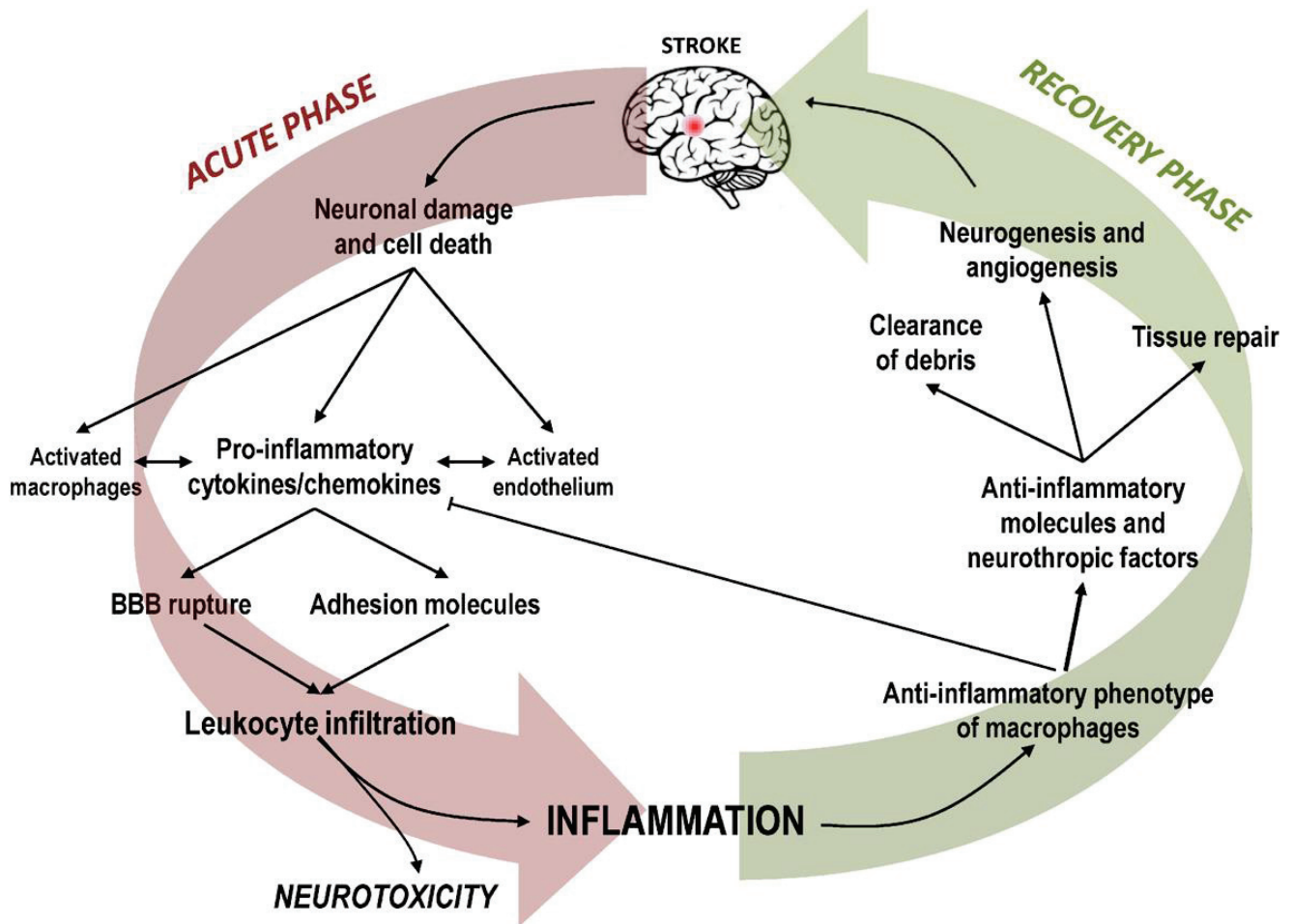


Figure 6 : Mécanismes de la réponse inflammatoire post-ischémique et évolution au cours du temps (Simats, García-Berrocso and Montaner, 2016) (*BBB : blood-brain barrier*)

2. Mécanismes

A. La nécrose cellulaire et l'activation de la microglie

La nécrose cellulaire libère des DAMPS (danger-associated molecular patterns) tels que des fragments d'acides nucléiques, des nucléotides (ATP, Uridine diphosphate), la protéine S100B et la HMGB1 (high-mobility group box 1), qui activent les récepteurs transmembranaires Toll-like (TLR : Toll like receptor) des cellules immunitaires. Parallèlement, l'activation de seconds messagers liée à l'influx massif de calcium dans la cellule, l'augmentation de radicaux libres

de l'oxygène et l'hypoxie déclenchent l'expression de gènes proinflammatoires via la synthèse de facteurs transcriptionnels incluant NF- κ B (nuclear factor- κ B), HIF-1, IRF-1 (interferon regulatory factor 1) et STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) (Planas *et al.*, 1996; O'Neill and Kaltschmidt, 1997; Ruscher *et al.*, 1998; Iadecola *et al.*, 1999).

Les cellules microgliales, les principales cellules immunitaires résidentes du cerveau, sont précocément activées. Le passage de l'état de repos à l'état activé s'accompagne de modifications de leur morphologie et de la production de cytokines, de molécules d'adhésion, de métalloprotéases matricielles-9 (MMP-9 : matrix metalloproteinase-9), d'espèces réactives de l'oxygène et d'autres médiateurs pro-inflammatoires. Ces médiateurs sont destinés à recruter d'autres cellules immunitaires sur le site et ainsi renforcer la réaction inflammatoire (Iadecola and Anrather, 2011).

B. La synthèse de cytokines/chimiokines

Les cytokines sont des polypeptides de petite taille, immunomodulateurs, qui jouent un rôle important dans l'activation, la prolifération et la différenciation cellulaire. Elles interviennent également dans la régulation de l'expression des molécules d'adhésion et des chimiokines. La microglie activée de type M1 produit des cytokines proinflammatoires, IL-1 β (interleukin -1 β), TNF- α (tumor necrosis factor-alpha), IL-6, et IL-18 qui amplifient la réponse inflammatoire après l'infarctus cérébral alors que la microglie activée de type M2 produit des cytokines anti-inflammatoires TGF- β (transforming growth factor- β), IL-4 et IL-10, qui inhibent l'expression de cytokines proinflammatoires et diminuent l'inflammation par la suite (Pawluk *et al.*, 2020).. Au sein des cytokines, on distingue les chimiokines, en particulier IL-8 et MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), qui ont un effet chémoattractant sur les leucocytes. Elles sont

sécrétées par les neurones, les astrocytes, la microglie, les oligodendrocytes et les cellules endothéliales activées (Rostène *et al.*, 2011). Elles participent ainsi au recrutement de leucocytes qui vont à leur tour sécréter des cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation et ainsi moduler la réponse immunitaire.

C. Le rôle des métalloprotéases matricielles

Les métalloprotéases matricielles (MMP : matrix metalloproteinase) sont des endopeptidases, dépendantes du calcium et du zinc, actives à pH physiologique (Frederick Woessner, 1994). Elles participent aux lésions d'ischémie-reperfusion cérébrale, en particulier, les MMP-2 et MMP-9 du fait de leur action sur le collagène de type IV, constituant majoritaire des membranes basales endothéliales (Bai and Lyden, 2015). Une source importante de MMP-9 est l'afflux de polynucléaires neutrophiles mais la microglie, les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules endothéliales peuvent également en sécréter (Rosell *et al.*, 2008). Les MMPs sont synthétisées sous une forme inactive (pro-MMP ou zymogène), stockées puis sécrétées ou insérées à la membrane plasmique. Elles ont une structure commune comportant un pro-domaine, un prédomaine N-terminal nécessaire à leur acheminement intracellulaire jusqu'à la membrane et un domaine catalytique comportant un atome de zinc. Certaines MMPs possèdent également un domaine homologue à l'hémopexine (Bonnans, Chou and Werb, 2014). La présence du prodomaine, par l'intermédiaire de son groupement cystéine lié à l'atome de zinc du domaine catalytique (« cystein switch »), est responsable de la forme inactive (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990). Plusieurs mécanismes régulent l'expression des gènes codant pour les MMPs au niveau épigénétique, transcriptionnel, avec notamment un effet inducteur des cytokines et des facteurs de

croissance, et post-transcriptionnel (Fanjul-Fernández *et al.*, 2010). Un autre élément de régulation est l'activation des MMPs à partir de leur forme inactive sous laquelle elles sont synthétisées. La forme active est obtenue par clivage protéolytique du prodomaine par des protéases intra- ou extracellulaires ou par oxydation du groupe thiol par des espèces réactives de l'oxygène (Woessner, 1991; Rajagopalan *et al.*, 1996; Deem and Cook-Mills, 2004). Une fois activées, les MMPs peuvent être inhibées par une famille d'inhibiteurs tissulaires spécifiques (TIMPs) (Woessner, 1991). Dans des conditions physiologiques, les MMPs présentes à de faibles concentrations jouent un rôle central dans la dégradation de la matrice extracellulaire et participent à son remodelage physiologique. Elles participent à de nombreux processus cellulaires, tels que la migration, l'invasion, la prolifération ou l'apoptose et jouent un rôle crucial dans la morphogénèse, l'angiogénèse et la cicatrisation (Woessner, 1991; Vu, 2000). Dans le cadre des lésions d'ischémie-reperfusion, l'action protéolytique de MMP-9 sur la membrane basale et les jonctions serrées, compromet la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et favorise ainsi le développement de l'œdème vasogénique (figure 7) (Woessner, 1991; Rosenberg *et al.*, 1996; Rosenberg, Estrada and Dencoff, 1998; Debatisse, 2020). La dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire et des jonctions serrées est également de nature à favoriser les complications hémorragiques et à faciliter l'infiltration leucocytaire qui va entretenir voire amplifier la réaction inflammatoire (Turner and Sharp, 2016).

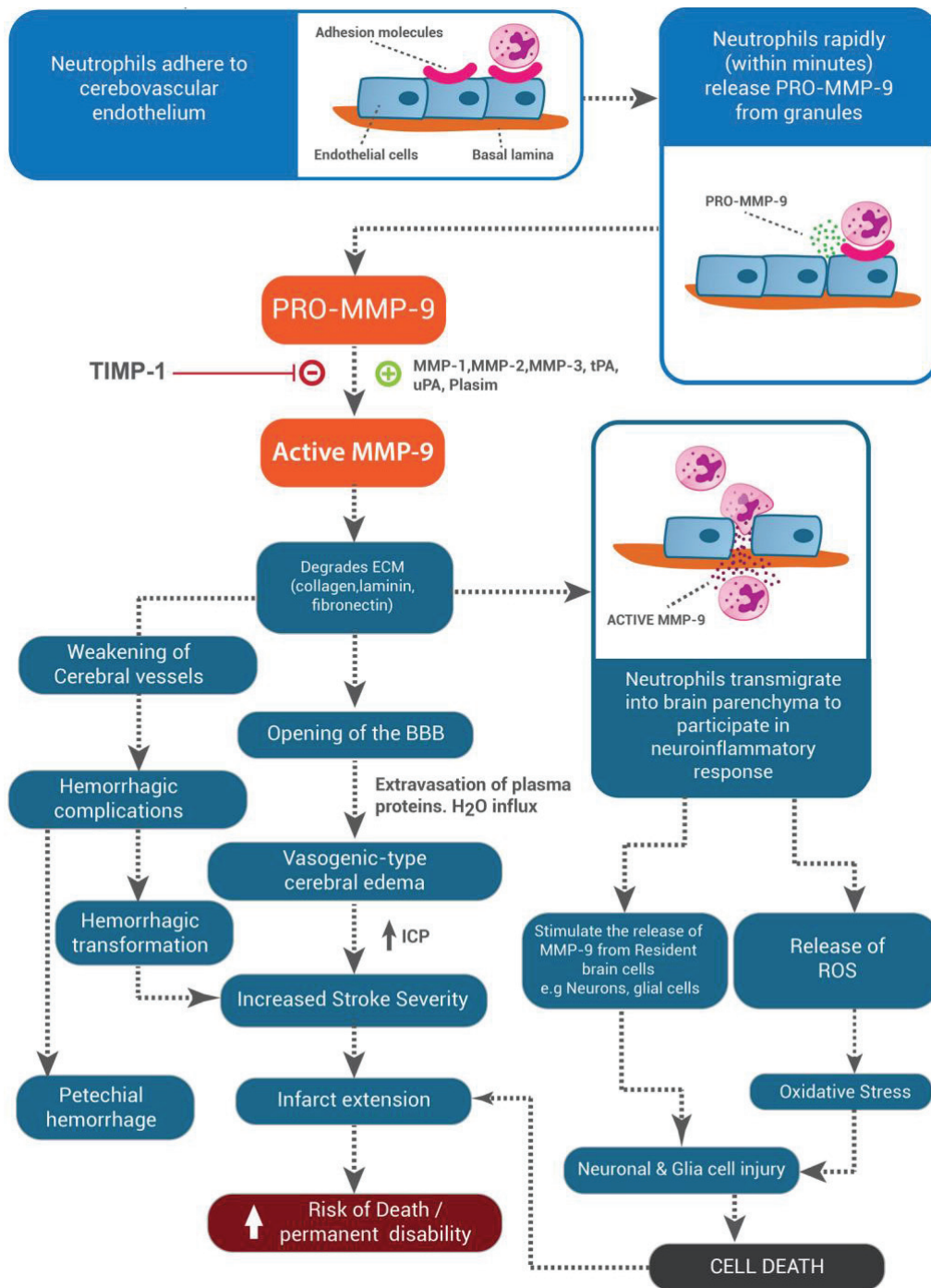


Figure 7 : Rôle de la MMP-9 dans les lésions d'ischémie-reperfusion (Turner and Sharp, 2016) (MMP : matrix metalloprotéinase, TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase, tPA : tissue plasminogen activator, uPA : urokinase-type plasminogen activator, ECM : extracellular matrix, BBB : blood-brain barrier, ICP : intracranial pressure, ROS : reactive oxygen species)

D. L'activation de l'endothélium et le rôle des molécules d'adhésion

Les cellules endothéliales sont rapidement activées après la survenue de l'infarctus cérébral et expriment des molécules d'adhésion. Les premières molécules d'adhésion à être exprimées sont les sélectines (e et p-selectines), stockées préalablement dans les corps de Weibel-Palade (Carvalho-Tavares *et al.*, 2000). Cette interaction entre les sélectines et les ligands des sélectines exprimés par les leucocytes permet un roulement des leucocytes sur la surface endothéliale. Cette interaction est renforcée par l'expression endothéliale de VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) ou encore PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1) qui sont des ligands pour les intégrines exprimées à la surface des leucocytes (Henninger *et al.*, 1997; Stanimirovic *et al.*, 1997). Cette deuxième étape permet aux leucocytes d'adhérer plus fermement à l'endothélium. L'ensemble de ces phénomènes concoure à la transmigration des leucocytes.

E. La rupture de la barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique est constituée de cellules endothéliales reliées entre-elles par des jonctions serrées, de la lame basale, des pieds astrocytaires et des péricytes. Cette barrière est fonctionnelle dès le développement du système nerveux central (Liddelow, 2011). La rupture de la barrière hémato-encéphalique est observée dès la 25ème minute après la reperfusion cérébrale chez le rat et dès la troisième heure suivant un infarctus cérébral chez l'Homme (Strbian *et al.*, 2008; Giraud *et al.*, 2015). Cette perméabilité anormale permet la migration de différentes cellules inflammatoires telles que les macrophages, les cellules natural killer (NK), les lymphocytes T et les leucocytes polymorphonucléaires jusqu'au site de l'ischémie.

F. Le recrutement leucocytaire

L'afflux de leucocytes activés qui interagissent avec les cellules endothéliales activées, et s'accumulent avec les globules rouges et les plaquettes activés, contribuent par leur présence à l'obstruction de la microcirculation mise en jeu dans les phénomènes de « no-reflow » évoqués plus loin (del Zoppo *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 1992).

Les polynucléaires neutrophiles sont les premiers leucocytes circulants recrutés (Gelderblom *et al.*, 2009; Kalimo *et al.*, 2013). Ils interviennent principalement en libérant leurs granulations riches en médiateurs de l'inflammation, qui ont pour effet d'amplifier la réaction inflammatoire. Ils libèrent en particulier dans l'espace extracellulaire des cytokines/chimiokines, des facteurs du complément, des MMP-9 et des NETs (neutrophil extracellular traps) qui sont des filaments de chromatine (association d'ADN et d'histones) décondensée recouverts par de nombreuses protéines d'origine principalement granulaire. Ces médiateurs clés, impliqués dans l'immunité innée, l'inflammation et l'hémostase constituent l'architecture du thrombus et modifient la structure de la fibrine ce qui peut modifier sa résistance au traitement pharmacologique ou mécanique (Brinkmann, 2004; Longstaff *et al.*, 2013). L'effet des polynucléaires neutrophiles dépend néanmoins du ratio entre le phénotype « N1 », pro-inflammatoire et le phénotype « N2 » aux propriétés anti-inflammatoires, qui peut évoluer au fil du temps (Fridlender *et al.*, 2009).

Les monocytes sont recrutés dans les 24 premières heures (Gelderblom *et al.*, 2009 ; Planas, 2018). Ils se différencient in situ en macrophages et participent ainsi au nettoyage des débris.

Le système immunitaire adaptatif est également activé par la nécrose cellulaire du fait du relargage et du drainage d'antigènes du système nerveux central vers les ganglions lymphatiques où ils entrent en contact avec les cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes B et T (Chamorro *et al.*, 2012). Cette mise en contact peut déclencher une réaction médiée par les cellules T in situ et conduire à la production d'anticorps dirigés spécifiquement contre des antigènes du système nerveux central. Les lymphocytes sont recrutés quelques jours après la survenue de l'infarctus cérébral. Les lymphocytes T cytotoxiques et NK semblent contribuer à l'aggravation des lésions, tandis que les lymphocytes B et T régulateurs auraient plutôt un rôle protecteur (Kleinschnitz *et al.*, 2010; Sakaguchi *et al.*, 2010; Brait *et al.*, 2012; Gan *et al.*, 2014). Ce dernier point est incertain et sujet à débat (Berchtold *et al.*, 2019).

G. L'activation plaquettaire

Les lésions de l'endothélium conduisent à l'exposition de la matrice extracellulaire sous-endothéliale au flux sanguin durant la reperfusion. Cette exposition déclenche l'adhésion des plaquettes dans la microcirculation par l'intermédiaire d'une liaison entre le complexe glycoprotéique (GP) plaquettaire Ib-V-IX et le facteur Willebrand (Savage, Almus-Jacobs and Ruggeri, 1998). Cette première étape est importante dans le « roulement » des plaquettes à la surface de l'endothélium. L'activation plaquettaire fait intervenir plusieurs récepteurs et voies de signalisations entraînant des modifications biochimiques comme l'augmentation du taux de calcium intracellulaire, le réarrangement du cytosquelette, la sécrétion du contenu des granules denses et α et des changements conformationnels des intégrines passant d'un état de faible affinité à un état de forte affinité, conduisant à la formation des agrégats

plaquettaires (Stegner and Nieswandt, 2011). Ce phénomène contribue probablement à la thrombose de la microcirculation et au phénomène de « no-reflow ».

H. L'activation du complément

Le système du complément est constitué de protéines circulantes et membranaires activées en cascade par un clivage protéolytique séquentiel selon 3 voies différentes qui convergent vers l'activation de la protéine C3: la voie classique, la voie alternative et la voie des lectines. In fine, le complément a une action cytolytique via la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) mais a également des fonctions d'opsonisation / phagocytose, et d'activation des leucocytes. Ce système est également lié à la cascade de la coagulation puisque la thrombine et la plasmine sont capables d'activer directement le complément (voie extrinsèque) (Amara *et al.*, 2008; Foley *et al.*, 2016). Le complément, en particulier la voie alternative et la voie des lectines, est impliqué dans les lésions d'ischémie-reperfusion. Le mécanisme d'action est mal connu. Les études précliniques ont montré la présence des protéines C3 et C1q au sein de l'infarctus cérébral, et une expression accrue des récepteurs de C3 par la microglie activée en périphérie de l'infarctus (Nishino *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1996; Huang, 1999). Les anaphylatoxines C3a et C5a agiraient sur les cellules de la lignée myéloïde et augmenteraient ainsi la production d'espèces réactives de l'oxygène, la sécrétion de cytokines proinflammatoires et la dégranulation. Les souris déficientes en C3 (C3^{-/-}) ou traitées par antagoniste du récepteur C3a avaient un infarctus de moindre volume et un meilleur pronostic fonctionnel (Mocco *et al.*, 2006, p. 200). Les souris déficientes en lectine liant le mannose (MBL : Mannose-Binding lectin) avaient également un infarctus de moindre volume et un meilleur pronostic fonctionnel, alors qu'un traitement par recombinant humain de MBL exacerbait les lésions (Cervera *et al.*, 2010). L'analyse immunohistochimique a montré

que les isoformes A et C de la MBL se déposaient précocément sur l'endothélium ischémié (Fumagalli *et al.*, 2016).

I. Le phénomène de « no-reflow » et la thromboinflammation de la microcirculation

La recanalisation artérielle proximale n'est pas synonyme de la reperfusion tissulaire, c'est-à-dire de la restauration du flux sanguin au niveau de la microcirculation. Un défaut de reperfusion tissulaire en dépit d'une recanalisation artérielle proximale a été observée chez l'animal (Crowell and Olson, 1972; Anwar, Buchweitz-Milton and Weiss, 1988; Belayev *et al.*, 2002). Son importance chez l'Homme reste débattue (De Silva *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 2015; Schiphorst *et al.*, 2020). Ce phénomène peut être expliqué par des embolies distales ou par une atteinte structurelle et fonctionnelle de la microcirculation secondaire aux lésions d'ischémie-reperfusion (« no-reflow ») (Ames *et al.*, 1968). Les mécanismes proposés pour expliquer ce phénomène de « no-reflow » sont d'une part l'obstruction de la lumière par l'entrappement des globules rouges, des leucocytes et des plaquettes activés, l'adhésion des polynucléaires neutrophiles et des plaquettes à l'endothélium activé, l'augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et l'activation du facteur tissulaire responsable du dépôt de fibrine et, d'autre part la compression extrinsèque des capillaires réduisant la lumière artérielle sous l'effet du gonflement des pieds astrocytaires et la contraction des péricytes (del Zoppo *et al.*, 1991; J. H. Garcia *et al.*, 1994; Julio H Garcia *et al.*, 1994; del Zoppo and Mabuchi, 2003; Yemisci *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2014; Klöner, King and Harrington, 2018).

J. L'immunodépression systémique et les infections

Environ 30% des patients présentent une infection au décours d'un infarctus cérébral (Westendorp *et al.*, 2011). Cette incidence élevée, bien qu'elle puisse être partiellement expliquée par le terrain, les troubles de déglutition et les actes invasifs, semble surtout être la conséquence de l'immunodépression systémique (Chamorro, Urra and Planas, 2007). Les études précliniques ont montré une réduction précoce et soutenue de l'immunité cellulaire (désactivation monocytaire, lymphopénie, « shift » des sous-populations lymphocytaires Th1/Th2) avec en particulier une réduction de la production d'IFN- γ (interféron-gamma), orchestrée par le système nerveux sympathique (Prass *et al.*, 2003, p. 200). Chez l'homme, les taux d'IL-10 et de monocytes, probablement désactivés, étaient associés à la survenue d'une infection après un infarctus cérébral (Chamorro *et al.*, 2006). Il pourrait s'agir d'un mécanisme adaptatif destiné à minimiser l'inflammation cérébrale. Plusieurs études ont montré une association entre la survenue d'une infection et le pronostic fonctionnel et la mortalité tandis que d'autres auteurs suggèrent qu'il s'agit plutôt d'un marqueur de sévérité de l'infarctus cérébral (Vargas *et al.*, 2006; Vermeij *et al.*, 2009; Finlayson *et al.*, 2011). Le rapport de causalité semble en effet incertain dans le sens où l'utilisation préventive d'une antibiothérapie, bien qu'elle diminue globalement le taux d'infections, n'a aucun effet sur le pronostic fonctionnel ou la mortalité (Vermeij *et al.*, 2018).

3. Biomarqueurs de l'inflammation chez l'Homme

A. La nécessité d'explorer l'inflammation chez l'Homme

Les données des études précliniques ont enrichi notre compréhension du syndrome d'ischémie-reperfusion. Néanmoins, la transposition des données provenant des études précliniques à l'Homme est de nature incertaine. En effet, il existe des différences de structure et de fonction immunitaire entre les espèces. Les neutrophiles circulants prédominent chez les humains (50-70%) alors que chez les rongeurs, ce sont les lymphocytes qui prédominent (75-90%). Plusieurs molécules impliquées dans la réponse immunitaire sont exprimées différemment ou pas exprimées d'une espèce à l'autre (Haley, 2003; Mestas and Hughes, 2004). Les cellules endothéliales de l'Homme peuvent présenter un antigène aux lymphocytes T CD4+ et CD8+ tandis que les cellules endothéliales de souris ne peuvent activer que les lymphocytes T CD8+ (Kreisel *et al.*, 2002). Ces différences doivent être prises en considération lorsqu'on transpose les résultats obtenus chez les rongeurs à l'Homme et expliquent, au moins en partie, l'échec des essais de neuroprotection chez l'Homme (Cheng, Al-Khoury and Zivin, 2004).

B. Marqueurs biologiques

a) Généralités

Tous les composants cellulaires de l'unité neurovasculaire contribuent à la sécrétion de nombreuses protéines inflammatoires en réaction à l'ischémie. La désintégration de cette entité et l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique permet leur passage dans l'espace extracellulaire, le sang et le liquide cérébro-spinal. En parallèle, un certain nombre de

marqueurs présents dans le sang résultent de la réaction systémique secondaire à l'ischémie cérébrale.

L'identification d'un panel de marqueurs inflammatoires est de nature à mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques secondaires à l'ischémie et leur dynamique dans le temps, à améliorer le pronostic des patients pris en charge pour un infarctus cérébral et à définir et évaluer de nouvelles stratégies de neuroprotection. La relation entre le taux de ces biomarqueurs et l'évolution clinique est néanmoins de nature incertaine. Les données précliniques sur le rôle de l'inflammation dans les lésions d'ischémie-reperfusion plaident pour une relation causale. Mais on ne peut exclure que les taux des marqueurs inflammatoires ne soient uniquement le reflet ou la conséquence de la sévérité de l'infarctus. Leurs valeurs peuvent également être modifiées par une infection intercurrente, fréquente après un infarctus cérébral.

b) En l'absence de traitement ou dans le cadre de la thrombolyse intraveineuse

De nombreuses études se sont intéressées aux marqueurs de l'inflammation au cours d'un infarctus cérébral traité ou non par thrombolyse intraveineuse. Le marqueur le plus étudié est la protéine C-réactive (CRP : C-reactive protein). La CRP augmente progressivement durant les premiers jours suivant un infarctus cérébral (Winbeck *et al.*, 2002; Audebert *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006; Worthmann *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2017; Yoshida *et al.*, 2017). Le taux de CRP initial ou son augmentation au cours des premiers jours est associé à la sévérité clinique initiale et au volume lésionnel initial (Audebert *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006; Molnar *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2017; Yoshida *et al.*, 2017; Mobarra *et al.*, 2019). Il ne semble pas associé à l'importance de la pénombre ischémique ou à la croissance des lésions (Lorenzano *et al.*, 2018, 2019). Bien que les études publiées montrent des résultats conflictuels, deux méta analyses

récentes ont confirmé la valeur prédictive de la CRP initiale sur le pronostic fonctionnel et la mortalité (Yu *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2020).

Concernant les cytokines, l'IL-6, a également fait l'objet de plusieurs études. Son taux dans le sang augmente dès les premières heures et est associé au pronostic fonctionnel et vital mais sa valeur prédictive ajoutée par rapport aux variables cliniques reste modérée (Mazzotta *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004; Whiteley *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2013; Reiche *et al.*, 2019; Lasek-Bal *et al.*, 2019). Cette association n'a pas été confirmée dans d'autres études (Oto *et al.*, 2008; Ormstad *et al.*, 2011). Concernant les paramètres d'imagerie, une association entre le taux d'IL-6 et le volume hypoperfusé a été suggérée par une étude de faible effectif (Montaner, Rovira, *et al.*, 2003). L'association entre le taux d'IL-6 et le volume lésionnel a fait l'objet de plusieurs études mais reste incertaine (Fassbender *et al.*, 1994; Montaner, Rovira, *et al.*, 2003; Waje-Andreassen *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2017). Le TNF- α a également fait l'objet de plusieurs études. Son augmentation dans le sang à la phase aiguë et sa valeur pronostique sont débattus (Intiso *et al.*, 2004; Mazzotta *et al.*, 2004; Emsley *et al.*, 2007). La chimiokine MCP-1 a été peu étudiée dans le cadre de l'infarctus cérébral. Son taux augmente précocement. Son taux à 6 heures a été rapporté comme étant associé au pronostic clinique (Worthmann *et al.*, 2010).

Plusieurs études ont montré que le taux de MMP-9 augmentait précocement après la survenue d'un infarctus cérébral (Montaner, Rovira, *et al.*, 2003; Worthmann *et al.*, 2010; Brouns *et al.*, 2011). Son taux était associé au risque de transformation hémorragique en l'absence de traitement de reperfusion ou après thrombolyse intraveineuse (Castellanos *et al.*, 2003, 2007; Montaner, Molina, *et al.*, 2003; Ning *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2008; Inzitari *et al.*

al., 2013; Rodríguez *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018). Une étude portant sur un nombre limité de patients a également montré que le taux de MMP-9 était associé à la croissance des lésions en cas d'occlusion de l'artère sylvienne traitée par thrombolyse intraveineuse, sans prendre en compte l'élément majeur qu'est la recanalisation artérielle (Rosell *et al.*, 2005). L'association entre le taux de MMP-9 et le pronostic fonctionnel est plus controversée (Ning *et al.*, 2006; Rodriguez-Yanez *et al.*, 2006; Lucivero *et al.*, 2007; Brouns *et al.*, 2011; Ramos-Fernandez, Bellolio and Stead, 2011; Graham *et al.*, 2012; Sapojnikova *et al.*, 2014; Abdelnaseer *et al.*, 2017; Zhong *et al.*, 2017; Maestrini *et al.*, 2020). Une association entre le taux de MMP-9 à la phase aiguë de l'infarctus cérébral et la présence de marqueurs indirects de rupture de la barrière hémato-encéphalique à l'IRM a été rapportée (hyperintensité précoce en FLAIR, HARM (hyperintense acute reperfusion injury marker)) (Barr *et al.*, 2010; Jha *et al.*, 2014). En revanche, aucune association significative entre le taux de MMP-9 et l'importance de l'œdème cérébral n'a été rapportée (Moldes *et al.*, 2008).

