Amélioration de la valeur prédictive des modèles animaux dans la recherche sur l'accident vasculaire cérébral (AVC) avec l'utilisation d'un modèle de diabète murin insulinodépendant pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques

Florent Lebrun

▶ **To cite this version:**

Florent Lebrun. Amélioration de la valeur prédictive des modèles animaux dans la recherche sur l'accident vasculaire cérébral (AVC) avec l'utilisation d'un modèle de diabète murin insulinodépendant pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMC420 . tel-03991764

HAL Id: tel-03991764
https://theses.hal.science/tel-03991764

Submitted on 16 Feb 2023

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

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

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Amélioration de la valeur prédictive des modèles animaux dans la recherche sur l'accident vasculaire cérébral (AVC) avec l'utilisation d'un modèle de diabète murin insulinodépendant pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques

Présentée et soutenue par
FLORENT LEBRUN

Thèse soutenue le 12/12/2022 devant le jury composé de		
MME MARIE-CHRISTINE BOUTON	Directeur de recherche, Sorbonne Université	Rapporteur du jury
M. TAE-HEE CHO	Professeur des universités PraticienHosp, Université Lyon 1 Claude Bernard	Rapporteur du jury
MME EMMANUELLE CANET-SOULAS	Professeur des universités, Université Lyon 1 Claude Bernard	Membre du jury
M. NICOLAS VIOLLE	Docteur, Université de Lorraine	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp, Université de Caen Normandie	Membre du jury
M. CYRILLE ORSET	Professeur des universités, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par CYRILLE ORSET (Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

PhIND
PHYSIOPATHOLOGY & IMAGING OF NEUROLOGICAL DISORDERS

Table des matières

Index de figures .....

Liste des abréviations 13

ÉTAT DE L'ART 17

I. L'accident vasculaire cérébral 1

A. Aux origines du mal : de l'apoplexie... 1

B. ... à l'accident vasculaire cérébral 2

C. Un peu d'épidémiologie des AVC 3

D. Etiologie des AVC 4

E. Physiopathologie de l'AVC ischémique 5

1. Composition du thrombus 6

2. Atteintes vasculaires 9

a. Réduction hétérogène du débit sanguin cérébral (DSC) 9

b. Mécanismes compensatoires face aux atteintes vasculaires 10

3. Atteintes tissulaires 12

a. Privation énergétique 12

b. Excitotoxicité 13

c. Apoptose 16

4. Altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE) 17

5. Inflammation et AVC 18

F. Les transformations hémorragiques (TH) 20

1. Classification des TH 21

2. Etiologie des TH 21

a. Données précliniques et cliniques des TH 22

b. Axes de progression des modèles animaux dans l'étude des TH 23

3. Physiopathologie des TH 23

a. Le rôle des MMP dans les TH 24

b. Le rôle des ROS dans les TH 26

c. Le rôle de l'inflammation dans les TH 27

d. Le rôle du remodelage vasculaire dans les TH retardées 28

G. Les facteurs de risques et comorbidités de l'AVC 29
1. Les facteurs de risques non-modifiables 29
2. Les facteurs de risques modifiables 30
H. Le diabète, une comorbidité majeure de l'AVC 33
1. L'impact du diabète et de l'hyperglycémie sanguine dans l'AVC en clinique 33
2. La prise en charge des patients diabétiques et/ou hyperglycémiques 35
3. L'effet de l'hyperglycémie et du diabète dans les modèles précliniques 37
4. Le lien entre le diabète, l'AVC et le tPA en préclinique 38
5. Les stratégies précliniques pour bloquer les effets délétères du tPA en préclinique 39
I. Prise en charge de l'AVC 40
1. Aspects cliniques et diagnostiques 40
2. Imagerie à la phase aigüe 40
3. Les traitements actuels de l'AVC ischémique 43
a. La thrombectomie 43
b. La thrombolyse pharmacologique 45
II. L'activateur tissulaire du plasminogène : le tPA 47
A. Historique 47
B. Structure du tPA 49
1. La chaîne lourde du tPA (chaîne A) : 50
2. La chaîne légère du tPA (chaîne B) : 50
C. Expression du tPA 51
1. Dans la circulation sanguine 51
2. Dans le SNC 52
3. Dans la périphérie 53
D. Inhibition du tPA : les serpines 53
E. Les rôles du tPA 55
1. Le tPA vasculaire 55
a. L'activité thrombolytique du tPA et la résistance plaquettaire 55
b. L'activité du tPA sur la BHE et les TH 57
2. Le tPA dans le SNC 59
a. Le rôle du tPA dans le développement cérébral 59
b. Le tPA et la modulation glutamatergique 61

c. Le tPA responsable de l'excitotoxicité ? 62
d. tPA et plasticité synaptique 65
e. L'importance du tPA dans des exemples de processus cognitifs 67
f. Le tPA : davantage anti que pro-apoptotique 68
g. Le lien entre tPA et inflammation 69
h. Le tPA et la substance blanche 70
i. Le tPA et le couplage neurovasculaire 72
F. Le tPA comme traitement de l'AVC 72
III. Les nouvelles stratégies basées sur la thrombolyse de l'AVC ischémique 78
A. La stratégie basée sur la dégradation des autres constituants du thrombus : La N-Acétylcystéine (NAC) 78
B. La stratégie basée sur la régulation des effets délétères du tPA : Le glunomab 81
IV. La recherche préclinique sur les AVC ischémiques 83
A. L'utilisation des modèles animaux pour la recherche 83
B. Modélisation de l'ischémie cérébrale chez le rongeur 83
1. Modèle monofilament 84
2. Modèle électrocoagulation 85
3. Modèles thromboemboliques 86
C. Discussion sur la pertinence de l'expérimentation animale dans l'AVC 88
1. Les spécificités interspécifiques des rongeurs limitant la recherche sur l'AVC .. 89
2. Les progrès et les axes d'améliorations des études précliniques 91
OBJECTIFS 97
RÉSULTATS 99
DISCUSSION 187
L'effet du diabète en tant que comorbidité sur l'AVC ischémique préclinique 191
L'effet du tPA dans notre modèle d'AVC ichémique chez des animaux diabétiques 193
La NAC, une alternative au tPA après un AVC ischémique sur des animaux diabétiques ? 195
L'immunothérapie pour potentialiser la thrombolyse et limiter les effets délétères du tPA : le Glunomab 198
Lien entre Glunomab, AVC ischémique et inflammation 200
Les limites de notre étude 202
CONCLUSION 205
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 258

Index de figures

Figure 1 : Illustration du médecin grec Hippocrates et de son corpus hippocratique 1
Figure 2 : Incidence de l'AVC dans le monde, normalisée pour 100 000 habitants/an. 3
Figure 3 : Principaux types d'AVC - l'AVC hémorragique et l'AVC ischémique. 5
Figure 4 : Comparaison de la composition des thrombi artériels et veineux. 6
Figure 5 : Cascade de la coagulation 8
Figure 6 :Atteintes tissulaires lors d'un AVC ischémique. 10
Figure 7 : Importance du débit collatéral sur la reperfusion après un AVC ischémique.. 11
Figure 8 : Mécanismes cellulaires survenant après l'AVC ischémique 12
Figure 9 : Mécanismes moléculaires et cellulaires de l'AVC ischémique 14
Figure 10 : Mécanismes moléculaires conduisant à la mort cellulaire après un AVC ischémique 17
Figure 11 : Schématisation de la BHE. 18
Figure 12 : Réactions immunitaires après la survenue d'un AVC ischémique. 19
Figure 13 : Facteurs à l'origine des TH après un AVC.. 24
Figure 14 : Mécanismes inflammatoires impliqués dans les TH. 27
Figure 15 : Représentation des évènements liés au diabète et à l'hyperglycémie post-AVC sur la rupture de la BHE et la TH 34
Figure 16 : Représentation des évènements liés au diabète et à l'hyperglycémie post-AVC sur la reperfusion et la récupération du tissu cérébral.. 36
Figure 17 : L'injection de tPA après un AVC ischémique chez des souris diabétiques peut augmenter le volume de lésion. 37
Figure 18 : Séquences d'imagerie de l'AVC ischémique.. 43
Figure 19 : Evaluation de la récupération fonctionnelle selon le traitement reçu (thrombolyse/thrombectomie) avec l'échelle modifiée de Rankin. 44
Figure 20 : Structure et fonctions du tPA. 49
Figure 21 : Expression du tPA dans les cellules du SNC 52
Figure 22 : Mécanismes d'action des serpines 54
Figure 23 : Mécanisme d'action de la fibrinolyse endogène 56
Figure 24 : Implication du tPA dans les TH. 59
Figure 25 : Le tPA est impliqué dans la corticogenèse. 61

Figure 26 : Le tPA est impliqué dans l'excitotoxicité. 64
Figure 27 : Expression des ARNm du tPA dans l'hippocampe de rat, avant et après stimulation neuronale. 66
Figure 28 : Expression du tPA dans le noyau de la strie terminale. 68
Figure 29 : Le tPA est impliqué dans la remyélinisation de la substance blanche chez l'adulte.. 71
Figure 30 : Exemples d'activateur du plasminogène 74
Figure 31 : Comparaison de la structure du tPA avec celle du Desmoteplase 75
Figure 32 : Structure et effets du Tenecteplase. 76
Figure 33 : Mécanisme d'action de la NAC. 80
Figure 34 : Mécanisme d'action du Glunomab. 81
Figure 35 : Modèle monofilament. 85
Figure 36 : Modèle électrocoagulation 86
Figure 37 : Modèle thrombolytique par injection de thrombine ou application de $FeCl_3$. 88
Figure 38 : Effet de l'injection de STZ chez des souris sur le niveau de glucose dans le sang et la sécrétion d'insuline au cours du temps. 190
Figure 39 : L'injection du tPA permet une recanalisation et la réduction du volume de lésion ischémique. 191
Figure 40 : La NAC restaure la perméabilité des vaisseaux après une thrombose occlusive et améliore l'issue de l'AVC thrombotique. 196
Figure 41 : Le blocage de la liaison tPA-NMDA (sous unité GluN1) prévient les effets pro-excitotoxiques du tPA *in vitro* et *in vivo* sans impacter ses effets anti-apoptotiques.. 199

Liste des abréviations

ACM : Artère Cérébrale Moyenne

ADAMTS : A *Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*

ADC : Coefficient de Diffusion Apparent

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AG : Anesthésie Générale

AIF : *Apoptosis-inducing Factor*

AIT : Accident Ischémique Transitoire

Akt : Protéine Kinase B

AMPA : *α-Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid*

AMPAR : *α-Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid Receptor*

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN Messager

ARRIVE : Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments

ATP : Adénosine Triphosphate

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BAM : *Border Associated Macrophages*

BDNF : *Brain Derived Neurotrophic Factor*

BHE : Barrière Hématoencéphalique

CEO : *Cerebral Extraction of Oxygen*

CNV : Couplage Neurovasculaire

CSPG : Protéoglycanes de type Chondroïtine Sulfate

DSC : Débit Sanguin Cérébral

DWI : *Diffusion Weighted Imaging*

ECASS : *European Cooperative Acute Stroke Study*

EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*

ESOC : *European Stroke Organization Conference*

FDA : *Food and Drug Administration*

FT : Facteur Tissulaire

HGF : *Hepatocyte Growth Factor*

HI : Infarctus Hémorragique

HIF-1α : *Hypoxia-Inducible Factor-1α*

HTA : Hypertension Artérielle

ICAM : *Inter Cellular Adhesion Molecule-1*

Il : Interleukine

IMPROVE : *Ischaemia Models : Procedural Refinements Of in Vivo Experiments*

IP : Intraperitoneal

IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique

IV : Intraveineuse

LBS : *Lysin Binding Site*

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LDL : *Low density lipoprotein*

LRP : *Low density lipoprotein Receptor-related Protein*

LTP : *Long-Term Potentiation*

MAPK/ERK : *Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase*

MCAo : Occlusion de l'Artère Cérébrale Moyenne

MEC : Matrice Extracellulaire

MMP : Métalloprotéinases Matricielles

MPIO : M*icrometer-sized Paramagnetic Iron Oxide*

mRS : *Modified Rankin Scale*

NAC : N-acétylcystéine

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NMDA : *N-Methyl-D-Aspartate*

NMDAR : *N-Methyl-D-Aspartate Receptor*

nNOS : *Neuronal Nitric Oxide Synthase*

NOD *: non-obese diabetic*

NOX : NADPH oxydase

NIHSS : *National Institute of Health*

nNOS : N*euronal Nitric Oxide Synthase*

NS : Neuroserpine

NTD : *Distal N-terminal Domain*

PA : Pression Artérielle

PAI-1 : Inhibiteur de l'Activateur tissulaire du Plasminogène 1

PDGF : *Platelet-Derived Growth Factor*

PH : Hématome Parenchymateux

PI3K : *Phosphatidylinositol-3-Kinase*

PID : Dépolarisations Péri-infarcts

PLAT : *Plasminogen Activator Tissue-type*

PN-1 : Protéase Nexine-1

PPSE : Potentiel Postsynaptique Excitateur

RCL : *Reactive Center Loop*

ROS *: Reactive Oxygen Species*

rtPA : *Recombinant Tissue-type Plasminogen Activator*

sc-tPA : *Single-Chain Tissue-type Plasminogen Activator*

SEP : Sclérose En Plaques

SNC : Système Nerveux Central

SNP : S*ingle Nucleotide Polymorphism*

STAIR : *Stroke Treatment Academy Roundtable*

STZ : Streptozotocine

TAFI *: Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitors*

tc-tPA : *Two-Chain Tissue-type Plasminogen Activator*

TDM : Tomodensitométrie

TH : Transformation Hémorragique

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TNK : Tenecteplase

TOF : *Time Of Flight*

tPA : Activateur Tissulaire du Plasminogène

Trk-B : *Tropomyosin Receptor Kinase B*

UI : Unité d'Activité Enzymatique

uPA : Activateur du Plasminogène de type Urokinase

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

VWF : Facteur Von Willebrand

ÉTAT DE L’ART

I. L'accident vasculaire cérébral

A. Aux origines du mal : de l'apoplexie...

Durant l'Antiquité, le *Corpus hippocratique*, recueil de livres de médecine traditionnellement attribué au médecin grec Hippocrate (v. 460-377 av. J.-C.) décrit pour la première fois l'accident vasculaire cérébral (AVC). Le mot alors employé est « apoplexie », terme clinique signifiant en grec ancien « frapper de stupeur » ou « renverser » pour décrire des malades sidérés d'une douleur subite accompagnée d'une perte de la vue, de connaissance et de mouvement. L'anatomiste Erasistrate (v. 310 - v. 250 av. J.-C.) attribue ensuite cette apoplexie à une brusque abondance de sang dans le cerveau. Cette explication s'avèrera suffisante pour traverser les âges et les civilisations jusqu'au Bas-Moyen Âge (Figure 1).