Les molécules d'adhésion VCAM et ICAM-1, e-selectine et p-selectine ont été peu étudiées. Leur taux est augmenté au décours d'un infarctus cérébral (Frijns *et al.*, 1997; Bitsch *et al.*, 1998; Lip *et al.*, 2002; Cherian *et al.*, 2003; Licata *et al.*, 2006; Pusch *et al.*, 2015). Les résultats sont divergents quant à une éventuelle association entre leurs taux et le volume lésionnel ou le pronostic clinique (Bitsch *et al.*, 1998; Lip *et al.*, 2002; Montaner, Rovira, *et al.*, 2003; Pusch *et al.*, 2015; Richard *et al.*, 2015)

En ce qui concerne le système du complément, le taux de MBL était plus élevé chez des patients à la phase aiguë d'un infarctus cérébral comparé à une population contrôle (Wang, Sun and Zhang, 2014). Un déficit en MBL était associé à des taux moindres de C3, de CRP et

de cytokines proinflammatoires, à un volume lésionnel moindre et à un meilleur pronostic fonctionnel (Cervera *et al.*, 2010; Osthoff *et al.*, 2011). Les données longitudinales suggèrent que la voie alternative du complément reste activée de façon prolongée 3 mois après un infarctus cérébral (Nguyen *et al.*, 2020).

c) Dans le cadre de la thrombectomie mécanique

Dans le cadre de la thrombectomie mécanique, peu de données sont disponibles. La CRP hypersensible, qui est dosée en routine, a été décrite récemment comme étant associée au mauvais pronostic fonctionnel (mRS 3-6 à 3 mois) et au risque d'hémorragie intracrânienne symptomatique (hsCRP ≥ 3 vs < 1 mg/L) (Kim *et al.*, 2020). Cette association entre le taux de CRP et le pronostic fonctionnel n'a pas été confirmée dans une autre étude portant sur 115 patients chez lesquels une recanalisation satisfaisante a été obtenue par thrombectomie mécanique (Huber *et al.*, 2016). Une équipe allemande a rapporté la cinétique (admission, J1, J3, J7 et J90) d'un panel de marqueurs sériques de l'inflammation et de la coagulation (CRP, IL-6, MMP-9, MCP-1, diméthylarginine symétrique et asymétrique, facteur von Willebrand et ADAMTS-13 (disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif 13)) chez 41 patients admis pour un infarctus cérébral lié à une occlusion artérielle proximale dans le territoire carotidien ou vertébrobasilaire (Schuppner *et al.*, 2018). En analyse univariée, une faible activité d'ADAMTS-13 et des taux élevés de CRP et IL-6 à partir du 3^{ème} jour étaient associés à un mauvais pronostic fonctionnel défini comme un mRS 5-6 à 3 mois. En analyse multivariée, seule une faible activité d'ADAMTS-13 était indépendamment associée à un mauvais pronostic fonctionnel. Cette association inverse entre le taux d'ADAMTS-13 et le pronostic fonctionnel a été confirmée uniquement chez les 59 patients pour lesquels une reperfusion satisfaisante a été obtenue (« reperfusion futile ») parmi les 78 patients traités

par thrombectomie mécanique pour une occlusion artérielle proximale dans le territoire carotidien ou vertébrobasilaire (Bustamante *et al.*, 2018).

D'autres études conduites dans le cadre de la thrombectomie mécanique se sont intéressées aux taux de leucocytes. L'une d'elles a montré que le taux de leucocytes circulants était associé au pronostic fonctionnel à la sortie d'hospitalisation et à 3 mois (Huber *et al.*, 2016).

D'autres équipes ont étudié les sous-populations leucocytaires et ont montré que le taux de polynucléaires neutrophiles à l'admission était associé à un mauvais pronostic fonctionnel à 3 mois (modified rankin scale (mRS) 3-6) (Boisseau *et al.*, 2019). Le ratio polynucléaires neutrophiles/lymphocytes à l'admission, et dans les premiers jours, était également associé à un mauvais pronostic fonctionnel, y compris chez les patients pour lesquels la reperfusion est considérée comme satisfaisante, et au risque d'hémorragie intracrânienne symptomatique (Brooks *et al.*, 2014; Goyal *et al.*, 2018; Aly *et al.*, 2020; Lux *et al.*, 2020).

Dans une étude récente, le sang artériel prélevé par micro-cathéter à 3 endroits différents (prélèvement fémoral, carotidien et en aval de l'occlusion) a été analysé chez 151 patients admis pour un infarctus cérébral lié à une occlusion artérielle proximale dans le territoire carotidien traité par thrombectomie mécanique. Les auteurs ont montré que les taux de leucocytes, principalement de polynucléaires neutrophiles mais également de lymphocytes et monocytes, ainsi que les taux de chimiokine CXCL11 étaient plus élevés en aval de l'occlusion comparés aux autres prélèvements. Le gradient local/systémique de neutrophiles était significativement associé au score NIHSS à 72 heures (Kollikowski *et al.*, 2020). Une autre étude (BACTRAC) s'est intéressée à l'analyse protéomique dans le sang artériel prélevé en aval de l'occlusion, comparé au sang artériel systémique. Les premiers résultats portant sur un nombre limité de patients ont montré un taux plus faibles de plusieurs chimiokines (C-C motif chemokine 19, 20 et 23), du facteur 21 de croissance du fibroblaste et

de la ficoline-2 dans le sang artériel en aval de l'occlusion comparée à celle du sang artériel systémique (Maglinger *et al.*, 2020). La même équipe a identifié un panel de gènes codant pour des cytokines/chimiokines dont l'expression est associée au volume lésionnel et à l'œdème à l'aide du « machine learning » (Martha *et al.*, 2020).

C. Imagerie

La dynamique spatiale et temporelle de l'inflammation cérébrale peut être approchée in vivo par l'imagerie cérébrale. La tomographie par émission de positons (TEP), utilisant comme ligand radioactif le ^{11}C -PK11195, ou un des traceurs de la même famille (DPA-714, GE-180), ciblant la protéine de translocation (TSPO) exprimée principalement par la microglie activée, permet de caractériser in vivo l'activation microgliale. Les études cliniques réalisées sur un échantillon limité de patients montrent une activation microgliale précoce au sein de l'infarctus et de la zone péri-infarctus qui s'étend plus tardivement le long du tractus pyramidal, au thalamus ipsilatéral et à l'hémisphère controlatéral (Shi *et al.*, 2019). Dans l'une de ces études, combinant la TEP au ^{11}C -PK11195 et la TEP au ^{11}C -flumazenil, un marqueur de la perte neuronale, il existait une dissociation entre la fixation réduite du ^{11}C -flumazenil et l'absence d'augmentation claire de la fixation du ^{11}C -PK11195 au sein de la pénombre ischémique, soulevant la question de la participation de l'activation microgliale à la mort neuronale sélective au sein de la pénombre (Morris *et al.*, 2018). Le ^{11}C -PK11195 n'est néanmoins pas un marqueur spécifique ni du caractère délétère de l'inflammation ni de la microglie activée puisqu'il est également exprimé, dans une moindre mesure, par les astrocytes, les monocytes, et les macrophages, et de façon faible par les cellules endothéliales. L'affinité du PK11195 in vitro pour les astrocytes activés est cependant 5 fois moins importante que pour les cellules microgliales (Banati, 2003). La liaison de ce ligand aux

astrocytes activés devient quantitativement négligeable in vivo dans l'ischémie cérébrale récente où l'activation microgliale supplante l'astrocytose, et ce de façon encore plus marquée avec l'énantiomère R qui est utilisé en PET (Banati, 2003 ; Ejaz *et al.*, 2016 ; Hughes *et al.*, 2012).

L'IRM cérébrale permet d'évaluer de façon non spécifique la perméabilité de la barrière hématoencéphalique. La présence d'une prise de contraste leptoméningée ou parenchymateuse sur la séquence pondérée T1 après injection de gadolinium, la présence de HARM ou l'IRM de suivi dynamique du signal T1 après injection de gadolinium ou de nanoparticules de gadolinium (DCE : Dynamic Contrast Enhanced-imaging) sont autant de moyens disponibles pour évaluer, de façon non spécifique, la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Latour *et al.*, 2004; Giraud *et al.*, 2015; Villringer *et al.*, 2017, Debatisse *et al.*, 2020). L'utilisation de l'IRM couplée à l'injection de nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (USPIO : ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide) comme agent de contraste a également été proposée pour monitorer l'activité phagocytaire in vivo. Une étude menée chez la souris après occlusion de l'artère cérébrale moyenne a montré un réhaussement après injection d'USPIO précocement en bordure de l'infarctus puis dans un second temps au niveau de l'hémisphère controlatéral via le corps calleux, de façon concordante avec les données des analyses histochimiques (Wiart *et al.*, 2007). Leur intérêt chez l'Homme est incertain (Nighoghossian *et al.*, 2007).

4. La neuroprotection par les traitements immunomodulateurs

A. Les limites de la recherche translationnelle

Les seuls traitements neuroprotecteurs validés à ce jour sont les traitements de reperfusion. Aucun traitement ciblant l'inflammation n'a été jusqu'à présent validé dans le traitement de l'infarctus cérébral, en complément du traitement de reperfusion, en dépit de résultats prometteurs issus des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale. Les limites de la recherche translationnelle peuvent s'expliquer par les différences de structure et de fonction immunitaire entre les espèces évoquées précédemment, les délais de traitement souvent plus longs chez l'Homme, les différences en terme d'âge et de comorbidités, les modalités d'évaluation de l'efficacité, les différences d'anatomie cérébrale et vasculaire, les différences de concentration plasmatiques des traitements (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999). L'échec des traitements peut également être expliqué par la complexité et la dualité de la réaction inflammatoire, qui semble délétère à la phase aiguë alors qu'elle pourrait être bénéfique à une phase plus tardive. Par ailleurs, le traitement immunomodulateur n'est pas dénué d'effets indésirables, d'autant plus qu'il existe une immunodépression systémique. Une meilleure connaissance des mécanismes et de la cinétique de la réaction inflammatoire est indispensable à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

B. Les principales molécules évaluées chez l'Homme

a) Antagoniste du récepteur de l'interleukin-1

Une métaanalyse d'études précliniques a montré que l'administration précoce d'un antagoniste du récepteur de l'IL-1 réduisait le volume de l'infarctus (Banwell, Sena and

Macleod, 2009). Une étude clinique de phase 2 a évalué l'efficacité de l'analogue recombinant de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 humaine administré par voie intraveineuse (bolus de 100 mg puis perfusion de 2 mg/kg/h pendant 72 heures) dans les 6 heures suivant la survenue d'un infarctus cérébral (Emsley, 2005). Les taux de leucocytes, de polynucléaires neutrophiles, de CRP et d'IL-6 étaient plus faibles et l'évolution fonctionnelle était meilleure chez les patients avec un infarctus cortical dans le groupe de patients traités avec l'analogue recombinant de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 humaine. Plus récemment, une autre étude de phase 2 SCIL-STROKE a testé ce même traitement par voie sous-cutanée (100 mg/12h pendant 3 jours), seul ou associé à un traitement de reperfusion, et a montré l'absence de bénéfice sur le pronostic fonctionnel en dépit d'une réduction significative des marqueurs inflammatoires plasmatiques (Smith *et al.*, 2018). Aucun problème de tolérance n'a été constaté dans ces deux études cliniques.

b) La minocycline

La minocycline est un antibiotique de la famille des tétracyclines de 2^{ème} génération qui suscite un intérêt particulier dans le cadre de la neuroprotection. Cette molécule lipophile, qui traverse la barrière hémato-encéphalique, a des mécanismes d'action multiples. Elle a une action anti-inflammatoire. Elle réduit fortement l'activation microgliale et l'expression des cytokines et des MMPs, en particulier la MMP-9 (Yrjanheikki *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2015). La minocycline réduit également l'apoptose et la production de radicaux libres (Morimoto *et al.*, 2005; Matsukawa *et al.*, 2009). Plusieurs études précliniques ont montré que l'administration de minocycline diminuait le volume de l'infarctus et améliorait le pronostic fonctionnel (Xu *et al.*, 2004; Yenari *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Matsukawa *et al.*, 2009; Yew *et al.*, 2019; Drieu *et al.*, 2020). En association avec

l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA : tissue plasminogen activator) administré dans une fenêtre thérapeutique précoce ou tardive, la minocycline réduisait l'expression de MMP-9 et le risque hémorragique, sans compromettre l'activité fibrinolytique du tPA (Murata *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2009; Fan, Lo and Wang, 2013). Chez l'homme, l'étude d'escalade de dose MINOS a montré une bonne tolérance de la minocycline administrée par voie intraveineuse seule ou en association avec le rt-PA (Fagan *et al.*, 2010). Trois essais de phase 2 ont montré que la minocycline administrée par voie orale (200 mg/j pendant 5 jours) dans les 24 heures suivant un infarctus cérébral, seule ou associée au rtPA, était bien tolérée et était associée à un pronostic fonctionnel plus favorable (Lampl *et al.*, 2007; Padma Srivastava *et al.*, 2012; Amiri-Nikpour *et al.*, 2015). Le dernier essai de phase 2 réalisé dans le cadre de la thrombolyse intraveineuse n'a pas montré de bénéfice de la minocycline administrée par voie intraveineuse (100 mg/12h, 5 doses) sur le pronostic fonctionnel des patients (Kohler *et al.*, 2013). La puissance de cette étude était néanmoins limitée.

c) L'enlimomab

Enlimomab, un anticorps murin dirigé contre ICAM-1, couplé au tPA a montré une réduction de l'infiltration leucocytaire et du volume de l'infarctus dans une étude menée chez le lapin (Bowes *et al.*, 1995). Ces données n'ont pas été confirmées chez l'Homme. L'enlimomab administré dans les 6 heures suivant un infarctus cérébral n'apporte pas d'amélioration clinique. En revanche, il y avait plus d'effets indésirables (infection, fièvre) et de décès dans le groupe de patients traités par enlimomab (Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators, 2001).

d) Le fingolimod

Le fingolimod (FTY720) utilisé dans le traitement de la sclérose en plaques, est un analogue de la sphingosine-1-phosphate. Cette prodrogue, une fois phosphorylée par la sphingosine kinase, active les récepteurs de la sphingosine-1-phosphate des lymphocytes et facilite ainsi leur internalisation et leur dégradation ce qui est responsable d'une séquestration réversible des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires et donc d'une réduction du nombre de lymphocytes circulants (Brinkmann *et al.*, 2002). Le fingolimod semblerait avoir également un effet sur les récepteurs sphingosine-1-phosphate exprimés par les neurones, les astrocytes, la microglie et les cellules endothéliales (Wang, Kawabori and Houkin, 2020). Sa forme non phosphorylée est responsable d'autres effets biologiques indépendamment de son action sur les récepteurs de la sphingosine-1-phosphate (Pitman *et al.*, 2012). Les études précliniques ont montré que le fingolimod réduisait l'infiltration leucocytaire et le volume de l'infarctus cérébral et améliorait le pronostic fonctionnel après un infarctus cérébral (Liesz *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013). L'effet du fingolimod sur l'importance de l'oedème après un infarctus cérébral est plus controversé, en particulier chez les souris diabétiques (Liesz *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2020). Deux essais cliniques pilotes ont évalué l'effet du fingolimod administré par voie orale (0,5 mg/j) durant 3 jours, seul (1^{ère} dose administrée 6 à 72h après l'installation des symptômes) ou associé au tPA (1^{ère} dose administrée < 4,5h après l'installation des symptômes) (Fu *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015). Ces deux études ont montré un bénéfice du traitement avec un moindre volume lésionnel, un moindre taux d'hémorragies et un meilleur pronostic fonctionnel. Le taux de lymphocytes était comme attendu réduit, sans événement indésirable grave. Une étude plus récente suggère que le bénéfice du fingolimod combiné au rt-PA chez des patients pris en charge 4,5h à 6h après un infarctus cérébral en rapport avec une occlusion artérielle proximale serait

médié par son effet positif sur la reperfusion antérograde, ou rétrograde en cas d'occlusion artérielle persistante (Tian *et al.*, 2018). La réduction des lymphocytes était observée à 24h et persistait plusieurs jours. Ces données sont confortées par les résultats d'études précliniques montrant une réduction des phénomènes de microthrombose artérielle dans le groupe de souris traitées par fingolimod (Kraft *et al.*, 2013; Schuhmann *et al.*, 2016). Un essai clinique de phase II (FAMTAIS) évaluant le bénéfice du fingolimod dont la 1^{ère} dose est administrée dans un délai de 6h suivant un infarctus cérébral lié à une occlusion artérielle proximale dans le territoire carotidien, combiné à un traitement de reperfusion associant la thrombolyse et la thrombectomie mécanique ('bridging therapy') est en cours (Zhang *et al.*, 2017). Sa tolérance, en particulier cardiaque, fait l'objet d'une attention particulière compte-tenu des événements rapportés dans le cadre de la sclérose en plaques (Racca *et al.*, 2016).

e) Le Natalizumab

Le natalizumab est un anticorps monoclonal humanisé qui se fixe à la sous-unité $\alpha 4$ de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (CD49d) présente à la surface des lymphocytes T et qui est validé dans le traitement de la sclérose en plaques. L'intégrine $\alpha 4\beta 1$ se fixe sur les molécules d'adhésion VCAM ou MadCAM-1 (mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1) présentes sur les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique et facilite le passage des lymphocytes T. Le natalizumab, en limitant ces interactions, réduit la migration leucocytaire à travers la barrière hémato-encéphalique. En dépit de cet effet attendu sur l'infiltration leucocytaire, les résultats des études précliniques évaluant le bénéfice des anticorps anti-CD49d sur le volume de l'infarctus et le pronostic fonctionnel sont contradictoires (Langhauser *et al.*, 2014; Llovera *et al.*, 2015; Drieu *et al.*, 2020). L'étude clinique de phase 2 ACTION a évalué l'efficacité de l'administration de natalizumab par voie intraveineuse (300 mg) dans les

9 heures suivant un infarctus cérébral, seul ou en complément du rt-PA (Elkins *et al.*, 2017). Le taux de patients ayant un mRS 0-1 à 30 jours chez les patients traités par natalizumab était significativement inférieur à celui observé chez les patients traités par placebo, sans effet observé sur la croissance des lésions. Ces taux n'étaient plus significativement différents à 90 jours. Les taux d'événements graves ou de décès étaient similaires dans les deux groupes. Les résultats de l'étude ACTION 2 publiés récemment plaident en faveur de l'absence d'efficacité du natalizumab à la dose de 300 ou 600 mg administré par voie intraveineuse dans les 24 heures suivant un infarctus cérébral sur le pronostic fonctionnel (Elkind *et al.*, 2020).

f) Le Hu23F2G et UK-279,276

L'intégrine CD11b/CD18 joue un rôle important dans l'adhésion des polynucléaires neutrophiles par le biais de son interaction avec de la molécule d'adhésion ICAM-1 située sur l'endothélium. Les souris déficientes en CD18 (CD18 -/-) ont un moindre recrutement des polynucléaires neutrophiles et un moindre volume d'infarctus après une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (Prestigiacomo *et al.* 1999). Deux études de phase 3 ciblant l'intégrine CD11b/CD18 des polynucléaires neutrophiles, HALT (Hu23F2G) et ASTIN (UK-279,276), ont été interrompues prématurément pour futilité (Del Zoppo, 2010; Krams *et al.* 2003).

C. Les perspectives à l'ère de la thrombectomie mécanique

La plupart des essais cliniques n'ont pas accordé d'importance à la reperfusion artérielle alors que la restauration du débit sanguin cérébral pourrait être un pré-requis au potentiel effet neuroprotecteur des traitements. De plus, l'absence de reperfusion peut compromettre la diffusion des molécules testées jusqu'à l'unité neurovasculaire (Chamorro, 2018). Ces

traitements méritent d'être évalués comme une approche complémentaire aux traitements de reperfusion actuels (Mizuma, You and Yenari, 2018).

PROBLEMATIQUE - OBJECTIFS

Au cours de ces 30 dernières années, des innovations thérapeutiques majeures ont bouleversé la prise en charge de l'infarctus cérébral. La possibilité de restaurer la perfusion et d'épargner ainsi la pénombre ischémique par une approche pharmacologique et/ou mécanique constitue l'essentiel de ces transformations. Sur le plan angiographique, une reperfusion précoce est observée chez plus de 70% des patients traités par thrombectomie mécanique devant une occlusion proximale. Toutefois en dépit de cette reperfusion, l'évolution clinique demeure péjorative, au moins en partie en raison des dommages secondaires propres aux mécanismes d'ischémie-reperfusion au sein de la pénombre ischémique.

La réaction inflammatoire post-ischémique est une composante essentielle de la physiopathologie de ces lésions. A ce jour la dynamique de cette réaction reste peu connue, en particulier dans le cadre de la thrombectomie mécanique. Une meilleure connaissance de ce phénomène autoriserait cependant une approche plus ciblée de la neuroprotection.

Notre travail de thèse se propose d'approcher la réaction inflammatoire secondaire à l'ischémie par l'analyse dynamique des marqueurs inflammatoires sériques couplée à une analyse séquentielle de l'imagerie au sein de la cohorte HIBISCUS-STROKE. Si de nombreux travaux ont étudié la réponse inflammatoire dans le contexte de l'histoire naturelle ou du traitement par la thrombolyse intraveineuse, nous proposons ici une approche inédite focalisée sur les patients traités par thrombectomie mécanique pour une occlusion proximale.

Ce travail de thèse a eu pour objectif de préciser la relation entre la cinétique des marqueurs sériques de l'inflammation et les facteurs clefs du pronostic clinique : la qualité de la circulation collatérale, la croissance des lésions, le risque de transformation hémorragique et plus globalement la reperfusion dite « futile » à l'issue de la thrombectomie mécanique.

METHODE

La cohorte HIBISCUS-STROKE

Nous avons initié la cohorte HIBISCUS-STROKE en octobre 2016. Les patients pris en charge à l'unité neurovasculaire de Lyon pour un infarctus cérébral en rapport avec une occlusion artérielle proximale dans le territoire carotidien, ayant une IRM cérébrale à l'admission et traités par thrombectomie mécanique ont été inclus. L'analyse a comporté des prélèvements veineux périphériques séquentiels (admission, 6, 24 et 48 heures et 3 mois après l'admission). Le sérum, le plasma et les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC : peripheral blood mononuclear cells) issus de ces prélèvements ont été conditionnés et conservés à -80°C dans une sérothèque (Centre de Ressources Biologiques NeuroBioTec). Le sérum des patients a fait l'objet dans un second temps, après décongélation, d'un dosage par la méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota ou Affymetrix, eBioscience) de différents marqueurs impliqués dans l'inflammation : CRP, IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF-RI (Tumor necrosis factor receptor 1) soluble, ST2 (suppression of tumorigenicity 2) soluble, MMP-9, P-selectine soluble et VCAM-1. Les patients ont également fait l'objet d'une imagerie cérébrale séquentielle comprenant des séquences de diffusion (DWI : diffusion-weighted imaging), de FLAIR, de T2*, d'angiographie IRM « time of flight » (TOF) du polygone de Willis, de perfusion (DSC : Dynamic susceptibility contrast) à l'admission, un scanner cérébral sans injection à 24 heures, une IRM cérébrale (séquence FLAIR) à 6 jours (figure 8). Les patients ont été systématiquement revus en consultation à 3 mois pour une évaluation clinique (score mRS) et biologique et à 12 mois. Le consentement du patient ou des

proches était recueilli au cours de l'hospitalisation. A ce jour, plus de 250 patients ont été inclus.

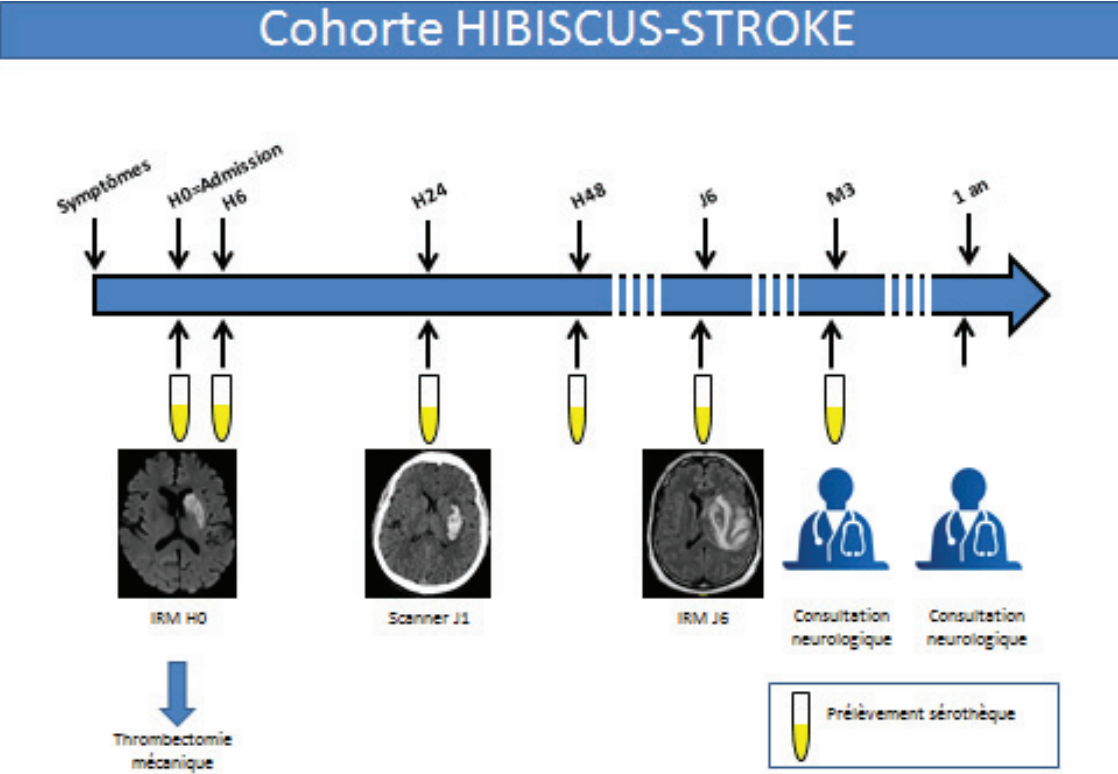


Figure 8 : Déroulement chronologique des examens dans le cadre de la cohorte HIBISCUS-STROKE (H : heure, J : jour, M : mois)

RESULTATS

La partie Résultats est présentée sous forme d'articles publiés répondant aux différents objectifs.

L'étude 1 est publiée dans Stroke:

Mechtouff L, Bochaton T, Paccalet A, Crola Da Silva C, Buisson M, Amaz C, Derex L, Ong E, Berthezene Y, Eker OF, Dufay N, Mewton N, Ovize M, Cho TH, Nighoghossian N. Matrix Metalloproteinase-9 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Are Associated With Collateral Status in Acute Ischemic Stroke With Large Vessel Occlusion. Stroke. 2020;51:2232-2235.

L'étude 2 est publiée dans Frontiers in Neurology:

Mechtouff L, Bochaton T, Paccalet A, Crola Da Silva C, Buisson M, Amaz C, Bouin M, Derex L, Ong E, Berthezene Y, Eker OF, Dufay N, Mewton N, Ovize M, Nighoghossian N, Cho TH. Matrix Metalloproteinase-9 Relationship With Infarct Growth and Hemorrhagic Transformation in the Era of Thrombectomy. Front Neurol. 2020;11:473.

L'étude 3 est publiée dans Neurology:

Mechtouff L, Bochaton T, Paccalet A, Crola Da Silva C, Buisson M, Amaz C, Derex L, Ong E, Berthezene Y, Eker OF, Dufay N, Mewton N, Ovize M, Cho TH, Nighoghossian N. Association of Interleukin-6 levels and futile reperfusion after mechanical thrombectomy. Neurology 2020, in press.

« 25 September 2020

NEUROLOGY MS ID#: NEUROLOGY/2020/066019

MS TITLE: Association of Interleukin-6 levels and futile reperfusion after mechanical thrombectomy

Dear Dr. MECHTOUFF:

We are pleased to accept your paper for publication in NEUROLOGY. »

Etude 1 : Association entre les taux de marqueurs inflammatoires sériques et la qualité de la circulation collatérale

Contexte et état de la question

La qualité de la circulation collatérale est un élément déterminant de la croissance et de la rapidité de progression des lésions aux dépens de la pénombre ischémique (Liebeskind, 2003; Campbell *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2013; Vagal *et al.*, 2018). Elle est associée à un plus fort taux de recanalisation artérielle précoce après thrombolyse intraveineuse, à des lésions de moindre volume et à une meilleure réponse clinique aux procédures mécaniques (Lima *et al.*, 2010; Bang *et al.*, 2011; Menon *et al.*, 2011; Liebeskind *et al.*, 2014; Nambiar *et al.*, 2014; Berkhemer *et al.*, 2016, p. 2; Leng *et al.*, 2016; Seners *et al.*, 2019). Elle semble conditionnée par des facteurs génétiques, hémodynamiques, métaboliques, neuraux et la configuration du polygone de Willis (Liebeskind, 2003; van Raamt *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Menon *et al.*, 2013). La contribution de l'inflammation à la qualité de la circulation collatérale n'a, à ce jour, pas été évaluée dans le contexte de la thrombectomie mécanique. Toutefois deux hypothèses ont été avancées (figure 9). La première, formulée par Rocha et Jovin, suggère que l'œdème ischémique précoce augmenterait la pression interstitielle s'exerçant sur les artéioles et conduirait ainsi à une réduction de la lumière artériolaire (Rocha and Jovin, 2017). La seconde, issue de données expérimentales sur les artères des membres inférieurs, implique le processus d'artériogénèse, c'est-à-dire la croissance et le remodelage de collatérales préexistantes (Heil *et al.*, 2004). La chimiokine MCP-1 et les monocytes circulants semblent

jouer un rôle important et précoce dans ce processus (Ito *et al.*, 1997; Hoefer *et al.*, 2001; Voskuil *et al.*, 2004).

Nous proposons dans cette première étude d'évaluer la contribution de l'inflammation à la qualité de la circulation collatérale à la phase aiguë de l'infarctus cérébral en confrontant les taux sériques de différents marqueurs inflammatoires à l'admission à la qualité de la circulation collatérale appréciée sur l'artériographie cérébrale, avant thrombectomie mécanique.

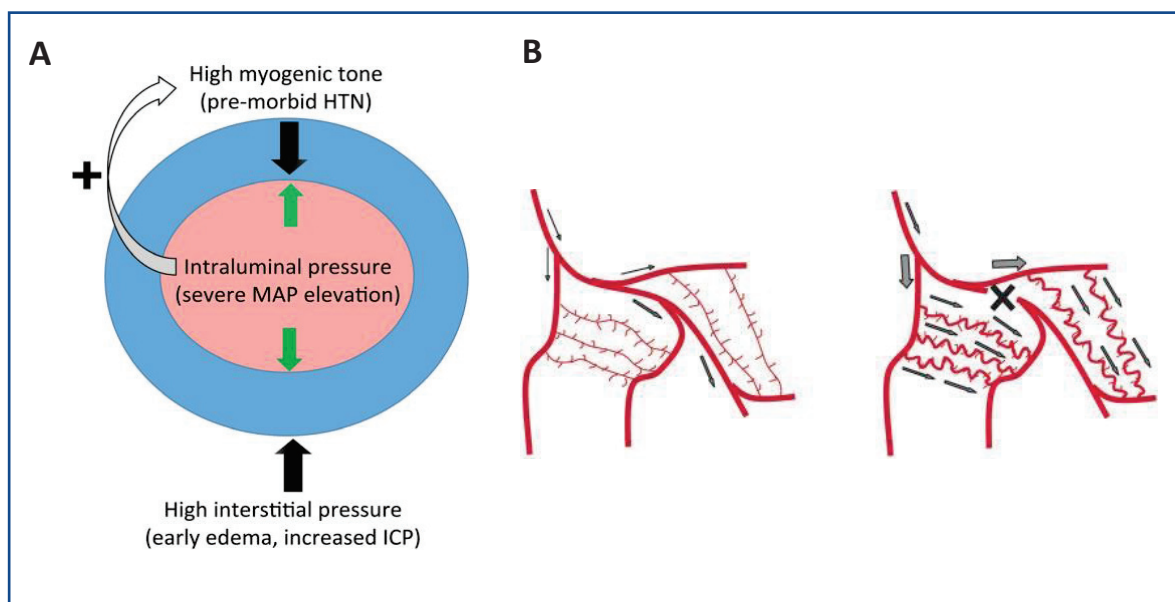


Figure 9 : Illustration des deux hypothèses physiopathologiques avancées pour expliquer la contribution de l'inflammation à la qualité de la circulation collatérale A/ Hypothèse 1: l'œdème précoce augmenterait la pression interstitielle s'exerçant sur les artérioles et conduirait à une réduction de la lumière artériolaire (Rocha and Jovin, 2017) B/ Hypothèse 2: l'occlusion artérielle, représentée ici au niveau de l'artère fémorale d'un lapin, entraîne le recrutement des collatérales selon le gradient de pressions (pressions hautes (en amont de l'occlusion) -> pressions basses (en aval de l'occlusion)) ce qui augmente les forces de cisaillement au niveau de l'endothélium artériolaire et stimulerait l'artériogénèse (Heil *et al.*, 2004) (HTN : hypertension ; MAP : mean arterial pressure ; ICP : intracranial pressure)

Principaux résultats

Nous avons montré qu'une circulation collatérale de bonne qualité était associée à des taux sériques plus faibles de MMP-9 et à des taux sériques plus élevés de MCP-1 à l'admission.

BRIEF REPORT

Matrix Metalloproteinase-9 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Are Associated With Collateral Status in Acute Ischemic Stroke With Large Vessel Occlusion

Laura Mechtouff¹, MD; Thomas Bochaton, MD, PhD; Alexandre Paccalet; Claire Crola Da Silva, PhD; Marielle Buisson, PhD; Camille Amaz; Laurent Derex, MD, PhD; Elodie Ong, MD; Yves Berthezene, MD, PhD; Omer Faruk Eker, MD, PhD; Nathalie Dufay, PhD; Nathan Mewton, MD, PhD; Michel Ovize, MD, PhD; Tae-Hee Cho, MD, PhD; Norbert Nighoghossian, MD, PhD

BACKGROUND AND PURPOSE: In ischemic stroke, inflammatory status may condition the development of collateral circulation. Here we assessed the relationship between systemic inflammatory biomarkers and collateral status in large vessel occlusion before mechanical thrombectomy.

METHODS: HIBISCUS-STROKE is a cohort study including acute ischemic stroke patients with large vessel occlusion treated with mechanical thrombectomy following admission magnetic resonance imaging. MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) and MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) were measured on blood sampling collected at admission. Collateral status was assessed on pretreatment Digital subtraction angiography and categorized into poor (Higashida score, 0–2) and good (Higashida score, 3–4). A multiple logistic regression model was performed to detect independent markers of good collateral status.

RESULTS: One hundred and twenty-two patients were included, of them 71 patients (58.2%) had a good collateral status. In univariate analysis, low MMP-9 levels ($P=0.01$), high MCP-1 levels ($P<0.01$), a low National Institute of Health Stroke Score ($P=0.046$), a high diastolic blood pressure ($P=0.049$), the absence of tandem occlusion ($P=0.046$), a high Alberta Stroke Program Early CT Score ($P<0.01$) and a low volume on the diffusion-weighted imaging ($P<0.01$) were associated with good collateral status. Following multivariate analysis, low MMP-9 levels ($P=0.02$) and high MCP-1 levels ($P<0.01$) remained associated with good collateral status.

CONCLUSIONS: Low MMP-9 and high MCP-1 levels were associated with good pretreatment collateral status in patients with acute ischemic stroke with large vessel occlusion. These results might suggest a relationship between collateral status and inflammation.

Key Words: brain edema ■ collateral circulation ■ digital subtraction angiography ■ matrix metalloproteinase 9 ■ monocyte chemoattractant proteins

The functional status of collaterals may impact the timing of tissue loss and response to reperfusion therapies in acute ischemic stroke (AIS).¹

Collateral development in ischemic stroke depends on a number of factors, including genetic profile, hemodynamic, metabolic and neural mechanisms, and patency of ipsilateral posterior circle of Willis.²

The contribution of inflammation to collateral failure has been suggested through different mechanisms.

Early brain edema which is partly mediated by inflammatory pathways may increase the resistance of collateral arterioles thus contributing to collateral failure.^{3,4} In contrast, some experimental data deriving from cardiovascular research claimed for a beneficial role of inflammation in arteriogenesis that is triggered by fluid shear stress after a sudden occlusion.⁵

Considering all these factors, we assess the relationship between 2 systemic markers of inflammation,

Correspondence to: Laura Mechtouff, MD, Stroke Department, Hospices Civils de Lyon, 59 Blvd Pinel, 69677 Bron. Email laura.mechtouff@chu-lyon.fr

The Data Supplement is available with this article at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/STROKEAHA.120.029395>.

For Sources of Funding and Disclosures, see page 2235

© 2020 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at www.ahajournals.org/journal/str

MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) and MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), and collateral circulation status in the setting of AIS with large vessel occlusion from the HIBISCUS-STROKE (Cohort of Patients to Identify Biological and Imaging Markers of Cardiovascular Outcomes in Stroke) cohort data.

METHODS

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

HIBISCUS-STROKE is an ongoing cohort study including all patients admitted since October 2016 in the Lyon Stroke Center for an AIS with large vessel occlusion treated with mechanical thrombectomy following brain magnetic resonance imaging assessment. The study was approved by the local ethics committee, and all subjects or their relatives signed an informed consent form. MMP-9 and MCP-1 were measured on blood sampling collected at admission before intravenous thrombolysis administration using ELISA test. Pretreatment collateral status on digital subtraction angiography was categorized into poor (Higashida score, 0–2) and good (Higashida score, 3–4).⁶ A multiple logistic regression model was performed using a backward selection procedure. Detailed methods are available in the [Data Supplement](#).

RESULTS

Study Population

Between October 2016 to April 2019, 122 patients were included (Figure 1 in the [Data Supplement](#)). No significant imbalance was observed for the main criteria between included and excluded patients except for baseline National Institute of Health Stroke Scale score and the rate of intracranial internal carotid artery or tandem occlusion ($P < 0.05$; Table 1 in the [Data Supplement](#)).

Among included patients, 71 (58.2%) had good collateral status. The main baseline characteristics according to collateral status are shown in Table 1.

Factors Associated With Collateral Status

In univariate analysis, low MMP-9 and high MCP-1 levels at admission were significantly associated with good collateral status as well as a low National Institute of Health Stroke Scale score, a high diastolic blood pressure, the absence of tandem occlusion, a high Alberta Stroke Program Early CT Score and a lower volume on the diffusion-weighted imaging (both $P < 0.01$; Figure and Table 2).

In multivariate analysis, low MMP-9 levels, high MCP-1 levels, a high National Institute of Health Stroke Scale score, and a low diastolic blood pressure were significantly associated with good collateral status (Table 2). We did not find any interaction between diffusion-weighted

Table 1. Baseline Characteristics of the Study Population According to the Collateral Status

	Collateral Status		P Value
	Poor (n=51)	Good (n=71)	
Age, y	69±16	69±16	0.92
Male	29 (56.9)	40 (56.3)	1.00
Prestroke mRS score >2	2 (3.9)	6 (8.5)	0.47
Hypertension	22 (43.1)	32 (45.1)	0.86
Diabetes mellitus	6 (11.8)	14 (19.7)	0.32
Hyperlipidemia	7 (13.7)	20 (28.2)	0.08
Current smoking	9 (17.7)	14 (19.7)	0.82
Statin use	11 (21.6)	17 (23.9)	0.83
Baseline NIHSS score	17 [12–19]	13 [7–19]	0.03
SBP, mm Hg	138.6±19.5	139.1±23.2	0.96
DBP, mm Hg	74.1±15.7	80.3±17.9	0.08
Glucose level, mmol/L	6.1 [5.6–7.5]	6.5 [5.7–7.9]	0.50
Etiology			0.11
Cardioembolism	27 (52.9)	45 (63.4)	
LAA	6 (11.8)	9 (12.7)	
Other	7 (13.7)	1 (1.4)	
Undetermined	11 (21.6)	16 (22.5)	
IV thrombolysis	30 (58.8)	35 (49.3)	0.36
Thrombus location			
M1 MCA segment	40 (78.4)	57 (80.3)	0.82
M2 MCA segment	12 (23.5)	15 (21.1)	0.83
Intracranial ICA	14 (27.5)	10 (14.1)	0.11
Tandem occlusion	11 (21.6)	6 (8.5)	0.06
ASPECTS	6 [4–7]	8 [7–9]	<0.01
DWI lesion volume, cc	37.0 [23.0–66.2]	7.2 [2.1–15.9]	<0.01
Onset to admission, min	107 [75–233]	158 [70–275]	0.52
Onset to groin puncture, min	196 [155–313]	240 [167–378]	0.32
MMP-9, ng/mL	759.0 [508.8–1218.7]	522.4 [367.4–1001.8]	0.05
High MMP-9 level	30 (63.8)	24 (39.3)	0.02
MCP-1, pg/mL	54.4 [37.9–81.8]	76.7 [58.3–112.9]	<0.01
High MCP-1 level	16 (33.3)	39 (61.9)	<0.01

Variables are displayed as absolute number (percentage of column total), mean±SD, or median (25th–75th percentiles) as appropriate. ASPECTS indicates Alberta Stroke Program Early CT Score; DBP, diastolic blood pressure; DWI, diffusion-weighted imaging; ICA, intracranial carotid artery; IV, intravenous; LAA, Large-artery atherosclerosis; MCA, middle-cerebral-artery segment; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MMP-9, matrix metalloproteinase 9; NIHSS, National Institute of Health Stroke Scale; and SBP, systolic blood pressure.

imaging lesion volume or diabetes mellitus and MMP-9 or MCP-1 levels.

DISCUSSION

The novelty of this study lies in the baseline assessment of biomarkers and collateral status in patients with AIS with large vessel occlusion. We found that low MMP-9

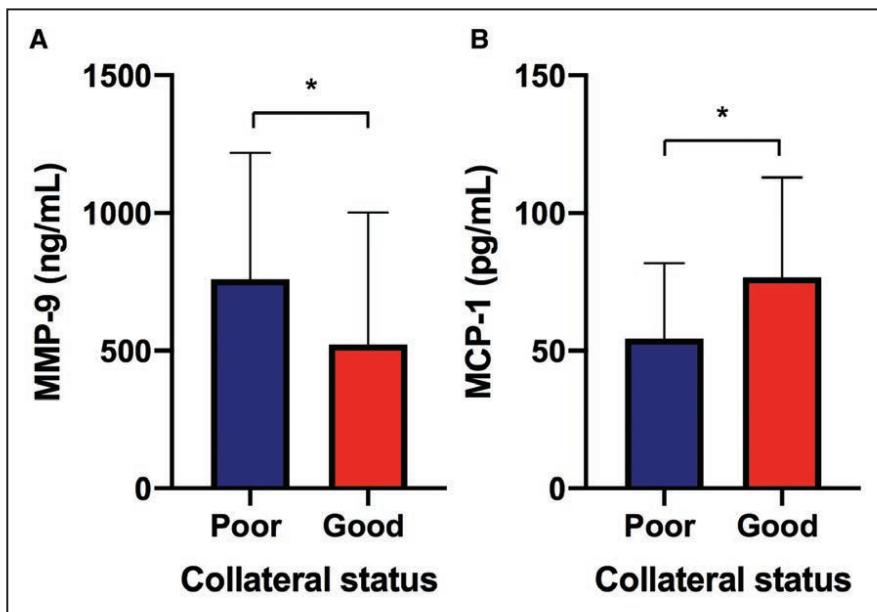


Figure. Biomarkers levels according to collateral status. MMP-9 (matrix metalloproteinase 9; **A**), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1; **B**).

and high MCP-1 levels at admission were associated with good collateral status.

MMP-9 compromises blood-brain-barrier integrity by degrading components of the tight junctions and extracellular matrix, thereby promoting cerebral edema.^{7,8} The resulting higher interstitial pressure may lead to increase of arterioles resistance with subsequent collateral failure.^{3,4} This should deserve further explorations as our preliminary data suggest a relationship between MMP-9 levels and collateral status.

In contrast to MMP-9, MCP-1 levels, in spite of its contribution to ischemia-reperfusion injury, were associated with good collateral status. As a counterpart to the preceding mechanism, experimental data from cardiovascular research have shown that inflammatory reaction is also involved in arteriogenesis. This process is initially triggered by fluid shear stress acting on the collateral endothelium.⁵ After endothelial activation, the recruitment of circulating monocytes is an important step toward proliferation of vascular wall cells and remodeling processes. MCP-1, a chemokine expressed by endothelial cells seems to be actively involved in this process through its chemoattractant effect on monocytes. Indeed MCP-1^{-/-} mice have been

shown to have a reduced monocyte recruitment and collateral artery formation after femoral artery occlusion while local infusion of MCP-1 seems to accelerate even to promote arteriogenesis in rabbits.^{9,10} Although the arteriogenesis process is thought to require several days to be effective, data derived from in vitro study revealed immediate early gene activation in response to fluid shear stress.¹¹ However, it remains an open question as to whether these data can be applied to patients with AIS.

Although pathophysiological and experimental data call for a causal relationship between biomarkers and collateral status, these changes might also be considered as a consequence of AIS.

CONCLUSIONS

In our study conducted in patients with AIS with large vessel occlusion, low MMP-9 and high MCP-1 levels were associated with good pretreatment collateral status. These results suggest a complex intertwined relationship between collateral status and inflammatory process from ischemic-reperfusion injury to arteriogenesis. Our data call for trials assessing whether

Table 2. Factors Associated With Good Collateral Status in Univariate and Multivariate Analysis

	Crude OR (95% CI)	P Value	Adjusted OR (95% CI)	P Value
High vs low MMP-9 level	0.37 (0.17–0.81)	0.01	0.34 (0.14–0.87)	0.02
High vs low MCP-1 level	3.25 (1.48–7.14)	<0.01	4.12 (1.61–10.53)	<0.01
NIHSS score*	0.93 (0.88–0.99)	0.046	0.91 (0.84–0.98)	0.01
DBP†	1.02 (1.00–1.05)	0.049	1.03 (1.01–1.06)	0.02
Tandem occlusion	0.34 (0.12–0.98)	0.046	0.40 (0.10–1.59)	0.19

DBP indicates diastolic blood pressure; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MMP-9: matrix metalloproteinase 9; NIHSS, National Institute of Health Stroke Score; and OR, odds ratio.

*Per 1-unit increase.

†Per 1 mmHg increase.

regulation of these markers might supplement the benefit of reperfusion treatment in enhancing collateral status.

ARTICLE INFORMATION

Received February 12, 2020; accepted April 16, 2020.

Affiliations

Stroke Department (L.M., L.D., E.O., T.-H.C., N.N.), Cardiac Intensive Care Unit (T.B.), Clinical Investigation Center, INSERM 1407 (M.B., C.A., N.M., M.O.), Neuro-radiology Department (Y.B., O.F.E.), and NeuroBioTec, CRB (N.D.), Hospices Civils de Lyon, France. INSERM U1060, CarMeN laboratory (L.M., T.B., A.P., C.C.D.S., E.O., M.O., T.-H.C.) and CREATIS, CNRS UMR 5220, INSERM U1044 (Y.B.), University Lyon 1, France.

Sources of Funding

This work was supported by the RHU MARVELOUS (Recherche Hospitalo-Universitaire [RHU] New MR Imaging to Prevent Cerebral and Myocardial Reperfusion Injury; ANR-16-RHUS-0009) of Université de Lyon, within the program Investissements d'Avenir operated by the French National Research Agency and the Caisse d'aide sociale de l'Éducation nationale (CASDEN) prize from CASDEN/Fondation de l'Avenir.

Disclosures

Dr Nighoghossian reports grants from French National Research agency during the conduct of the study; personal fees from Boehringer Ingelheim and grants from French National research agency outside the submitted work. The other authors report no conflicts.

REFERENCES

- Berkhemer OA, Jansen IG, Beumer D, Fransen PS, van den Berg LA, Yoo AJ, Lingsma HF, Sprengers MES, Jenniskens SFM, Nijeholt GJL, et al; MR CLEAN Investigators. Collateral status on baseline computed tomographic angiography and intra-arterial treatment effect in patients with proximal anterior circulation stroke. *Stroke*. 2016;47:768–776. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011788
- Liebeskind DS. Collateral circulation. *Stroke*. 2003;34:2279–2284. doi: 10.1161/01.STR.0000086465.41263.06
- Rocha M, Jovin TG. Fast versus slow progressors of infarct growth in large vessel occlusion stroke: clinical and research implications. *Stroke*. 2017;48:2621–2627. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017673
- Broocks G, Kemmling A, Meyer L, Nawabi J, Schön G, Fiehler J, Kniep H, Hanning H. Computed tomography angiography collateral profile is directly linked to early edema progression rate in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2019;50:3424–3430. doi: 10.1161/STROKEAHA.119.027062
- Heil M, Schaper W. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res*. 2004;95:449–458. doi: 10.1161/01.RES.0000141145.78900.44
- Higashida RT, Furlan AJ, Roberts H, Tomsick T, Connors B, Barr J, Dillon W, Warach S, Broderick J, Tilley B, et al; Technology Assessment Committee of the American Society of Interventional and Therapeutic Neuroradiology; Technology Assessment Committee of the Society of Interventional Radiology. Trial design and reporting standards for intra-arterial cerebral thrombolysis for acute ischemic stroke. *Stroke*. 2003;34:e109–e137. doi: 10.1161/01.STR.0000082721.62796.09
- Rosenberg GA, Yang Y. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus*. 2007;22:E4. doi: 10.3171/foc.2007.22.5.5
- Rodríguez JA, Sobrino T, Orbe J, Purroy A, Martínez-Vila E, Castillo J, Páramo JA. proMetalloproteinase-10 is associated with brain damage and clinical outcome in acute ischemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2013;11:1464–1473. doi: 10.1111/jth.12312
- Voskuil M, Hoefler IE, van Royen N, Hua J, de Graaf S, Bode C, Buschmann IR, Piek JJ. Abnormal monocyte recruitment and collateral artery formation in monocyte chemoattractant protein-1 deficient mice. *Vasc Med*. 2004;9:287–292. doi: 10.1191/1358863x04vm571oa
- Hoefler IE, van Royen N, Buschmann IR, Piek JJ, Schaper W. Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovasc Res*. 2001;49:609–617. doi: 10.1016/s0008-6363(00)00243-1
- Shyy YJ, Hsieh HJ, Usami S, Chien S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemoattractant protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:4678–4682. doi: 10.1073/pnas.91.11.4678

STROKE

SUPPLEMENTAL MATERIAL

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

Supplemental Methods

1/ Study population

HIBISCUS-STROKE is an ongoing cohort study including all patients admitted since October 2016 in the Lyon Stroke Center for an acute ischemic stroke (AIS) with large vessel occlusion (LVO) treated with mechanical thrombectomy (MT) following brain magnetic resonance imaging (MRI) assessment. Patients without interpretable data about collateral status as well as patients with known inflammatory disease, active malignancy, vasculitis, antibiotics at admission, myocardial infarction or major surgery in the 30 previous days were excluded.

The study was approved by the local ethics committee and all subjects or their relatives signed an informed consent form.

2/ Data collection

Baseline data on demographic characteristics, prestroke modified rankin scale (mRS) score, risk factors, medical history, and use of medications were collected at admission. Neurological status was assessed by board certified neurologists using National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) score at admission. Stroke subtype was classified according to the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) criteria.¹

3/ Neuroimaging

All MRIs were performed with 1.5-Tesla Intera or 3-Tesla Achieva scanners (Philips, Best, Netherlands). The admission MRI protocol included fluid-attenuated inversion recovery, T2-gradient echo, diffusion-weighted imaging (DWI), time-of-flight MRA and perfusion-weighted imaging. A stroke neurologist (T-H. C.) with expertise in neuroradiology, blinded to clinical and laboratory data, independently reviewed both admission and follow-up MRI using a dedicated post-processing work station (3D slicer software). The acute ischemic lesion was segmented from the baseline DWI with a semi-automated method (3D Slicer: <https://www.slicer.org/>) by using both a validated ADC threshold ($ADC < 620 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$) and visual assessment of b1000 images. Lesion volumes were subsequently calculated from the segmentation masks. Alberta Stroke Program Early CT score (ASPECTS) was measured.²

4/ Blood Sampling Protocol

Sera were prepared and stored at -80°C within a 3 hour delay at the NeuroBioTec biobank (CRB-HCL : BB-0033-00046, France). All samples were thawed only once for study measurements. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were measured using ELISA kit from R&D (DuoSet). Sensitivities were 12.2 pg/mL and 10 pg/ml pg/mL respectively.

5/ Statistical analysis

Continuous variables are expressed as means (standard deviation [SD]) or medians (interquartile range [IQR]), and categorical variables as percentages. Normality of distributions was assessed graphically and with the Shapiro-Wilk test. MMP-9 or MCP-1 did not have a normal distribution. Since there is no set threshold, we dichotomized MMP-9 and MCP-1 according to their median in order to have two balanced groups with a suitable size. The association between each variable and collateral status was measured by calculating

1 crude odds ratios (ORs) and 95% CIs using conditional logistic regression analyses. A
2 multiple logistic regression model was performed to detect independent markers of good
3 collateral status. Covariates identified as statistically significant in univariate analyses and
4 likely causal (NIHSS, diastolic blood pressure and cervical internal carotid artery occlusion)
5 were included in multiple logistic regression model along with other potential predictors
6 independent of their univariate p value (age, glucose level and statin use). A backward
7 selection procedure was chosen. ASPECTS score and DWI lesion volume were not entered in
8 the multivariable model as these variables appear less likely as a cause of collateral status
9 than a consequence.³Data have been tested for collinearity using assessment of variance
10 inflation factor (VIF). Interaction between baseline DWI lesion volume and MMP-9 / MCP-1
11 levels (log transformed) have been tested. Two-tailed $p < 0.05$ was considered to be
12 statistically significant. The data were analyzed with Stata Version 15™ (STATA CORP,
13 COLLEGE STATION, TEXAS 77845 USA).
14

1 **References**

2 1. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al.
3 Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter
4 clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24:35-
5 41.

6 2. Barber PA, Demchuk AM, Zhang J, Buchan AM. Validity and reliability of a
7 quantitative computed tomography score in predicting outcome of hyperacute stroke
8 before thrombolytic therapy. *The Lancet*. 2000;355:1670-1674.

9 3. Rocha M, Jovin TG. Fast Versus Slow Progressors of Infarct Growth in Large
10 Vessel Occlusion Stroke: Clinical and Research Implications. *Stroke*. 2017;48:2621-
11 2627.

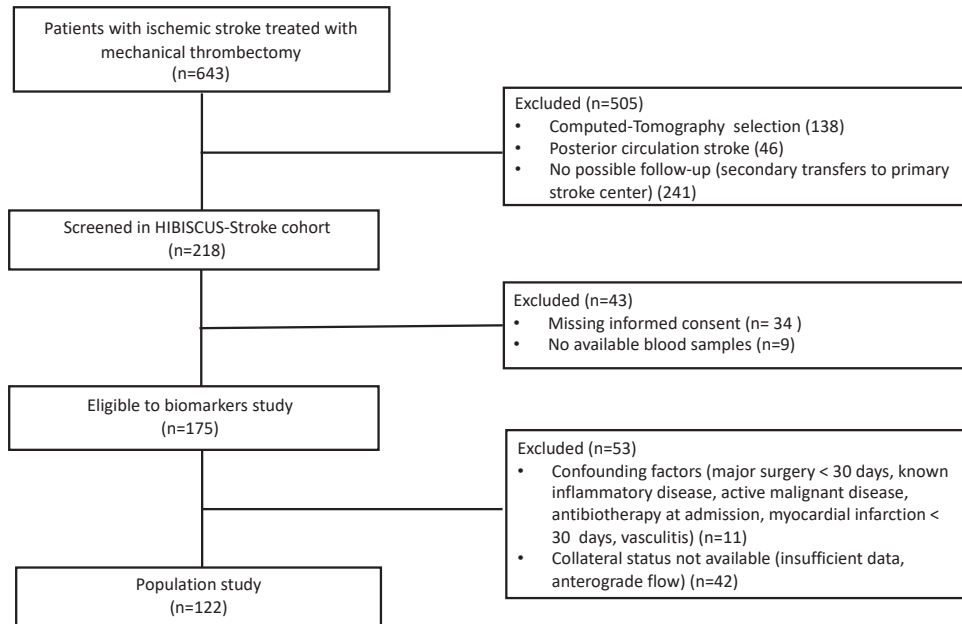
12

13

14

15

1 Supplemental Figure and Table



2

3 Supplemental Figure I. Study flow-chart

4

	Included patients (n=122)	Excluded patients (n=521)	p- value
Age, years	69 +/- 16	71 +/- 15	0.11
Male	69 (56.6)	300 (49.2)	0.17
Baseline NIHSS score	15 [8-19]	17 [11-21]	<0.01
IV thrombolysis	65 (53.3)	343 (56.7)	0.49
Onset to IV thrombolysis, min	130 [105-180]	140 [115-185]	0.5
Onset to reperfusion, min	254 [197-358]	275 [200-354]	0.81
Thrombus location			
M1 MCA segment	97 (79.5)	436 (71.5)	0.08
M2 MCA segment	24 (19.7)	84 (13.8)	0.1
Intracranial ICA	24 (19.7)	183 (30.0)	0.02
Tandem occlusion	17 (13.9)	137 (22.5)	0.04
ASPECTS	7 [6-8]	7 [6-8]	0.50

1 NIHSS: National Institute of Health Stroke Score, IV: intravenous, MCA: middle-cerebral-
2 artery segment, ICA: intracranial carotid artery, ASPECTS: Alberta Stroke Program Early CT
3 score. Variables are displayed as absolute number (percentage of column total), mean ± SD,
4 or median (25th–75th percentiles) as appropriate.

5

6 **Supplemental Table I.** Baseline characteristics of included and excluded patients

7

8

9

Etude 2 : Association entre le taux sérique de MMP-9 et le risque de transformation hémorragique et de croissance des lésions à l'ère de la thrombectomie mécanique

Contexte et état de la question

La MMP-9 intervient à la phase aiguë de l'infarctus cérébral comme en témoigne l'augmentation précoce de sa concentration (Ramos-Fernandez, Bellolio and Stead, 2011; Cojocarui *et al.*, 2012; Misra *et al.*, 2020). Son action protéolytique dirigée contre la matrice extra-cellulaire et les jonctions serrées compromet la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et favorise l'œdème vasogénique (Woessner, 1991; Rosenberg *et al.*, 1996; Rosenberg, Estrada and Dencoff, 1998). Une étude portant sur un nombre limité de patients a également montré que le taux de MMP-9 était associé à la croissance des lésions en cas d'occlusion de l'artère sylvienne traitée par thrombolyse intraveineuse, sans prendre en compte l'élément majeur qu'est la recanalisation artérielle (Rosell *et al.*, 2005). Plusieurs études convergentes ont montré que le taux de MMP-9 était associé au risque de transformation hémorragique spontanément ou après thrombolyse intraveineuse (Castellanos *et al.*, 2003, 2007; Montaner, Molina, *et al.*, 2003; Ning *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2008; Inzitari *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018). Le rôle de la MMP-9 sur la croissance des lésions et le risque de transformation hémorragique n'a pas été documenté jusqu'à présent dans le cadre de la thrombectomie mécanique alors que la reperfusion active les MMPs et potentialise les lésions de la barrière hémato-encéphalique (Lu *et al.*, 2008).

Nous avons eu pour objectif dans ce deuxième travail de décrire la cinétique de MMP-9 dans le sérum et d'évaluer l'association entre le taux sérique de MMP-9 et i/ la croissance des lésions (volume en FLAIR à J6 - volume en diffusion à l'admission) et ii/ le risque de transformation hémorragique dans le cadre de la thrombectomie mécanique au sein de la cohorte HIBISCUS-STROKE.

Principaux résultats

Nous avons constaté que le taux sérique de MMP-9 était maximal 6 heures après l'admission et qu'il était associé à la croissance des lésions et au risque de transformation hémorragique, le plus souvent mineure, dans le cadre de la thrombectomie mécanique.



Matrix Metalloproteinase-9 Relationship With Infarct Growth and Hemorrhagic Transformation in the Era of Thrombectomy

Laura Mechtouff^{1,2*}, Thomas Bochaton^{2,3}, Alexandre Paccalet², Claire Crola Da Silva², Marielle Buisson⁴, Camille Amaz⁴, Morgane Bouin⁵, Laurent Derex¹, Elodie Ong^{1,2}, Yves Berthezene^{6,7}, Omer Faruk Eker⁶, Nathalie Dufay⁸, Nathan Mewton⁴, Michel Ovize^{2,4}, Norbert Nighoghossian^{1,2} and Tae-Hee Cho^{1,2}

¹ Stroke Department, Pierre Wertheimer Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, ² CarMeN, INSERM U.1060/Université Lyon1/INRA U. 1397/INSA Lyon/Hospices Civils Lyon, Université de Lyon, Lyon, France, ³ Cardiac Intensive Care Unit, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, ⁴ Clinical Investigation Center, INSERM 1407, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, ⁵ Cellule Recherche Imagerie, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, ⁶ Neuroradiology Department, Pierre Wertheimer Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, ⁷ CREATIS, CNRS UMR 5220, INSERM U1044, University Lyon 1, Lyon, France, ⁸ NeuroBioTec, CRB, Pierre Wertheimer Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Laszlo Csiba,
University of Debrecen, Hungary

Reviewed by:

Amir Shaban,
University of Iowa Hospitals and
Clinics, United States
Georgios Tsvigoulis,
National and Kapodistrian University
of Athens, Greece

*Correspondence:

Laura Mechtouff
laura.mechtouff@chu-lyon.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Stroke,
a section of the journal
Frontiers in Neurology

Received: 14 February 2020

Accepted: 30 April 2020

Published: 09 June 2020

Citation:

Mechtouff L, Bochaton T, Paccalet A, Crola Da Silva C, Buisson M, Amaz C, Bouin M, Derex L, Ong E, Berthezene Y, Eker OF, Dufay N, Mewton N, Ovize M, Nighoghossian N and Cho T-H (2020) Matrix Metalloproteinase-9 Relationship With Infarct Growth and Hemorrhagic Transformation in the Era of Thrombectomy. *Front. Neurol.* 11:473. doi: 10.3389/fneur.2020.00473

Objective: To assess the relationship between matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), a proteolytic enzyme involved in the breakdown of the blood-brain barrier, and infarct growth and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke (AIS) with large vessel occlusion (LVO) in the era of mechanical thrombectomy (MT) using the kinetics of MMP-9 and sequential magnetic resonance imaging (MRI).