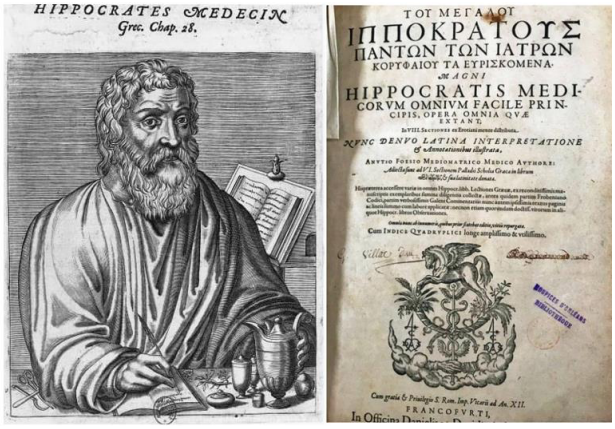


Figure 1 : Illustration du médecin grec Hippocrates et de son corpus hippocratique. Dans cet ouvrage est décrit pour la première fois l'accident vasculaire cérébral sous le terme d'apoplexie.

Au XVIIème siècle, grâce à la récente autorisation d'autopsier, le pathologiste suisse J.J. Wepfer (1620 -1695) confirme un saignement encéphalique dans certains cas d'apoplexie, mais avance également que les symptômes présentés par d'autres patients pourraient être provoqués par l'obstruction d'une artère cérébrale (Engelhardt, 2017). Pourtant, cette hypothèse d'une dichotomie de la maladie tardera à faire des émules car, au cours des XVII et XVIIIème siècles, le terme d'apoplexie est principalement utilisé pour expliquer une hémorragie du système nerveux central (SNC). A tel point que ce mot devienne synonyme d'hémorragie tout court, pouvant survenir dans n'importe quel organe. Cette confusion est beaucoup critiquée dans la deuxième moitié du XIXème, pour que finalement en 1914, le neurologue

français J. Dejerine (1849-1917) conclut que l'apoplexie peut survenir en dehors de toute hémorragie cérébrale, et que le terme ne devrait désigner qu'un syndrome clinique : « la perte soudaine et simultanée de plusieurs fonctions cérébrales » (Poirier and Derouesné, 1993).

Depuis la fin de la seconde guerre mondiale, le renversant terme d'apoplexie est devenu scientifiquement obsolète au profit du terme « Accident vasculaire cérébral » mais garde son équivalent populaire avec l'attaque cérébrale. Cette origine étymologique se retrouve littéralement dans la langue anglaise avec l'emploi médical du mot *stroke*.

B. … à l'accident vasculaire cérébral

L'AVC est donc une attaque neurologique soudaine ayant pour origine soit l'obstruction, soit la rupture d'un vaisseau sanguin dans le cerveau. Les termes accident, attaque et *stroke* soulignent uniquement l'aspect brutal de la survenue des symptômes ; car dans la plupart des cas, les causes de cette affection restent internes (liées à l'âge, l'alimentation, l'hygiène de vie, etc.). Les premiers symptômes, déjà décrits dans l'antique *Corpus hippocratique* varient en fonction de la zone cérébrale impactée (zone focale), et du type d'AVC : maux de tête, perte de motricité, perte de sensibilité, trouble du langage, trouble de la vision, perte de connaissance et dans les cas extrêmes, un décès.

A plus long-terme, la gravité et les séquelles résultent des premiers symptômes focaux et de la prise en charge du patient. Ces handicaps peuvent comprendre des déficiences motrices telles que l'hémiparésie (faiblesse latéralisée du corps), l'hémiplégie (paralysie d'un côté du corps) et la parésie faciale centrale (Amarenco et al., 2009). Les troubles du langage et de la parole sont également courants, tels que l'aphasie (troubles de la compréhension du langage) et la dysarthrie (troubles de l'articulation de la parole ; Beal, 2010). Nous pouvons ajouter à cette liste non-exhaustive d'autres handicaps tels que des déficits de l'attention et de la mémoire, des troubles émotionnels et visuels, ainsi que des niveaux de conscience altérés (Khoshnam et al., 2017).

Il est à noter que dans certains cas, les premiers symptômes peuvent disparaitre assez rapidement (moins d'une heure après l'occlusion d'une artère) ; dans ce cas on parle d'accident ischémique transitoire (AIT). La baisse de la perfusion sanguine locale momentanée est alors insuffisante pour causer la mort cellulaire. De ce fait, ces patients ne subissent pas de handicap

à moyen-terme (Clissold et al., 2020), à l'inverse des personnes souffrant d'un AVC qui voient leur qualité de vie drastiquement impactée par l'accumulation des handicaps cités plus haut.

C. Un peu d'épidémiologie des AVC

En France, on dénombre chaque année plus de 140 000 nouveaux cas d'AVC, soit un toutes les quatre minutes (données INSERM). A l'échelle mondiale, l'AVC a provoqué 6 millions de décès et a touché au total 13 millions de personnes dans le monde en 2019 (données OMS). En 2030, ces chiffres pourraient être multipliés par 2 (Feigin et al., 2014). De fait, la prévalence et le coût de cette pathologie s'accroissent à mesure que la population globale grandit mais surtout vieillit. Au cours des 4 dernières décennies, l'incidence de l'AVC a plus que doublé dans les pays à revenus faibles et moyens, tandis qu'elle a diminué de 42% dans les pays à revenu élevé dans lesquels le niveau de vie et le système médical progresse d'années en années (Figure 2).

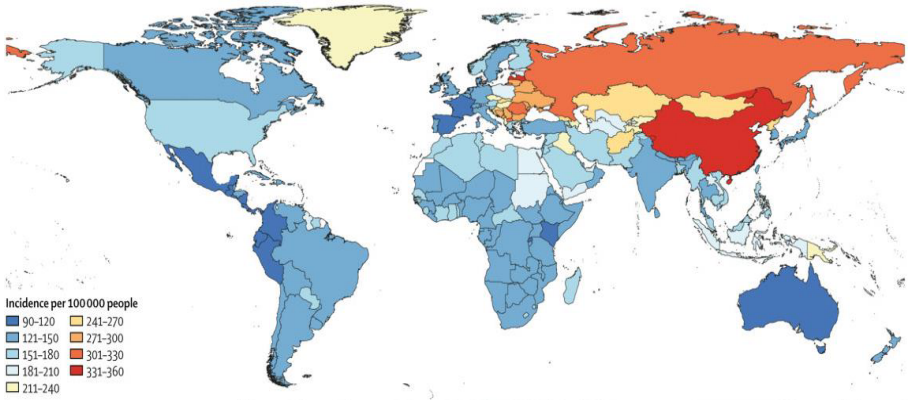


Figure 2 : Incidence de l'AVC dans le monde, normalisée pour 100 000 habitants/an. L'incidence la plus élevée est observée en Asie orientale, en particulier en Chine (354 pour 100 000 habitants/an), suivi par l'Europe de l'est (200 pour 100 000 habitants/an). Tandis que l'incidence la plus faible est retrouvée dans les pays d'Amérique centrale, notamment au Salvador (97 pour 100 000 habitants/an). On peut noter que l'incidence de l'AVC, normalisée selon l'âge, est similaire entre hommes et femmes en dessous de 55 ans. Elle est cependant plus élevée chez les hommes entre 55 et 75 ans (Johnson et al., 2019).

L'AVC est la première cause de handicap acquis chez l'adulte, la deuxième cause de démence dans les pays industrialisés après la maladie d'Alzheimer et la deuxième cause de mortalité dans le monde avec 20% des personnes qui décèdent dans l'année suivant l'AVC, posant un problème majeur de Santé Publique (données INSERM et du Ministère de la Santé).

D. Etiologie des AVC

Les AVC existent principalement sous deux formes selon la nature du désordre vasculaire : les infarctus ischémiques dans 80 % à 85% des cas et les accidents hémorragiques dans 15% à 20% des cas (données Inserm).

Les AVC hémorragiques sont causés par la rupture d'une artère cérébrale, souvent abîmée, située dans le cortex ou dans les méninges qui l'entourent. Les principales causes sont la rupture d'un anévrisme (dilatation anormale de la paroi artérielle), un traumatisme crânien, des malformations vasculaires, ou encore une tumeur. Dans le cas où ces différentes causes sont associées à de l'hypertension artérielle, le diagnostic est alors sérieusement alourdi chez les patients. Le sang déversé hors du compartiment vasculaire va rapidement engendrer un hématome cérébral, qui occasionnera des signes neurologiques focaux brutaux en rapport avec les structures détruites ou comprimées par la lésion. Par ailleurs, il se constitue un œdème autour de l'hématome, ce qui aggrave la compression du cerveau dans la boîte crânienne, entraînant ou aggravant l'hypertension intracrânienne. Ce type d'accident est le plus dangereux en termes de mortalité et de séquelles (Unnithan, M Das and Mehta, 2022 ; Figure 3).

Quant aux AVC ischémiques, ils sont causés par l'obstruction du flux sanguin par un caillot sanguin ou thrombus. Ce blocage peut concerner une artère du SNC, comme l'artère cérébrale moyenne (ACM), ou un vaisseau à destination cérébrale, par exemple la carotide interne. La privation des apports sanguins entraînera un infarctus cérébral (lésion due à la mort cellulaire) au niveau de la zone normalement irriguée. Environ un quart de ces thrombi est dû à une arythmie cardiaque, un deuxième quart est causé par la rupture d'une plaque d'athérome (dépôt graisseux dans les artères), le troisième quart à une maladie des petites artères (elle-même pouvant être causée par l'hypertension et le diabète) et le quart restant à d'autres dommages vasculaires comme des lésions artérielles. Pour simplifier, retenons que l'AVC ischémique est divisé en deux sous-catégories : l'AVC thrombotique, lorsque le caillot se forme dans une artère cérébrale, et l'AVC embolique quand le caillot se forme en dehors du SNC et vient se loger dans une artère cérébrale *via* la circulation sanguine. Notons également que dans de très rare cas, l'infarctus cérébral présente une origine veineuse : on parle de thrombose veineuse cérébrale, qui représente moins de 1% des AVC (Meschia and Brott, 2018 ; Figure 3).

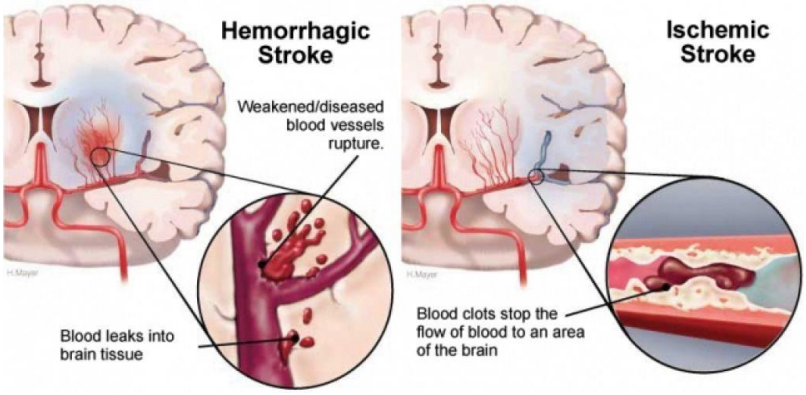


Figure 3 : Principaux types d'AVC - l'AVC hémorragique et l'AVC ischémique. L'AVC hémorragique est dû à la rupture d'un vaisseau sanguin du cerveau et à l'écoulement du sang dans le tissu cérébral tandis que l'AVC ischémique est dû à l'obstruction d'un vaisseau cérébral par un caillot sanguin.

Il existe une complication majeure survenant après un AVC mettant en cause cette classification étiologique binomiale. En effet dans certains cas un AVC d'origine ischémique va devenir hémorragique, on parle alors d'une transformation hémorragique (TH). Cette complication sévère survient dans 18% des AVC ischémiques d'origine thrombotique (Fiorelli et al., 1999) et dans 40% des AVC ischémiques emboliques (Molina et al., 2001). Le pronostic des patients diffère cependant de celui de l'AVC hémorragique qui induit les déficits les plus grave et reste le plus mortel (12% de mortalité après TH comparativement aux 40% causés par une hémorragie intracérébrale ; Dennis, 2003). Car bien que la complication hémorragique soit fréquente, elle est rarement symptomatique.

Dans ce manuscrit et pour ce projet, nous nous intéressons essentiellement aux AVC ischémiques et leurs complications hémorragiques.

E. Physiopathologie de l'AVC ischémique

Nous allons tenter ici de retracer succinctement la pathologie dans sa chronologie de l'AVC ischémique thrombotique. Nous parcourerons la formation du thrombus accompagnée des atteintes vasculaires, en passant par l'altération de la barrière hématoencéphalique jusqu'aux phénomènes d'excitotoxicité et d'inflammations correspondant aux dommages tissulaires.

1. Composition du thrombus

La formation du thrombus naît d'un déséquilibre au niveau des mécanismes normaux de réparation des vaisseaux, appelés hémostase et coagulation, et évolue jusqu'à l'obstruction partielle ou totale du vaisseau sanguin.

Les thrombi peuvent être constitués entre autres d'une partie dense riche en fibrine et plaquettes, de globules rouges, de cellules immunitaires comme les neutrophiles et de collagène (Liebeskind et al., 2011). La composition précise des thrombi obstruant les artères cérébrales est relativement difficile à déterminer, pour plusieurs raisons. Elle varie en fonction du type d'AVC, plutôt plaquettaire dans le cas d'un AVC d'origine athéromateuse et plutôt fibrineux dans le cas d'un AVC d'origine cardio-embolique. La composition diffère également en fonction du temps : plutôt plaquettaire au départ (dans les trois premières heures) pour devenir fibrineux par la suite. Les stratégies de développement médicamenteuses doivent prendre en considération cette grande variabilité dans la composition des thrombi (Figure 4).

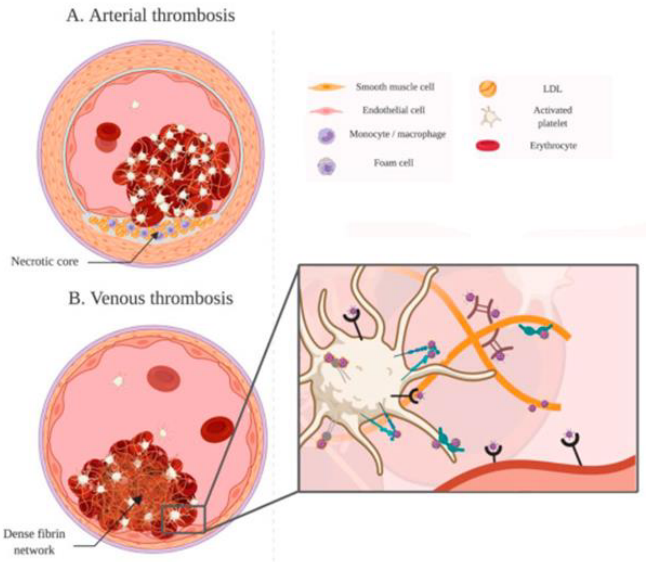


Figure 4 : Comparaison de la composition des thrombi artériels et veineux. Les caillots issus des artères (A) ont une composition riche en plaquettes, et sont aussi appelés « thrombi blancs ». Ils sont principalement dus à l'athérosclérose. Plusieurs voies de signalisation sont à l'origine de l'activation des cellules endothéliales impliquées dans la formation de thrombi. Les LDL pénètre le tissu, provoquant une inflammation locale et le recrutement de cellules inflammatoires circulantes. Le détachement de la plaque d'athérome déclenche le recrutement de cellules des muscles lisses pour prévenir la rupture de la paroi. Parfois, les plaquettes s'agrègent sur la paroi du vaisseau lésé provoquant la formation consécutive d'un réseau de fibrine. Les caillots de fibrines (B) sont eux d'origine veineuse et sont aussi appelés « thrombi rouges ». Ils contiennent des érythrocytes, un dense réseau de fibrine et quelques plaquettes. La formation du thrombus s'opère en réponse à différents signaux : une lésion de la paroi des vaisseaux, une stase du flux sanguin ou encore à une hypercoagulation du sang (Zenych, Fournier and Chauvierre, 2020).

Voici les deux mécanismes principaux induisant la formation d'un thrombus pouvant conduire à un AVC ischémique :

1- La formation du thrombus artériel peut faire suite à l'endommagement de la paroi artérielle interne (endothélium), d'origine purement mécanique ou athéromateuse. Alors, les composants de l'endothélium (notamment le collagène IV, la fibronectine, la laminine) et le facteur tissulaire (FT) exprimé également par les cellules musculaires lisses des vaisseaux vont être exposés à la circulation sanguine (Furie and Furie, 2008). Les plaquettes sanguines (ou thrombocytes) disposent à leur surface des récepteurs permettant d'adhérer à ces composants, ce qui entraîne leur activation conformationnelle (Jackson, Nesbitt and Westein, 2009). Le facteur von Willebrand (VWF) est une protéine sécrétée notamment par l'endothélium lésé et va se lier au collagène et aux plaquettes. Le neo-thrombus, riche en VWF et en plaquettes, est capable de se lier au fibrinogène (facteur de coagulation circulant).

En parallèle, l'activation plaquettaire entraîne une activation de la cascade de coagulation aboutissant à la génération de thrombine au niveau du thrombus. Cette protéine induit la transformation du fibrinogène en fibrine, protéine devenue fibreuse et qui entraîne un maillage solide du thrombus à la paroi vasculaire. Tout au long de ce processus d'accroissement du thrombus, ce dernier peut emboliser et obstruer une artère en aval de plus petit calibre. Ou bien si son ancrage à la paroi est suffisant et les interactions entre les plaquettes et autres composants sont suffisamment fortes, le thrombus se stabilise et continue sa croissance jusqu'à obstruer complètement l'artère dans laquelle il se forme (Kim et al., 2016 ; Figure 4).

2- Les arythmies cardiaques comme les fibrillations auriculaires vont être plutôt responsables de la formation d'un thrombus dit « de stase » engendré par des mécanismes distincts de ceux des thrombi artériels. Ils dépendent moins de l'agrégation plaquettaire que des voies intrinsèques et extrinsèques de la coagulation. La stase sanguine favorise l'accumulation de thrombine sanguine et active l'endothélium local, ce qui entraîne la sécrétion par ces derniers de P-sélectine et de VWF. Ces protéines vont favoriser l'adhésion de leucocytes (monocytes et neutrophiles) et de plaquettes. Les monocytes vont synthétiser le FT qui initie la voie extrinsèque de la coagulation et forme finalement de la thrombine. Les leucocytes vont

eux aussi favoriser la formation de thrombine par activation de la voie intrinsèque de la coagulation. *In fine*, cette importante quantité de thrombine va massivement participer au clivage du fibrinogène en fibrine. Nous pouvons ajouter que la thrombine est également capable d'activer le facteur XIII qui va stabiliser le réseau de fibrine et donc stabiliser le thrombus. Dans ce cas, nous comprenons que le thrombus est richement constitué de fibrine mais pauvre en plaquettes, comparativement à un thrombus d'origine athéromateuse (López and Chen, 2009 ; Figure 5).

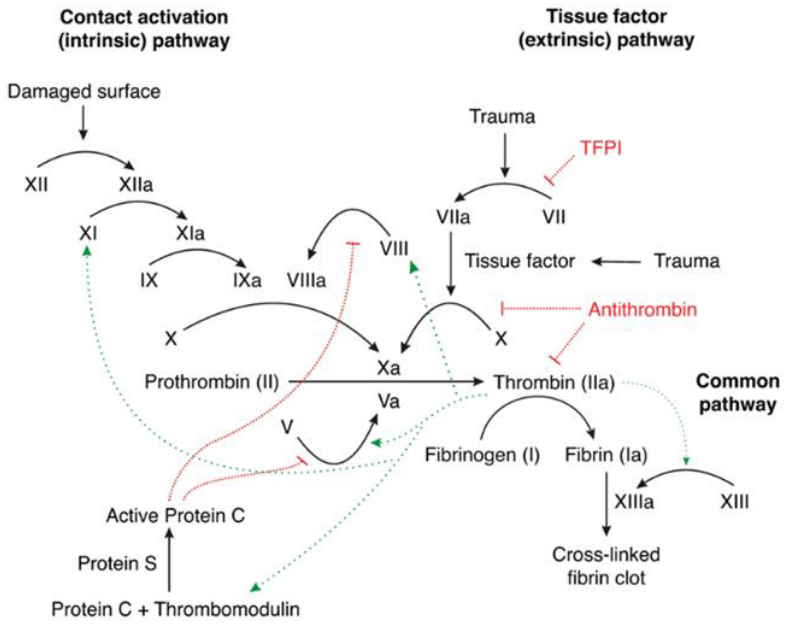


Figure 5 : Cascade de la coagulation. La voie intrinsèque de la coagulation commence par l'activation du facteur XII en XIIa après exposition au collagène endothélial, présent uniquement en cas de lésion endothéliale. Le facteur XIIa agit alors comme un catalyseur afin d'activer le facteur XI en XIa. Le facteur XIa active à son tour le facteur IX en IXa. Ce facteur IXa catalyse ensuite la réaction de transformation du facteur X en Xa. La voie extrinsèque débute par la libération d'un facteur tissulaire par les cellules endothéliales après un dommage externe. Ce facteur tissulaire va ensuite activer le facteur VII en VIIa. Le facteur VIIa active à son tour le facteur X en Xa. La voie commune débute au facteur X, activé en facteur Xa via la voie intrinsèque ou extrinsèque. Le facteur Xa une fois activé, en combinaison avec le facteur V, peut alors activer la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa). Le facteur IIa peut alors activer le fibrinogène en fibrine. Le facteur XIII agit ensuite sur les brins de fibrine formés pour créer un maillage de fibrine. Ce processus aide à la stabilisation du clou plaquettaire. La thrombine est également capable d'activer d'autres facteurs (XI et XIII) et cofacteur (V et VIII).

Lorsqu'un caillot est présent, les mécanismes endogènes de la fibrinolyse vont se déclencher afin de le dégrader et rétablir une circulation sanguine normale. Cependant, il arrive que ce mécanisme ne soit pas en mesure de pallier la formation du thrombus. Ce qui mène, dans les cas les plus graves, à une ischémie cérébrale.

2. Atteintes vasculaires

a. Réduction hétérogène du débit sanguin cérébral (DSC)

Après le blocage partiel ou total par un caillot d'une artère cérébrale s'en suit la diminution ou l'interruption du flux sanguin dans les branches alimentant la zone en aval. Ainsi, l'aire cérébrale en question voit sa population cellulaire privée soudainement d'oxygène et de glucose, ce qui provoque en quelques minutes sa mort. Chaque minute qui passe entraîne la destruction de deux millions de neurones en moyenne (Saver, 2006).

L'AVC ischémique est donc caractérisé par un cœur ischémique tissulaire, résultant de la mort cellulaire précoce débutant lors de la phase aigüe (quelques minutes après l'occlusion). Cette région est généralement considérée comme irrécupérable. La région entourant ce cœur est appelée pénombre. Elle subit dans un premier temps une réduction uniquement partielle de l'apport sanguin grâce à la présence de vaisseaux collatéraux qui maintiennent cette zone à flot. Cette zone également dite « à risque » est à fort enjeu car sa reperfusion rapide et suffisante sera corrélée avec de meilleurs résultats neurologiques chez les patients victimes d'un AVC. Cette zone tissulaire d'importance majeure est la cible principale pour le développement de médicaments thrombolytiques pour la phase aigüe de l'AVC ischémique (Candelario-Jalil and Paul, 2021). La dernière zone, la plus éloignée du cœur ischémique est l'oligémie bénigne, tissu hypoperfusé ne présentant cependant aucune mort cellulaire (Furlan et al., 1996 ; Figure 6).

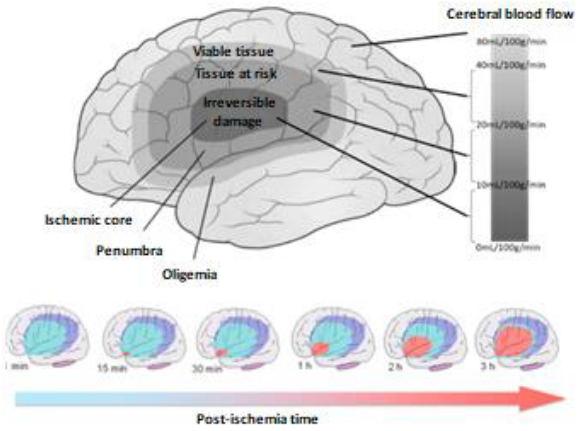


Figure 6 : Atteintes tissulaires lors d'un AVC ischémique. Suite à un AVC ischémique, on distingue 3 régions : le cœur ischémique, qui correspond à la zone de dommages irréversibles, la pénombre ischémique, tissu à risque où les dommages sont réversibles, et l'oligémie bégnine, zone d'hypoperfusion qui ne présente cependant pas de mort cellulaire. La pénombre ischémique va progressivement nécroser et former des dommages irréversibles en quelques heures.

b. Mécanismes compensatoires face aux atteintes vasculaires

Deux importants mécanismes vont être mis en jeu pour contrebalancer cette chute de débit sanguin cérébral (DSC).

- ✓ L'augmentation de la fraction d'extraction de l'oxygène sanguin par le cerveau (CEO) permise par l'anastomose artérielle dans le SNC :

Les valeurs de CEO sont physiologiquement comprises entre 24 et 42 % mais peuvent aller jusqu'à 100% en condition ischémique (Audibert, Charpentier and Mertes, 2007). Ce mécanisme compensatoire est supporté grâce à un réseau anastomotique artériel cérébral primordial, le polygone de Willis. De plus, au niveau du SNC, les artères postérieures (vertébrales et tronc basilaire notamment) et antérieures (carotides internes) étant reliées, une réduction du DSC dans l'un de ces vaisseaux (ou de leurs collatérales) peut être rapidement compensé par une vasodilatation des autres (Fang et al., 2016).

De plus, la circulation collatérale en aval des grandes artères cérébrales va former de nombreuses anastomoses dans le cerveau, ce qui permettra la suppléance temporaire des apports sanguins dans les régions ischémiques encore sauvables (la pénombre). Cependant, ces réseaux vasculaires collatéraux varient considérablement d'un individu à l'autre et le succès

de la reperfusion spontanée après un AVC ischémique varie en fonction des individus (El Amki and Wegener, 2017). On peut donc raisonnablement penser que les trois zones décrites plus haut (cœur, pénombre et oligémie) sont directement dépendantes de la « qualité » des anastomoses collatérales (Figure 7).

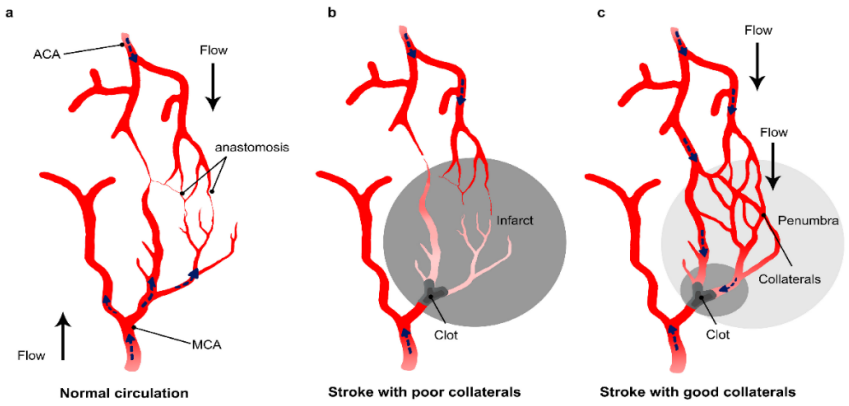


Figure 7 : Importance du débit collatéral sur la reperfusion après un AVC ischémique. (a) Réseau collatéral présentant des anastomoses entre l'artère cérébrale moyenne (MCA) et l'artère cérébrale antérieure (ACA). (b) Lors d'un AVC ischémique, si le réseau collatéral n'est pas suffisamment développé, le flux sanguin n'est pas suffisant pour compenser la réduction du débit sanguin cérébral liée à l'occlusion de l'artère. (c) Lors d'un AVC ischémique, si le réseau collatéral est suffisamment développé, alors la réduction du débit sanguin liée à l'occlusion de l'artère peut être temporairement compensée (El Amki and Wegener, 2017).

- ✓ La réaction de la pression artérielle (PA) systémique :

L'altération après ischémie, même très focale, du DSC entraîne dans certains cas la baisse de la PA systémique, ce qui peut ensuite réduire davantage la perfusion du tissu affecté. En conséquence, ce phénomène serait délétère pour les patients (Ahmed, Näsman and Wahlgren, 2000). Paradoxalement, l'observation des cas d'hypertension systémique post-AVC n'est pas forcément signe de meilleurs résultats. En effet, il est suggéré que l'hyperperfusion focale associée à l'augmentation de la PA au niveau du tissu nécrotique favorise le développement d'un gonflement malin, un œdème cérébral (Marchal, Young and Baron, 1999). Il est donc difficile de déterminer la prise en charge optimale de PA changeante en phase aiguë de l'AVC. L'essai CHHIPS basé au Royaume-Uni (Potter et al., 2009) conclut en faveur de la réduction thérapeutique de la PA post-AVC. Et l'étude sur 306 patients de Hong et collaborateurs (Hong et al., 2019) conclut qu'une PA élevée peut être nocive chez les patients

sans reperfusion focale, mais protectrice chez ceux qui ont préalablement reperfusé localement.

3. Atteintes tissulaires

La durée entre l'occlusion artérielle, la mort cellulaire puis la nécrose tissulaire dépend de multiples facteurs dont l'intensité du DSC résiduel et le type cellulaire considéré (du plus au moins sensible à l'ischémie : les neurones, les cellules gliales et les cellules endothéliales). Plusieurs phénomènes vont participer à la dégradation tissulaire et sont discutés dans cette partie. La privation énergétique entraînant les dépolarisations envahissantes des neurones, l'excitotoxicité, l'apoptose et l'inflammation participent à la mort neuronale. Ces phénomènes ne se déroulent pas exactement en même temps, chacun ayant une cinétique propre (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999 ; Figure 8).