Methods: HIBISCUS-STROKE is a cohort study including AIS patients with LVO treated with MT following admission MRI. Patients underwent sequential assessment of MMP-9, follow-up CT at day 1, and MRI at day 6. The CT scan at day 1 classified any hemorrhagic transformation according to the European Co-operative Acute Stroke Study-II (ECASS II) classification. Infarct growth was defined as the difference between final Fluid-Attenuated Inversion Recovery volume and baseline diffusion-weighted imaging volume. Conditional logistic regression analyses were adjusted for main confounding variables including reperfusion status.

Results: One hundred and forty-eight patients represent the study population. A high MMP-9 level at 6 h from admission (H6) ($p = 0.02$), a high glucose level ($p = 0.01$), a high temperature ($p = 0.04$), and lack of reperfusion ($p = 0.02$) were associated with infarct growth. A high MMP-9 level at H6 ($p = 0.03$), a high glucose level ($p = 0.03$) and a long delay from symptom onset to groin puncture ($p = 0.01$) were associated with hemorrhagic transformation.

Conclusions: In this MT cohort study, MMP-9 level at H6 predicts infarct growth and hemorrhagic transformation.

Keywords: stroke, matrix metalloproteinase 9, MRI, thrombectomy, thrombolytic therapy

INTRODUCTION

Ischemia-reperfusion injury in stroke is defined as a biochemical cascade causing a deterioration of ischemic brain tissue that parallels and antagonizes the beneficial effect of reperfusion (1). A key feature of this process is the proteolytic breakdown of the blood-brain barrier (BBB) vasculature. The increase of BBB permeability is mediated by activation of matrix metalloproteinase (MMP), and especially MMP-9 (2, 3).

So far, the importance of MMP-9 on infarct growth and risk of hemorrhagic transformation has not been explored in relation to mechanical thrombectomy (MT). In the context of intravenous (IV) thrombolysis, early increase of MMP-9 expression may promote hemorrhagic transformation but also infarct growth with subsequent influence on neurological disability (4–12). Since restoration of the blood supply following MT might be more abrupt and potentially cause greater BBB damage despite a timely and successful reperfusion, an appropriate assessment of MMP-9 activity in this setting may provide additional insight into reperfusion injury related to MT (13). We sought to determine whether early MMP-9 level is associated with infarct growth and hemorrhagic transformation. For this purpose, a sequential assessment of MMP-9 and ischemic damage using MRI was implemented in the setting of MT.

METHODS

Study Population

HIBISCUS-STROKE is an ongoing cohort study including all patients admitted since October 2016 in the Lyon Stroke Department for an acute ischemic stroke (AIS) with large vessel occlusion (LVO) treated either within 0–6 h or 6–24 h time window with MT following brain magnetic resonance imaging (MRI) assessment. Patients with Computed-Tomography at admission, with posterior circulation stroke, without follow-up planned in our institution (secondary transfers to primary stroke center), without informed consent and without available blood samples were excluded from the HIBISCUS-STROKE cohort. Among patients included in the HIBISCUS-STROKE cohort, those with known inflammatory disease, active malignancy, vasculitis, antibiotics at admission, myocardial infarction, or major surgery in the 30 previous days were excluded in order not to skew the results of the biomarkers analysis. All patients underwent a sequential assessment of systemic MMP-9 level. Peripheral blood samples were collected from each patient: at admission (H0), 6 h (H6), 24 h (H24), and 48 h (H48) from admission. A CT scan was performed at day 1 in order to rule out any hemorrhagic transformation. Final infarct size was assessed on follow-up MRI at day 6 (Figure 1).

Baseline data on demographic characteristics, lifestyle risk factors, medical history, and use of medications were collected at hospital admission. Neurological status was assessed by board certified neurologists using National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) score at admission, and the modified rankin scale (mRS) score at 3 months during a face-to-face follow-up visit. Poor outcome was defined as 3-month mRS score > 2. Stroke

subtype was classified according to the Trial of Org 10,172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) criteria (14).

The study was approved by the local ethics committee and all subjects or their relatives signed an informed consent form.

Neuroimaging

All MRIs were performed with 1.5-Tesla Intera or 3-Tesla Achieva scanners (Philips, Best, Netherlands). The admission MRI protocol included fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR), T2-gradient echo, diffusion-weighted imaging (DWI), time-of-flight MRA, and perfusion-weighted imaging. The CT scan at day 1 classified any hemorrhagic transformation according to the European Co-operative Acute Stroke Study-II (ECASS II) classification (15). The follow-up MRI protocol at day 6 included FLAIR sequence. A stroke neurologist (T-H. C.) with expertise in neuroradiology, blinded to clinical and laboratory data, independently reviewed both admission and follow-up MRI using a dedicated post-processing work station (3D slicer software). The acute ischemic lesion was segmented from the baseline DWI with a semi-automated method (3D Slicer: <https://www.slicer.org/>) by using both a validated ADC threshold ($ADC < 620 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$) and visual assessment of b1000 images. The final infarct was identified on day-6 FLAIR images using 3D Slicer. Lesion volumes were subsequently calculated from the segmentation masks. Infarct growth was defined as the difference between final volume on the FLAIR-sequence and baseline volume on the DWI-sequence. Alberta Stroke Program Early CT score (ASPECTS) was measured on baseline DWI (16). Successful reperfusion was defined as thrombolysis in cerebral infarction score (TICI) $\geq 2b$ (17).

Blood Sampling Protocol

White blood cells (WBC) count and high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) were routinely measured at admission. MMP-9 level was measured using DuoSet[®] ELISA Development Kits (R&D Systems). Sera were prepared and stored at -80°C within a 3 h delay at the NeuroBioTec biobank (CRB-HCL: BB-0033-00046, France). All samples were thawed only once for study measurements. Serum samples were diluted at 1/2,000. Sensitivity was 12.2 pg/mL.

Statistical Analysis

Continuous variables are expressed as means (standard deviation [SD]) or medians (interquartile range [IQR]), and categorical variables as percentages. Medians were compared using the Mann–Whitney or Kruskal–Wallis test for independent samples. The Wilcoxon signed rank test was performed for matched samples. Percentages were compared using the Fishers exact test. Spearman correlation coefficients (r) were calculated between variables. Analyses were focused on the early MMP-9 peak at H6. Normality of distributions was assessed graphically and with the Shapiro–Wilk test. As MMP-9, infarct growth, WBC count, and hsCRP were not normally distributed, we dichotomized them according to their median. The association between MMP-9 level at H6 and infarct growth and hemorrhagic transformation was measured by calculating crude odds ratios (ORs) and 95% CIs using conditional logistic regression analyses. A multiple logistic

regression model was performed to detect independent markers of infarct growth or any hemorrhagic transformation. Covariates with a significant univariate association with infarct growth or hemorrhagic transformation were included in each multivariate model along with other potential predictors independent of their univariate *p*-value, selected a priori. A backward selection procedure was chosen. The models were adjusted for:

- infarct growth: age, sex, glucose level, temperature, baseline volume on the DWI-sequence, stroke onset to groin puncture time, IV thrombolysis, and reperfusion status (NIHSS score and systolic blood pressure not retained by the backward selection),
- hemorrhagic transformation: sex, glucose level, stroke onset to groin puncture time, IV thrombolysis, and baseline volume on the DWI-sequence (age, NIHSS score, and systolic blood pressure not retained by the backward selection).

Two-tailed *p* < 0.05 was considered to be statistically significant. The data were analyzed with Stata Version 15™ (STACORP, COLLEGE STATION, TEXAS 77845 USA).

Data Availability Statement

Further anonymized data can be made available to qualified investigators on request to the corresponding author.

RESULTS

HIBISCUS-STROKE Cohort

Between October 2016 to April 2019, 148 patients met the inclusion criteria (Figure 1). Baseline and follow-up MRI were available and interpretable for 127 (77.4%) patients. The main clinical and imaging characteristics are shown in Table 1. Mean age was 69 ± 15. Sixty percent of patients were men. Median NIHSS score on admission was 15 [9–19]. Median infarct growth was 3.4 cc [–1.3 to 24.6]. Hemorrhagic transformation occurred in 40 patients (27.6%). Ninety-one (61.5%) patients had a good outcome (mRS score 0–2) at 3 months. No patient was lost at the 3-month follow-up.

In our population, MMP-9 levels peaked early at 6 h from admission (*p* = 0.04; Figure 2).

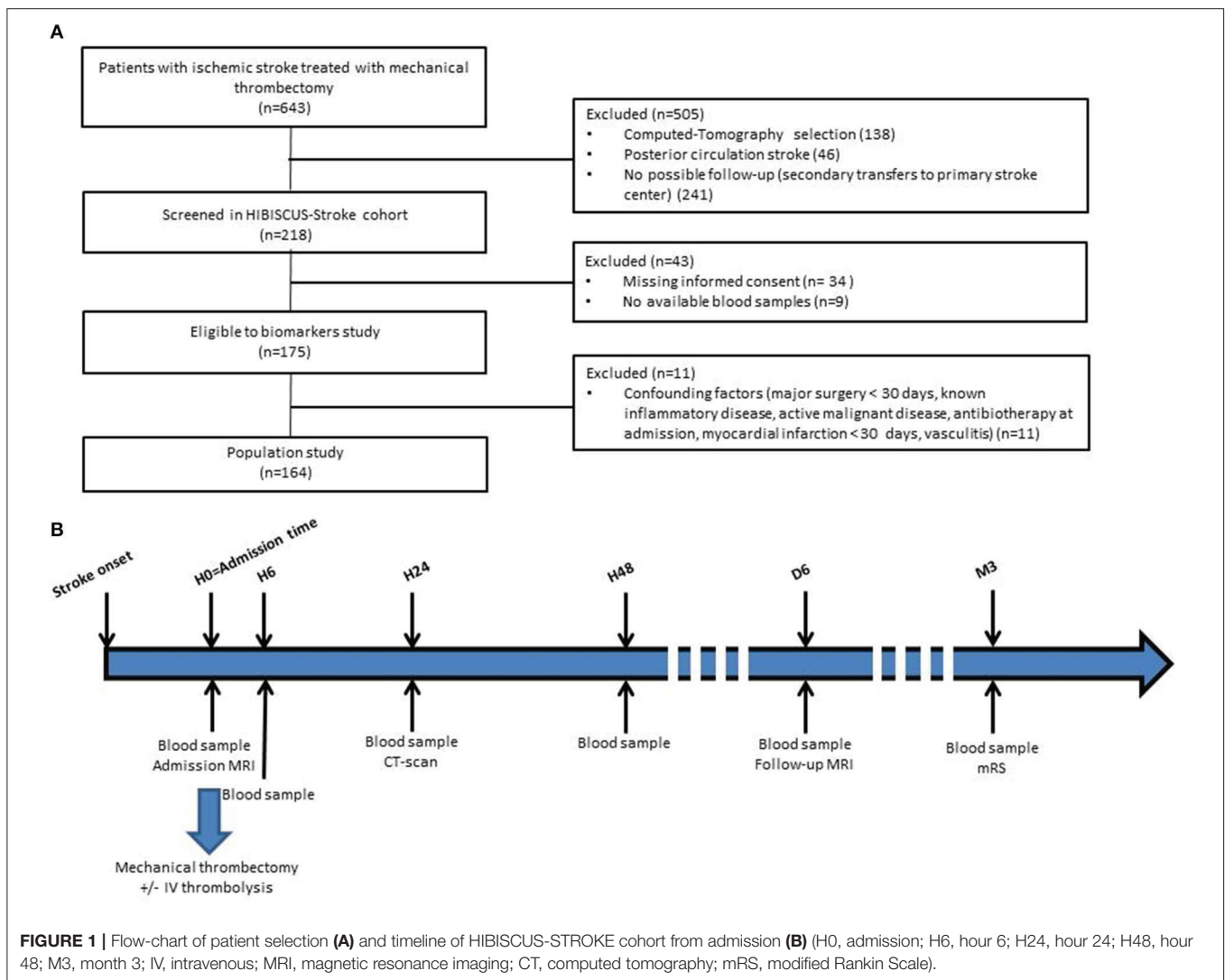


TABLE 1 | Characteristics of the study population.

	MMP-9 level at H6			p-value
	All (n = 148)	Low-level (MMP-9 H6 ≤ 775 ng/mL) (n = 74)	High-level (MMP-9 H6 > 775 ng/mL) (n = 74)	
Age, years	69 ± 15	70 ± 14	67 ± 16	0.15
Male, n (%)	89 (60.1)	46 (62.2)	43 (58.1)	0.74
Prestroke mRS score > 2	8 (5.4)	3 (4.1)	5 (6.8)	0.72
Hypertension	69 (46.6)	37 [50]	32 [43.2]	0.51
Diabetes	25 (16.9)	11 [14.9]	14 [18.9]	0.66
Hyperlipidemia	38 (25.7)	20 [27]	18 [24.3]	0.71
Current smoking	29 (19.6)	12 [16.2]	17 [23.0]	0.41
Baseline NIHSS score	15 [9–19]	13 [7–19]	16 [12–19]	0.05
SBP, mmHg	140.1 ± 22.2	141.9 ± 23.8	138.3 ± 20.6	0.39
DBP, mmHg	77.6 ± 17.4	78.0 ± 18.4	77.2 ± 16.6	0.91
Baseline temperature	36.5 ± 0.6	36.5 ± 0.5	36.5 ± 0.7	0.46
Glucose level, mmol/L	6.27 [5.61–7.59]	6.00 [5.56–6.99]	6.44 [5.78–7.92]	0.28
hsCRP at admission, mg/L	3.3 [1.6–7.8]	3 [1.3–5.9]	3.5 [1.8–11.4]	0.13
WBC count at admission, 10 ⁹ /L	8.3 [6.6–10.0]	7 [5.9–9.0]	9.2 [8.0–11.1]	<0.01
Etiology				0.25
Cardioembolism	79 (53.4)	39 (52.7)	39 (52.7)	
LAA	24 (16.2)	9 (12.2)	12 (16.2)	
Other	16 (10.8)	11 (14.9)	4 (5.4)	
Undetermined	29 (19.6)	15 (20.3)	19 (25.7)	
IV thrombolysis	78 (52.7)	37 (50)	41 (55.4)	0.62
Thrombus location				
M1 MCA segment	118 (79.7)	57 (75.7)	62 (83.8)	0.31
M2 MCA segment	28 (18.9)	17 (23.0)	11 (14.9)	0.29
Intracranial ICA	44 (29.7)	21 (28.4)	23 (31.1)	0.86
Tandem occlusion	30 (20.3)	15 (20.3)	15 (20.3)	1
ASPECTS	7 [6–8]	8 [6–9]	7 [6–8]	0.13
DWI lesion volume, cc	17.4 [5.7–44.2]	13.3 [4.9–34.8]	23.0 [8.0–46.2]	0.18
Reperfusion (TICI2b-3)	123 (83.1)	63 (85.1)	60 (81.1)	0.66
Onset to admission, min	117 [70–282]	124 [73–302]	115 [70–245]	0.72
Onset to groin puncture, min	222 [155–373]	230 [156–403]	218 [155–320]	0.57
Onset to reperfusion, min	255 [195–378]	256 [195–414]	247 [195–358]	0.67
FLAIR lesion volume, cc	26.1 [7.8–61.1]	16.7 [5.1–41.4]	38.7 [13.6–85.7]	0.01
Infarct growth, cc	3.3 [–1.3 to 22.7]	0.8 [–4.4 to 14.8]	4.9 [0.5 to 36.2]	0.02

(Continued)

TABLE 1 | Continued

	MMP-9 level at H6			p-value
	All (n = 148)	Low-level (MMP-9 H6 ≤ 775 ng/mL) (n = 74)	High-level (MMP-9 H6 > 775 ng/mL) (n = 74)	
Any hemorrhagic transformation	40 (27.6)	14 (18.9)	26 (36.6)	0.03
PH type 1 or 2	3 (2.1)	2 (2.7)	1 (1.4)	1
SAH	4 (2.8)	1 (1.4)	3 (4.2)	0.36
mRS score 0–2	91 (61.5)	46 (62.2)	45 (60.8)	1

MMP-9, matrix metalloproteinase 9; H6, hour 6; NIHSS, National Institute of Health Stroke Score; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; hsCRP, High sensitivity C-reactive protein; WBC, white blood cells; LAA, Large-artery atherosclerosis; IV, intravenous; mRS, modified rankin scale; MCA, middle-cerebral-artery segment; ICA, intracranial carotid artery; ASPECTS, Alberta Stroke Program Early CT score; DWI, diffusion-weighted sequence; TICI, thrombolysis in cerebral infarction score; FLAIR, Fluid Attenuated Inversion Recovery; PH, Parenchymal hematoma; SAH, Subarachnoid hemorrhage. Variables are displayed as absolute number (percentage of column total); mean ± SD; or median (25th–75th percentiles) as appropriate. Significant values are shown in bold.

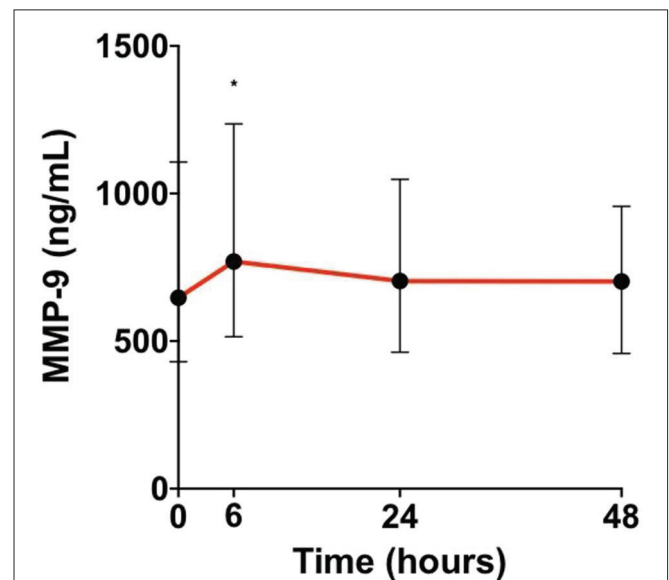


FIGURE 2 | Median matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) levels in patient's sera at admission, 6, 24, and 48 h from admission [H0, admission; H6, hour 6; H24, hour 24; H48, hour 48; Wilcoxon test for matched samples comparing MMP-9 levels at each time with the time before (**p* < 0.05)].

MMP-9 and Infarct Growth

In univariate analyses, a high glucose level [OR = 1.25 (1.02–1.54); *p* = 0.03], a long delay from symptom onset to groin puncture [OR = 1.05 (1.00–1.11) per 30 min increase; *p* = 0.04], lack of IV thrombolysis [OR = 0.42 (0.20–0.88); *p* = 0.02] and lack of reperfusion [OR = 0.27 (0.09–0.79); *p* = 0.02] were associated with infarct growth. A high WBC count [OR = 1.30 (0.53–3.17); *p* = 0.56] and a high hsCRP level [OR = 0.69

(0.28–1.69); $p = 0.42$] at admission were not associated with infarct growth. After adjustment for main confounding variables, a high MMP-9 level at H6 [3.43 (1.23–9.55); $p = 0.02$], a high glucose level [1.43 (1.08–1.90); $p = 0.01$], a high temperature [2.55 (1.03–6.29); $p = 0.04$], and lack of reperfusion [0.16 (0.03–0.77); $p = 0.02$] were independently associated with infarct growth (Table 2).

MMP-9 and Hemorrhagic Transformation

A high MMP-9 level at H6 [OR = 2.48 (1.16–5.27); $p = 0.02$] was associated with hemorrhagic transformation. A high WBC count [OR = 1.96 (0.91–4.25); $p = 0.09$] and a high hsCRP level [OR = 0.57 (0.28–1.27); $p = 0.17$] at admission were not associated with hemorrhagic transformation. After adjustment for main confounding factors, a high MMP-9 level at H6 [2.91 (1.14–7.42); $p = 0.03$], a high glucose level [1.20 (1.02–1.42); $p = 0.03$] and a long delay from symptom onset to groin puncture [OR = 1.08 (1.02–1.14) per 30 min increase; $p = 0.02$] remained significantly associated with hemorrhagic transformation.

DISCUSSION

Our study assessed the association between MMP-9 level and outcome in AIS patients with LVO treated with MT. The study design stands apart from earlier works due to a sequential assessment of both MMP-9 and ischemic damage on MRI. MMP-9 level at 6 h from admission was associated with infarct growth and hemorrhagic transformation.

We observed an early peak at 6 h from admission. Previous studies assessing kinetics of MMP-9 in AIS patients whether or not they are treated with IV thrombolysis with heterogeneous delays from the stroke onset have shown an early increase in the first 24 h (4, 10, 11, 18–22).

Pathological data show the presence of high MMP-9 levels not only in infarct tissue but also in the peri-infarct areas, suggesting MMP-9 involvement in the process of infarct growth (23, 24). A previous study conducted in 24 patients with middle cerebral artery (MCA) occlusion treated with IV thrombolysis found that MMP-9 level was associated with infarct growth at 24 h, but they did not report reperfusion status, which is a major confounding factor when interpreting their results (12). Our study confirms that MMP-9 level at H6 and infarct growth remains associated in the setting of MT after adjustment for reperfusion status.

Numerous studies have documented an increase in MMP-9 levels following AIS, associated with disruption of the BBB, thus promotion of hemorrhagic complications (2, 3, 25). This aspect has received special attention in patients treated with IV thrombolysis (4–9). Indeed, in addition to its thrombolytic action, tissue plasminogen activator (tPA), via activation of MMP-9, may also damage the basal lamina and tight junctions of the cerebral blood vessels, resulting in increased permeability of the BBB and hemorrhagic complications (26). We add to these existing data of MMP-9 activity and hemorrhage risk in AIS patients treated with tPA by examining AIS patients with LVO treated with MT, a therapy with much higher reperfusion rates and one which allows the recording of reperfusion status

TABLE 2 | Predictors of infarct growth and any hemorrhagic transformation in univariate and multivariate analyses.

	crude OR [95% CI]	p-value	adjusted OR [95% CI]	p-value
Infarct growth				
High vs low MMP-9 level at H6	1.93 (0.92–4.01)	0.08	3.43 (1.23–9.55)	0.02
Glucose level ¹	1.25 (1.02–1.54)	0.03	1.43 (1.08–1.90)	0.01
Temperature ²	1.78 (0.93–3.41)	0.08	2.55 (1.03–6.29)	0.04
Reperfusion (TICI 2b–3)	0.27 (0.09–0.79)	0.02	0.16 (0.03–0.77)	0.02
Any hemorrhagic transformation				
High vs. low MMP-9 level at H6	2.48 (1.16–5.27)	0.02	2.91 (1.14–7.42)	0.03
Glucose level ¹	1.10 (0.97–1.24)	0.14	1.20 (1.02–1.42)	0.03
Onset to groin puncture time ³	1.04 (1.00–1.09)	0.06	1.08 (1.02–1.14)	0.01

OR, odds ratio; MMP-9, matrix metalloproteinase 9; H6, hour 6; IV, intravenous; TICI, thrombolysis in cerebral infarction score; ICA, internal carotid artery.

¹per 1 mmol/L increase.

²per 1°C increase.

³per 30 min increase.

Significant values are shown in bold.

after treatment. We found an association between MMP-9 level at H6 and the risk of hemorrhagic transformation, mainly minor. The clinical relevance of this minor bleeding is still debated (27).

The observed association between MMP-9 level at H6 and infarct growth and hemorrhagic transformation do not necessarily imply a cause-effect relationship. Nevertheless, the experimental data currently available on the role of MMP-9 and on the effect of MMP-9 inhibition may be consistent with a causal relationship (28–32). Preclinical animal studies suggest that MMP-9 inhibition can be of therapeutic importance in ischemic stroke although a small pilot study conducted in humans did not show efficacy of this drug on 3-months mRS score in the setting of IV thrombolysis (28–33). Insofar as we have now entered into a new era of highly effective reperfusion, a new approach investigating the potential benefit of compounds which can directly inhibit MMP-9 activity should be considered in future MT trials (34).

We recognize some limitations of our study. First, although the limited sample size and the monocentric design may be considered as a limitation, its major strength lies in sequential assessment of MMP-9 coupled with MRI data within a homogeneous cohort of stroke patients with LVO in the context of MT. Secondly, imaging was performed either on 1.5 or 3T according to MRI magnets availability. However, overall differences in the DWI and FLAIR imaging are usually subtle between both fields strengths as previously documented (35–37). Thirdly, final FLAIR-volume on day 6 may include a significant amount of edema instead of true

infarction although previous studies have reported that it likely reflects final infarct size (38–40). The edema component could be further assessed using non-linear co-registration methods (41). Edema component should be further assessed using post-processing analysis as the nonlinear registration method (41). Fourthly, susceptibility-weighted imaging (SWI) or T2*-weighted gradient echo (GRE) imaging were not performed at day 6. These sequences would have been more sensitive than CT, and might have revealed minor hemorrhagic transformation (Hemorrhagic infarction type 1 and 2) consistent with delayed reperfusion damage following blood brain barrier injury. Lastly, a comprehensive imaging assessment of BBB disruption assessing subarachnoid hemorrhage, gadolinium sulcal enhancement [hyperacute injury marker (HARM)], or microvascular permeability (K2) would have been a more direct measure of MMP-9 action and deserves further investigation (42–44).

In this MT cohort study using sequential assessment of MMP-9 levels and MRI, a high MMP-9 level at H6 predicts infarct growth and hemorrhagic transformation.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/supplementary material.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the study was approved by the local ethics

committee and all subjects or their relatives signed an informed consent form. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LM and TB: major role in the acquisition of data, analysis of the data, drafting the manuscript for intellectual content, AP, CC, MBo, LD, EO, YB, OE, and ND: major role in the acquisition of data, revised the manuscript for intellectual content, MBu: major role in the acquisition of data, analysis of the data, revised the manuscript for intellectual content, CA: analysis of the data, revised the manuscript for intellectual content, NM, MO: design of the study, revised the manuscript for intellectual content, TC: major role in the acquisition of data, analysis of the data, revised the manuscript for intellectual content, NN: design of the study, major role in the acquisition of data, drafting the manuscript for intellectual content.

FUNDING

This work was supported by the RHU MARVELOUS (ANR-16-RHUS-0009) of Université de Lyon, within the program Investissements d'Avenir operated by the French National Research Agency (ANR) and the CASDEN prize from CASDEN/Fondation de l'Avenir awarded to LM.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Karen Reilly for editing assistance.

REFERENCES

- Bai J, Lyden PD. Revisiting cerebral postischemic reperfusion injury: new insights in understanding reperfusion failure, hemorrhage, and edema. *Int J Stroke*. (2015) 10:143–52. doi: 10.1111/ijts.12434
- Pfefferkorn T, Rosenberg GA. Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke*. (2003) 34:2025–30. doi: 10.1161/01.STR.0000083051.93319.28
- Barr TL, Latour LL, Lee K-Y, Schaewe TJ, Luby M, Chang GS, et al. Blood-brain barrier disruption in humans is independently associated with increased matrix metalloproteinase-9. *Stroke*. (2010) 41:e123–8. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.570515
- Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation*. (2003) 107:598–603. doi: 10.1161/01.CIR.0000046451.38849.90
- Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, et al. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke*. (2003) 34:40–6. doi: 10.1161/01.STR.0000046764.57344.31
- Castellanos M, Sobrino T, Millán M, García M, Arenillas J, Nombela E, et al. Serum cellular fibronectin and matrix metalloproteinase-9 as screening biomarkers for the prediction of parenchymal hematoma after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke: a multicenter confirmatory study. *Stroke*. (2007) 38:1855–9. doi: 10.1161/STROKEAHA.106.481556
- Rodríguez JA, Sobrino T, Orbe J, Purroy A, Martínez-Vila E, Castillo J, et al. proMetalloproteinase-10 is associated with brain damage and clinical outcome in acute ischemic stroke. *J Thromb Haemost*. (2013) 11:1464–73. doi: 10.1111/jth.12312
- Inzitari D, Giusti B, Nencini P, Gori AM, Nesi M, Palumbo V, et al. MMP9 variation after thrombolysis is associated with hemorrhagic transformation of lesion and death. *Stroke*. (2013) 44:2901–3. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002274
- Wang L, Wei C, Deng L, Wang Z, Song M, Xiong Y, et al. The accuracy of serum matrix metalloproteinase-9 for predicting hemorrhagic transformation after acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. (2018) 27:1653–65. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.01.023
- Ning M, Furie KL, Koroshetz WJ, Lee H, Barron M, Lederer M, et al. Association between tPA therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke. *Neurology*. (2006) 66:1550–5. doi: 10.1212/01.wnl.0000216133.98416.b4
- Kelly PJ, Morrow JD, Ning M, Koroshetz W, Lo EH, Terry E, et al. Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke: the biomarker evaluation for antioxidant therapies in stroke (BEAT-stroke) study. *Stroke*. (2008) 39:100–4. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.488189
- Rosell A, Alvarez-Sabín J, Arenillas JF, Rovira A, Delgado P, Fernández-Cadenas I, et al. A matrix metalloproteinase protein array reveals a strong relation between MMP-9 and MMP-13 with diffusion-weighted image lesion increase in human stroke. *Stroke*. (2005) 36:1415–20. doi: 10.1161/01.STR.0000170641.01047.cc
- Mizuma A, You JS, Yenari MA. Targeting reperfusion injury in the age of mechanical thrombectomy. *Stroke*. (2018) 49:1796–802. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017286

14. Adams HP Jr, Bendixen BH, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE. Classification of subtype of acute ischemic stroke. *Stroke*. (1993) 24:35–41. doi: 10.1161/01.str.24.1.35
15. Hacke W, Kaste M, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. *JAMA*. (1995) 274:1017–25. doi: 10.1001/jama.1995.03530130023023
16. Barber PA, Demchuk AM, Zhang J, Buchan AM. Validity and reliability of a quantitative computed tomography score in predicting outcome of hyperacute stroke before thrombolytic therapy. *Lancet*. (2000) 355:1670–4. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02237-6
17. Higashida RT, Furlan AJ. Trial design and reporting standards for intra-arterial cerebral thrombolysis for acute ischemic stroke. *Stroke*. (2003) 34:e109–e37. doi: 10.1161/01.STR.0000082721.62796.09
18. Worthmann H, Tryc AB, Goldbecker A, Ma YT, Tountopoulou A, Hahn A, et al. The temporal profile of inflammatory markers and mediators in blood after acute ischemic stroke differs depending on stroke outcome. *Cerebrovasc Dis*. (2010) 30:85–92. doi: 10.1159/000314624
19. Demir R, Ulvi H, Özel L, Özdemir G, Güzelcik M, Aygül R. Relationship between plasma metalloproteinase-9 levels and volume and severity of infarct in patients with acute ischemic stroke. *Acta Neurol Belg*. (2012) 112:351–6. doi: 10.1007/s13760-012-0067-4
20. Sobrino T, Pérez-Mato M, Brea D, Rodríguez-Yáñez M, Blanco M, Castillo J. Temporal profile of molecular signatures associated with circulating endothelial progenitor cells in human ischemic stroke. *J Neurosci Res*. (2012) 90:1788–93. doi: 10.1002/jnr.23068
21. Brouns R, Wauters A, De Surgeloose D, Mariën P, De Deyn PP. Biochemical markers for blood-brain barrier dysfunction in acute ischemic stroke correlate with evolution and outcome. *Eur Neurol*. (2011) 65:23–31. doi: 10.1159/000321965
22. Montaner J, Rovira A, Molina CA, Arenillas JF, Ribó M, Chacón P, et al. Plasmatic level of neuroinflammatory markers predict the extent of diffusion-weighted image lesions in hyperacute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. (2003) 23:1403–7. doi: 10.1097/01.WCB.0000100044.07481.97
23. Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabín J, Fernández-Cadenas I, Ribó M, Molina CA, et al. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke*. (2006) 37:1399–406. doi: 10.1161/01.STR.0000223001.06264.af
24. Amantea D, Russo R, Gliozzi M, Fratto V, Berliocchi L, Bagetta G, Bernardi G, Corasaniti MT. Early upregulation of matrix metalloproteinases following reperfusion triggers neuroinflammatory mediators in brain ischemia in rat. *Int Rev Neurobiol*. (2007) 82:149–69. doi: 10.1016/S0074-7742(07)82008-3
25. Rosenberg GA, Yang Y. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus*. (2007) 22:1–9. doi: 10.3171/foc.2007.22.5.5
26. Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke*. (2002) 33:831–6. doi: 10.1161/hs0302.104542
27. Kaesmacher J, Kaesmacher M, Maegerlein C, Zimmer C, Gersing AS, Wunderlich S, et al. Hemorrhagic transformations after thrombectomy: risk factors and clinical relevance. *Cerebrovasc Dis Basel Switz*. (2017) 43:294–304. doi: 10.1159/000460265
28. Jiang X-F, Namura S, Nagata I. Matrix metalloproteinase inhibitor KB-R7785 attenuates brain damage resulting from permanent focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett*. (2001) 305:41–4. doi: 10.1016/S0304-3940(01)01800-6
29. Nagel S, Su Y, Horstmann S, Heiland S, Gardner H, Koziol J, et al. Minocycline and hypothermia for reperfusion injury after focal cerebral ischemia in the rat-effects on BBB breakdown and MMP expression in the acute and subacute phase. *Brain Res*. (2008) 1188:198–206. doi: 10.1016/j.brainres.2007.10.052
30. Switzer JA, Hess DC, Ergul A, Waller JL, Machado LS, Portik-Dobos V, et al. Matrix metalloproteinase-9 in an exploratory trial of intravenous minocycline for acute ischemic stroke. *Stroke*. (2011) 42:2633–5. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.618215
31. Fan F, Yang J, Xu Y, Guan S. MiR-539 Targets MMP-9 to regulate the permeability of blood-brain barrier in ischemia/reperfusion injury of brain. *Neurochem Res*. (2018) 43:2260–7. doi: 10.1007/s11064-018-2646-0
32. Romanic AM, White RE, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke*. (1998) 29:1020–30. doi: 10.1161/01.STR.29.5.1020
33. Kohler E, Prentice DA, Bates TR, Hankey GJ, Claxton A, van Heerden J, et al. Intravenous minocycline in acute stroke: a randomized, controlled pilot study and meta-analysis. *Stroke*. (2013) 44:2493–9. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.000780
34. Savitz SI, Baron J-C, Yenari MA, Sanossian N, Fisher M. Reconsidering neuroprotection in the reperfusion era. *Stroke*. (2017) 48:3413–9. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017283
35. Rosso C, Drier A, Lacroix D, Mutlu G, Pires C, Lehericy S, et al. Diffusion-weighted MRI in acute stroke within the first 6 hours: 1.5 or 3.0 Tesla? *Neurology*. (2010) 74:1946–53. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181e396d1
36. Kosior RK, Wright CJ, Kosior JC, Kenney C, Scott JN, Frayne R, Hill MD. 3-Tesla versus 1.5-Tesla magnetic resonance diffusion and perfusion imaging in hyperacute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. (2007) 24:361–8. doi: 10.1159/000106983
37. Kuhl CK, Textor J, Gieseke J, von Falkenhausen M, Gernert S, Urbach H, et al. Acute and subacute ischemic stroke at high-field-strength (3.0-T) diffusion-weighted MR imaging: intraindividual comparative study. *Radiology*. (2005) 234:509–16. doi: 10.1148/radiol.2342031323
38. Krongold M, Almekhlafi MA, Demchuk AM, Coutts SB, Frayne R, Eilaghi A. Final infarct volume estimation on 1-week follow-up MR imaging is feasible and is dependent on recanalization status. *NeuroImage Clin*. (2015) 7:1–6. doi: 10.1016/j.nicl.2014.10.010
39. Tourdias T, Renou P, Sibon I, Asselineau J, Bracoud L, Dumoulin M, et al. Final cerebral infarct volume is predictable by MR imaging at 1 week. *Am J Neuroradiol*. (2011) 32:352–8. doi: 10.3174/ajnr.A2271
40. Lu M, Mitsias PD, Ewing JR, Soltanian-Zadeh H, Bagher-Ebadian H, Zhao Q, et al. Predicting final infarct size using acute and subacute multiparametric MRI measurements in patients with ischemic stroke. *J Magn Reson Imaging*. (2005) 21:495–502. doi: 10.1002/jmri.20313
41. Harston GWJ, Carone D, Sheerin F, Jenkinson M, Kennedy J. Quantifying infarct growth and secondary injury volumes: comparing multimodal image registration measures. *Stroke*. (2018) 49:1647–55. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.020788
42. Luby M, Hsia AW, Nadareishvili Z, Cullison K, Pednekar N, Adil MM, et al. Frequency of Blood-brain barrier disruption post-endovascular therapy and multiple thrombectomy passes in acute ischemic stroke patients. *Stroke*. (2019) 50:2241–4. doi: 10.1161/STROKEAHA.119.025914
43. Renú A, Laredo C, Lopez-Rueda A, Llull L, Tudela R, San-Roman L, et al. Vessel wall enhancement and blood-cerebrospinal fluid barrier disruption after mechanical thrombectomy in acute ischemic stroke. *Stroke*. (2017) 48:651–7. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.015648
44. Latour LL, Kang D-W, Ezzeddine MA, Chalela JA, Warach S. Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. *Ann Neurol*. (2004) 56:468–77. doi: 10.1002/ana.20199

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Mechtouff, Bochaton, Paccalet, Crola Da Silva, Buisson, Amaz, Bouin, Derex, Ong, Berthezene, Eker, Dufay, Mewton, Ovize, Nighoghossian and Cho. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Table 1: Characteristics of the study population: additional data

	MMP-9 level at H6			p-value
	All (n=148)	Low-level (MMP-9 H6 ≤ 775 ng/mL) (n=74)	High-level (MMP-9 H6 >775 ng/mL) (n=74)	
hsCRP at admission, mg/L	3.3 [1.6-7.8]	3 [1.3-5.9]	3.5 [1.8-11.4]	0.13
WBC count at admission, 10 ⁹ /L	8.3 [6.6-10.0]	7 [5.9-9.0]	9.2 [8.0-11.1]	<0.01

MMP-9: matrix metalloproteinase 9, H6: hour 6, hsCRP: High sensitivity C-reactive protein, WBC: White Blood Cell

Etude 3 : Association entre le taux sérique d'interleukine-6 et le caractère futile de la reperfusion

La thrombectomie mécanique a clairement démontré son efficacité en cas d'infarctus cérébral lié une occlusion artérielle proximale avec l'obtention d'une reperfusion artérielle dans plus de 70% des cas. Néanmoins, le taux de reperfusion futile, c'est-à-dire de patients ne retrouvant pas leur autonomie en dépit d'une reperfusion artérielle satisfaisante, est proche de 50% (Goyal *et al.*, 2016). Ce découplage est encore mal compris mais pourrait être expliqué, en dehors d'un infarctus déjà étendu lors de la reperfusion, par l'aggravation des lésions du fait des dommages d'ischémie-reperfusion et en particulier du phénomène de « no-reflow » résultant d'une atteinte thromboinflammatoire de la microcirculation (Ames *et al.*, 1968; Bai and Lyden, 2015). Les études expérimentales plaident en faveur du rôle clé de la cytokine IL-6 dans le processus inflammatoire mais également thrombotique au niveau de la microcirculation (Bai and Lyden, 2015; Tang *et al.*, 2015; Pawluk *et al.*, 2020). Chez l'Homme, plusieurs études ont rapporté une association entre le taux d'IL-6 et la sévérité initiale ou le pronostic fonctionnel après un infarctus cérébral (Bustamante *et al.*, 2014; Pusch *et al.*, 2015; Mengel *et al.*, 2019). Ces données ont été confirmées dans le cadre de la thrombectomie mécanique sur un nombre limité de patients, et sans prise en compte de la reperfusion artérielle (Schuppner *et al.*, 2018). Aucune étude n'a documenté jusqu'à présent la relation entre le taux d'IL-6 et la reperfusion futile dans le cadre de la thrombectomie mécanique.

Nous avons eu pour objectif dans ce travail de décrire la cinétique de l'IL-6 dans le sérum et d'évaluer la relation entre le taux sérique d'IL-6 et le pronostic clinique (mRS>2) chez les

patients pour lesquels la reperfusion artérielle est jugée satisfaisante après thrombectomie mécanique (TICI 2b/3) au sein de la cohorte HIBISCUS-STROKE.

Principaux résultats

Nous avons observé que le taux sérique d'IL-6 étaient maximal 24 heures après l'admission et que ce taux étaient associé à la reperfusion futile.

Association of Interleukin-6 levels and futile reperfusion after mechanical thrombectomy

Laura Mechtouff^{1,2}, MD, Thomas Bochaton^{2,3}, MD, PhD, Alexandre Paccalet², Claire Crola Da Silva², PhD, Marielle Buisson⁴, PhD, Camille Amaz⁴, Laurent Derex¹, MD, PhD, Elodie Ong^{1,2}, MD, Yves Berthezene^{5,6}, MD, PhD, Omer Faruk Eker⁵, MD, PhD, Nathalie Dufay⁷, PhD, Nathan Mewton⁴, MD, PhD, Michel Ovize^{2,4}, MD, PhD, Tae-Hee Cho^{1,2}, MD, PhD, Norbert Nighoghossian^{1,2}, MD, PhD

1. Stroke Center, Hospices Civils de Lyon, France
2. INSERM U1060, CarMeN laboratory, University Lyon 1, France
3. Cardiac Intensive Care Unit, Hospices Civils de Lyon, France
4. Clinical Investigation Center, INSERM 1407, Hospices Civils de Lyon, France
5. Neuroradiology Department, Hospices Civils de Lyon, France
6. CREATIS, CNRS UMR 5220, INSERM U1044, University Lyon 1, France
7. NeuroBioTec, CRB, Hospices Civils de Lyon, France

Corresponding author:

Dr Laura Mechtouff
Stroke department, Hospices Civils de Lyon
59 Boulevard Pinel 69677 Bron
Fax: 33(0)472357629
Tel: 33(0)427856747
e-mail:laura.mechtouff@chu-lyon.fr

Laura Mechtouff and Camille Amaz (Hospices Civils de Lyon, France) conducted the statistical analysis.

Manuscript word count: 1599

Abstract word count: 250

Character count for the title (including spaces and punctuation): 89

Number of references: 10

Number of tables: 2

Number of figures: 1

Study funding: supported by the RHU MARVELOUS (ANR-16-RHUS-0009) of Université Claude Bernard Lyon-1 (UCBL), within the program “Investissements d’Avenir” operated by the French National Research Agency (ANR).

Search terms: [6] Infarction, [54] cohort studies, [120] MRI

Study sponsorship or funding:

This work was supported by the RHU MARVELOUS (ANR-16-RHUS-0009) of Université de Lyon, within the program “Investissements d'Avenir” operated by the French National Research Agency (ANR) and the CASDEN prize from CASDEN/Fondation de l'Avenir awarded to Laura Mechtouff.

Disclosure(s):

- L. Mechtouff reports no disclosures relevant to the manuscript.
- T. Bochaton reports no disclosures relevant to the manuscript.
- A. Paccalet reports no disclosures relevant to the manuscript.
- C. Crola Da Silva reports no disclosures relevant to the manuscript.
- M. Buisson reports no disclosures relevant to the manuscript.
- C. Amaz reports no disclosures relevant to the manuscript.
- L. Derex reports no disclosures relevant to the manuscript.
- E. Ong reports no disclosures relevant to the manuscript.
- Y. Berthezene reports no disclosures relevant to the manuscript.
- O. Eker reports no disclosures relevant to the manuscript.
- N. Dufay reports no disclosures relevant to the manuscript.
- N. Mewton reports no disclosures relevant to the manuscript.
- T-H. Cho reports no disclosures relevant to the manuscript.
- M. Ovize reports no disclosures relevant to the manuscript.
- N. Nighoghossian reports no disclosures relevant to the manuscript.

Abstract

Objective: To assess whether interleukin-6 (IL-6) level is a marker of futile reperfusion in acute ischemic stroke (AIS) patients with large vessel occlusion (LVO) treated with mechanical thrombectomy (MT).

Methods

HIBISCUS-STROKE (CoHort of Patients to Identify Biological and Imaging markerS of Cardiovascular Outcomes in Stroke) includes AIS patients treated with MT after magnetic resonance imaging (MRI). We performed a sequential assessment of IL-6 (admission, 6 hours, 24 hours, 48 hours and three months from admission). Among patients with successful reperfusion (thrombolysis in cerebral infarction scale 2b/3), reperfusion was considered as effective if 3-month modified Rankin scale (mRS) score was 0-2 and futile if 3-month mRS score was 3-6. Our model was adjusted for the main confounding variables.

Results

One hundred and sixty-four patients represent the study population. One hundred and thirty-three patients had successful reperfusion (81.1%) while in 46 (34.6%), this one was classified as futile. In single-variable analyses, high IL-6 levels at 6, 24 and 48 hours, in combination with a higher age, a pre-stroke mRS score > 2, a past history of hypertension or diabetes, current smoking, a higher baseline National Institute of Health Stroke Scale Score, the absence of associated intravenous thrombolysis, an intracranial internal carotid artery or a tandem occlusion and an increased infarct growth were associated with futile reperfusion. Following multivariable analyses, a high IL-6 level at 24 hours (odds ratio 6.15, 95% confidence interval 1.71-22.10) remained associated with futile reperfusion.

Conclusions

IL-6 is a marker of futile reperfusion in the setting of MT.

Introduction

The rate of futile reperfusion after mechanical thrombectomy (MT) for acute ischemic stroke (AIS) with large vessel occlusion (LVO) would be around 54%.¹ The "no reflow" phenomenon involving both thrombotic and inflammatory pathways contribute to futile reperfusion.^{2,3} Interleukin-6 (IL-6) plays a key role in this process.⁴ Consistently, several observational studies have shown a relationship between IL-6 levels and stroke severity and outcome, but its role in clinical practice remains controversial⁵ However the relationship between IL-6 and futile reperfusion remains no documented in AIS patients treated with MT. In this context, we assessed whether IL-6 level is a marker of futile reperfusion.

Methods

1/ Study population

HIBISCUS-STROKE (CoHort of Patients to Identify Biological and Imaging markerS of CardiovascUlar Outcomes in Stroke) is an ongoing cohort study starting in October 2016 that included AIS patients with LVO treated with MT after brain magnetic resonance imaging (MRI) assessment in the Lyon Stroke Center. Patients with known inflammatory disease, active malignancy, vasculitis, antibiotics at admission, myocardial infarction or major surgery in the 30 previous days were excluded. Peripheral blood samples were collected from each patient at admission before intravenous (IV) thrombolysis administration, 6 hours, 24 hours, 48 hours and 3-months from admission. A CT scan was performed at day 1 and a follow-up MRI at day 6.

Baseline data on demographic characteristics, medical history including risk factors, were collected at admission. Baseline neurological status was assessed by board certified neurologists using National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) score. The modified Rankin Scale (mRS) score was assessed at 3 months during a face-to-face follow-up visit.

Among patients with successful reperfusion defined as thrombolysis in cerebral infarction (TICI) score ≥ 2 , reperfusion was considered as effective if 3-month mRS score was 0-2 and futile if 3-month mRS score was 3-6.

2/ Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

The study was approved by the local ethics committee and all subjects or their relatives signed an informed consent form (IRB number: 00009118).

3/ Neuroimaging

All MRI studies were performed with 1.5-Tesla Intera or 3-Tesla Achieva scanners (Philips, Best, Netherlands). The admission protocol included fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR), T2-gradient echo, diffusion-weighted imaging (DWI), time-of-flight MRA and perfusion-weighted imaging. A CT scan was performed at day 1 to classify any hemorrhagic transformation according to the European Cooperative Acute Stroke Study II classification. A final MRI was performed at 1 month to map the final infarct on FLAIR. The follow-up MRI protocol at day 6 included FLAIR sequence. A stroke neurologist with expertise in neuroradiology, blinded to clinical data and follow-up independently reviewed MRI using a dedicated post-processing work station (3D slicer software). Alberta Stroke Program Early CT (ASPECT) score and baseline volume on the DWI-sequence as well as final volumes on the FLAIR-sequence were measured. Infarct growth corresponds the difference between final and baseline volume. Pretreatment collateral status was categorized into poor (Higashida score 0-2) and good (Higashida score 3-4).

4/ Blood Sampling Protocol

White blood cells (WBC) count and high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) were routinely measured at admission. IL-6 was measured using ELISA kit from ThermoFisher scientific (Invitrogen). Sensitivity was 2 pg/mL. Sera were stored at -80°C within a 3 hour delay at the NeuroBioTec biobank (CRB-HCL : BB-0033-00046, France). All samples were thawed only once for study measurements.

5/ Statistical analysis

Descriptive statistics are presented are expressed as means +/- standard deviation [SD]) or medians (interquartile range [IQR]) for continuous variables and as absolute number (percentages) for categorical variables. Correlation between IL-6 levels and MRI parameters were performed using spearman rank. Single-variable then a multivariable logistic regression using a backward selection procedure with a p-value threshold of 0.20 was performed to assess independent markers of futile reperfusion among patients with successful reperfusion. Baseline covariates with a significant association with futile reperfusion in the single-variable model were included in the multivariable model along with other potential predictors independent of their p value in the single-variable model, selected a priori as age, baseline NIHSS score and baseline lesion volume.^{6,7} Normality of distributions was assessed graphically and with the Shapiro-Wilk test. As IL-6, hsCRP and WBC didn't have a normal distribution, we dichotomized them according to their median. To prevent expected collinearity between intracranial internal carotid artery (ICA) and tandem occlusion, and between baseline lesion volume and infarct growth, only intracranial ICA occlusion and infarct growth were entered in the multivariable analysis. We performed Receiving operating curves (ROC) for prediction of futile reperfusion in the clinico-radiological model which included potential predictors independent of their p value in the single-variable model, selected a priori (age, baseline NIHSS score and baseline lesion volume) with and without IL-

6 level at 24 hours and compared the two Area Under the Curve (AUC) using DeLong's test. We performed a sensitivity analysis using imputation methods of missing data: last & next method for IL-6 level at 24 hours and last observation carried forward for final lesion volume when data were available otherwise we used the median. The data were analyzed with Stata Version 15™ (STATA CORP, COLLEGE STATION, TEXAS 77845 USA).

6/ Data Availability Statement

Further anonymized data can be made available to qualified investigators on request to the corresponding author.

Results

1/ Study population

A total of 643 consecutive AIS patients were treated with MT in our institution from October 2016 to April 2019. Among them, 138 patients with Computed-Tomography at admission, 46 with posterior circulation stroke, 241 without scheduled follow-up visit in our stroke center (secondary transfers from primary stroke center), 34 without informed consent and 9 without available blood samples were excluded. Of the remaining 175 patients included in the HIBISCUS-STROKE cohort, 11 were excluded due to active disease resulting in systemic inflammation. The remaining 164 patients represent the study population. Excluded patients were less likely to be male (223 (46.5%) vs 98 (59.8%)), had a higher baseline NIHSS score (17 [12-21] vs 15 [9-19]) and were less likely to have a M1 segment middle cerebral artery occlusion (336 (70.1%) vs 131 (79.9%)). Mean age was 69 +/- 15 years. Median baseline NIHSS score was 15 [9-19]. Successful reperfusion was obtained in 133 patients (81.1%), of them 46 (34.6%) showed a futile reperfusion. No patient was lost at the 3-month follow-up. The main characteristics of the study population are shown in Table 1.

2/ IL-6 levels in the whole study population

IL-6 levels were significantly lower in patients with effective reperfusion compared to patients with futile and no or partial reperfusion at several time points. Kinetics of IL-6 in different subgroups are presented in figure 1.

IL-6 levels did not correlate with baseline MRI parameters. In contrast, we found a slight but significant correlation between IL-6 levels at 48 hours and infarct growth (ρ 0.22). No association was found between IL-6 levels at admission and collateral status (odds ratio (OR) 0.82, 95% confidence interval (CI) 0.39-1.74).

3/ Factors associated with futile reperfusion

Single-variable analyses showed that high IL-6 levels at 6 (OR 2.49, 95% CI 1.14-5.46), 24 and 48 hours (OR 3.24, 95% CI 1.47-7.15) were associated with futile reperfusion in combination with a higher age, a prestroke mRS score > 2 , a past history of hypertension or diabetes, current smoking, a higher baseline NIHSS score, the absence of associated IV thrombolysis and an intracranial ICA or tandem occlusion (table 2). WBC count (OR 0.77, 95% CI 0.36-1.62) and hsCRP level (OR 1.03, 95% CI 0.48-2.19) at admission were not associated with futile reperfusion. We did not find any association between poor collateral status and futile reperfusion (OR 1.07, 95% CI 0.44-2.60). Among follow-up imaging data, an increased infarct growth was significantly associated with futile reperfusion.

The multivariable analysis confirmed that a high IL-6 level at 6 (odds ratio (OR) 3.06, 95% confidence interval (CI) 0.88-10.61), 24 and 48 hours (OR 3.38, 95% CI 1.05-10.89) were associated with futile reperfusion together with a past history of hypertension, a higher baseline NIHSS score, the absence of associated IV thrombolysis and an increased infarct growth (table 2). The addition of IL-6 level at 24 hours to the clinic-radiological model

resulted in a slight but non-significant improvement of discriminatory accuracy for distinguishing futile from effective reperfusion (AUC 0.78 vs 0.72).

4/ Sensitivity analysis

The same covariates were retained in the multivariable model when using an upward selection ($p < 0.5$) as an alternative variable selection procedure. After imputation of missing data, a high IL-6 level at 24 hours remained associated with futile reperfusion (OR 4.47, 95% CI 1.69-11.84).

Discussion

In our study early high levels of IL-6 were independently associated with futile reperfusion in AIS patients with LVO treated with MT. In this context, IL-6 seems a key factor of thromboinflammation and infarct growth.^{2,3,8}

A single study conducted in the setting of MT showed that IL-6 levels were not independently associated with poor outcome defined as 3-month mRS score 5-6 in 41 patients with AIS involving anterior or posterior circulation, without adjustment for reperfusion status.⁹

The relationship between IL-6 levels and futile reperfusion does not necessarily imply a causal relationship. IL-6 may merely reflect ischemic core progression regardless of reperfusion status. Nevertheless IL-6 may also contribute to infarct growth as reported with other systemic markers in the context of thrombectomy.^{4,6,10}

The major strength of our study lies in sequential assessment of IL-6 coupled with MRI data within a homogeneous cohort of AIS patients with LVO in the context of MT. We acknowledge some limitations. First, due to restrictive inclusion criteria, only one quarter of patients treated with MT in our institution were included and differed from excluded patients

in terms of gender, baseline NIHSS score and thrombus location, which may limit generalization. A propensity-weighted analysis would have been relevant as an additional sensitivity analysis but the variables of interest (IL-6 levels and 3-months mRS) were not collected in excluded patients. Second, the limited sample size and the subsequent limited precision with which the identified association is estimated call for further studies. In addition, the lack of follow-up vascular imaging may also prevent the assessment of arterial re-occlusion and/or downstream embolization after the index event that may distort the true incidence of futile reperfusion.

Summary / Conclusion

We found that high IL-6 levels at 24 hours were associated with futile reperfusion in AIS patients with LVO treated with MT.

Name	Location	Role	Contribution
Laura Mechtouff, MD	Hospices Civils de Lyon, France, Université Lyon1, France	Author	Major role in the acquisition of data, analysis of the data, drafting the manuscript for intellectual content
Thomas Bochaton, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, Université Lyon1, France	Author	Major role in the acquisition of data, analysis of the data, drafting the manuscript for intellectual content
Alexandre Paccalet	Université Lyon1, France	Author	Major role in the acquisition of data, revised the manuscript for intellectual content
Claire Crola-Da-Silva, PhD	Université Lyon1, France	Author	Major role in the acquisition of data, revised the manuscript for intellectual content
Marielle Buisson, PharmD	Hospices Civils de Lyon, France	Author	Major role in the acquisition of data, analysis of the data, revised the manuscript for intellectual content
Camille Amaz	Hospices Civils de Lyon, France	Author	Analysis of the data, revised the manuscript for intellectual content
Laurent Derex, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, France	Author	Major role in the acquisition of data
Elodie Ong, MD	Hospices Civils de Lyon, France	Author	Major role in the acquisition of data
Yves Berthezene, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, Université Lyon1, France	Author	Major role in the acquisition of data, revised the manuscript for intellectual content
Omer Faruk Eker, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, Université Lyon1, France	Author	Major role in the acquisition of data
Nathalie Dufay, PhD	Hospices Civils de Lyon, France	Author	Major role in the acquisition of data
Nathan Mewton, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, France	Author	Design of the study, revised the manuscript for intellectual content
Tae-Hee Cho, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, Université Lyon1, France	Author	Major role in the acquisition of data, analysis of the data, revised the manuscript for intellectual content
Michel Ovize, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, Université Lyon1, France	Author	Design of the study, revised the manuscript for intellectual content
Norbert Nighoghossian, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, Université Lyon1, France	Author	Design of the study, major role in the acquisition of data, drafting the manuscript for intellectual content

Appendix 1: Authorship

References

1. Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *The Lancet*. 2016;387:1723–1731.
2. De Meyer SF, Denorme F, Langhauser F, Geuss E, Fluri F, Kleinschnitz C. Thromboinflammation in Stroke Brain Damage. *Stroke*. 2016;47:1165–1172.
3. Stoll G, Nieswandt B. Thrombo-inflammation in acute ischaemic stroke — implications for treatment. *Nat Rev Neurol*. 2019;15:473–481.
4. Tang YH, Vital S, Russell J, Seifert H, Neil Granger D. Interleukin-6 mediates enhanced thrombus development in cerebral arterioles following a brief period of focal brain ischemia. *Exp Neurol*. 2015;271:351–357.
5. Bustamante A, Sobrino T, Giralt D, et al. Prognostic value of blood interleukin-6 in the prediction of functional outcome after stroke: A systematic review and meta-analysis. *J Neuroimmunol*. 2014;274:215–224.
6. Boisseau W, Desilles J-P, Fahed R, et al. Neutrophil count predicts poor outcome despite recanalization after endovascular therapy. *Neurology*. 2019;93:e467–e475.
7. Shi Z-S, Liebeskind DS, Xiang B, et al. Predictors of Functional Dependence Despite Successful Revascularization in Large-Vessel Occlusion Strokes. *Stroke*. 2014;45:1977–1984.
8. Clark WM, Lutsep HL. Potential of anticytokine therapies in central nervous system ischaemia. *Expert Opin Biol Ther*. 2001;1:227–237.
9. Schuppner R, Dirks M, Grosse G, et al. ADAMTS-13 Activity Predicts Outcome in Acute Ischaemic Stroke Patients Undergoing Endovascular Treatment. *Thromb Haemost*. 2018;47:758–767.
10. Bustamante A, Ning M, García-Berrocoso T, et al. Usefulness of ADAMTS13 to predict response to recanalization therapies in acute ischemic stroke. *Neurology*. 2018;90:e995–e1004.

Figure legends

Figure 1: Kinetics of interleukine-6 (IL-6) (H0: admission, H6: hour 6, H24: hour 24, H48: hour 48, M3: month 3) (* indicate $p < 0.05$ when testing effective reperfusion to futile reperfusion, * indicate $p < 0.05$ when testing effective reperfusion to no or partial reperfusion)

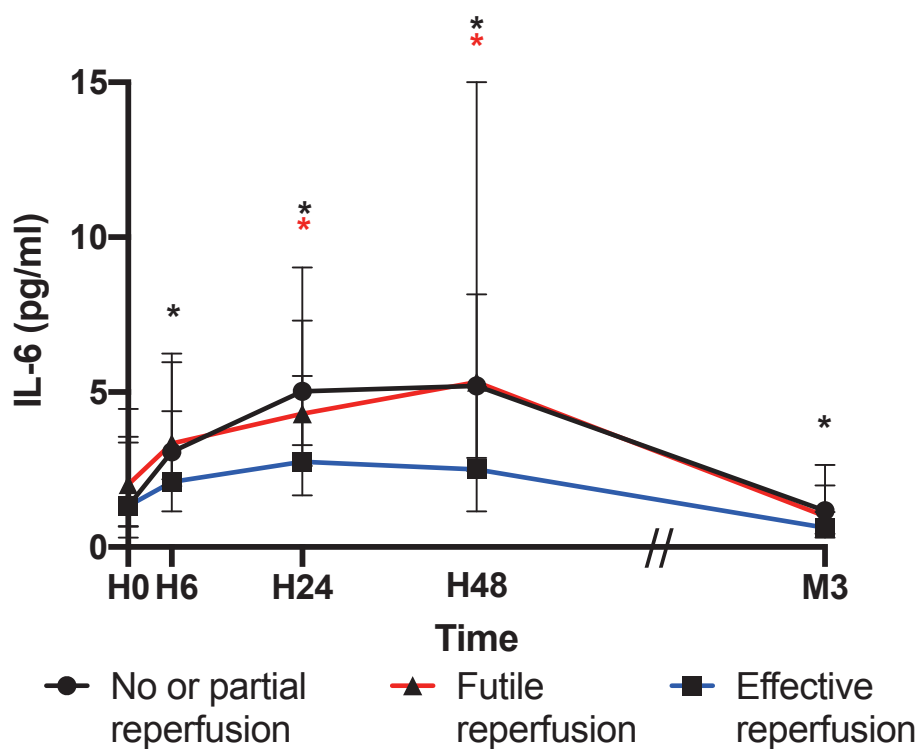


Table 1: Characteristics of the study population

	No or partial reperfusion (n=31)	Successful reperfusion	
		Effective (n=87)	Futile (n=46)
Age, years	68 +/- 17	66 +/- 15	75 +/- 13
Male	18 (58.1)	55 (63.2)	25 (54.4)
Prestroke mRS score>2	2 (6.5)	1 (1.2)	7 (15.2)
Hypertension	13 (41.9)	31 (35.6)	36 (78.3)
Diabetes	4 (12.9)	10 (11.5)	13 (28.3)
Hyperlipidemia	5 (16.1)	21 (24.1)	16 (34.8)
Baseline NIHSS score	15 [9-19]	14 [8-18]	17 [13-21]
SBP, mmHg	139.1 +/- 23.5	138.7 +/- 20.5	144.8 +/- 24.4
DBP, mmHg	77.0 +/- 15.2	78.6 +/- 15.8	75.2 +/- 20.9
Glucose level, mmol/L	6.8 [5.8-8.0]	6.0 [5.4-7.0]	6.8 [5.9-8.7]
WBC count at admission, 10 ⁹ /L ^k	8.7 [6.6-11.6]	8.4 [6.5-10.0]	8.1 [6.9-10.4]
hsCRP at admission, mg/L ^j	3 [1.7-8.2]	3.3 [1.4-7.7]	3.3 [1.9-9.7]
Etiology			
Cardioembolism	14 (45.2)	45 (51.7)	25 (54.4)
LAA	7 (22.6)	10 (11.5)	9 (19.6)
Other	4 (12.9)	9 (10.3)	4 (8.7)
Undetermined	6 (19.3)	23 (26.4)	8 (17.4)
IV thrombolysis	15 (48.4)	54 (62.1)	19 (41.3)
Thrombus location			
M1 MCA segment	24 (77.4)	68 (78.2)	39 (84.8)
M2 MCA segment	7 (22.6)	20 (23.0)	5 (10.9)
Intracranial ICA	9 (29.0)	21 (24.1)	23 (50.0)

Tandem occlusion	6 (19.4)	15 (17.2)	17 (37.0)
ASPECT score	7 [5-8]	7 [7-9]	7 [5-8]
Baseline lesion volume, cc ^a	23.3 [11.7-48.5]	13.2 [4.1-30.2]	23.1 [10.4-54.3]
Poor collaterals ^b	14 (58.3)	26 (38.2)	11 (36.7)
Onset to groin puncture, min	307 [175-540]	187 [146-301]	246 [176-382]
Onset to reperfusion, min ^c	377 [276-1035]	238 [184-352]	285 [208-467]
Final lesion volume, mL ^d	49.5 [20.7-150.3]	13.7 [4.7-37.6]	41.5 [16.3-76.2]
Infarct growth, mL ^d	20.4 [2.9-98.1]	1.0 [-4.4-6.2]	12.7 [-0.1-35.5]
Any hemorrhagic transformation	12/30 (25.5)	18/85 (21.2)	17/45 (37.8)
PH type 1 or 2	1/30 (3.3)	1/85 (1.2)	3/45 (6.7)
SAH	1/30 (3.3)	2/85 (2.4)	2/45 (4.4)
IL-6 level at admission, pg/mL ^e	1.3 [0.3-3.6]	1.3 [0.7-3.4]	2.0 [0.7-4.5]
High IL-6 level at admission	13/28 (46.4)	37/78 (47.4)	25/43 (58.1)
IL-6 level at 6 hours, pg/mL ^f	3.1 [2.0-6.0]	2.1 [1.1-4.4]	3.3 [2.2-6.2]
High IL-6 level at 6 hours	13/25 (52.0)	34/82 (41.5)	26/40 (65.0)
IL-6 level at 24 hours, pg/mL ^g	5.0 [3.3-7.3]	2.7 [1.7-5.5]	4.3 [2.6-9.0]
High IL-6 level at 24 hours	20/28 (71.4)	30/81 (37.0)	26/43 (60.5)
IL-6 level at 48 hours, pg/mL ^h	5.2 [2.9-15.9]	2.5 [1.2-5.2]	5.3 [2.5-8.2]
High IL-6 level at 48 hours	19/28 (67.9)	28/81 (34.6)	28/42 (66.7)
IL-6 level at 3 months, pg/mL ⁱ	1.2 [0.3-2.0]	0.6 [0.3-1.1]	1.0 [0.4-2.6]
High IL-6 level at 3 months	12/20 (60.0)	29/70 (41.4)	17/26 (65.4)

mRS: modified Rankin scale, NIHSS: National Institute of Health Stroke Score, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, LAA: Large-artery atherosclerosis, IV: intravenous, MCA: middle-cerebral-artery segment, ICA: internal carotid artery, ASPECT: Alberta Stroke Program Early CT, PH: parenchymal hematoma, SAH: subarachnoid hemorrhage, IL-6: interleukine-6, hsCRP: High sensitivity C-reactive protein, WBC: white blood cell. Variables are displayed as absolute number / total number (percentage), mean \pm SD, or median (25th–75th percentiles) as appropriate.