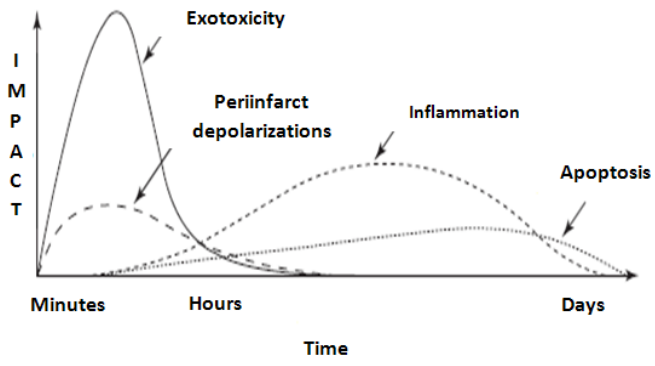


Figure 8 : Mécanismes cellulaires survenant après l'AVC ischémique. La survenue d'un AVC est à l'origine d'une excitotoxicité induite par l'activation excessive des récepteurs glutamatergiques par le NMDA entraîne une entrée massive de Ca^{2+} dans les cellules de la zone ischémiée. Cette excitotoxcicité peut induire des dépolarisations neuronales autour de la zone ischémiée ainsi qu'une inflammation. Ces phénomènes sont à l'origine de la mort des cellules par apoptose, initiée quelques minutes après l'AVC et perdurant plusieurs heures après sa survenue (Dirnagl et al., 1999 ; Zaleska et al., 2009).

a. Privation énergétique

Durant les premières minutes après l'occlusion, la chaîne respiratoire mitochondriale, l'usine énergétique cellulaire, est perturbée par le manque d'oxygène et l'Adénosine Triphosphate (ATP) n'est plus synthétisée. En l'absence de ce carburant cellulaire, les pompes transmembranaires Na^+/K^+ ATPases ne fonctionnent plus, et le potentiel de membrane des neurones n'est pas rétabli à son niveau basal. Les neurones présynaptiques restent alors

dépolarisés, ce qui engendre une entrée massive de Na^+ et Ca^{2+} dans les cellules et une libération de K^+ et de glutamate (acteur majeur de l'excitotoxicité) dans l'espace extracellulaire. Alors l'homéostasie ionique entre milieu extra et intracellulaire n'est plus respectée, la cellule gonfle et finit par éclater, causant l'apparition d'un œdème cytotoxique (Martin, Lloyd and Cowan, 1994).

b. Excitotoxicité

L'excitotoxicité fût le premier mécanisme moléculaire impliqué dans les lésions ischémiques à être identifié puis étudié en détails. L'excitotoxicité débute par la libération rapide et massive de glutamate, le principal acide aminé excitateur du cerveau, dans le milieu extracellulaire à la suite du déficit énergétique (Chamorro et al., 2016).

Les récepteurs au glutamate :

Plusieurs types de récepteurs au glutamate ont été identifiés. Nous allons nous focaliser sur les récepteurs ionotropes (munis d'un canal ionique en opposition aux récepteurs métabotropes) largement impliqués dans ces processus d'excitotoxicité. Ils en existent trois types et sont nommés en fonction des agonistes qui les activent : les récepteurs NMDA (NMDAR), les récepteurs AMPA (AMPAR) et les récepteurs kaïnate. L'ensemble de ces récepteurs ionotropes du glutamate sont donc des canaux laissant passer les cations de façon non sélective, le Na^+, le K^+ et le Ca^{2+}, et produisent toujours des réponses post-synaptiques excitatrices (PPSE ; Figure 9).

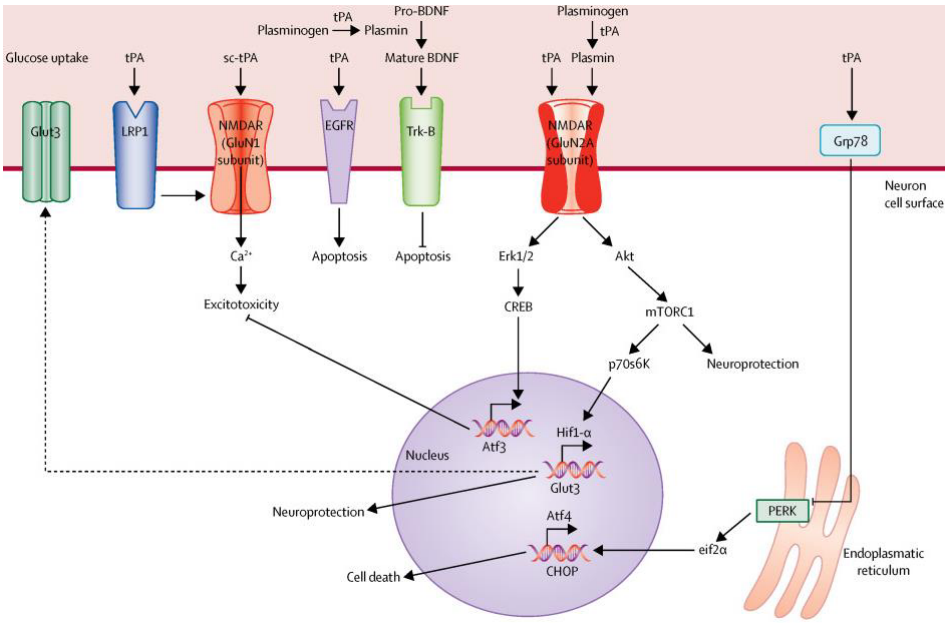


Figure 9 : Mécanismes moléculaires et cellulaires de l'AVC ischémique. Le déficit énergétique lié à la défaillance de la pompe Na^+/K^+ induit une entrée massive de Ca^{2+} au sein du neurone ainsi qu'une libération de glutamate au niveau de la fente synaptique. Ce glutamate peut alors activer les récepteurs post-synaptiques AMPA, NMDA et kaïnate engendrant une entrée de Ca^{2+}, Na^+ et Cl^- dans la cellule, tandis que le K^+ sort de la cellule. La sortie du K^+ de la cellule est responsable de la propagation de la dépolarisation neuronale jusqu'à la pénombre. La génération de radicaux libre par l'activation de voies enzymatiques médiées par le Ca^{2+} va provoquer l'activation microgliale et l'infiltration des leucocytes dans le parenchyme. Ce déséquilibre ionique est également à l'origine d'un œdème cytotoxique (Thiebaut *et al.*, 2018).

Trois familles de sous-unités des NMDAR ont été identifiées : les sous-unités GluN1, GluN2 et GluN3 (anciennement NR1, NR2 et NR3 ; Paoletti, 2011). GluN1 est présent de manière ubiquitaire dans le SNC et se montre essentiel à la fonctionnalité des NMDAR tandis que les deux autres sont spécifiques à certaines zones cérébrales.

Le NMDAR nous intéressera particulièrement dans ce projet. Il est composé de quatre sous-unités formant le canal ionique et doit comprendre obligatoirement deux sous-unités GluN1, associées à deux autres sous-unités GluN2 et/ou GluN3. On retrouve le NMDAR de manière ubiquitaire dans le SNC, sur les astrocytes (Krebs et al., 2003), au sein des oligodendrocytes (Káradóttir et al., 2005), à la surface des lymphocytes (Tuneva, Bychkova and Boldyrev, 2003), dans les cellules neuro-épithéliales (Sharp et al., 2003) et bien sûr au niveau des neurones pré et postsynaptiques. De manière intéressante, les NMDAR sont également retrouvés à la surface des cellules endothéliales cérébrales, aussi bien chez la souris que chez l'humain (Macrez et al., 2016).

Les mécanismes excitotoxiques :

Le glutamate (ainsi que des composés apparentés) peut devenir toxique pour les neurones lors d'une transmission synaptique excitatrice de longue durée. Dans les conditions normales, la concentration du glutamate libérée dans la fente synaptique atteint certes des niveaux élevés (environ 1 mM), mais ces valeurs ne sont maintenues que pendant quelques millisecondes. Les conditions ischémiques avec le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, entraînent des concentrations anormalement hautes de glutamate s'accumulant dans l'espace intercellulaire (Gouix et al., 2009). Ce glutamate en excès dans la fente synaptique va activer en masse ses récepteurs ce qui entraîne une dépolarisation membranaire et donc l'entrée massive de Ca^{2+} dans les neurones. La stimulation des NMDAR seule mène à l'activation de la protéine RhoA, qui elle-même contribue à la mort neuronale en activant certaines kinases spécifiques du stress excitotoxique (lipases et autres DNases ; Stankiewicz and Linseman, 2014). Et l'invasion invasion calcique cellulaire va aboutir à la mort cellulaire par différentes voies :

1- En changeant l'osmolarité cellulaire, ce qui provoque une entrée d'eau dans le cytoplasme, induisant un œdème cytoplasmique.
2- En engendrant la dépolarisation de la membrane mitochondriale, la faisant rompre. L'ATP n'est alors plus synthétisée et des déchets issus de la chaîne respiratoire enrayée sont libérés dans le cytoplasme comme des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et le cytochrome C déclenchant ainsi les mécanismes de mort tardive d'apoptose (décrit ci-après).
3- En activant l'oxyde nitrique synthase neuronale (*neuronal nitric oxide synthase*, nNOS), qui va produire du monoxyde d'azote en quantité et qui va ainsi participer au stress oxydatif jouant également un rôle délétère dans l'AVC (Chamorro et al., 2016).
4- En aboutissant à un cercle vicieux car cette entrée d'ions Ca^{2+} dans les neurones provoque également une nouvelle libération de glutamate.

Les dépolarisations péri-infarcts (PID) :

Les PID sont observées depuis longtemps dans les modèles d'AVC expérimentaux (Branston, Strong and Symon, 1977), et ont depuis été détectées chez les patients à la suite d'un AVC ischémique (Dohmen et al., 2008). Le glutamate relargué en excès dans le tissu lésé

peut activer les neurones voisins, devenant hyperactifs, et produisant eux-mêmes du glutamate. Ce phénomène peut se propager au-delà du tissu ischémié, qui s'avèrera lui aussi en souffrance. Ainsi, ces PID entraînent une expansion progressive de l'infarctus (Kudo, Zhao and Nowak, 2016) et peuvent même être responsables de la formation de l'œdème cytotoxique (Dreier and Reiffurth, 2015).

c. Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée, indispensable au développement et au maintien de la vie d'un organisme, a elle aussi sa part de responsabilité quant à la physiopathologie de l'AVC (Kerr, Wyllie and Currie, 1972).

Pendant l'ischémie, l'activation des NMDAR accompagnée de l'accumulation de Ca^{2+} intracellulaire provoque (entre autres, voir ci-dessus) le clivage de la protéine pro-apoptotique Bcl-2, au niveau de la membrane mitochondriale. Bcl-2 tronquée interagit ensuite avec d'autres protéines pro-apoptotiques afin d'ouvrir les pores mitochondriaux. L'ouverture des pores favorise la libération du cytochrome C mitochondrial et du facteur d'induction de l'apoptose (*AIF, apoptosis-inducing factor*). La cascade d'activation des caspases se déclenche alors, provoquant des dommages de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et donc la mort cellulaire (Nikoletopoulou et al., 2013). Il a été rapporté que les protéines caspases sont particulièrement activées dans la zone péri-lésionnelle de l'ischémie et que leur inhibition pourrait protéger le tissu cérébral (Li et al., 2000 ; Figure 10).

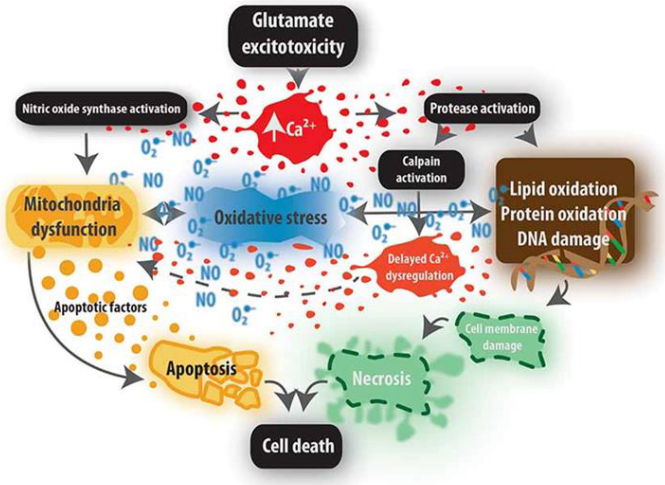


Figure 10 : Mécanismes moléculaires conduisant à la mort cellulaire après un AVC ischémique. L'entrée excessive de Ca^{2+} dans les neurones, liée à l'activation des récepteurs au glutamate par le NMDA induit l'activation de cascades enzymatiques provoquant le dysfonctionnement des mitochondries, un stress oxydatif et l'oxydation de macromolécules. Ces évènements sont à l'origine de la mort des cellules (Belov Kirdajova et al., 2020).

L'apoptose se distingue de la nécrose avec des stimuli déclencheurs, des voies biochimiques sollicitées, des modifications structurelles et des modes d'éliminations cellulaires très différents (Radak et al., 2017). Cette précision permet d'aboutir à la théorie répandue suivante. Dans les premiers temps de l'AVC les processus de mort cellulaire surviennent par nécrose au sein du cœur ischémique tandis que les phénomènes apoptotiques surviennent dans un second temps en périphérie de ce cœur et dans la zone péri-lésionnelle. Toutefois, cette doctrine a du plomb dans l'aile depuis que des marqueurs d'apoptose ont été identifiés au sein du foyer ischémique (Benchoua et al., 2001). Ce qui tend depuis à adopter une vision moins compartimentée des processus de mort cellulaire au cours de l'ischémie et permettrait aux stratégies anti-apoptotiques précoces de cibler des cellules au sein même du foyer ischémique.

4. Altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE)

La BHE, composée des cellules endothéliales cérébrales, des péricytes, de la glie et des neurones, participe au maintien de l'homéostasie cérébrale en contrôlant les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral (Weiss et al., 2009 ; Figure 11).

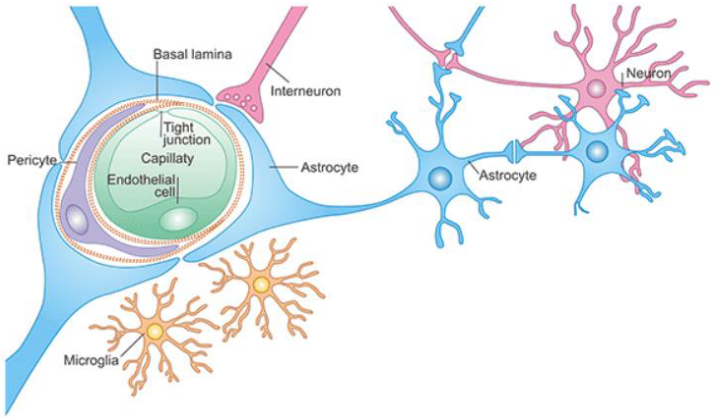


Figure 11 : Schématisation de la BHE. La BHE est constituée de cellules endothéliales, de péricytes, d'une lame basale et de pieds astrocytaires.

En condition ischémique, la perméabilité de la BHE est attribuée, en partie, aux métalloprotéinases matricielles (MMP) responsables de la dégradation des jonctions serrées entre cellules endothéliales et de la lame basale (Yang et al., 2007).

Lors d'un AVC ischémique l'ouverture de la BHE est biphasique (Kuroiwa et al., 1985). C'est-à-dire qu'une première altération a lieu durant les premières heures de la phase aigüe de l'ischémie (Rosenberg, Estrada and Dencoff, 1998). Cette primo-ouverture, réversible, est attribuée à une augmentation de l'expression de MMP-2 en particulier (Nakaji et al., 2006). Puis dans un second temps, entre 24 et 48 heures, arrive une infiltration leucocytaire et une activation de MMP-9, conduisant cette fois à une rupture complète de la BHE et à des dommages tissulaires sévères (Pun, Lu and Moochhala, 2009).

La conséquence principale de la rupture de la BHE est l'apparition d'un œdème vasogénique caractérisé par un passage d'eau du compartiment vasculaire vers le parenchyme cérébral (Yang et al., 2007). A l'instar des autres œdèmes cérébraux, celui-ci va être responsable d'une augmentation du volume cérébral associé à une élévation de la pression intracrânienne. De plus, les patients présentant une ouverture de la BHE après un AVC ischémique ont un plus grand risque de TH et un pronostic à long terme empiré (Hjort et al., 2008).

5. Inflammation et AVC

L'inflammation est la réaction du système immunitaire à une agression externe ou interne. En condition physiologique, les lymphocytes et les monocytes patrouillent dans la circulation cérébrale tandis que la microglie résidente est située dans le parenchyme cérébral. Ces deux populations sont séparées par la BHE. Lors d'un AVC, la réaction inflammatoire peut se décrire comme une cascade de réactions orchestrées qui s'initie immédiatement après l'occlusion du vaisseau pour évoluer et perdurer durant les jours et les semaines suivantes (Anrather and Iadecola, 2016). Dans les premiers instants, une rapide activation des cellules résidentes, en particulier des cellules microgliales, est rapidement accompagnée par l'infiltration dans le parenchyme des cellules inflammatoires circulantes telles que les granulocytes, les neutrophiles, les lymphocytes T ainsi que les monocytes/macrophages (Gerhard et al., 2000; Schilling et al., 2003). Après leur recrutement, les cellules s'activent et participent à la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires impliquées dans le recrutement spécifique de leucocytes au niveau des vaisseaux de la zone ischémiée (Chen et al., 2003, 2021). Quelques heures après le début de l'ischémie, ces cellules immunitaires ont commencé à libérer des médiateurs pro-inflammatoires tels que des interleukines (Il) ou le TNF. Ces médiateurs induisent l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et les leucocytes, permettant l'infiltration de ces derniers dans le parenchyme par diapédèse (del Zoppo et al., 1991 ; Figure 12).

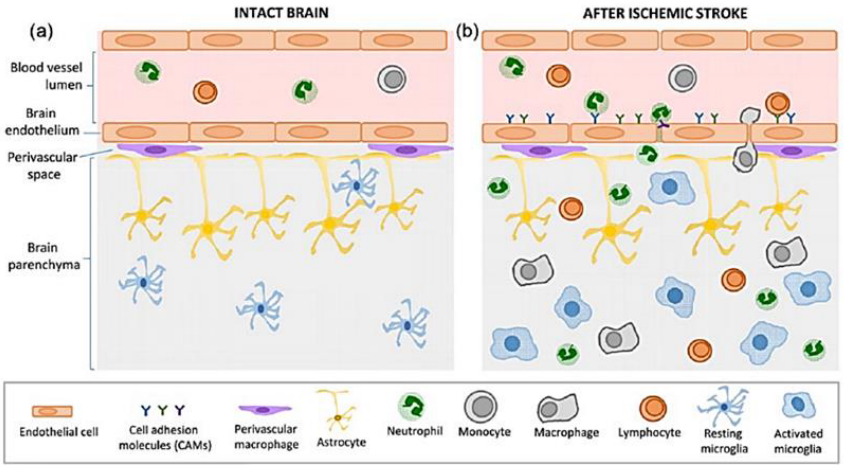


Figure 12 : Réactions immunitaires après la survenue d'un AVC ischémique. (a) En condition physiologiques, la BHE est formée de cellules endothéliales reliées entre elles par des jonctions serrées, de péricytes, d'une lame basale et de pieds astrocytaires. Cette BHE constitue une séparation entre le cerveau et le compartiment sanguin et assure une protection cérébrale contre les agents pathogènes circulant dans le sang. Dans ces conditions, les cellules immunitaires circulent librement dans le sang tandis que les cellules microgliales sont à l'état de repos dans le parenchyme. (b) A la suite d'un AVC ischémique, les cellules endothéliales présentes au niveau du site de lésion sont activées, provoquant la disparition des jonctions serrées, et expriment des molécules d'adhésion cellulaires. Ces dernières permettent le roulement et l'adhérence des leucocytes au niveau luminal

du vaisseau sanguin, et ainsi leur migration du compartiment vasculaire vers le parenchyme cérébral. Les leucocytes infiltrés sécrètent alors des facteurs pro-inflammatoires permettant le recrutement de monocytes/macrophages, puis de lymphocytes. La microglie quant à elle devient activée et sécrète des molécules pro-inflammatoires tout en étant capable de phagocyter (Drieu *et al.*, 2018).

L'utilisation de microparticules de fer (micrometer-sized paramagnetic iron oxide, MPIO) couplées à des anticorps anti-VCAM-1 (molécule d'adhésion exprimée par des cellules endothéliales activées) permettent une imagerie ultrasensible de l'inflammation focale après ischémie (Montagne et al., 2012). Ainsi, une étude réalisée au sein du laboratoire a utilisé cette méthode pour mettre en évidence 24 heures après une occlusion transitoire de l'ACM, une surexpression de VCAM-1, reflet de l'inflammation (Gauberti et al., 2013). Cette surexpression subsiste jusqu'à cinq jours après l'ischémie et est particulièrement importante dans la périphérie du cœur ischémique.

Le blocage, par l'utilisation d'un anticorps, de la molécule d'adhésion α4-intégrine présente sur l'endothélium, inhibe la transmigration des lymphocytes vers le parenchyme et réduit la taille de la lésion chez le rat (Becker et al., 2001). De la même manière, le blocage des molécules d'adhésion leucocytaires et endothéliales telles que la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM), la P-Sélectine ou la E-sélectine induit une diminution du volume de l'infarctus (Zhang et al., 1994; Morikawa et al., 1996; Suzuki et al., 1999).

Dans la phase subaigüe de l'ischémie, les leucocytes infiltrés et les cellules résiduelles activées participent à la sécrétion de molécules pro-inflammatoires (Il-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α), de radicaux libres et de protéases telles que les MMP, prenant part ainsi à l'extension de la zone ischémiée (Grilli et al., 2000). Il a été montré qu'une inactivation des cytokines pro-inflammatoires, telles qu'IL-8 ou IL-1β, avait un effet neuroprotecteur et réduisait la taille de la lésion tissulaire (Matsumoto et al., 1997).

F. Les transformations hémorragiques (TH)

La TH est caractérisée par une zone de saignement plus ou moins étendue dans et/ou au-delà de la zone ischémiée associée à l'augmentation de la morbidité et de la mortalité (Berger et al., 2001). Cette complication est relativement courante car surviendrait chez 10 à 40% des patients concernés par un AVC ischémique (Terruso et al., 2009). Chez l'Homme, la

présence de certaines comorbidités (tel que le diabète) et l'utilisation de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) en tant que thrombolytique durant la phase aigüe de l'AVC (voir I.H.) exacerbent la proportion et la gravité des TH (Thiebaut *et al.*, 2018; Simats and Liesz, 2022). Il s'agit bien là de la principale complication du tPA, le seul thérapeutique approuvé par la *FDA (Food and Drug Administration)* pour traiter l'AVC ischémique aigu.

1. Classification des TH

La sévérité des TH varie d'un saignement microscopique à de grandes hémorragies qui dépassent la taille de la lésion ischémique. Les études cliniques divisent fréquemment cette complication en quatre groupes (Classification ECASS : *European Cooperative Acute Stroke Study*) :

- ✓ Infarctus hémorragique de type 1 (HI1) : Pétéchies (ruptures de petits capillaires) isolées au sein du tissu lésé, sans effet de masse et asymptomatiques
- ✓ Infarctus hémorragique de type 2 (HI2) : Pétéchies confluentes au sein du tissu lésé, sans effet de masse attribuable au saignement.
- ✓ Hématome parenchymateux type 1 (PH1) : Lésion sanguine homogène occupant ≤ 30% de la zone ischémiée, avec un effet de masse « minime » attribuable à l'hématome.
- ✓ Hématome parenchymateux type 2 (PH2) : Lésion homogène occupant > 30% de la zone ischémiée, avec un effet de masse « substantiel » attribuable à l'hématome.

On retrouve régulièrement un autre type de classification dans les articles prenant en compte l'état neurologique clinique du patient basé sur le score NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale). Grâce à ce score très répandu, on peut simplement diviser la complication en TH symptomatique (score NIHSS > 4 dans les 36 heures suivant l'AVC) ou asymptomatique (Dzialowski et al., 2007). Notons qu'avec ce score, une TH dite « asymptomatique » peut malgré tout aggraver l'état clinique du patient à plus long-terme si l'œdème continue de croître ou dans le cas de TH plus tardives (Motto et al., 1999).

2. Etiologie des TH

Les causes d'apparition des TH ne sont pas parfaitement connues mais il existe une explication consensuelle dans la littérature. La cause du saignement est la résultante de la

physiopathologie de l'AVC ischémique expliquée précédemment ; notamment du fait de l'altération et du remodelage des vaisseaux sanguins impactés. Pour simplifier, les TH résultent de l'altération de la BHE. Elles se produisent surtout lors de la reperfusion du tissu cérébral, c'est à dire après la recanalisation de l'artère endommagée bouchée (Jickling et al., 2014). On comprend alors que l'action thrombolytique du tPA, seul traitement autorisé pour traiter la phase aigüe de l'AVC, peut engendrer une fuite de sang dans le tissu nerveux. Cet effet post-thrombolytique indésirable engendrant des TH sera discuté dans la partie II. de ce manuscrit, consacrée au tPA.

A l'heure actuelle il est difficile de déterminer si les mécanismes étiologiques sont les mêmes dans le cas des hémorragies pétéchiales (HI) ou lors des hémorragies parenchymateuses (PH). En effet, les HI sont considérées dans certains cas comme marqueur de bon pronostic en indiquant une reperfusion précoce du tissu ischémié, contrairement aux PH (Thomalla et al., 2007).

a. Données précliniques et cliniques des TH

Les modèles précliniques d'AVC sur rongeur dans lesquels on peut contrôler la recanalisation artérielle permettent de valider l'impact de la reperfusion sur les TH. Pour exemple, après l'occlusion de l'ACM (MCAo) de manière mécanique chez le rat, 82% des animaux souffrent de TH après reperfusion tardive (5 heures) tandis que le groupe sans reperfusion a une proportion de TH de 18% (Lu et al., 2008, 2009). Cette augmentation de TH après reperfusion est souvent corrélée avec une aggravation de la mortalité dans les modèles murins (Jickling et al., 2014). Les études de ce type sur les rongeurs sont en adéquation avec ce que l'on observe chez l'Homme chez qui la thrombectomie (recanalisation thérapeutique mécanique ; voir I.I.) après AVC ischémique augmente le risque de TH (Dorado et al., 2013).

Notons également que dans différents modèles de MCAo murins et dans de nombreux articles, plus la durée de l'occlusion artérielle est longue avant la reperfusion plus les taux et la sévérité des TH augmente (Jickling et al., 2014). Chez l'Homme, l'allongement du délai entre le début de l'ischémie et la reperfusion est également associé à une augmentation du risque et de la sévérité de TH chez les patients non-traités au tPA ou à la thrombectomie mécanique (Copin and Gasche, 2008). Cette notion de temporalité de reperfusion se complique quand on sait qu'une recanalisation trop précoce est aussi associée à une élévation du risque de TH (Bang

et al., 2011), bien que la sévérité des TH due à une reperfusion précoce est moins grâve que celles dues à une reperfusion tardive (rappelons-nous des HI parfois marqueurs de bons pronostics).

b. Axes de progression des modèles animaux dans l'étude des TH

Cependant les modèles animaux ne sont pas totalement transposables aux observations cliniques en ce qui concerne les TH. En effet, les patients présentent souvent des comorbidités modulant (souvent négativement) ce risque hémorragique ; et ces pathologies (comme le diabète et l'hypertension) ne sont que trop rarement modélisées chez l'animal pour la compréhension des phénomènes hémorragiques.

Chez l'Homme, la reperfusion post-AVC est également un processus dynamique et parfois progressif avec des enchaînements de cycles de reperfusion plus ou moins importants au cours du temps (Jickling et al., 2014). Les études précliniques qui utilisent beaucoup les modèles mécaniques de MCAo ne sont donc pas représentatifs des subtilités vasculaires *in situ* aboutissant aux TH. En d'autres termes, la reperfusion totale et brutale observée dans ces modèles peut conduire à des TH et des atteintes tissulaires exacerbées par rapport aux observations cliniques. Nous discuterons de l'importance du choix et de l'élaboration des modèles précliniques d'AVC dans la partie IV. de ce manuscrit.

La dernière limite des modèles murins est le timing d'observation des TH qui est souvent compris entre la reperfusion et les premières 24 heures après l'AVC. Et bien souvent cette observation n'a lieu qu'une fois. Nous soulevons ici un problème translationnel car chez les patients ayant subi un AVC, plusieurs épisodes de TH peuvent survenir durant les 24 premières heures mais au cours des jours et des semaines suivant l'AVC (Paciaroni et al., 2008).

Ainsi ces différents facteurs présents chez l'Homme méritent d'être retranscrits au mieux chez les animaux pour améliorer la modélisation des phénomènes de TH dans les modèles précliniques.

3. Physiopathologie des TH

Deux types de TH peuvent être distinguées en fonction du moment de leur apparition : la TH précoce, qui survient dans les 24 heures suivant le début de l'AVC, et la TH retardée qui

apparait au-delà des 24 heures jusqu'à plusieurs jours après l'AVC. Dans les deux cas, le rôle des MMP, des ROS et de l'inflammation est primordial mais l'action du remodelage vasculaire concerne uniquement les TH retardées. (Jickling et al., 2014 ; Figure 13).