- ^a Nineteen patients missing data
- ^b Forty-two patients missing data
- ^c Three patients with available data in the group no or partial reperfusion
- ^d Thirty-seven patients missing data
- ^e Fifteen patients missing data
- ^f Seventeen patients missing data
- ^g Twelve patients missing data
- ^h Thirteen patient missing data
- ⁱ Forty-eight patients missing data
- ^j Fourteen patients missing data
- ^k Eleven patients missing data

Table 2: Factors associated with futile recanalization in single-variable and multivariable analyses

	Single-variable analyses	Multivariable analysis
	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)
High vs low IL-6 level at H24	3.01 (1.39-6.55)	6.15 (1.71-22.10)
Age ¹	1.54 (1.17-2.03)	-
Prestroke mRS score >2	15.44 (1.84-129.78)	-
Hypertension	6.50 (2.85-14.86)	7.99 (2.03-31.42)
Diabetes	3.03 (1.21-7.61)	-
Current smoking	0.27 (0.09-0.82)	-
Baseline NIHSS score ²	1.10 (1.03-1.17)	1.12 (1.02-1.24)
IV thrombolysis	0.43 (0.21-0.89)	0.21 (0.06-0.77)
Intracranial ICA occlusion	3.14 (1.47-6.71)	2.77 (0.76-10.11)
Tandem occlusion	2.81 (1.24-6.37)	-
Infarct growth ³	3.79 (1.25-11.47)	7.24 (1.28-41.08)

OR: odds ratio, CI: confidence interval, IL-6: interleukine-6, H24: hour 24, NIHSS: National Institute of Health Stroke Score, IV: intravenous, ICA: internal carotid artery. Model was adjusted for age, NIHSS score, hypertension, IV thrombolysis, intracranial ICA occlusion and infarct growth (prestroke mRS score, diabetes and current smoking were not retained by the backward procedure).

¹ per 10-year increase

² per 1-unit increase

³ per a log+1 increase

DISCUSSION

Etude 1

L'objectif de ce premier travail était d'évaluer de façon originale la contribution de l'inflammation à la qualité de la circulation collatérale à la phase aiguë d'un infarctus cérébral en rapport avec une occlusion artérielle proximale. A cette fin, nous avons proposé de confronter les taux sériques des marqueurs inflammatoires à l'admission à la qualité de la circulation collatérale évaluée sur l'artériographie cérébrale pré-thérapeutique. Nous avons observé qu'une circulation collatérale de bonne qualité était associée à des taux sériques faibles de MMP-9. MMP-9, est une enzyme, qui par son action protéolytique sur la matrice extracellulaire et les jonctions serrées, compromet l'étanchéité de la barrière hémato-encéphalique et contribue au développement de l'œdème vasogénique (Woessner, 1991; Rosenberg *et al.*, 1996; Rosenberg, Estrada and Dencoff, 1998). Cet œdème, en augmentant la pression interstitielle s'exerçant sur les artéioles, pourrait conduire à une réduction de la lumière artériolaire comme l'ont proposé Rocha et Jovin (Rocha and Jovin, 2017). Cette hypothèse est confortée par une étude récente montrant une association entre la qualité de la circulation collatérale et la vitesse d'installation de l'œdème précoce mesurée sur le scanner cérébral réalisé à l'admission en cas d'occlusion proximale de l'artère sylvienne, sans que l'on puisse formellement affirmer la nature causale de cette relation (Broocks *et al.*, 2019). A l'inverse, nous avons également constaté qu'une circulation collatérale de bonne qualité était associée à des taux élevés de MCP-1. L'implication de MCP-1 dans le processus d'artériogénèse en raison de son effet chémoattractant sur les monocytes pourrait expliquer

cette association. Les données expérimentales obtenues chez l'animal révèlent qu'à l'issue d'une ligature de l'artère fémorale, la modification des gradients de pression inhérente à l'occlusion artérielle entraînerait une augmentation des forces de cisaillement ('fluid shear stress') au niveau de l'endothélium artériolaire ce qui favoriserait l'artériogénèse. La chimiokine MCP-1 par son effet chémoattractant sur les monocytes circulants semble jouer un rôle important et précoce dans ce processus (Ito *et al.*, 1997; Hofer *et al.*, 2001, p. 200; Voskuil *et al.*, 2004). Sept jours après l'occlusion de l'artère fémorale, les souris MCP1 -/- avaient un recrutement monocyttaire moindre et une collatéralité moins développée que les souris contrôles. L'administration intra-artérielle de MCP-1 a permis de restaurer une collatéralité aussi développée que les souris contrôles (Voskuil *et al.*, 2004). De même, une étude menée chez le lapin a montré que l'administration intra-artérielle de MCP-1 précocement après la ligature de l'artère fémorale accélérât le développement des collatérales à 7 jours (Hofer *et al.*, 2001). Les données obtenues à partir de cultures cellulaires montrent que l'expression du gène codant pour MCP-1 au sein des cellules endothéliales est un phénomène précoce résultant des forces de cisaillement (Shyy *et al.*, 1994). La translation de ces résultats expérimentaux à l'ischémie cérébrale mérite toutefois d'être validée. L'association statistique entre ces marqueurs inflammatoires et la qualité de la circulation collatérale ne permet pas de préjuger de la nature causale de la relation. Ces marqueurs sériques peuvent être le reflet de la qualité de la circulation collatérale, bien que les hypothèses physiopathologiques formulées plaident en faveur d'un lien causal.

La méthode de dosage de MMP-9 utilisée dans notre étude (ELISA) demeure également un facteur limitant notre interprétation dès lors qu'elle ne permet pas de distinguer la forme active de la forme inactive (pro-MMP-9). L'utilisation de la zymographie aurait permis un dosage des différentes formes de MMP-9 (Murphy and Crabbe, 1995). Le choix du sérum, basé

sur le matériel décongelé disponible, doit également être pris en considération dans l'interprétation des résultats dans le sens où les taux de MMP-9 sont décrits comme étant plus élevés dans le sérum que dans le plasma avec néanmoins une corrélation positive entre ces taux (Manello, 2008 ; Gerlach *et al.*, 2009). Dans notre étude, l'analyse multivariée repose non pas sur les valeurs absolues mais sur les valeurs relatives d'un patient à l'autre (taux élevé versus taux faible de MMP-9, dichotomie selon la médiane).

Ces résultats illustrent la complexité de la relation entre l'inflammation et la qualité de la circulation collatérale au cours d'un infarctus cérébral. L'effet favorable du fingolimod sur la collatéralité pourrait indirectement témoigner du caractère délétère de l'inflammation. En effet, cet analogue des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate responsable d'une séquestration réversible des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires et donc d'une réduction du nombre de lymphocytes circulants, combiné au rt-PA, améliore la qualité de la collatéralité à 24 heures en cas d'occlusion artérielle proximale persistante (Tian *et al.*, 2018).

Etude 2

L'objectif de ce deuxième travail était de décrire la cinétique de MMP-9 dans le sérum et d'évaluer l'association entre le taux sérique de MMP-9 et la croissance des lésions et le risque de transformation hémorragique à l'ère de la thrombectomie mécanique, dès lors que les données disponibles dans la littérature se limitaient jusqu'à présent au contexte de la thrombolyse intraveineuse.

Nous avons constaté que le taux sérique de MMP-9 était associé à la croissance des lésions, après ajustement sur la recanalisation artérielle, dans le cadre de la thrombectomie mécanique. Ces résultats confortent ceux obtenus dans une étude préalable réalisée sur un nombre limité de patients pris en charge pour une occlusion proximale de l'artère sylvienne traités par thrombolyse intraveineuse, sans que l'on dispose d'information sur la recanalisation artérielle (Rosell *et al.*, 2005). Ces données suggèrent que l'action de MMP-9 dépasse la zone d'infarctus. Les rares données anatomo-pathologiques disponibles chez l'Homme font état de la présence de MMP-9 non seulement dans la zone infarctée mais également en périphérie de cette zone (Rosell *et al.*, 2006). La nature des associations documentées par nos travaux mérite d'être confirmée par des études reposant sur des effectifs plus larges.

Nous avons également constaté que le taux sérique de MMP-9 était maximal 6 heures après l'admission et que ce taux était associé au risque de transformation hémorragique, le plus souvent mineure, dans le cadre de la thrombectomie mécanique. Ces résultats confirment ceux obtenus dans le cadre de la thrombolyse intraveineuse (Castellanos *et al.*, 2003, 2007; Montaner, Molina, *et al.*, 2003; Ning *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2008; Inzitari *et al.*, 2013;

Rodríguez *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018). Il est à noter que la moitié de nos patients étaient traités par thrombolyse intraveineuse. Le rt-PA, outre son action fibrinolytique, stimule la dégranulation des polynucléaires neutrophiles et active la MMP-9 (Sumii and Lo, 2002; Wang *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007; Cuadrado *et al.*, 2008). L'effet délétère du rt-PA pourrait être lié aux MMPs dans le sens où l'utilisation d'un inhibiteur de MMP associé au rt-PA diminue la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, le risque hémorragique et la mortalité dans les études expérimentales (Lapchak, Chapman and Zivin, 2000; Sumii and Lo, 2002; Pfefferkorn and Rosenberg, 2003). La dégradation de la barrière hémato-encéphalique pourrait également potentialiser la neurotoxicité directe du rt-PA en favorisant son extravasation au sein du parenchyme cérébral (Yepes *et al.*, 2009; Harston *et al.*, 2010). Dans notre étude, l'association entre le taux sérique de MMP-9 et le risque hémorragique était indépendant de la thrombolyse intraveineuse selon l'analyse multivariée.

Les données expérimentales plaident pour une relation causale et ouvrent la voie à des thérapeutiques ciblant MMP-9. En effet les études précliniques suggèrent qu'une déficience en MMP-9 (modèle de souris knock-out pour le gène codant pour MMP-9), l'utilisation d'inhibiteurs de MMP ou d'anticorps monoclonaux dirigés contre MMP-9 diminuent la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et/ou le volume de l'infarctus final (Romanic *et al.*, 1998; Rosenberg, Estrada and Dencoff, 1998; Asahi *et al.*, 2001). La minocycline qui a la capacité de réduire l'expression de MMP-9, a été testée chez l'Homme. Bien que les deux premiers essais aient été positifs, le dernier essai clinique réalisé dans le cadre de la thrombolyse intraveineuse n'a pas montré de bénéfice de la minocycline sur le pronostic fonctionnel des patients (Lampl *et al.*, 2007; Murata *et al.*, 2008; Padma Srivastava *et al.*, 2012; Kohler *et al.*, 2013). Une des explications possibles réside dans le rôle dual de MMP-9 avec un effet précoce probablement délétère et un effet plus tardif positif sur le remodelage

neurovasculaire (digestion de la matrice extracellulaire avant régénération, activation des facteurs de croissance...) (Zhao *et al.*, 2006).

La méthode de mesure de la croissance des lésions, qui a consisté à soustraire les volumes (FLAIR à J6 - Diffusion à l'admission) englobe non seulement l'infarctus mais également le volume lié à l'œdème ou au saignement. Une méthode de recalage non linéaire aurait permis de lever cette limite en prenant en compte la distorsion anatomique. Cette approche fera l'objet d'un travail ultérieur dans le cadre de la cohorte HIBISCUS-STROKE (Harston *et al.*, 2018).

Etude 3

Dans ce troisième travail, nous avons eu pour objectif d'évaluer la cinétique d'IL-6 dans le sérum et l'association entre le taux sérique d'IL-6, impliqué dans les phénomènes thromboinflammatoires, à la phase aiguë de l'infarctus cérébral et la reperfusion futile après thrombectomie mécanique au sein de la cohorte HIBISCUS-STROKE. Nous avons constaté que le taux sérique d'IL-6 était maximal 24 heures après l'admission et qu'il était associé à la reperfusion futile. Cette association persistait après ajustement sur des facteurs potentiellement confondants tels que la croissance des lésions. Ces résultats confortent ceux obtenus dans la seule étude ayant jusqu'à présent évalué l'association entre le taux d'IL-6 et le pronostic clinique à 3 mois, sans prise en compte de la reperfusion artérielle, dans le cadre de la thrombectomie mécanique (Schuppner *et al.*, 2018). Cette étude portant sur un nombre limité de patients, pris en charge pour une occlusion artérielle de la circulation antérieure ou postérieure, a montré que le taux d'IL-6 était associé à un mauvais pronostic à 3 mois (mRS 5-6). Plus largement, l'évaluation du rôle prédictif des marqueurs plasmatiques dans la reperfusion futile après thrombectomie mécanique s'est limitée jusqu'à présent à une étude centrée sur l'ADAMTS13 (disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13). La faible concentration de cette enzyme responsable du clivage du facteur de Willebrand, davantage impliquée dans les phénomènes thrombotiques, était associée à la reperfusion futile (Bustamante *et al.*, 2018).

La relation observée entre IL-6 et reperfusion futile n'est pas nécessairement de nature causale. L'augmentation des taux sériques d'IL-6 pourraient être un simple reflet de la sévérité de l'infarctus. Néanmoins, les données expérimentales, et notamment la réduction des

phénomènes microthrombotiques chez des souris traitées par antagoniste du récepteur à l'IL-6 ou déficientes en IL-6, plaident en faveur d'un rôle actif de l'IL-6 dans les processus thromboinflammatoires et le « no-reflow » suspectés dans la recanalisation futile (Bai and Lyden, 2015; Tang *et al.*, 2015).

Ces résultats laissent envisager de nouvelles voies thérapeutiques. L'essai de phase 2 SCIL-STROKE a récemment montré que l'administration d'un antagoniste du récepteur à IL-1 réduisait les concentrations plasmatiques de l'IL-6 et de la CRP mais n'améliorait pas le pronostic clinique après un infarctus cérébral traité dans la plupart des cas par thrombolyse intraveineuse (Smith *et al.*, 2018). Ce traitement, qui a par ailleurs été bien toléré, mériterait d'être réévalué dans le contexte de la thrombectomie mécanique.

Les limites de l'étude sont multiples. Tout d'abord, du fait de l'absence d'imagerie vasculaire de contrôle, nous ne pouvons exclure la survenue secondaire d'une réocclusion artérielle ou d'embolies distales qui pourraient expliquer l'absence de reperfusion tissulaire en l'absence d'atteinte de la microcirculation. Ensuite, l'absence de moyens pertinents permettant d'évaluer la microcirculation siège des phénomènes thrombo-inflammatoires et du « no reflow » limite également l'interprétation des résultats. Enfin, nous avons considéré que la reperfusion était satisfaisante lorsqu'elle était classée indifféremment TICI 2b ou TICI 3 alors que ces deux résultats angiographiques semblent ne pas avoir la même valeur pronostique (Chamorro *et al.*, 2017; Kleine *et al.*, 2017). Néanmoins, il s'agit d'une définition classiquement utilisée dans la littérature (Goyal *et al.*, 2016).

Forces et limites de la cohorte HIBISCUS-STROKE

La cohorte HIBISCUS-STROKE est constituée d'une population homogène, extrêmement bien phénotypée, dans le sens où elle combine à la fois des données biologiques et d'imagerie obtenues de façon séquentielle à la phase aiguë d'un infarctus cérébral en rapport avec une occlusion proximale, à l'ère de la thrombectomie mécanique. Il en résulte un nombre limité de patients et un ratio entre le nombre de patients inclus dans la cohorte et ceux traités par thrombectomie mécanique dans notre centre d'environ $\frac{1}{4}$. Les résultats observés dans cet échantillon très sélectif ne sont sans doute pas extrapolables à l'ensemble de la population traitée par thrombectomie mécanique, bien que les variations du phénotype entre patients inclus et exclus soient globalement limitées.

Une autre limite est inhérente à la nature des prélèvements réalisés. Les dosages sériques des marqueurs inflammatoires ne constituent qu'une d'approche indirecte et ne reflètent pas nécessairement la complexité des mécanismes inflammatoires in situ. Néanmoins, il s'agit d'une méthode facilement réalisable et exploitable in vivo, qui pourrait être utile par la suite pour sélectionner les patients dans le cadre d'essais thérapeutiques.

Synthèse

Ces 3 études apportent un éclairage sur la dynamique des lésions d'ischémie-reperfusion cérébrale dans le cadre de la thrombectomie mécanique.

Nous avons observé que les taux sériques de MMP-9 étaient associés à la qualité de la circulation collatérale à l'admission, au risque de transformation hémorragique à 24 heures et à la croissance des lésions durant les premiers jours, probablement en lien avec l'action protéolytique de MMP-9 sur les constituants de la barrière hémato-encéphalique.

L'association entre le taux de MCP-1 et la qualité de la circulation collatérale est de nature plus incertaine, la translation des données sur l'artériogénèse issues de la littérature cardiovasculaire à l'ischémie cérébrale et le déroulement chronologique étant hypothétiques.

L'association observée entre les taux d'IL-6 et le caractère futile de la reperfusion pourrait faire intervenir les phénomènes thromboinflammatoires de la microcirculation impliqués dans le « no-reflow », bien que l'importance de ce phénomène chez l'Homme soit débattue.

Bien que les taux sériques obtenus ne reflètent pas nécessairement les mécanismes in situ, cette approche réalisable in vivo est essentielle pour appréhender la dynamique de la réaction inflammatoire et peut identifier, couplée à l'imagerie cérébrale voire à l'imagerie de la neuroinflammation, certains marqueurs dans le cadre de la neuroprotection ciblant la réponse inflammatoire.

Les résultats de notre première étude méritent d'être confirmés mais posent la question de la place de l'immunomodulation à la phase aiguë de l'infarctus cérébral pour rehausser la collatéralité et ainsi prolonger la survie de la pénombre ischémique le temps que la perfusion cérébrale soit restaurée.

La MMP-9 et l'IL-6 sont des cibles potentielles de stratégies de neuroprotection ciblant l'inflammation qui pourraient prévenir ou réduire le risque de transformation hémorragique, la croissance lésionnelle ou le caractère futile de la reperfusion dans une fenêtre thérapeutique plus large. Des approches thérapeutiques telles que la minocycline, les antagonistes du récepteur de l'IL-6 ou indirectement de l'IL-1 nécessitent d'être évaluées dans le contexte de la thrombectomie mécanique où la reperfusion, qui est un prérequis, est obtenue dans plus de 70% des cas. La population cible reste à définir. Il pourrait s'agir d'un sous-groupe de patients défini sur la base du volume lésionnel ou des taux de marqueurs circulants ce qui impliquerait un dosage en temps réel et la détermination de valeurs seuils. Les critères d'évaluation de ces traitements sont également à définir. Le critère d'évaluation principal serait clinique, habituellement basé sur le score de rankin modifié à 3 mois mais l'atteinte cognitive est un élément important à intégrer. Les critères d'évaluation secondaires seraient radiologiques et pourraient reposer sur l'imagerie cérébrale subaigue avec coregistration et recalage non linéaire, éventuellement complétée par une séquence de perfusion à la recherche d'un phénomène de « no-reflow » et/ou une imagerie de la neuroinflammation.

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

La cohorte HIBISCUS-STROKE nous a permis d'identifier les marqueurs sériques de l'inflammation associés à la qualité de la circulation collatérale, à la croissance de l'infarctus, au risque de transformation hémorragique et à la reperfusion futile dans le cadre de la thrombectomie mécanique.

Cette approche inédite laisse entrevoir de nouvelles perspectives thérapeutiques en matière de neuroprotection. Dans l'immédiat, nous avons initié un essai clinique (PROTECT-I, financement : Fondation de l'Avenir) dont l'objectif est d'évaluer l'effet du conditionnement ischémique à distance, dont le mode d'action n'est que partiellement connu, sur la préservation de la pénombre ischémique chez des patients traités par thrombectomie mécanique pour un infarctus cérébral en rapport avec une occlusion artérielle proximale. Les études à venir seront fonction des prochaines données obtenues dans le cadre de la cohorte HIBISCUS.

Nous projetons de poursuivre l'exploitation des données de la cohorte HIBISCUS-STROKE en identifiant les marqueurs sériques de l'inflammation associés à l'œdème, à la réversibilité des lésions en diffusion et à la consommation de la pénombre ischémique, après recalage non linéaire prenant en compte la distorsion anatomique. Une approche par analyse de cluster est prévue dès lors que le nombre de patients inclus sera suffisant. Nous prévoyons également d'explorer le système du complément et en particulier la voie des lectines au sein de la cohorte HIBISCUS-STROKE, en collaboration avec l'Institut Mario Negri (S. Fumagalli, Milan) dans le

cadre d'un projet européen ERA-NET. Nous poursuivrons parallèlement les inclusions dans la cohorte HIBISCUS-STROKE en y ajoutant une étude ancillaire (HIBISCUS-STROKE II) dans laquelle une IRM cardiaque sera réalisée à 6 jours à la recherche de complications cardiaques s'intégrant dans le syndrome neurocardiaque.

BIBLIOGRAPHIE

Abdelnaseer, M. M. *et al.* (2017) 'Matrix Metalloproteinase-9 and Recovery of Acute Ischemic Stroke', *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 26(4), pp. 733–740. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.09.043.

Adams, H. P. *et al.* (1993) 'Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment.', *Stroke*, 24(1), pp. 35–41. doi: 10.1161/01.STR.24.1.35.

Albers, G. W. *et al.* (2018) 'Thrombectomy for Stroke at 6 to 16 Hours with Selection by Perfusion Imaging', *New England Journal of Medicine*, 378(8), pp. 708–718. doi: 10.1056/NEJMoa1713973.

Aly, M. *et al.* (2020) 'Follow-up neutrophil-lymphocyte ratio after stroke thrombectomy is an independent biomarker of clinical outcome', *Journal of NeuroInterventional Surgery*, p. neurintsurg-2020-016342. doi: 10.1136/neurintsurg-2020-016342.

Amara, U. *et al.* (2008) 'Interaction Between the Coagulation and Complement System', in Lambris, J. D. (ed.) *Current Topics in Complement II*. New York, NY: Springer US (Advances in Experimental Medicine and Biology), pp. 68–76. doi: 10.1007/978-0-387-78952-1_6.

Ames, A. *et al.* (1968) 'Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon', *The American Journal of Pathology*, 52(2), pp. 437–453.

Amiri-Nikpour, M. R. *et al.* (2015) 'An open-label evaluator-blinded clinical study of minocycline neuroprotection in ischemic stroke: gender-dependent effect', *Acta Neurologica Scandinavica*, 131(1), pp. 45–50. doi: 10.1111/ane.12296.

Anwar, M., Buchweitz-Milton, E. and Weiss, H. R. (1988) 'Effect of prazosin on microvascular perfusion during middle cerebral artery ligation in the rat.', *Circulation Research*, 63(1), pp. 27–34. doi: 10.1161/01.RES.63.1.27.

Asahi, M. *et al.* (2001) 'Effects of Matrix Metalloproteinase-9 Gene Knock-Out on the Proteolysis of Blood–Brain Barrier and White Matter Components after Cerebral Ischemia', *The Journal of Neuroscience*, 21(19), pp. 7724–7732. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-19-07724.2001.

Astrup, J. *et al.* (1977) 'Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia.', *Stroke*, 8(1), pp. 51–57. doi: 10.1161/01.STR.8.1.51.

Astrup, J., Siesjö, B. K. and Symon, L. (1981) 'Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra.', *Stroke*, 12(6), pp. 723–725. doi: 10.1161/01.STR.12.6.723.

Audebert, H. J. *et al.* (2004) 'Systemic Inflammatory Response Depends on Initial Stroke Severity but Is Attenuated by Successful Thrombolysis', *Stroke*, 35(9), pp. 2128–2133. doi: 10.1161/01.STR.0000137607.61697.77.

- Bai, J. and Lyden, P. D. (2015) 'Revisiting Cerebral Postischemic Reperfusion Injury: New Insights in Understanding Reperfusion Failure, Hemorrhage, and Edema', *International Journal of Stroke*, 10(2), pp. 143–152. doi: 10.1111/ijss.12434.
- Banati, R.B. (2003) 'Neuropathological imaging: in vivo detection of glial activation as a measure of disease and adaptive change in the brain', *Br Med Bull*, 65, pp. 121-31. doi: 10.1093/bmb/65.1.121.
- Bang, O. Y. *et al.* (2011) 'Collateral Flow Averts Hemorrhagic Transformation After Endovascular Therapy for Acute Ischemic Stroke', *Stroke*, 42(8), pp. 2235–2239. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.604603.
- Banwell, V., Sena, E. S. and Macleod, M. R. (2009) 'Systematic Review and Stratified Meta-analysis of the Efficacy of Interleukin-1 Receptor Antagonist in Animal Models of Stroke', *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 18(4), pp. 269–276. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2008.11.009.
- Baron, J.-C. (1999) 'Mapping the Ischaemic Penumbra with PET: Implications for Acute Stroke Treatment', *Cerebrovascular Diseases*, 9(4), pp. 193–201. doi: 10.1159/000015955.
- Baron, J.-C. *et al.* (2014) 'Selective neuronal loss in ischemic stroke and cerebrovascular disease', *J Cereb Blood Flow Metab*, 34(1), pp. 2-18. doi: 10.1038/jcbfm.2013.188.
- Barr, T. L. *et al.* (2010) 'Blood–Brain Barrier Disruption in Humans Is Independently Associated With Increased Matrix Metalloproteinase-9', *Stroke*, 41(3). doi: 10.1161/STROKEAHA.109.570515.
- Belayev, L. *et al.* (2002) 'Albumin Therapy of Transient Focal Cerebral Ischemia: In Vivo Analysis of Dynamic Microvascular Responses', *Stroke*, 33(4), pp. 1077–1084. doi: 10.1161/hs0402.105555.
- Berchtold, D. *et al.* (2019) 'Friend or foe? – B cells in stroke', *Neuroforum*, 25(3), pp. 173–183. doi: 10.1515/nf-2018-0031.
- Berkhemer, O. A. *et al.* (2015) 'A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke', *New England Journal of Medicine*, 372(1), pp. 11–20. doi: 10.1056/NEJMoa1411587.
- Berkhemer, O. A. *et al.* (2016) 'Collateral Status on Baseline Computed Tomographic Angiography and Intra-Arterial Treatment Effect in Patients With Proximal Anterior Circulation Stroke', *Stroke*, 47(3), pp. 768–776. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011788.
- Bhatia, R. *et al.* (2010) 'Low Rates of Acute Recanalization With Intravenous Recombinant Tissue Plasminogen Activator in Ischemic Stroke: Real-World Experience and a Call for Action', *Stroke*, 41(10), pp. 2254–2258. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.592535.
- Bitsch, A. *et al.* (1998) 'A Longitudinal Prospective Study of Soluble Adhesion Molecules in Acute Stroke', *Stroke*, 29(10), pp. 2129–2135. doi: 10.1161/01.STR.29.10.2129.