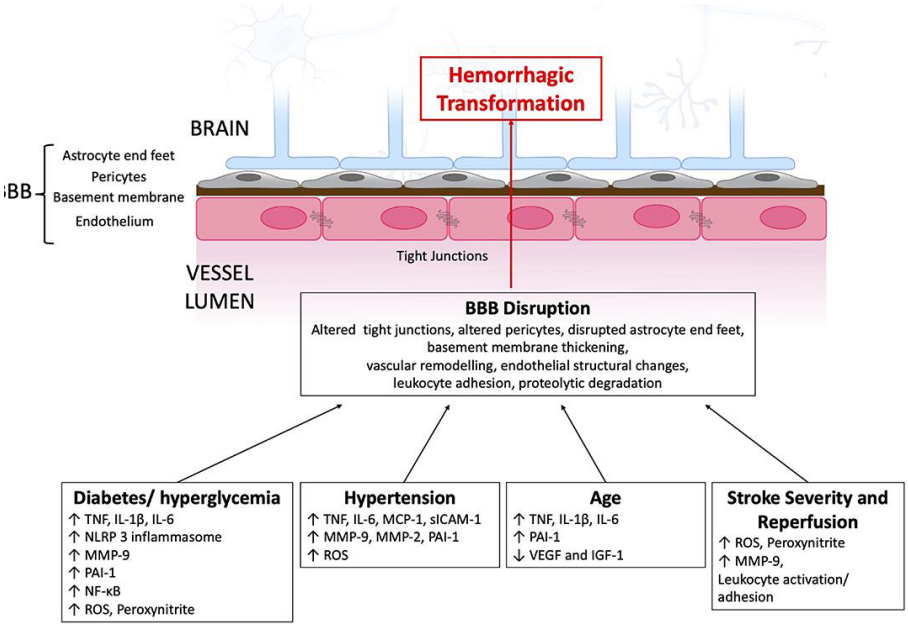


Figure 13 : Facteurs à l'origine des TH après un AVC. A la suite de l'AVC et de la reperfusion, l'augmentation de la production de ROS, de peroxynitrite et des MMP-9 ainsi que l'activation et l'adhésion leucocytaire provoquent la perte d'intégrité de la BHE à l'origine des TH. Les facteurs de risque tels que la diabète, l'hypertension et l'âge sont également à l'origine des TH (Spronk *et al.*, 2021).

a. Le rôle des MMP dans les TH

Bien que les MMP présentes dans le compartiment sanguin, comme MMP-9, jouent un rôle majeur dans la perturbation précoce de la BHE, les protéases provenant du cerveau y contribuent également, à l'instar de MMP-2. (Liu et al., 2012 ; Suofu et al., 2012 ; Figure 13).

MMP-2 est principalement sécrété par les astrocytes, les cellules endothéliales, et potentiellement les leucocytes. Son expression ainsi que celle de ses activateurs augmente dans le SNC dans les 1 à 3 heures suivant l'apparition de l'AVC chez le rongeur et reste élevée pendant plusieurs jours (Heo et al., 1999; Liu et al., 2012). Ce taux élevé de MMP-2 est corrélé à l'ouverture précoce de la BHE et à la dégradation des protéines des jonctions serrées endothéliales, claudine-5 et occludine dans les modèles de MCAo chez le rongeur (Rosenberg, Estrada and Dencoff, 1998; Yang et al., 2007; Liu et al., 2012). De plus, il a été démontré que

l'injection directe de MMP-2 dans le cerveau des rongeurs perturbe la BHE et entraîne une hémorragie, confirmant ainsi le rôle de MMP-2 dans la TH précoce.

Dans les premières 24 heures après le début de l'AVC, MMP-9 est principalement exprimée par les cellules endothéliales (Zhao et al., 2006) tandis qu'elle est principalement identifiée dans les cellules cérébrales tels que les neurones, les astrocytes et la microglie à mesure que l'AVC évolue (Zhao et al., 2006; del Zoppo et al., 2012). Cela confirme l'idée que les leucocytes circulants, y compris les neutrophiles, contribuent à la production de MMP-9 au début de l'AVC, tandis que les cellules cérébrales sont la source prédominante de MMP-9 dans une phase plus tardive de l'AVC. MMP-9 est impliquée dans la dégradation des protéines de jonctions serrées (claudine-5, occludine et Zona occludens-1) et des protéines de la lame basale (fibronectine, lamine et collagène ; Yang et al., 2007). Après un AVC ischémique, MMP-9 favorise la perméabilité de la BHE, aussi bien chez les animaux que chez l'Homme (Castellanos et al., 2003; Yang et al., 2007). Chez les souris déficientes en MMP-9 ou traitées avec un inhibiteur de MMP-9, une réduction de la taille de l'infarctus et de la dégradation des jonctions serrées est observée après MCAo (M. Asahi et al., 2000; Lo, 2008) .

MMP-3 matricielle est produite par les péricytes (Jickling et al., 2014) et les cellules endothéliales (Suzuki et al., 2007) après un AVC ischémique. Elle active la pro-MMP-9 en MMP-9 active ce qui favorise l'altération de la BHE, notamment lorsqu'elle est associée au tPA. Une étude menée chez la souris, a permis de montrer une augmentation des MMP-3 dans le cerveau dans les 24 heures suivant le début de l'AVC (Suzuki et al., 2007). Cette élévation de MMP-3 peut survenir à la suite de l'inflammation liée à l'AVC ou peut être induite par le tPA (voir II.E.2.g.). Chez la souris, l'inflammation cérébrale induite par le lipopolysaccharide entraîne une dégradation de la BHE, tandis que cet effet est réduit chez les souris déficientes en MMP-3 diminuant ainsi le taux de TH à 24 heures (Gurney, Estrada and Rosenberg, 2006).

Les protéases cérébrales contribuent également aux TH retardée comme MMP-2 et MMP-10, MMP-13, mais encore la plasmine, le tPA et l'urokinase (Suzuki et al., 1999; Wang et al., 2003; Yepes et al., 2003).

b. Le rôle des ROS dans les TH

La reperfusion des tissus ischémiques entraîne la production de ROS à partir de plusieurs sources tels que les mitochondries intracellulaires, les récepteurs membranaires et les médiateurs inflammatoires (Gürsoy-Ozdemir, Can and Dalkara, 2004; Fraser, 2011). Cette augmentation permise par la reperfusion post-ischémie peut altérer la BHE en endommageant les cellules endothéliales, les péricytes, les cellules musculaires lisses et les astrocytes. Tandis que les dommages des ROS au niveau des petits capillaires prédisposent à l'hémorragie pétéchiale, leurs lésions sur les cellules endothéliales et musculaires lisses des artères peuvent produire des hémorragies parenchymateuses plus importantes (Jickling et al., 2014 ; Figure 13).

Il a par exemple été mis en évidence que le superoxyde et le peroxynitrite perturbent l'intégrité microvasculaire et sont donc susceptibles de contribuer à la TH. En effet, après MCAo et reperfusion chez le rat, ces ROS sont tous deux augmentés dans les microvaisseaux et les pieds astrocytaires augmentant alors le taux de TH (Gürsoy-Ozdemir, Can and Dalkara, 2004). Chez l'Homme, le marqueur de stress oxydatif F2-isoprostane est augmenté dans le sang six heures après le début de l'AVC et les taux plasmatiques de 3-nitrotyrosine sont élevés à 3 et 24 heures après l'ischémie (Bas et al., 2012).

Chez le rongeur, l'inhibition des ROS peut diminuer la perturbation de la BHE et réduire le taux de TH (M. Asahi et al., 2000; Lapchak et al., 2002). Cependant, chez l'Homme, cette inhibition des ROS ne s'est pas avérée utile pour réduire le taux ou la sévérité des TH, ou même améliorer les résultats après AVC (Shuaib *et al.*, 2007).

Les ROS ont également un rôle majeur dans les TH tardives puisqu'elles interviennent en tant que molécules de signalisation dans le remodelage vasculaire et l'angiogenèse (Craige et al., 2011). Elles ont des effets régulateurs sur de nombreux facteurs angiogéniques, notamment le VEGF ou HIF-1α (*hypoxia-inducible factor-1α* ; Bir et al., 2012) et sur la prolifération et la différenciation des progéniteurs endothéliaux (Jickling et al., 2014). La NADPH oxydase (NOX) est une source importante d'ions superoxydes et de ROS. Il a été démontré que les ROS induites par NOX4 favorisent la migration et la prolifération des cellules endothéliales ainsi que la récupération du flux sanguin après une ischémie (Craige et al., 2011) Autre exemple, lorsque NOX1 et NOX2 sont délétées chez la souris, l'activité angiogénique est altérée (Garrido-Urbani et al., 2011).

Finissons avec le fait que plusieurs facteurs cliniques associés aux TH chez les patients peuvent favoriser la génération de ROS comme l'âge, la glycémie, le diabète, la sévérité de l'infarctus ; Whiteley et al., 2016).

c. Le rôle de l'inflammation dans les TH

L'inflammation et l'activation du système immunitaire jouent un rôle important dans la rupture de la BHE comme nous le verrons plus tard dans la partie II.E.g. Cette neuroinflammation est majoritairement médiée par la production de ROS et de MMP par les cellules du système immunitaires mais aussi par les astrocytes et les cellules endothéliales (Spronk *et al.*, 2021 ; Figure 14).

Après l'AVC, l'activation de la microglie constitue une source importante de MMP-9 qui favorise la perturbation de la BHE (del Zoppo et al., 2012). Les interactions entre les monocytes périphériques et les cellules endothéliales induisent également cette expression (Yamamoto et al., 2012), et les monocytes pénétrant ensuite dans le cerveau pour se différencier en macrophages produisent également des MMP (del Zoppo et al., 2012). L'infiltration des monocytes dans le cerveau durant plusieurs jours après l'AVC contribue également aux TH retardées.

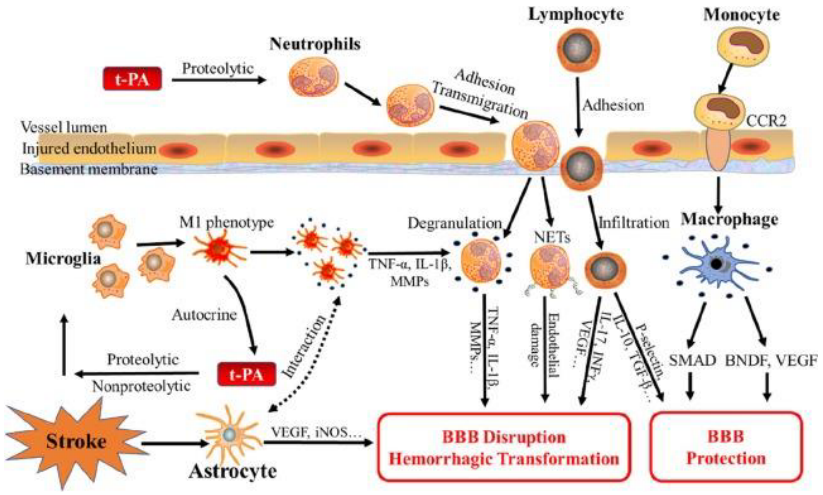


Figure 14 : Mécanismes inflammatoires impliqués dans les TH. Après un AVC, la microglie activée sécrète des cytokines telles que le TNF-α, l'IL-1β et les MMP. Le tPA intervient également dans l'activation de la microglie. Lors de l'AVC, le tPA active également les neutrophiles via la protéolyse. Les neutrophiles adhèrent aux cellules endothéliales vasculaires et migrent dans le cerveau à travers la BHE. LA dégranulation des neutrophiles infiltrés, la libération d'ADN et d'histones pour former des NETS (*Neutrophiles Extracellular Traps*), l'augmentation du TNF-α, de l'IL-1β, des MMP et d'autres médiateurs de l'inflammation provoquent la rupture de la BHE et augmentent le risque de TH. L'infiltration lymphocytaire dans parenchyme provoque la libération de plusieurs cytokines pro- et anti-inflammatoires afin de réguler la BHE. Les monocytes se lient au CCR2 des cellules

endothéliales et migrent dans le cerveau avant de se différencier en macrophages. Les macrophages promeuvent alors l'expression de SMAD, BDNF et VEGF, protègent la BHE et empêchent l'apparition de TH. Les astrocytes sécrètent du VEGF pour induire la detruction de la barrière endothéliale et libèrent des iNOS pour lésée la BHE. De plus, l'interaction astrocytes-microglie provoque l'expression des MMP-9 dans le tissu ischémié et augmente le risque de TH (Ma et al., 2021).

d. Le rôle du remodelage vasculaire dans les TH retardées

Le remodelage vasculaire et l'angiogenèse sont des composantes importantes de la récupération après un AVC, cependant, celles-ci peuvent également favoriser les TH. Un certain nombre de facteurs de croissance, de MMP et d'autres molécules sont impliqués dans la formation de nouveaux vaisseaux et de l'unité neurovasculaire. Au cours de ce remodelage vasculaire, les vaisseaux sont davantages perméables et enclin aux TH (Durukan et al., 2009 ; Figure 13).

Le VEGF joue un rôle important dans le remodelage vasculaire et l'angiogenèse. Après l'ischémie cérébrale chez le rongeur, l'inhibition de l'activité du VEGF permet une réduction du taux de TH (Chen et al., 2010), avec administration ou non de tPA (Kanazawa et al., 2011). En revanche, lorsque le VEGF est administré dans les 24 heures suivant l'AVC, le taux et la sévérité des TH sont augmentés (Abumiya et al., 2005) ainsi que la taille de la lésion ischémique (Zhang et al., 2000). En revanche l'administration de VEGF plusieurs jours après l'AVC améliore la récupération neurologique en favorisant l'angiogenèse. Plusieurs auteurs ont observé une réduction de la perméabilité à la BHE et une augmentation du flux sanguin cérébral à long-terme à la suite de ce traitement (Zhang *et al.*, 2000; Zechariah, ElAli, Doeppner, *et al.*, 2013). Ainsi, le VEGF a un rôle biphasique dans les AVC : en administration précoce il favoriserait la perturbation de la BHE et l'apparition des TH, et en injection tardive il améliorerait l'intégrité du réseau artériel cérébral et de la BHE.

Les MMP contribuent également au remodelage vasculaire et à la néovascularisation avec un rôle également biphasique (Yang and Rosenberg, 2011). L'inhibition précoce et transitoire des MMP après un AVC réduit la taille de lésion et favorise la formation de nouveaux vaisseaux à 3 semaines (Jickling et al., 2014). En revanche, un traitement retardé avec des inhibiteurs de MMP, 7 jours après l'AVC, bloque le remodelage vasculaire, augmente les lésions cérébrales, et entrave la récupération fonctionnelle à 14 jours (Zhao et al., 2006). Les angiopoïétines pourraient également être impliquées dans la TH retardée. En effet, chez le

rongeur, l'altération de l'angiopoïétine-1 dans le coeur ischémique provoque la perturbation de la BHE d'après Zhang et collaborateurs (Zhang et al., 2002). Chez les patients victimes d'AVC, l'augmentation du taux d'angiopoïétine-1 est associée à la TH symptomatique associée au traitement thrombolytique permis par le tPA (Sobrino et al., 2010).

G. Les facteurs de risques et comorbidités de l'AVC

Un facteur de risque est défini comme « tout attribut, caractéristique ou exposition d'un sujet qui augmente la probabilité de développer une maladie ou de souffrir d'un traumatisme » (Source OMS). Un facteur ou marqueur de risque est dit modifiable lorsqu'il est dépendant des choix de l'individu, à la différence du facteur non-modifiable.

1. Les facteurs de risques non-modifiables

Les facteurs de risque non-modifiables d'AVC sont nombreux et comprennent notamment l'âge, le sexe, l'origine ethnique et la génétique.