- Boisseau, W. *et al.* (2019) 'Neutrophil count predicts poor outcome despite recanalization after endovascular therapy', *Neurology*, 93(5), pp. e467–e475. doi: 10.1212/WNL.00000000000007859.
- Bonnans, C., Chou, J. and Werb, Z. (2014) 'Remodelling the extracellular matrix in development and disease', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12), pp. 786–801. doi: 10.1038/nrm3904.
- Bowes, M. P. *et al.* (1995) 'Monoclonal antibodies preventing leukocyte activation reduce experimental neurologic injury and enhance efficacy of thrombolytic therapy', *Neurology*, 45(4), pp. 815–819. doi: 10.1212/WNL.45.4.815.
- Bracard, S. *et al.* (2016) 'Mechanical thrombectomy after intravenous alteplase versus alteplase alone after stroke (THRACE): a randomised controlled trial', *The Lancet Neurology*, 15(11), pp. 1138–1147. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30177-6.
- Brait, V. H. *et al.* (2012) 'Importance of T Lymphocytes in Brain Injury, Immunodeficiency, and Recovery after Cerebral Ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(4), pp. 598–611. doi: 10.1038/jcbfm.2012.6.
- Brinkmann, V. *et al.* (2002) 'The Immune Modulator FTY720 Targets Sphingosine 1-Phosphate Receptors', *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), pp. 21453–21457. doi: 10.1074/jbc.C200176200.
- Brinkmann, V. (2004) 'Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria', *Science*, 303(5663), pp. 1532–1535. doi: 10.1126/science.1092385.
- Broocks, G. *et al.* (2019) 'Computed Tomography Angiography Collateral Profile Is Directly Linked to Early Edema Progression Rate in Acute Ischemic Stroke', *Stroke*, 50(12), pp. 3424–3430. doi: 10.1161/STROKEAHA.119.027062.
- Brooks, S. D. *et al.* (2014) 'Admission neutrophil–lymphocyte ratio predicts 90 day outcome after endovascular stroke therapy', *Journal of NeuroInterventional Surgery*, 6(8), pp. 578–583. doi: 10.1136/neurintsurg-2013-010780.
- Brouns, R. *et al.* (2011) 'Biochemical Markers for Blood-Brain Barrier Dysfunction in Acute Ischemic Stroke Correlate with Evolution and Outcome', *European Neurology*, 65(1), pp. 23–31. doi: 10.1159/000321965.
- Burgos, A. M. and Saver, J. L. (2019) 'Evidence that Tenecteplase Is Noninferior to Alteplase for Acute Ischemic Stroke: Meta-Analysis of 5 Randomized Trials', *Stroke*, 50(8), pp. 2156–2162. doi: 10.1161/STROKEAHA.119.025080.
- Bustamante, A. *et al.* (2014) 'Prognostic value of blood interleukin-6 in the prediction of functional outcome after stroke: A systematic review and meta-analysis', *Journal of Neuroimmunology*, 274(1–2), pp. 215–224. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.07.015.

Bustamante, A. *et al.* (2018) 'Usefulness of ADAMTS13 to predict response to recanalization therapies in acute ischemic stroke', *Neurology*, 90(12), pp. e995–e1004. doi: 10.1212/WNL.0000000000005162.

Campbell, B. C. *et al.* (2013) 'Failure of Collateral Blood Flow is Associated with Infarct Growth in Ischemic Stroke', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(8), pp. 1168–1172. doi: 10.1038/jcbfm.2013.77.

Campbell, B. C. V. *et al.* (2015) 'Endovascular Therapy for Ischemic Stroke with Perfusion-Imaging Selection', *New England Journal of Medicine*, 372(11), pp. 1009–1018. doi: 10.1056/NEJMoa1414792.

Campbell, B. C. V. *et al.* (2018) 'Tenecteplase versus Alteplase before Thrombectomy for Ischemic Stroke', *New England Journal of Medicine*, 378(17), pp. 1573–1582. doi: 10.1056/NEJMoa1716405.

Campbell, B. C. V. *et al.* (2019) 'Extending thrombolysis to 4.5–9 h and wake-up stroke using perfusion imaging: a systematic review and meta-analysis of individual patient data', *The Lancet*, 394(10193), pp. 139–147. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31053-0.

Campbell, B. C. V. *et al.* (2020) 'Effect of Intravenous Tenecteplase Dose on Cerebral Reperfusion Before Thrombectomy in Patients With Large Vessel Occlusion Ischemic Stroke: The EXTEND-IA TNK Part 2 Randomized Clinical Trial', *JAMA*, 323(13), p. 1257. doi: 10.1001/jama.2020.1511.

Carvalho-Tavares, J. *et al.* (2000) 'A Role for Platelets and Endothelial Selectins in Tumor Necrosis Factor- α -Induced Leukocyte Recruitment in the Brain Microvasculature', *Circulation Research*, 87(12), pp. 1141–1148. doi: 10.1161/01.RES.87.12.1141.

Castellanos, M. *et al.* (2003) 'Plasma Metalloproteinase-9 Concentration Predicts Hemorrhagic Transformation in Acute Ischemic Stroke', *Stroke*, 34(1), pp. 40–46. doi: 10.1161/01.STR.0000046764.57344.31.

Castellanos, M. *et al.* (2007) 'Serum Cellular Fibronectin and Matrix Metalloproteinase-9 as Screening Biomarkers for the Prediction of Parenchymal Hematoma After Thrombolytic Therapy in Acute Ischemic Stroke: A Multicenter Confirmatory Study', *Stroke*, 38(6), pp. 1855–1859. doi: 10.1161/STROKEAHA.106.481556.

Cervera, A. *et al.* (2010) 'Genetically-Defined Deficiency of Mannose-Binding Lectin Is Associated with Protection after Experimental Stroke in Mice and Outcome in Human Stroke', *PLoS ONE*. Edited by A. Meisel, 5(2), p. e8433. doi: 10.1371/journal.pone.0008433.

Chamorro, A. *et al.* (2006) 'Interleukin 10, monocytes and increased risk of early infection in ischaemic stroke', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 77(11), pp. 1279–1281. doi: 10.1136/jnnp.2006.100800.

Chamorro, Á. *et al.* (2012) 'The immunology of acute stroke', *Nature Reviews Neurology*, 8(7), pp. 401–410. doi: 10.1038/nrneurol.2012.98.

- Chamorro, Á. *et al.* (2017) 'Complete reperfusion is required for maximal benefits of mechanical thrombectomy in stroke patients', *Scientific Reports*, 7(1), p. 11636. doi: 10.1038/s41598-017-11946-y.
- Chamorro, Á. (2018) 'Neuroprotectants in the Era of Reperfusion Therapy', *Journal of Stroke*, 20(2), pp. 197–207. doi: 10.5853/jos.2017.02901.
- Chamorro, Á., Urra, X. and Planas, A. M. (2007) 'Infection After Acute Ischemic Stroke: A Manifestation of Brain-Induced Immunodepression', *Stroke*, 38(3), pp. 1097–1103. doi: 10.1161/01.STR.0000258346.68966.9d.
- Cheng, Y. D., Al-Khoury, L. and Zivin, J. A. (2004) 'Neuroprotection for ischemic stroke: Two decades of success and failure', *NeuroRX*, 1(1), pp. 36–45. doi: 10.1602/neurorx.1.1.36.
- Cherian, P. *et al.* (2003) 'Endothelial and Platelet Activation in Acute Ischemic Stroke and Its Etiological Subtypes', *Stroke*, 34(9), pp. 2132–2137. doi: 10.1161/01.STR.0000086466.32421.F4.
- Cho, T.-H. *et al.* (2015) 'Reperfusion Within 6 Hours Outperforms Recanalization in Predicting Penumbra Salvage, Lesion Growth, Final Infarct, and Clinical Outcome', *Stroke*, 46(6), pp. 1582–1589. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.007964.
- Cojocarui, I. M. *et al.* (2012) 'Changes in plasma matrix metalloproteinase-9 levels in patients with acute ischemic stroke', *Romanian Journal of Internal Medicine = Revue Roumaine De Medecine Interne*, 50(2), pp. 155–158.
- Crowell, R. M. and Olson, Y. (1972) 'Impaired microvascular filling after focal cerebral ischemia in the monkey: Modification by treatment', *Neurology*, 22(5), pp. 500–500. doi: 10.1212/WNL.22.5.500.
- Cuadrado, E. *et al.* (2008) 'Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release', *Journal of Leukocyte Biology*, 84(1), pp. 207–214. doi: 10.1189/jlb.0907606.
- Darby, D. G. *et al.* (1999) 'Pathophysiological Topography of Acute Ischemia by Combined Diffusion-Weighted and Perfusion MRI', *Stroke*, 30(10), pp. 2043–2052. doi: 10.1161/01.STR.30.10.2043.
- Datta, A. *et al.* (2020) 'Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy', *Transl Stroke Res*, 11(6), pp. 1185–1202. doi: 10.1007/s12975-020-00806-z.
- Davis, S. M. *et al.* (2008) 'Effects of alteplase beyond 3 h after stroke in the Echoplanar Imaging Thrombolytic Evaluation Trial (EPITHET): a placebo-controlled randomised trial', *The Lancet Neurology*, 7(4), pp. 299–309. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70044-9.
- De Meyer, S. F. *et al.* (2016) 'Thromboinflammation in Stroke Brain Damage', *Stroke*, 47(4), pp. 1165–1172. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011238.

De Silva, D. A. *et al.* (2009) 'Assessing Reperfusion and Recanalization as Markers of Clinical Outcomes After Intravenous Thrombolysis in the Echoplanar Imaging Thrombolytic Evaluation Trial (EPITHET)', *Stroke*, 40(8), pp. 2872–2874. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.543595.

Debatisse, J. *et al.* (2020) 'PET-MRI nanoparticles imaging of blood-brain barriers damage and modulation after stroke reperfusion', *Brain Communications*, in press.

Deem, T. L. and Cook-Mills, J. M. (2004) 'Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) activation of endothelial cell matrix metalloproteinases: role of reactive oxygen species', *Blood*, 104(8), pp. 2385–2393. doi: 10.1182/blood-2004-02-0665.

Dirnagl, U., Iadecola, C. and Moskowitz, M. A. (1999) 'Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view', *Trends in Neurosciences*, 22(9), pp. 391–397. doi: 10.1016/S0166-2236(99)01401-0.

Dohmen, C. *et al.* (2008) 'Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence', *Annals of Neurology*, 63(6), pp. 720–728. doi: 10.1002/ana.21390.

Drieu, A. *et al.* (2020) 'Immune Responses and Anti-inflammatory Strategies in a Clinically Relevant Model of Thromboembolic Ischemic Stroke with Reperfusion', *Translational Stroke Research*, 11(3), pp. 481–495. doi: 10.1007/s12975-019-00733-8.

Ejaz, S. *et al.* (2016) 'Normobaric hyperoxia markedly reduces brain damage and sensorimotor deficits following brief focal ischaemia', *Brain*, 139(Pt3), pp. 751–764.

Elkind, M. S. V. *et al.* (2020) 'Natalizumab in acute ischemic stroke (ACTION II): A randomized, placebo-controlled trial', *Neurology*, 95(8), pp. e1091–e1104. doi: 10.1212/WNL.00000000000010038.

Elkins, J. *et al.* (2017) 'Safety and efficacy of natalizumab in patients with acute ischaemic stroke (ACTION): a randomised, placebo-controlled, double-blind phase 2 trial', *The Lancet Neurology*, 16(3), pp. 217–226. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30357-X.

Emsley, H. C. *et al.* (2007) 'Clinical outcome following acute ischaemic stroke relates to both activation and autoregulatory inhibition of cytokine production', *BMC Neurology*, 7(1), p. 5. doi: 10.1186/1471-2377-7-5.

Emsley, H. C. A. (2005) 'A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 76(10), pp. 1366–1372. doi: 10.1136/jnnp.2004.054882.

Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators. (2001) 'Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: Results of the Enlimomab Acute Stroke Trial', *Neurology*, 57(8), pp. 1428–1434. doi: 10.1212/WNL.57.8.1428.

Fagan, S. C. *et al.* (2010) 'Minocycline to Improve Neurologic Outcome in Stroke (MINOS): A Dose-Finding Study', *Stroke*, 41(10), pp. 2283–2287. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.582601.

- Fan, X., Lo, E. H. and Wang, X. (2013) 'Effects of Minocycline Plus Tissue Plasminogen Activator Combination Therapy After Focal Embolic Stroke in Type 1 Diabetic Rats', *Stroke*, 44(3), pp. 745–752. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.000309.
- Fanjul-Fernández, M. *et al.* (2010) 'Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(1), pp. 3–19. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.07.004.
- Fassbender, K. *et al.* (1994) 'Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease', *Journal of the Neurological Sciences*, 122(2), pp. 135–139. doi: 10.1016/0022-510X(94)90289-5.
- Feigin, V. L. *et al.* (2019) 'Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016', *The Lancet Neurology*, 18(5), pp. 459–480. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30499-X.
- Finlayson, O. *et al.* (2011) 'Risk factors, inpatient care, and outcomes of pneumonia after ischemic stroke', *Neurology*, 77(14), pp. 1338–1345. doi: 10.1212/WNL.0b013e31823152b1.
- Foley, J. H. *et al.* (2016) 'Complement Activation in Arterial and Venous Thrombosis is Mediated by Plasmin', *EBioMedicine*, 5, pp. 175–182. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.02.011.
- Frederick Woessner, J. (1994) 'The Family of Matrix Metalloproteinases', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 732(1 Inhibition of), pp. 11–21. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb24720.x.
- Fridlender, Z. G. *et al.* (2009) 'Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN', *Cancer Cell*, 16(3), pp. 183–194. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017.
- Frijns, C. J. M. *et al.* (1997) 'Soluble Adhesion Molecules Reflect Endothelial Cell Activation in Ischemic Stroke and in Carotid Atherosclerosis', *Stroke*, 28(11), pp. 2214–2218. doi: 10.1161/01.STR.28.11.2214.
- Fu, Y. *et al.* (2014) 'Impact of an immune modulator fingolimod on acute ischemic stroke', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(51), pp. 18315–18320. doi: 10.1073/pnas.1416166111.
- Fumagalli, S. *et al.* (2016) 'Lectin Complement Pathway and Its Bloody Interactions in Brain Ischemia', *Stroke*, 47(12), pp. 3067–3073. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.012407.
- Gan, Y. *et al.* (2014) 'Ischemic neurons recruit natural killer cells that accelerate brain infarction', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(7), pp. 2704–2709. doi: 10.1073/pnas.1315943111.
- Garcia, Julio H *et al.* (1994) 'Brain Microvessels: Factors Altering Their Patency after the Occlusion of a Middle Cerebral Artery (Wistar Rat)', 145(3), p. 13.
- Garcia, J. H. *et al.* (1994) 'Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat)', *The American Journal of Pathology*, 144(1), pp. 188–199.

- Garcia-Bonilla, L. *et al.* (2016) 'Spatio-temporal profile, phenotypic diversity, and fate of recruited monocytes into the post-ischemic brain', *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), p. 285. doi: 10.1186/s12974-016-0750-0.
- Gauberti, M., De Lizarrondo, S. M. and Vivien, D. (2016) 'The "inflammatory penumbra" in ischemic stroke: From clinical data to experimental evidence', *European Stroke Journal*, 1(1), pp. 20–27. doi: 10.1177/2396987316630249.
- Gauberti, M., *et al.* (2018) 'Ischemia-Reperfusion Injury After Endovascular Thrombectomy for Ischemic Stroke', *Stroke*, 49(12), pp. 3071–3074. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.022015.
- Gelderblom, M. *et al.* (2009) 'Temporal and Spatial Dynamics of Cerebral Immune Cell Accumulation in Stroke', *Stroke*, 40(5), pp. 1849–1857. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.534503.
- Gerlach, R. F. *et al.* (2009) 'Positive correlations between serum and plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 or MMP-9 levels in disease conditions', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47(7), pp. 888–891. DOI: [10.1515/cclm.2009.203](https://doi.org/10.1515/cclm.2009.203).
- Giraud, M. *et al.* (2015) 'Early Blood Brain Barrier Changes in Acute Ischemic Stroke: A Sequential MRI Study: Blood Brain Barrier Changes', *Journal of Neuroimaging*, 25(6), pp. 959–963. doi: 10.1111/jon.12225.
- Goyal, M. *et al.* (2015) 'Randomized Assessment of Rapid Endovascular Treatment of Ischemic Stroke', *New England Journal of Medicine*, 372(11), pp. 1019–1030. doi: 10.1056/NEJMoa1414905.
- Goyal, M. *et al.* (2016) 'Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials', *The Lancet*, 387(10029), pp. 1723–1731. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00163-X.
- Goyal, N. *et al.* (2018) 'Admission Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio as a Prognostic Biomarker of Outcomes in Large Vessel Occlusion Strokes', *Stroke*, 49(8), pp. 1985–1987. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.021477.
- Graham, C. A. *et al.* (2012) 'Matrix metalloproteinase 9 mRNA: An early prognostic marker for patients with acute stroke', *Clinical Biochemistry*, 45(4–5), pp. 352–355. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.12.006.
- Hacke, W. *et al.* (2008) 'Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke', *New England Journal of Medicine*, 359(13), pp. 1317–1329. doi: 10.1056/NEJMoa0804656.
- Haley, P. J. (2003) 'Species differences in the structure and function of the immune system', *Toxicology*, 188(1), pp. 49–71. doi: 10.1016/S0300-483X(03)00043-X.
- Hall, C. N. *et al.* (2014) 'Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease', *Nature*, 508(7494), pp. 55–60. doi: 10.1038/nature13165.
- Harston, G. W. *et al.* (2010) 'The Contribution of L-Arginine to the Neurotoxicity of Recombinant Tissue Plasminogen Activator following Cerebral Ischemia: A Review of rtPA

Neurotoxicity', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 30(11), pp. 1804–1816. doi: 10.1038/jcbfm.2010.149.

Harston, G. W. J. *et al.* (2018) 'Quantifying Infarct Growth and Secondary Injury Volumes: Comparing Multimodal Image Registration Measures', *Stroke*, 49(7), pp. 1647–1655. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.020788.

Hart, R. G. *et al.* (2014) 'Embolic strokes of undetermined source: the case for a new clinical construct', *The Lancet Neurology*, 13(4), pp. 429–438. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70310-7.

Hata, R. *et al.* (2000) 'Evolution of Brain Infarction after Transient Focal Cerebral Ischemia in Mice', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 20(6), pp. 937–946. doi: 10.1097/00004647-200006000-00006.

Heil, M. *et al.* (2004) 'Collateral Artery Growth (Arteriogenesis) After Experimental Arterial Occlusion Is Impaired in Mice Lacking CC-Chemokine Receptor-2', *Circulation Research*, 94(5), pp. 671–677. doi: 10.1161/01.RES.0000122041.73808.B5.

Henninger, D. D. *et al.* (1997) 'Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 158(4), pp. 1825–1832.

Hoefer, I. E. *et al.* (2001) 'Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit', *Cardiovascular Research*, 49(3), pp. 609–617. doi: 10.1016/S0008-6363(00)00243-1.

Hossmann, K. A. (1996) 'Periinfarct depolarizations', *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews*, 8(3), pp. 195–208.

Hossmann, K.-A. (1994) 'Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia', *Annals of Neurology*, 36(4), pp. 557–565. doi: 10.1002/ana.410360404.

Hu, Z. *et al.* (2020) 'Can baseline C-reactive protein level predict functional outcome in acute ischaemic stroke? A meta-analysis', *Biomarkers*, pp. 1–8. doi: 10.1080/1354750X.2020.1817982.

Huang, J. (1999) 'Neuronal Protection in Stroke by an sLex-Glycosylated Complement Inhibitory Protein', *Science*, 285(5427), pp. 595–599. doi: 10.1126/science.285.5427.595.

Huber, T. *et al.* (2016) 'Blood Leukocytes as Prognostic Parameter in Stroke Thrombectomy', *Cerebrovascular Diseases*, 42(1–2), pp. 32–40. doi: 10.1159/000444369.

Hughes, J. L. *et al.* (2012) 'A microPET study of the regional distribution of [11C]-PK11195 binding following temporary focal cerebral ischemia in the rat. Correlation with post mortem mapping of microglia activation', *Neuroimage*, 59(3), pp. 2007–2016. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.10.060.

Iadecola, C. *et al.* (1999) 'The Transcription Factor Interferon Regulatory Factor 1 Is Expressed after Cerebral Ischemia and Contributes to Ischemic Brain Injury', *Journal of Experimental Medicine*, 189(4), pp. 719–727. doi: 10.1084/jem.189.4.719.

Iadecola, C. (2017) 'The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease', *Neuron*, 96(1), pp. 17–42. doi: 10.1016/j.neuron.2017.07.030.

Iadecola, C. and Anrather, J. (2011) 'The immunology of stroke: from mechanisms to translation', *Nature Medicine*, 17(7), pp. 796–808. doi: 10.1038/nm.2399.

Iijima, T., Mies, G. and Hossmann, K.-A. (1992) 'Repeated Negative DC Deflections in Rat Cortex following Middle Cerebral Artery Occlusion are Abolished by MK-801: Effect on Volume of Ischemic Injury', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 12(5), pp. 727–733. doi: 10.1038/jcbfm.1992.103.

Inoue, M. *et al.* (2013) 'Clinical Outcomes Strongly Associated With the Degree of Reperfusion Achieved in Target Mismatch Patients: Pooled Data from the Diffusion and Perfusion Imaging Evaluation for Understanding Stroke Evolution Studies', *Stroke*, 44(7), pp. 1885–1890. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.000371.

Intiso, D. *et al.* (2004) 'Tumor necrosis factor alpha serum levels and inflammatory response in acute ischemic stroke patients', *Neurological Sciences*, 24(6), pp. 390–396. doi: 10.1007/s10072-003-0194-z.

Inzitari, D. *et al.* (2013) 'MMP9 Variation After Thrombolysis Is Associated With Hemorrhagic Transformation of Lesion and Death', *Stroke*, 44(10), pp. 2901–2903. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002274.

Ito, W. D. *et al.* (1997) 'Monocyte Chemotactic Protein-1 Increases Collateral and Peripheral Conductance After Femoral Artery Occlusion', *Circulation Research*, 80(6), pp. 829–837. doi: 10.1161/01.RES.80.6.829.

Jha, R. *et al.* (2014) 'Fluid-Attenuated Inversion Recovery Hyperintensity Correlates With Matrix Metalloproteinase-9 Level and Hemorrhagic Transformation in Acute Ischemic Stroke', *Stroke*, 45(4), pp. 1040–1045. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.004627.

Jiang, C. *et al.* (2017) 'Changes in the cellular immune system and circulating inflammatory markers of stroke patients', *Oncotarget*, 8(2), pp. 3553–3567. doi: 10.18632/oncotarget.12201.

Jovin, T. G. *et al.* (2015) 'Thrombectomy within 8 Hours after Symptom Onset in Ischemic Stroke', *New England Journal of Medicine*, 372(24), pp. 2296–2306. doi: 10.1056/NEJMoa1503780.

Jung, S. *et al.* (2013) 'Factors that determine penumbral tissue loss in acute ischaemic stroke', *Brain*, 136(12), pp. 3554–3560. doi: 10.1093/brain/awt246.

Kalimo, H. *et al.* (2013) 'Polymorphonuclear neutrophil infiltration into ischemic infarctions: myth or truth?', *Acta Neuropathologica*, 125(3), pp. 313–316. doi: 10.1007/s00401-013-1098-5.

- Kato, H. *et al.* (1996) 'Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat', *Brain Research*, 734(1–2), pp. 203–212.
- Kelly, P. J. *et al.* (2008) 'Oxidative Stress and Matrix Metalloproteinase-9 in Acute Ischemic Stroke: The Biomarker Evaluation for Antioxidant Therapies in Stroke (BEAT-Stroke) Study', *Stroke*, 39(1), pp. 100–104. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.488189.
- Kim, S. *et al.* (2020) 'Association of High-sensitivity C-reactive Protein with Patient Prognosis Following Mechanical Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke', *Current Neurovascular Research*, 17. doi: 10.2174/1567202617666200517110949.
- Kleine, J. F. *et al.* (2017) 'Time to redefine success? TIC1 3 versus TIC1 2b recanalization in middle cerebral artery occlusion treated with thrombectomy', *Journal of NeuroInterventional Surgery*, 9(2), pp. 117–121. doi: 10.1136/neurintsurg-2015-012218.
- Kleinschnitz, C. *et al.* (2010) 'Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation', *Blood*, 115(18), pp. 3835–3842. doi: 10.1182/blood-2009-10-249078.
- Kloner, R. A., King, K. S. and Harrington, M. G. (2018) 'No-reflow phenomenon in the heart and brain', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 315(3), pp. H550–H562. doi: 10.1152/ajpheart.00183.2018.
- Kohler, E. *et al.* (2013) 'Intravenous Minocycline in Acute Stroke: A Randomized, Controlled Pilot Study and Meta-analysis', *Stroke*, 44(9), pp. 2493–2499. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.000780.
- Kollikowski, A. M. *et al.* (2020) 'Local Leukocyte Invasion during Hyperacute Human Ischemic Stroke', *Annals of Neurology*, 87(3), pp. 466–479. doi: 10.1002/ana.25665.
- Kraft, P. *et al.* (2013) 'FTY720 Ameliorates Acute Ischemic Stroke in Mice by Reducing Thrombo-Inflammation but Not by Direct Neuroprotection', *Stroke*, 44(11), pp. 3202–3210. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002880.
- Kreisel, D. *et al.* (2002) 'Mouse Vascular Endothelium Activates CD8⁺ T Lymphocytes in a B7-Dependent Fashion', *The Journal of Immunology*, 169(11), pp. 6154–6161. doi: 10.4049/jimmunol.169.11.6154.
- Kristián, T. and Siesjö, B. K. (1998) 'Calcium in Ischemic Cell Death', *Stroke*, 29(3), pp. 705–718. doi: 10.1161/01.STR.29.3.705.
- Lai, T. W., Zhang, S. and Wang, Y. T. (2014) 'Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection', *Progress in Neurobiology*, 115, pp. 157–188. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.006.
- Lampl, Y. *et al.* (2007) 'Minocycline treatment in acute stroke: An open-label, evaluator-blinded study', *Neurology*, 69(14), pp. 1404–1410. doi: 10.1212/01.wnl.0000277487.04281.db.

- Langhauser, F. *et al.* (2014) 'Blocking of $\alpha 4$ Integrin Does Not Protect From Acute Ischemic Stroke in Mice', *Stroke*, 45(6), pp. 1799–1806. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.005000.
- Langhorne, P., Ramachandra, S. and Stroke Unit Trialists' Collaboration (2020) 'Organised inpatient (stroke unit) care for stroke: network meta-analysis', *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Edited by Cochrane Stroke Group. doi: 10.1002/14651858.CD000197.pub4.
- Lapchak, P. A., Chapman, D. F. and Zivin, J. A. (2000) 'Metalloproteinase Inhibition Reduces Thrombolytic (Tissue Plasminogen Activator)–Induced Hemorrhage After Thromboembolic Stroke', *Stroke*, 31(12), pp. 3034–3040. doi: 10.1161/01.STR.31.12.3034.
- Lasek-Bal, A. *et al.* (2019) 'The importance of selected markers of inflammation and blood-brain barrier damage for short-term ischemic stroke prognosis', *Journal of Physiology and Pharmacology*, 70(2), pp.209-217. doi: 10.26402/jpp.2019.2.04.
- Latour, L. L. *et al.* (2004) 'Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia', *Annals of Neurology*, 56(4), pp. 468–477. doi: 10.1002/ana.20199.
- Lee, C. Z. *et al.* (2007) 'Matrix Metalloproteinase-9 Inhibition Attenuates Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*, 38(9), pp. 2563–2568. doi: 10.1161/STROKEAHA.106.481515.
- Lee, J.-M. *et al.* (2000) 'Brain tissue responses to ischemia', *Journal of Clinical Investigation*, 106(6), pp. 723–731. doi: 10.1172/JCI11003.
- Leng, X. *et al.* (2016) 'Impact of collaterals on the efficacy and safety of endovascular treatment in acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 87(5), pp. 537–544. doi: 10.1136/jnnp-2015-310965.
- Li, W. *et al.* (2020) 'Fingolimod Inhibits Inflammation but Exacerbates Brain Edema in the Acute Phases of Cerebral Ischemia in Diabetic Mice', *Frontiers in Neuroscience*, 14, p. 842. doi: 10.3389/fnins.2020.00842.
- Licata, G. *et al.* (2006) 'Immunoinflammatory Activation during the Acute Phase of Lacunar and Non-Lacunar Ischemic Stroke: Association with Time of Onset and Diabetic State', *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 19(3), pp. 639–646. doi: 10.1177/039463200601900320.
- Liddelow, S. A. (2011) 'Fluids and barriers of the CNS: a historical viewpoint', *Fluids and Barriers of the CNS*, 8(1), p. 2. doi: 10.1186/2045-8118-8-2.
- Liebeskind, D. S. (2003) 'Collateral Circulation', *Stroke*, 34(9), pp. 2279–2284. doi: 10.1161/01.STR.0000086465.41263.06.
- Liebeskind, D. S. *et al.* (2014) 'Collaterals at Angiography and Outcomes in the Interventional Management of Stroke (IMS) III Trial', *Stroke*, 45(3), pp. 759–764. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.004072.

- Liesz, A. *et al.* (2011a) 'Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke', *Brain*, 134(3), pp. 704–720. doi: 10.1093/brain/awr008.
- Lima, F. O. *et al.* (2010) 'The Pattern of Leptomeningeal Collaterals on CT Angiography Is a Strong Predictor of Long-Term Functional Outcome in Stroke Patients With Large Vessel Intracranial Occlusion', *Stroke*, 41(10), pp. 2316–2322. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.592303.
- Lip, G. Y. H. *et al.* (2002) 'Sequential alterations in haemorheology, endothelial dysfunction, platelet activation and thrombogenesis in relation to prognosis following acute stroke: The West Birmingham Stroke Project', *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 13(4), pp. 339–347. doi: 10.1097/00001721-200206000-00010.
- Liu, J. *et al.* (2013) 'Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Receptor Agonist FTY720 (Fingolimod) in Animal Models of Stroke', *International Journal of Neuroscience*, 123(3), pp. 163–169. doi: 10.3109/00207454.2012.749255.
- Llovera, G. *et al.* (2015) 'Results of a preclinical randomized controlled multicenter trial (pRCT): Anti-CD49d treatment for acute brain ischemia', *Science Translational Medicine*, 7(299), pp. 299ra121-299ra121. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa9853.
- Logallo, N. *et al.* (2017) 'Tenecteplase versus alteplase for management of acute ischaemic stroke (NOR-TEST): a phase 3, randomised, open-label, blinded endpoint trial', *The Lancet Neurology*, 16(10), pp. 781–788. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30253-3.
- Longstaff, C. *et al.* (2013) 'Mechanical Stability and Fibrinolytic Resistance of Clots Containing Fibrin, DNA, and Histones', *Journal of Biological Chemistry*, 288(10), pp. 6946–6956. doi: 10.1074/jbc.M112.404301.
- Lorenzano, S. *et al.* (2018) 'Oxidative Stress Biomarkers of Brain Damage: Hyperacute Plasma F2-Isoprostane Predicts Infarct Growth in Stroke', *Stroke*, 49(3), pp. 630–637. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.018440.
- Lorenzano, S. *et al.* (2019) 'Early molecular oxidative stress biomarkers of ischemic penumbra in acute stroke', *Neurology*, 93(13), pp. e1288–e1298. doi: 10.1212/WNL.00000000000008158.
- Lu, A. *et al.* (2008) 'Reperfusion activates metalloproteinases that contribute to neurovascular injury', *Experimental Neurology*, 210(2), pp. 549–559. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.12.003.
- Lucivero, V. *et al.* (2007) 'Different roles of matrix metalloproteinases-2 and -9 after human ischaemic stroke', *Neurological Sciences*, 28(4), pp. 165–170. doi: 10.1007/s10072-007-0814-0.
- Ma, H. *et al.* (2019) 'Thrombolysis Guided by Perfusion Imaging up to 9 Hours after Onset of Stroke', *New England Journal of Medicine*, 380(19), pp. 1795–1803. doi: 10.1056/NEJMoa1813046.

Machado, L. S. *et al.* (2009) 'Minocycline and Tissue-Type Plasminogen Activator for Stroke: Assessment of Interaction Potential', *Stroke*, 40(9), pp. 3028–3033. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.556852.

Maestrini, I. *et al.* (2020) 'Analysis of the association of MPO and MMP-9 with stroke severity and outcome: Cohort study', *Neurology*, 95(1), pp. e97–e108. doi: 10.1212/WNL.00000000000009179.