Si l'âge moyen de survenue d'un AVC en France est de 74 ans, 25% des patients ont moins de 65 ans et 10% moins de 45 ans (données INSERM). Tandis que dans la jeune population, les femmes ont autant ou plus de risque d'être touchées que les hommes (du fait des grossesses et de la prise de contraceptifs), le risque est légèrement plus élevé pour les hommes pour les individus âgés (Kapral et al., 2005). En raison de leur durée de vie plus longue, les femmes sont plus touchées que les hommes dans le monde (Cordonnier et al., 2017). Il existe également des disparités « ethno-raciales » bien documentées. Par exemple, les populations hispaniques, afro-américaines et latino-américaines sont davantage sujettes aux AVC que les autres ethnies (Howard et al., 2016). Concernant les nombreuses disparités génétiques associés aux AVC, nous pouvons citer les troubles monogéniques (par exemple l'anémie falciforme altérant les globules rouges circulants) qui seraient responsables de moins de 1% des causes de survenue d'AVC (Chauhan and Debette, 2016). Dans les faits, de très nombreux variants issus de simples polymorphismes nucléotidiques (SNP) peuvent s'avérer être des marqueurs de risque de l'AVC dans de très rares cas (Ekkert et al., 2021). Un exemple parmi tant d'autres sont la survenue de SNP au niveau du chromosome 9p21 identifiés comme facteur de risque de nombreuses maladies cardiovasculaires (Matarin et al., 2008).

2. Les facteurs de risques modifiables

Les facteurs de risque sont de loin les plus importantes causes de survenue de toutes les formes d'AVC. L'étude INTERSTROKE de 2010 menée dans 22 pays a montré que 10 facteurs de risques modifiables expliquaient 90% des cas d'AVC (O'Donnell et al., 2010, 2016), rendant les stratégies de préventions envers ces pathologies essentielles. Une autre étude de ce genre, s'étendant de 1990 à 2013 et regroupant 188 pays (Feigin et al., 2014), a subdivisé ces facteurs de risques non-modifiables en trois sous catégories : les facteurs métaboliques (l'hypertension, le diabète, le cholestérol), les facteurs comportementaux (le tabac, l'alimentation, l'alcool et l'absence d'activité physique), et les facteurs environnementaux (la pollution de l'air, l'exposition au plomb).

- ✓ L'hypertension artérielle (HTA) :

L'HTA est définie par une PA systolique supérieure à 140 mmHg et/ou une PA diastolique supérieure à 90 mmHg. C'est le facteur de risque modifiable le plus important, avec une corrélation directe entre une PA élevée du patient et l'AVC dans 52% des cas (Victoria E. O'Collins *et al.*, 2013). Les cardiopathies et notamment la fibrillation atriale multiplient par 4 le risque de survenue d'un AVC. Le risque d'AVC dû à l'HTA ne varie ni avec l'âge, ni avec le sexe (O'Donnell et al., 2016). Les traitements pharmacologiques de l'HTA ou sa régulation *via* des changements de mode de vie sont donc les stratégies les plus efficaces pour réduire les risques d'ischémie cérébrale. Selon l'étude PROGRESS, une diminution de la PA, grâce à des antihypertenseurs, réduit le risque d'AVC de 43 % (PROGRESS Collaborative Group, 2001).

- ✓ Le diabète :

Le diabète est une maladie chronique caractérisée par la présence d'un excès de glucose dans le sang, appelé hyperglycémie. On distingue deux sous-catégories : le diabète « de type 1 », dû à un défaut génétique de sécrétion d'insuline (hormone qui métabolise le glucose) et le diabète « de type 2 », dû à une insulino-résistance acquise de l'organisme (voir I.H.).

Les patients diabétiques doublent (au minimum) le risque de survenue d'un AVC et 25 à 45% des patients victimes d'un AVC ischémique ont le diabète au moment du premier AVC

(Zabala et al., 2020). En effet, l'hyperglycémie chronique contribue au durcissement (athérosclérose) et à la modification structurale des artères, augmentant ainsi le risque de formation de thrombus sanguin. Plusieurs études épidémiologiques montrent que la prévalence mondiale du diabète augmente. On estime que celle-ci sera de 6,3% en 2025 contre 5,1% en 2003 (Données INSERM), représentant ainsi un véritable défi dans le cadre de la prévention des AVC. Une étude anglaise a prouvé que le contrôle journalier de la glycémie *via* l'alimentation et la prise d'insuline chez des patients insulino-résistants (Turner et al., 1999) réduit le risque d'athérosclérose (et donc d'AVC). Plus généralement, le suivi thérapeutique diminue l'incidence des AVC chez les patients insulino-résistants traités avec des antidiabétiques tels que l'acarbose (Chiasson et al., 1998), le pioglitazone (Erdmann et al., 2007) et l'insuline (Alloubani, Saleh and Abdelhafiz, 2018). Comme le diabète est bien souvent associé à une hyperlipidémie, il a été montré qu'une diminution du taux de cholestérol chez les patients diabétiques réduit de 28% le risque de développer un AVC ischémique (Collins et al., 2003).

- ✓ La mauvaise alimentation et l'obésité :

Au cours des dernières années, le nombre d'AVC lié à une mauvaise alimentation et au surpoids a significativement augmenté (Données INSERM). L'étude GBD (Global Burden of Disease) considère la faible alimentation en fruit comme le deuxième facteur de risque majeur des AVC après l'HTA, suivi de l'obésité et la junk-food riche en sodium (Feigin et al., 2021). L'obésité, maladie chronique définie par un indice de masse corporelle supérieur à 30 kg/m^2, est associée à une augmentation du risque d'AVC chez l'homme (Kurth et al., 2002; Kernan et al., 2013). Concernant la population féminine, les données de la littérature sont plutôt contradictoires. Certaines études montrent l'association entre surpoids et développement d'infarctus ischémiques chez les femmes (Rexrode et al., 1997; Antillon and Towfighi, 2011), tandis que d'autres prouvent le contraire (Lindenstrøm, Boysen and Nyboe, 1993; Selmer and Tverdal, 1995). Quoi qu'il en soit, et pour les deux sexes, manger cinq fruits et légumes par jour diminuerait le risque de développer un AVC de 26% par rapport à des individus mangeant moins de trois portions de ces produits (He, Nowson and MacGregor, 2006).

- ✓ Le tabac :

Les fumeurs ont deux fois à quatre fois plus de risque de développer un AVC que les non-fumeurs tant chez les hommes que chez les femmes (Shinton and Beevers, 1989). De plus, il existe une importante relation dose-effet ; en ce sens que plus le nombre de cigarettes fumées est grand, plus le risque d'AVC est élevé (Office of the Surgeon General (US) and Office on Smoking and Health (US), 2004). Qui plus est, il existe un lien clair entre l'exposition à la fumée secondaire (ou tabagisme passif) et l'AVC chez l'adulte (You et al., 1999; Office on Smoking and Health (US), 2006). Bonne nouvelle, la renonciation au tabac et la non-exposition au tabagisme passif réduisent sensiblement le risque d'AVC (Office of the Surgeon General (US) and Office on Smoking and Health (US), 2004).

- ✓ L'alcool :

L'abus d'alcool, de manière régulière ou ponctuelle, peut dans certains cas augmenter les risques d'AVC. En effet, l'alcool sans modération est lié à un certains nombres d'autres maladies et facteurs de risques associés aux AVC tels que l'HTA, la fibrillation auriculaire, le diabète et le surpoids. Au niveau mondial, la consommation excessive d'alcool est associée à plus d'un million d'AVC chaque année. De manière intéressante, l'alcool peut avoir des effets à la fois négatifs et positifs sur le système neuro et cardiovasculaire en fonction surtout de la dose journalière et du type de boisson (de Gaetano et al., 2016; Scheen, 2019). Des chercheurs anglo-suédois ont colligé 27 études cliniques prospectives pour aboutir à la conclusion qu'une consommation modérée d'alcool, jusqu'à deux verres par jour, est associée à une réduction du risque d'AVC ischémique, tandis que la consommation excessive est associée à un risque accru de tous les types d'AVC (Larsson et al., 2016). Au-delà des deux verres quotidiens, chaque dose d'alcool en plus élève le risque d'AVC. Il faut savoir qu'à consommation égale, l'accroissement du risque est plus important pour les femmes que pour les hommes : en effet, les femmes voient leur risque d'AVC augmenter au-delà de un verre par jour, tandis que c'est le cas au-delà de deux verres pour les hommes (Larsson et al., 2016). Beaucoup d'articles discutent de cette ambivalence et dualité de la prise d'alcool sur la santé cardiovasculaire et les doses limites sont difficiles à déterminer donc rarement les mêmes. En raison des incertitudes quant à la dose théorique optimale propre à chaque individu (variable en fonction de l'âge, du sexe, des comorbidités, etc.), la limitation aux nombres de verres conseillées par les Autorité de Santé semble offrir le meilleur compromis. Dix verres d'alcool standard maximum par semaine, sans dépasser les 2 verres standard par jour (Données Ministère de la Santé).

Concluons cette partie en soulignant le fait que les marqueurs de risques les plus fréquents sont les facteurs dits modifiables, donc « évitables », grâce à un travail de Santé Publique en termes de prévention qui doit être obligatoirement suivi d'un ajustement des modes de vie collectifs et individuels.

H. Le diabète, une comorbidité majeure de l'AVC

Une comorbidité désigne un trouble ou une affection associée à une maladie principale, dans notre cas l'AVC ischémique. Elle est souvent responsable de l'aggravation des résultats liés à cette maladie primaire. Le diabète est décrit comme un facteur de risque de l'AVC puisqu'il augmente la probabilité de sa survenue et constitue également une comorbidité susceptible d'aggraver la pathologie. Dans ces travaux de thèse nous nous sommes intéressés à l'hyperglycémie chronique reflétant les effets du diabète en tant que comorbidité de l'AVC ischémique.

1. L'impact du diabète et de l'hyperglycémie sanguine dans l'AVC en clinique

L'hyperglycémie sanguine est fréquemment rencontrée chez les patients admis à l'hôpital pour un AVC ischémique. Elle résulte souvent du diabète insulino-résistant de type 2 ; les patients atteints du diabète de type 1 (insulino-dépendant) étant habituellement sous traitement régulateur de la glycémie (Mitsios *et al.*, 2018). Le diabète, quel que soit son type, est reconnu comme une comorbidité vasculaire cliniquement importante qui entraîne des taux de recanalisation plus faibles et des risques accrus de TH chez les patients. Les facteurs contribuant à l'exacerbation de la TH chez le diabétique comprennent majoritairement l'hyperglycémie mais également le stress oxydatif vasculaire, l'inflammation et le déséquilibre de la protéolyse extracellulaire. Elle affecte négativement le devenir des patients victimes d'AVC en aboutissant par la suite à des résultats fonctionnels et cognitifs réduits ainsi qu'un risque accru de mortalité (Tsivgoulis *et al.*, 2019 ; Figure 15).

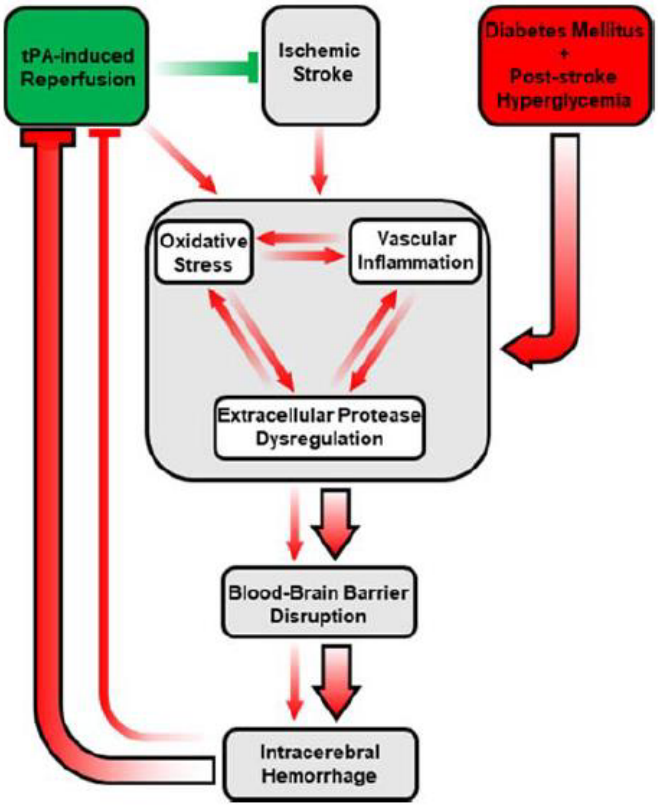


Figure 15 : Représentation des évènements liés au diabète et à l'hyperglycémie post-AVC sur la rupture de la BHE et la TH. Après un AVC ischémique, le diabète et l'hyperglycémie post-AVC sont à l'origine de l'augmentation du stress oxydatif, de l'inflammation vasculaire et de la dysrégulation de la protéolyse extracellulaire. Ces évènements initieront la rupture de la BHE qui mènera à la TH (Jiang, Liu, *et al.*, 2021).

De manière intéressante, l'hyperglycémie est également fréquente chez les patients non diabétiques. Dans ces cas, elle est liée aux réponses cellulaires face au stress aigu (Christensen *et al.*, 2004). Tsivgoulis et collaborateurs ne montrent aucune différence entre les patients diabétiques et non diabétiques présentant une hyperglycémie lors de l'admission à l'hôpital. Les patients diabétiques présentent cependant un taux de mortalité à 3 mois plus élevés par rapport aux patients non-diabétiques (Tsivgoulis *et al.*, 2019). Tziomalos et collaborateurs ont même démontré que les patients présentant une hyperglycémie liée au stress vasculaire deux jours après l'admission présentent un AVC plus sévère que les patients diabétiques hyperglycémiques (Tziomalos *et al.*, 2017).

Globalement, une étude montre que l'hyperglycémie persistante, 6 et 24 heures après le début de l'AVC, est corrélée à un risque augmenté de TH et une augmentation de la mortalité dans les 30 jours (Mi *et al.*, 2018). Bevers et collaborateurs ont quant à eux démontré que

l'hyperglycémie était associée à des lésions plus grandes observées à l'IRM, corrélées à une détérioration du devenir des patients (Bevers *et al.*, 2017). Les taux de glucose élevés sont également responsables de résultats fonctionnels moins bons chez les patients après thrombolyse pharmacologique entrainant une reperfusion précoce (Rosso *et al.*, 2018).

Suissa et collaborateurs (Suissa *et al.*, 2020) ont montré que l'hyperglycémie a des effets délétères sur la pénombre ischémique des patients malgré de bons scores de recanalisation. En fait, il a été rapporté que des niveaux de glucose élevés étaient davantage délétères chez les patients dotés d'une arborisation artérielle terminale importante, tandis que ses effets sont moins importants lorsque le nombre de collatérales est faible (Kim *et al.*, 2018).

2. La prise en charge des patients diabétiques et/ou hyperglycémiques

Face à ces problématiques, la restauration de la glycémie en urgence pour les patients atteints d'ischémie est depuis longtemps considérée comme bénéfique. Bien que, dans une revue de 2019, Palaiodimou et collaborateurs nous expliquent que cette conclusion, issue de résultats de plusieurs essais cliniques contrôlés randomisés, est discutable. Puisqu'un contrôle glycémique strict comporte le risque non négligeable de moduler cette même glycémie, induisant de fait des biais dans les résultats (Palaiodimou *et al.*, 2019).

L'administration IV de tPA en tant que traitement thrombolytique a longtemps été considérée comme un pilier de la prise en charge de l'AVC ischémique en phase aigüe. Cependant, les patients ne sont pas tous égaux face au tPA : certains sous-groupes de patients présentent des résultats aggravés après le traitement (Jiang, Han, *et al.*, 2021). Le lecteur de ce manuscirt l'a compris, les patients diabétiques appartiennent à cette catégorie.