Maglinger, B. *et al.* (2020) 'Proteomic changes in intracranial blood during human ischemic stroke', *Journal of NeuroInterventional Surgery*, p. neurintsurg-2020-016118. doi: 10.1136/neurintsurg-2020-016118.

Manello, F. (2008) 'Serum or plasma samples? The "Cinderella" role of blood collection procedures: preanalytical methodological issues influence the release and activity of circulating matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors, hampering diagnostic trueness and leading to misinterpretation', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(4), pp. 611–614. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.159608

Manning, N. W. *et al.* (2014) 'Acute Ischemic Stroke: Time, Penumbra, and Reperfusion', *Stroke*, 45(2), pp. 640–644. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.003798.

Martha, S. R. *et al.* (2020) 'Expression of Cytokines and Chemokines as Predictors of Stroke Outcomes in Acute Ischemic Stroke', *Frontiers in Neurology*, 10, p. 1391. doi: 10.3389/fneur.2019.01391.

Matsukawa, N. *et al.* (2009) 'Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke', *BMC Neuroscience*, 10(1), p. 126. doi: 10.1186/1471-2202-10-126.

Mazzotta, G. *et al.* (2004) 'Different cytokine levels in thrombolysis patients as predictors for clinical outcome', *European Journal of Neurology*, 11(6), pp. 377–381. doi: 10.1111/j.1468-1331.2004.00798.x.

Mengel, A. *et al.* (2019) 'Biomarkers of immune capacity, infection and inflammation are associated with poor outcome and mortality after stroke - the PREDICT study', *BMC Neurology*, 19(1), p. 148. doi: 10.1186/s12883-019-1375-6.

Menon, B. K. *et al.* (2011) 'Regional Leptomeningeal Score on CT Angiography Predicts Clinical and Imaging Outcomes in Patients with Acute Anterior Circulation Occlusions', *American Journal of Neuroradiology*, 32(9), pp. 1640–1645. doi: 10.3174/ajnr.A2564.

Menon, B. K. *et al.* (2013) 'Leptomeningeal collaterals are associated with modifiable metabolic risk factors: Leptomeningeal Collaterals', *Annals of Neurology*, p. n/a-n/a. doi: 10.1002/ana.23906.

Mestas, J. and Hughes, C. C. W. (2004) 'Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology', *The Journal of Immunology*, 172(5), pp. 2731–2738. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2731.

Mies, G., Iijima, T. and Hossmann, K.-A. (1993) 'Correlation between periinfarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat', *NeuroReport*, 4(6), pp. 709–711. doi: 10.1097/00001756-199306000-00027.

Misra, S. *et al.* (2020) 'Blood biomarkers for the diagnosis and differentiation of stroke: A systematic review and meta-analysis', *International Journal of Stroke*, 15(7), pp. 704–721. doi: 10.1177/1747493020946157.

Mizuma, A., You, J. S. and Yenari, M. A. (2018) 'Targeting Reperfusion Injury in the Age of Mechanical Thrombectomy', *Stroke*, 49(7), pp. 1796–1802. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017286.

Mobarra, N. *et al.* (2019) 'The Association between Inflammatory Markers in the Acute Phase of Stroke and Long-Term Stroke Outcomes: Evidence from a Population-Based Study of Stroke', *Neuroepidemiology*, 53(1–2), pp. 20–26. doi: 10.1159/000494685.

Mocco, J. *et al.* (2006) 'Complement Component C3 Mediates Inflammatory Injury Following Focal Cerebral Ischemia', *Circulation Research*, 99(2), pp. 209–217. doi: 10.1161/01.RES.0000232544.90675.42.

Moldes, O. *et al.* (2008) 'High Serum Levels of Endothelin-1 Predict Severe Cerebral Edema in Patients With Acute Ischemic Stroke Treated With t-PA', *Stroke*, 39(7), pp. 2006–2010. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.495044.

Molnar, T. *et al.* (2010) 'Relationship between C-reactive protein and early activation of leukocytes indicated by leukocyte antisedimentation rate (LAR) in patients with acute cerebrovascular events', *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 44(3), pp. 183–192. doi: 10.3233/CH-2010-1273.

Montaner, J., Molina, C. A., *et al.* (2003) 'Matrix Metalloproteinase-9 Pretreatment Level Predicts Intracranial Hemorrhagic Complications After Thrombolysis in Human Stroke', *Circulation*, 107(4), pp. 598–603. doi: 10.1161/01.CIR.0000046451.38849.90.

Montaner, J., Rovira, A., *et al.* (2003) 'Plasmatic Level of Neuroinflammatory Markers Predict the Extent of Diffusion-Weighted Image Lesions in Hyperacute Stroke', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23(12), pp. 1403–1407. doi: 10.1097/01.WCB.0000100044.07481.97.

Mori, E. *et al.* (1992) 'Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons.', *Stroke*, 23(5), pp. 712–718. doi: 10.1161/01.STR.23.5.712.

Morimoto, N. *et al.* (2005) 'Minocycline inhibits oxidative stress and decreases in vitro and in vivo ischemic neuronal damage', *Brain Research*, 1044(1), pp. 8–15. doi: 10.1016/j.brainres.2005.02.062.

Morris, R. S. *et al.* (2018) 'Relationships between selective neuronal loss and microglial activation after ischaemic stroke in man', *Brain*, 141(7), pp. 2098–2111. doi: 10.1093/brain/awy121.

- Murata, Y. *et al.* (2008) 'Extension of the Thrombolytic Time Window With Minocycline in Experimental Stroke', *Stroke*, 39(12), pp. 3372–3377. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.514026.
- Murphy, G. and Crabbe, T. (1995) '[28] Gelatinases A and B', in *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 470–484. doi: 10.1016/0076-6879(95)48030-7.
- Nadareishvili, Z. *et al.* (2019) 'Molecular signature of penumbra in acute ischemic stroke: a pilot transcriptomics study', *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 6(4), pp. 817–820. doi: 10.1002/acn3.757.
- Nambiar, V. *et al.* (2014) 'CTA Collateral Status and Response to Recanalization in Patients with Acute Ischemic Stroke', *American Journal of Neuroradiology*, 35(5), pp. 884–890. doi: 10.3174/ajnr.A3817.
- Nguyen, V. A. *et al.* (2020) 'Longitudinal Stroke Recovery Associated With Dysregulation of Complement System—A Proteomics Pathway Analysis', *Frontiers in Neurology*, 11, p. 692. doi: 10.3389/fneur.2020.00692.
- Nicoletti, F. *et al.* (2011) 'Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside', *Neuropharmacology*, 60(7–8), pp. 1017–1041. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.10.022.
- Nighoghossian, N. *et al.* (2007) 'Inflammatory Response After Ischemic Stroke: A USPIO-Enhanced MRI Study in Patients', *Stroke*, 38(2), pp. 303–307. doi: 10.1161/01.STR.0000254548.30258.f2.
- NINDS rt-PA Stroke Study Group (1995) 'Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke', *New England Journal of Medicine*, 333(24), pp. 1581–1588. doi: 10.1056/NEJM199512143332401.
- Ning, M. *et al.* (2006) 'Association between tPA therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke', *Neurology*, 66(10), pp. 1550–1555. doi: 10.1212/01.wnl.0000216133.98416.b4.
- Nishino, H. *et al.* (1994) 'Pathophysiological process after transient ischemia of the middle cerebral artery in the rat', *Brain Research Bulletin*, 35(1), pp. 51–56. doi: 10.1016/0361-9230(94)90215-1.
- Nogueira, R. G. *et al.* (2018) 'Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct', *New England Journal of Medicine*, 378(1), pp. 11–21. doi: 10.1056/NEJMoa1706442.
- O'Donnell, M. J. *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(10046), pp. 761–775. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30506-2.
- O'Neill, L. A. J. and Kaltschmidt, C. (1997) 'NF-κB: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function', *Trends in Neurosciences*, 20(6), pp. 252–258. doi: 10.1016/S0166-2236(96)01035-1.

- Ormstad, H. *et al.* (2011) 'Serum levels of cytokines and C-reactive protein in acute ischemic stroke patients, and their relationship to stroke lateralization, type, and infarct volume', *Journal of Neurology*, 258(4), pp. 677–685. doi: 10.1007/s00415-011-6006-0.
- Ornello, R. *et al.* (2018) 'Distribution and Temporal Trends From 1993 to 2015 of Ischemic Stroke Subtypes: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Stroke*, 49(4), pp. 814–819. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.020031.
- Osthoff, M. *et al.* (2011) 'Mannose-Binding Lectin Deficiency Is Associated With Smaller Infarction Size and Favorable Outcome in Ischemic Stroke Patients', *PLoS ONE*. Edited by S. G. Meuth, 6(6), p. e21338. doi: 10.1371/journal.pone.0021338.
- Oto, J. *et al.* (2008) 'Plasma proinflammatory and anti-inflammatory cytokine and catecholamine concentrations as predictors of neurological outcome in acute stroke patients', *Journal of Anesthesia*, 22(3), pp. 207–212. doi: 10.1007/s00540-008-0639-x.
- Padma Srivastava, M. *et al.* (2012) 'Efficacy of minocycline in acute ischemic stroke: A single-blinded, placebo-controlled trial', *Neurology India*, 60(1), p. 23. doi: 10.4103/0028-3886.93584.
- Park, S.-Y. *et al.* (2013) 'Predictive value of circulating interleukin-6 and heart-type fatty acid binding protein for three months clinical outcome in acute cerebral infarction: multiple blood markers profiling study', *Critical Care*, 17(2), p. R45. doi: 10.1186/cc12564.
- Pawluk, H. *et al.* (2020) 'The Role of Selected Pro-Inflammatory Cytokines in Pathogenesis of Ischemic Stroke', *Clinical Interventions in Aging*, Volume 15, pp. 469–484. doi: 10.2147/CIA.S233909.
- Pfefferkorn, T. and Rosenberg, G. A. (2003) 'Closure of the Blood-Brain Barrier by Matrix Metalloproteinase Inhibition Reduces rtPA-Mediated Mortality in Cerebral Ischemia With Delayed Reperfusion', *Stroke*, 34(8), pp. 2025–2030. doi: 10.1161/01.STR.0000083051.93319.28.
- Pitman, M. R. *et al.* (2012) 'Molecular Targets of FTY720 (Fingolimod)', *Current Molecular Medicine*, 12(10), pp. 1207–1219. doi: 10.2174/156652412803833599.
- Planas, A. M. *et al.* (1996) 'Induction of Stat3, a Signal Transducer and Transcription Factor, in Reactive Microglia following Transient Focal Cerebral Ischaemia', *European Journal of Neuroscience*, 8(12), pp. 2612–2618. doi: 10.1111/j.1460-9568.1996.tb01556.x.
- Planas, A. M. (2018) 'Role of Immune Cells Migrating to the Ischemic Brain', *Stroke*, 49(9), pp. 2261–2267. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.021474.
- Prass, K. *et al.* (2003) 'Stroke-induced Immunodeficiency Promotes Spontaneous Bacterial Infections and Is Mediated by Sympathetic Activation Reversal by Poststroke T Helper Cell Type 1–like Immunostimulation', *Journal of Experimental Medicine*, 198(5), pp. 725–736. doi: 10.1084/jem.20021098.

Pusch, G. *et al.* (2015) 'Early Dynamics of P-selectin and Interleukin 6 Predicts Outcomes in Ischemic Stroke', *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 24(8), pp. 1938–1947. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.05.005.

Racca, V. *et al.* (2016) 'Fingolimod effects on left ventricular function in multiple sclerosis', *Multiple Sclerosis Journal*, 22(2), pp. 201–211. doi: 10.1177/1352458515587753.

Rajagopalan, S. *et al.* (1996) 'Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability.', *Journal of Clinical Investigation*, 98(11), pp. 2572–2579. doi: 10.1172/JCI119076.

Rama, R. and García, J. C. (2016) 'Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Stroke', in Schaller, B. (ed.) *Ischemic Stroke - Updates*. InTech. doi: 10.5772/64991.

Ramos-Fernandez, M., Bellolio, M. F. and Stead, L. G. (2011) 'Matrix Metalloproteinase-9 as a Marker for Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review', *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 20(1), pp. 47–54. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2009.10.008.

Reiche, E. M. V. *et al.* (2019) 'Immune-inflammatory, oxidative stress and biochemical biomarkers predict short-term acute ischemic stroke death', *Metabolic Brain Disease*, 34(3), pp. 789–804. doi: 10.1007/s11011-019-00403-6.

Richard, S. *et al.* (2015) 'E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 as biomarkers of 3-month outcome in cerebrovascular diseases', *Journal of Inflammation*, 12(1), p. 61. doi: 10.1186/s12950-015-0106-z.

Ringleb, P. *et al.* (2019) 'Extending the time window for intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke using magnetic resonance imaging-based patient selection', *International Journal of Stroke*, 14(5), pp. 483–490. doi: 10.1177/1747493019840938.

Rocha, M. and Jovin, T. G. (2017) 'Fast Versus Slow Progressors of Infarct Growth in Large Vessel Occlusion Stroke: Clinical and Research Implications', *Stroke*, 48(9), pp. 2621–2627. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017673.

Rodríguez, J. A. *et al.* (2013) 'proMetalloproteinase-10 is associated with brain damage and clinical outcome in acute ischemic stroke', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11(8), pp. 1464–1473. doi: 10.1111/jth.12312.

Rodriguez-Yanez, M. *et al.* (2006) 'New-onset hypertension and inflammatory response/poor outcome in acute ischemic stroke', *Neurology*, 67(11), pp. 1973–1978. doi: 10.1212/01.wnl.0000247064.53130.91.

Romanic, A. M. *et al.* (1998) 'Matrix Metalloproteinase Expression Increases After Cerebral Focal Ischemia in Rats: Inhibition of Matrix Metalloproteinase-9 Reduces Infarct Size', *Stroke*, 29(5), pp. 1020–1030. doi: 10.1161/01.STR.29.5.1020.

Rosell, A. *et al.* (2005) 'A Matrix Metalloproteinase Protein Array Reveals a Strong Relation Between MMP-9 and MMP-13 With Diffusion-Weighted Image Lesion Increase in Human Stroke', *Stroke*, 36(7), pp. 1415–1420. doi: 10.1161/01.STR.0000170641.01047.cc.

Rosell, A. *et al.* (2006) 'Increased Brain Expression of Matrix Metalloproteinase-9 After Ischemic and Hemorrhagic Human Stroke', *Stroke*, 37(6), pp. 1399–1406. doi: 10.1161/01.STR.0000223001.06264.af.

Rosell, A. *et al.* (2008) 'MMP-9–Positive Neutrophil Infiltration Is Associated to Blood–Brain Barrier Breakdown and Basal Lamina Type IV Collagen Degradation During Hemorrhagic Transformation After Human Ischemic Stroke', *Stroke*, 39(4), pp. 1121–1126. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.500868.

Rosenberg, G. A. *et al.* (1996) 'Proteolytic Cascade Enzymes Increase in Focal Cerebral Ischemia in Rat', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 16(3), pp. 360–366. doi: 10.1097/00004647-199605000-00002.

Rosenberg, G. A., Estrada, E. Y. and Dencoff, J. E. (1998) 'Matrix Metalloproteinases and TIMPs Are Associated With Blood-Brain Barrier Opening After Reperfusion in Rat Brain', *Stroke*, 29(10), pp. 2189–2195. doi: 10.1161/01.STR.29.10.2189.

Rostène, W. *et al.* (2011) 'Neurochemokines: a menage a trois providing new insights on the functions of chemokines in the central nervous system: Chemokines in brain functions', *Journal of Neurochemistry*, 118(5), pp. 680–694. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07371.x.

Ruscher, K. *et al.* (1998) 'Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons', *Neuroscience Letters*, 254(2), pp. 117–120. doi: 10.1016/S0304-3940(98)00688-0.

Sacco, R. L. *et al.* (2013) 'An Updated Definition of Stroke for the 21st Century: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association', *Stroke*, 44(7), pp. 2064–2089. doi: 10.1161/STR.0b013e318296aeca.

Sakaguchi, S. *et al.* (2010) 'FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system', *Nature Reviews Immunology*, 10(7), pp. 490–500. doi: 10.1038/nri2785.

Sapojnikova, N. *et al.* (2014) 'Correlation between MMP-9 and extracellular cytokine HMGB1 in prediction of human ischemic stroke outcome', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(9), pp. 1379–1384. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.04.031.

Savage, B., Almus-Jacobs, F. and Ruggeri, Z. M. (1998) 'Specific Synergy of Multiple Substrate–Receptor Interactions in Platelet Thrombus Formation under Flow', *Cell*, 94(5), pp. 657–666. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81607-4.

Saver, J. L. *et al.* (2015) 'Stent-Retriever Thrombectomy after Intravenous t-PA vs. t-PA Alone in Stroke', *New England Journal of Medicine*, 372(24), pp. 2285–2295. doi: 10.1056/NEJMoa1415061.

- Scanziani, M. *et al.* (1997) 'Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors', *Nature*, 385(6617), pp. 630–634. doi: 10.1038/385630a0.
- Schiphorst, A. ter *et al.* (2020) 'Tissue *no-reflow* despite full recanalization following thrombectomy for anterior circulation stroke with proximal occlusion: A clinical study', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, p. 0271678X2095492. doi: 10.1177/0271678X20954929.
- Schuhmann, M. K. *et al.* (2016) 'Fingolimod (FTY720) Reduces Cortical Infarction and Neurological Deficits During Ischemic Stroke Through Potential Maintenance of Microvascular Patency', *Current Neurovascular Research*, 13(4), pp. 277–282. doi: 10.2174/15672026136666160823152446.
- Schuppner, R. *et al.* (2018) 'ADAMTS-13 Activity Predicts Outcome in Acute Ischaemic Stroke Patients Undergoing Endovascular Treatment', *Thrombosis and Haemostasis*, 47(04), pp. 758–767. doi: 10.1055/s-0038-1637732.
- Seners, P. *et al.* (2019) 'Better Collaterals Are Independently Associated With Post-Thrombolysis Recanalization Before Thrombectomy', *Stroke*, 50(4), pp. 867–872. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.022815.
- Sharp, F. R. *et al.* (2000) 'Multiple Molecular Penumbrae after Focal Cerebral Ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 20(7), pp. 1011–1032. doi: 10.1097/00004647-200007000-00001.
- Shi, K. *et al.* (2019) 'Global brain inflammation in stroke', *The Lancet Neurology*, 18(11), pp. 1058–1066. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30078-X.
- Shyy, Y. J. *et al.* (1994) 'Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(11), pp. 4678–4682. doi: 10.1073/pnas.91.11.4678.
- Simats, A., García-Berrocso, T. and Montaner, J. (2016) 'Neuroinflammatory biomarkers: From stroke diagnosis and prognosis to therapy', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862(3), pp. 411–424. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.10.025.
- Smith, C. J. *et al.* (2004) 'Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome', *BMC Neurology*, 4(1), p. 2. doi: 10.1186/1471-2377-4-2.
- Smith, C. J. *et al.* (2006) 'Variability of the systemic acute phase response after ischemic stroke', *Journal of the Neurological Sciences*, 251(1–2), pp. 77–81. doi: 10.1016/j.jns.2006.09.011.
- Smith, C. J. *et al.* (2018) 'SCIL-STROKE (Subcutaneous Interleukin-1 Receptor Antagonist in Ischemic Stroke): A Randomized Controlled Phase 2 Trial', *Stroke*, 49(5), pp. 1210–1216. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.020750.

- Stanimirovic, D. B. *et al.* (1997) 'Increase in Surface Expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-Selectin in Human Cerebromicrovascular Endothelial Cells Subjected to Ischemia-Like Insults', in James, H. E. *et al.* (eds) *Brain Edema X*. Vienna: Springer Vienna, pp. 12–16. doi: 10.1007/978-3-7091-6837-0_4.
- Stegner, D. and Nieswandt, B. (2011) 'Platelet receptor signaling in thrombus formation', *Journal of Molecular Medicine*, 89(2), pp. 109–121. doi: 10.1007/s00109-010-0691-5.
- Strbian, D. *et al.* (2008) 'The blood–brain barrier is continuously open for several weeks following transient focal cerebral ischemia', *Neuroscience*, 153(1), pp. 175–181. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.02.012.
- Stroke Unit Trialists' Collaboration' (1997) 'Collaborative systematic review of the randomised trials of organised inpatient (stroke unit) care after stroke', *BMJ (Clinical research ed.)*, 314(7088), pp. 1151–1159.
- Sumii, T. and Lo, E. H. (2002) 'Involvement of Matrix Metalloproteinase in Thrombolysis-Associated Hemorrhagic Transformation After Embolic Focal Ischemia in Rats', *Stroke*, 33(3), pp. 831–836. doi: 10.1161/hs0302.104542.
- Szydłowska, K. and Tymianski, M. (2010) 'Calcium, ischemia and excitotoxicity', *Cell Calcium*, 47(2), pp. 122–129. doi: 10.1016/j.ceca.2010.01.003.
- Tang, Y. H. *et al.* (2015) 'Interleukin-6 mediates enhanced thrombus development in cerebral arterioles following a brief period of focal brain ischemia', *Experimental Neurology*, 271, pp. 351–357. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.06.004.
- The GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators (2018) 'Global, Regional, and Country-Specific Lifetime Risks of Stroke, 1990 and 2016', *New England Journal of Medicine*, 379(25), pp. 2429–2437. doi: 10.1056/NEJMoa1804492.
- Thomalla, G. *et al.* (2018) 'MRI-Guided Thrombolysis for Stroke with Unknown Time of Onset', *New England Journal of Medicine*, 379(7), pp. 611–622. doi: 10.1056/NEJMoa1804355.
- Tian, D. *et al.* (2018) 'Fingolimod enhances the efficacy of delayed alteplase administration in acute ischemic stroke by promoting anterograde reperfusion and retrograde collateral flow', *Annals of Neurology*, 84(5), pp. 717–728. doi: 10.1002/ana.25352.
- Turner, R. J. and Sharp, F. R. (2016) 'Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10. doi: 10.3389/fncel.2016.00056.
- Vagal, A. *et al.* (2018) 'Collateral Clock Is More Important Than Time Clock for Tissue Fate: A Natural History Study of Acute Ischemic Strokes', *Stroke*, 49(9), pp. 2102–2107. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.021484.
- Van Raamt, A. F. *et al.* (2006) 'The Fetal Variant of the Circle of Willis and Its Influence on the Cerebral Collateral Circulation', *Cerebrovascular Diseases*, 22(4), pp. 217–224. doi: 10.1159/000094007.

- Van Wart, H. E. and Birkedal-Hansen, H. (1990) 'The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(14), pp. 5578–5582. doi: 10.1073/pnas.87.14.5578.
- Vargas, M. *et al.* (2006) 'Clinical Consequences of Infection in Patients With Acute Stroke: Is It Prime Time for Further Antibiotic Trials?', *Stroke*, 37(2), pp. 461–465. doi: 10.1161/01.STR.0000199138.73365.b3.
- Vermeij, F. H. *et al.* (2009) 'Stroke-Associated Infection Is an Independent Risk Factor for Poor Outcome after Acute Ischemic Stroke: Data from the Netherlands Stroke Survey', *Cerebrovascular Diseases*, 27(5), pp. 465–471. doi: 10.1159/000210093.
- Vermeij, J.-D. *et al.* (2018) 'Antibiotic therapy for preventing infections in people with acute stroke', *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Edited by Cochrane Stroke Group. doi: 10.1002/14651858.CD008530.pub3.
- Villringer, K. *et al.* (2017) 'DCE-MRI blood–brain barrier assessment in acute ischemic stroke', *Neurology*, 88(5), pp. 433–440. doi: 10.1212/WNL.0000000000003566.
- Virani, S. S. *et al.* (2020) 'Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association', *Circulation*, 141(9). doi: 10.1161/CIR.0000000000000757.
- Voskuil, M. *et al.* (2004) 'Abnormal monocyte recruitment and collateral artery formation in monocyte chemoattractant protein-1 deficient mice', *Vascular Medicine*, 9(4), pp. 287–292. doi: 10.1191/1358863x04vm571oa.
- Vu, T. H. (2000) 'Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology', *Genes & Development*, 14(17), pp. 2123–2133. doi: 10.1101/gad.815400.
- Wahlgren, N. *et al.* (2008) 'Multivariable Analysis of Outcome Predictors and Adjustment of Main Outcome Results to Baseline Data Profile in Randomized Controlled Trials: Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-MONitoring Study (SITS-MOST)', *Stroke*, 39(12), pp. 3316–3322. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.510768.
- Waje-Andreassen, U. *et al.* (2005) 'IL-6: an early marker for outcome in acute ischemic stroke', *Acta Neurologica Scandinavica*, 111(6), pp. 360–365. doi: 10.1111/j.1600-0404.2005.00416.x.
- Wang, L. *et al.* (2018) 'The Accuracy of Serum Matrix Metalloproteinase-9 for Predicting Hemorrhagic Transformation After Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 27(6), pp. 1653–1665. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.01.023.
- Wang, X. *et al.* (2003) 'Lipoprotein receptor–mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator', *Nature Medicine*, 9(10), pp. 1313–1317. doi: 10.1038/nm926.

- Wang, Z., Kawabori, M. and Houkin, K. (2020) 'FTY720 (Fingolimod) Ameliorates Brain Injury through Multiple Mechanisms and is a Strong Candidate for Stroke Treatment', *Current Medicinal Chemistry*, 27(18), pp. 2979–2993. doi: 10.2174/0929867326666190308133732.
- Wang, Z.-Y., Sun, Z.-R. and Zhang, L.-M. (2014) 'The Relationship Between Serum Mannose-Binding Lectin Levels and Acute Ischemic Stroke Risk', *Neurochemical Research*, 39(2), pp. 248–253. doi: 10.1007/s11064-013-1214-x.
- Wei, Y. *et al.* (2011) 'Fingolimod provides long-term protection in rodent models of cerebral ischemia', *Annals of Neurology*, 69(1), pp. 119–129. doi: 10.1002/ana.22186.
- Westendorp, W. F. *et al.* (2011) 'Post-stroke infection: A systematic review and meta-analysis', *BMC Neurology*, 11(1), p. 110. doi: 10.1186/1471-2377-11-110.
- Whiteley, W. *et al.* (2009) 'Inflammatory Markers and Poor Outcome after Stroke: A Prospective Cohort Study and Systematic Review of Interleukin-6', *PLoS Medicine*. Edited by F. M. Turnbull, 6(9), p. e1000145. doi: 10.1371/journal.pmed.1000145.
- Wiert, M. *et al.* (2007) 'MRI Monitoring of Neuroinflammation in Mouse Focal Ischemia', *Stroke*, 38(1), pp. 131–137. doi: 10.1161/01.STR.0000252159.05702.00.
- Winbeck, K. *et al.* (2002) 'Prognostic Relevance of Early Serial C-Reactive Protein Measurements After First Ischemic Stroke', *Stroke*, 33(10), pp. 2459–2464. doi: 10.1161/01.STR.0000029828.51413.82.
- Woessner, J. F. (1991) 'Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling', *The FASEB Journal*, 5(8), pp. 2145–2154. doi: 10.1096/fasebj.5.8.1850705.
- Worthmann, H. *et al.* (2010) 'The Temporal Profile of Inflammatory Markers and Mediators in Blood after Acute Ischemic Stroke Differs Depending on Stroke Outcome', *Cerebrovascular Diseases*, 30(1), pp. 85–92. doi: 10.1159/000314624.
- Xu, L. *et al.* (2004) 'Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats', *BMC Neurology*, 4(1), p. 7. doi: 10.1186/1471-2377-4-7.
- Yang, Yirong *et al.* (2015) 'Attenuation of acute stroke injury in rat brain by minocycline promotes blood–brain barrier remodeling and alternative microglia/macrophage activation during recovery', *Journal of Neuroinflammation*, 12(1), p. 26. doi: 10.1186/s12974-015-0245-4.
- Yemisci, M. *et al.* (2009) 'Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery', *Nature Medicine*, 15(9), pp. 1031–1037. doi: 10.1038/nm.2022.
- Yenari, M. A. *et al.* (2006) 'Microglia Potentiate Damage to Blood–Brain Barrier Constituents: Improvement by Minocycline In Vivo and In Vitro', *Stroke*, 37(4), pp. 1087–1093. doi: 10.1161/01.STR.0000206281.77178.ac.
- Yepes, M. *et al.* (2009) 'Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic', *Trends in Neurosciences*, 32(1), pp. 48–55. doi: 10.1016/j.tins.2008.09.006.

- Yew, W. P. *et al.* (2019) 'Early treatment with minocycline following stroke in rats improves functional recovery and differentially modifies responses of peri-infarct microglia and astrocytes', *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), p. 6. doi: 10.1186/s12974-018-1379-y.
- Yoshida, M. *et al.* (2017) 'Time dependent transition of the levels of protein-conjugated acrolein (PC-Acro), IL-6 and CRP in plasma during stroke', *eNeurologicalSci*, 7, pp. 18–24. doi: 10.1016/j.ensci.2017.03.005.
- Yrjanheikki, J. *et al.* (1998) 'Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), pp. 15769–15774. doi: 10.1073/pnas.95.26.15769.
- Yu, B. *et al.* (2019) 'C-reactive protein for predicting all-cause mortality in patients with acute ischemic stroke: a meta-analysis', *Bioscience Reports*, 39(2), p. BSR20181135. doi: 10.1042/BSR20181135.
- Zhang, J. *et al.* (2012) 'Secondary neurodegeneration in remote regions after focal cerebral infarction: a new target for stroke management?', *Stroke*, 43(6), pp. 1700–1705. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.632448.
- Zhang, H. *et al.* (2010) 'Wide Genetic Variation in the Native Pial Collateral Circulation is a Major Determinant of Variation in Severity of Stroke', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 30(5), pp. 923–934. doi: 10.1038/jcbfm.2010.10.
- Zhang, S. *et al.* (2017) 'Rationale and design of combination of an immune modulator Fingolimod with Alteplase bridging with Mechanical Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke (FAMTAIS) trial', *International Journal of Stroke*, 12(8), pp. 906–909. doi: 10.1177/1747493017710340.
- Zhao, B.-Q. *et al.* (2006) 'Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke', *Nature Medicine*, 12(4), pp. 441–445. doi: 10.1038/nm1387.
- Zhong, C. *et al.* (2017) 'Serum matrix metalloproteinase-9 levels and prognosis of acute ischemic stroke', *Neurology*, 89(8), pp. 805–812. doi: 10.1212/WNL.0000000000004257.
- Zhu, Z. *et al.* (2015) 'Combination of the Immune Modulator Fingolimod With Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Pilot Trial', *Circulation*, 132(12), pp. 1104–1112. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016371.
- Zivin, J. *et al.* (1985) 'Tissue plasminogen activator reduces neurological damage after cerebral embolism', *Science*, 230(4731), pp. 1289–1292. doi: 10.1126/science.3934754.
- del Zoppo, G. J. *et al.* (1991) 'Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons.', *Stroke*, 22(10), pp. 1276–1283. doi: 10.1161/01.STR.22.10.1276.
- del Zoppo, G. J. (2010) 'The neurovascular unit in the setting of stroke', *Journal of Internal Medicine*, 267(2), pp. 156–171. doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02199.x.

del Zoppo, G. J. and Mabuchi, T. (2003) 'Cerebral Microvessel Responses to Focal Ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23(8), pp. 879–894. doi: 10.1097/01.WCB.0000078322.96027.78.