Les facteurs pathologiques potentiels liés à la recanalisation sous-optimale du tPA dans les AVC diabétiques comprennent un taux plasmatique plus élevé d'inhibiteur du tPA (PAI-1), des lésions vasculaires athérogènes diabétiques, la glycation de l'annexine 2 du récepteur du tPA, ou encore les altérations de la densité du caillot de fibrine. Ajoutons cela à la capacité du tPA à engendrer des TH dans toutes les populations avec ou sans morbidités (voir II.). En outre, les collatérales, vaisseaux altérés dans le diabète, compromettent également l'efficacité du traitement par tPA (Jiang, Han, *et al.*, 2021). De plus, suite à l'injection IV de tPA, l'hyperglycémie provoque l'augmentation de l'acidose lactique dans le sang entraînant

l'aggravation de l'œdème cytotoxique et la réduction de la pénombre. Cette acidose est également impliquée dans la réduction de la réactivité vasomotrice cérébrale, la perturbation de la BHE et donc l'augmentation du risque d'hémorragie intracrânienne symptomatique (Dietrich, Alonso and Busto, 1993; Paciaroni *et al.*, 2008).

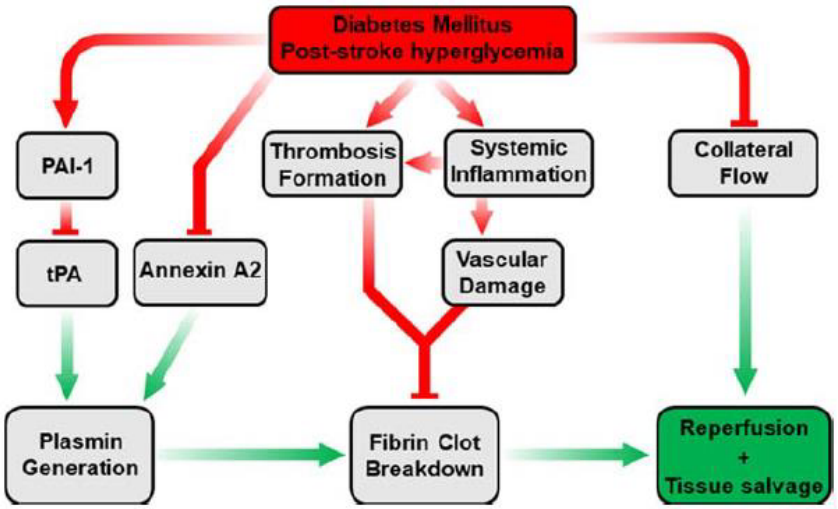


Figure 16 : Représentation des évènements liés au diabète et à l'hyperglycémie post-AVC sur la reperfusion et la récupération du tissu cérébral. Le diabète et l'hyperglycémie post-AVC sont à l'origine de l'élévation plasmatique de PAI-1, de la glycation de l'annexine 2 du récepteur du tPA, de la formation de caillots et de l'inflammation systémique, et de la réduction du flux collatéral. Ces évènements engendrent une mauvaise reperfusion du tissu cérébral après un AVC (Jiang, Liu, *et al.*, 2021).

En conséquence de ses effets délétères après un AVC ischémique, le tPA n'est bien entendu pas préconisé afin de traiter les patients diabétiques (Masrur *et al.*, 2015). Ainsi, la plupart des recherches sur les AVC aspirent à trouver de nouveaux traitements pour cette population. Une des approches consiste à trouver de nouvelles cibles thérapeutiques efficaces, tandis qu'un autre domaine de recherche consiste à optimiser l'utilisation du tPA en minimisant son potentiel hémorragique. Ces deux approches exigent une compréhension à jour des facteurs moléculaires et des voies responsables du maintien de l'intégrité de l'unité neurovasculaire, qui peut être compromise par l'AVC lui-même, par l'hyperglycémie, par le diabète ou par le tPA. L'utilisation du tPA et/ou de nouvelles cibles thérapeutiques *via* des modèles précliniques sont donc nécessaires le sort des patients victimes d'un AVC ischémique avec hyperglycémie/diabète (Elgebaly, Arreguin and Storke, 2019). Cette frange de la

population est loin d'être négligeable, en effet des médecins de l'Ecole de médecine de l'Université d'Indianapolis estiment que 40% des victimes d'AVC ischémiques pourraient être concernés par cette hyperglycémie à l'admission (Williams *et al.*, 2002).

3. L'effet de l'hyperglycémie et du diabète dans les modèles précliniques

Actuellement, et comme nous le verrons dans la dernière partie de ce manuscrit, la majorité des études expérimentales sur l'AVC utilisent des modèles d'ischémies focales, qui sont considérés comme plutôt pertinents sur le plan clinique (Rehni *et al.*, 2017). L'ischémie cérébrale induite par les modèles de MCAo impliquant une approche chirurgicale endovasculaire et transcrânienne ont permis de mettre en évidence les effets néfastes du diabète sur le cerveau, avec des modèles d'hyperglycémies aigues et chroniques. En effet, des études rapportent une augmentation de la taille de l'infarctus cérébral chez le rongeur (MacDougall and Muir, 2011; Navarro-Oviedo *et al.*, 2019), une réduction du flux sanguin cérébral, la formation d'œdèmes, une altération de la BHE associée à des TH (Dietrich, Alonso and Busto, 1993) et plus grands déficits cognitifs (McBride *et al.*, 2016).

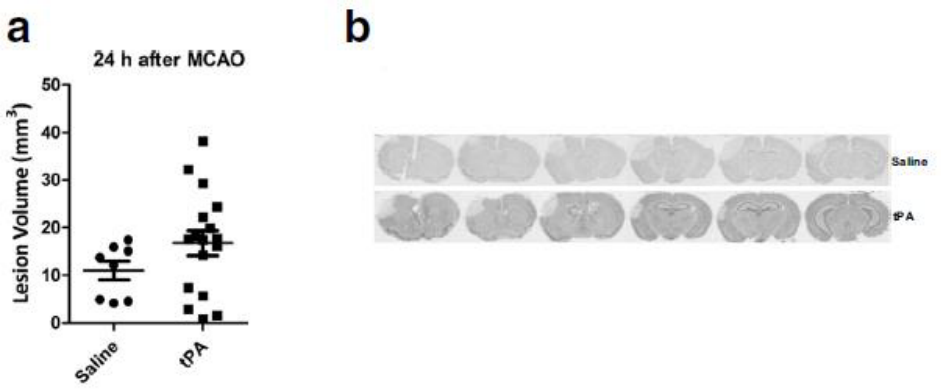


Figure 17 : L'injection de tPA après un AVC ischémique chez des souris diabétiques peut augmenter le volume de lésion. (a) Quantification du volume de lésion après un AVC ischémique chez des souris diabétiques, après injection de solution saline ou de tPA. (b) Illustrations représentatives du volume cérébral de lésion chez des souris ayant reçu la solution saline ou un traitement au tPA après un AVC ischémique (Navarro-Oviedo *et al.*, 2019).

Après induction de la MCAo chez des rats, cette fois spontanément diabétiques, Li et collaborateurs (W. Li *et al.*, 2013) ont également mis en évidence l'augmentation des TH et de la taille de l'œdème et une atteinte neurologique malgré une taille d'infarctus plus faible chez les rats diabétiques par rapport aux rats témoins. Ces résultats sont retrouvés à 24 heures, mais

pas à 7 jours, suggérant une mort neuronale retardée due au diabète dans leur modèle murin. Globalement, il y a un véritable consensus expérimental sur le fait que des niveaux élevés de glucose dans le cerveau augmentent les effets de l'ischémie entraînant une extension de l'infarctus et une mauvaise récupération neurologique (W. A. Li *et al.*, 2013).

Ces dernières années, de plus en plus de publications du domaine s'intéressent à l'impact du diabète sur les déficits liés à l'AVC (Couret *et al.*, 2018; Navarro-Oviedo *et al.*, 2019; Salman *et al.*, 2022). L'ensemble de ces études précliniques montrent de nombreuses similitudes en termes d'effets délétères obtenus chez l'Homme et chez le rongeur. Les modèles murins d'hyperglycémie chronique ou de diabète pourrait donc être un bon modèle pour étudier les TH, qui sont l'une des conséquences les plus fréquente et importante en termes de dommages cérébraux, autant chez le rongeur que chez les patients. Il est donc intéressant de pouvoir tester les nouveaux agents thrombolytiques dans ces modèles d'animaux hyperglycémiques chroniques dans un but translationnel et pour déterminer l'innocuité (ou non) de ces molécules.

4. Le lien entre le diabète, l'AVC et le tPA en préclinique

Malgré l'importance du tPA en milieu clinique, seul peu d'études expérimentales ont été menées pour évaluer l'effet du tPA en tant que traitement dans le cadre de l'AVC hyperglycémiques.

Dans un modèle d'hyperglycémie aiguë, le tPA a été infusé après MCAo mécanique sur des rongeurs et les résultats ont été évalués 3 jours après. Les auteurs ont mis en évidence que l'hyperglycémie exacerbe les lésions cérébrales chez les animaux traités au tPA en augmentant la taille de l'infarctus, le taux et la sévérité des TH par rapport aux animaux non-traités (Won *et al.*, 2011). Il convient de mentionner que l'hémorragie cérébrale induite par le tPA est corrélée à des niveaux élevés d'hyperglycémie et que dans ce modèle mécanique de MCAo (absence de thrombi physiologiques), seul les effets délétères du tPA peuvent être observés (Won *et al.*, 2011).

Dans une autre étude, Ning et collaborateurs ont montré que l'administration de tPA deux heures après un AVC embolique chez des rats diabétiques insulinodépendants augmente de manière significative la proportion de TH. Ces dernières induisent ensuite le gonflement du

cerveau à cause de la pression intracrânienne causée par la poussée de l'œdème (Ning *et al.*, 2012). Bien que la plupart des études concernant le traitement de l'AVC chez des animaux diabétiques semble être en faveur d'un rôle délétère du tPA, une étude menée par Fan et collaborateurs (Fan *et al.*, 2012) montre une diminution de l'infarctus après administration de tPA chez les rats diabétiques. Cependant, dans cette étude le tPA ne permet pas d'améliorer la taille de l'œdème cérébral qui surviennent après les TH. Le tPA a également provoqué l'augmentation significative des hémorragies intracérébrales chez les rats diabétiques par rapport aux animaux contrôles (Fan *et al.*, 2012).

5. Les stratégies précliniques pour bloquer les effets délétères du tPA

Plusieurs études sont intéressées à l'utilisation du tPA en tant que thrombolytique, en combinaison avec d'autres molécules, qui pourraient réduire les effets délétères induits par le tPA chez les animaux diabétiques.

Dans une étude en utilisant le même modèle d'AVC embolique sur des animaux diabétiques, il a été montré que la co-administration de minocycline (antibiotique couramment utilisé dans le traitement de l'acné et d'autres affections courantes) avec du tPA après un AVC réduit de manière significative l'infarctus cérébral, le gonflement cérébral et la TH cérébrale induite par le tPA (Fan *et al.*, 2012). Le modèle de MCAo mécanique a été utilisé par cette même équipe pour évaluer les effets de l'insuline, en association avec le tPA, sur ces animaux génétiquement diabétiques (Fan *et al.*, 2013). L'insuline a été administrée 1 heure après l'AVC tandis que le tPA a été administré une demi-heure après l'injection d'insuline. Les auteurs ont montré que l'administration de l'insuline seule ou du tPA seul n'a aucun effet sur l'ischémie. Cependant, la co-administration des deux traitements réduit significativement l'infarctus cérébral, la taille de l'œdème et l'hémorragie induite par le tPA.

L'ensemble des résultats de ces quelques études précliniques concernant le traitement de l'AVC par le tPA chez des animaux hyperglycémiques ou diabétiques ont permis de mettre en évidence que l'administration seule du tPA aggrave le risque de TH déjà potentialisé par le l'hyperglycémie. Il serait donc intéressant d'étudier les effets d'autres agents thérapeutiques combinés ou non avec le tPA, dans le cadre du traitement de l'AVC ischémique chez des animaux hyperglycémiques/diabétiques dans le but de proposer prochainement une

alternative au tPA, dangereux pour une importante frange de la population. Nous nous y sommes donc employé dans ces travaux de thèse.

I. Prise en charge de l'AVC

1. Aspects cliniques et diagnostiques

Chez l'Homme, la mort cellulaire post-AVC engendre donc des déficits neurologiques plus ou moins importants correspondants à la zone cérébrale impactée. Nous avons vu que plus la durée d'occlusion est longue, plus les dommages tissulaires sont importants : on parle de corrélation anatomo-clinique. Ainsi, le temps entre le début des symptômes cliniques (et leurs sévérités) jusqu'à la prise en charge du patient est déterminant pour le devenir du malade. Deux tests d'examen clinique sont exclusivement utilisés par les praticiens :

En 1989, Brott et ses collaborateurs ont proposé l'emploi de l'échelle National Institute of Health (NIHSS) pour l'examen initial du patient, permettant une évaluation fiable et compréhensible, aisément transposable entre les patients, et pouvant être régulièrement répétée (Brott et al., 1989; Kasner, 2006). Désormais, l'échelle NIHSS permet la standardisation de l'évaluation de la gravité de l'AVC et le suivi de la récupération clinique longitudinale. Aujourd'hui, 14 à 15 fonctions sont évaluées (13 à l'origine) et chaque réponse est cotée de 0 à 3 aboutissants à un score total compris entre 0 à 36.

Cependant, force est de constater que le score modifié de Rankin (mRS) s'est imposé comme l'échelle d'évaluation la plus fréquemment utilisée pour évaluer le pronostic des patients atteints d'un infarctus cérébral. Cette échelle, créée par John Rankin en 1957, a connu de nombreuses améliorations au cours des décennies pour évaluer au mieux le degré de handicap ou de dépendance des patients dans les actes de la vie quotidienne. L'échelle modifiée de Rankin se compose de 7 niveaux de gravité croissante allant de l'absence de tout symptôme (mRS=0) et symptômes minimes sans handicap (mRS=1) au handicap sévère avec grabatisation (mRS=5) et au décès (mRS=6 ; Quinn et al., 2009).

2. Imagerie à la phase aigüe

L'imagerie joue un rôle crucial dans l'identification et la sévérité de l'AVC des patients. Elle est susceptible de déterminer le type de traitement dont le patient pourra bénéficier (voir

I.I.). Un parcours d'imagerie et une interprétation rapide et efficace sont les clefs de la bonne prise en charge clinique. L'IRM et la tomodensitométrie aux rayons X (TDM) sont les méthodes multimodales de référence en neuro-imagerie d'urgence (Smith and Rowland Hill, 2017).

✓ La tomodensitométrie aux rayons X :

La TDM (parfois appelée scanographie, ou plus simplement scanner) a fait ses preuves en matière d'évaluation de l'AVC ischémique aigu, en ayant été utilisée dans de nombreux essais cliniques. Sommairement, elle consiste à mesurer l'absorption des rayons X par les tissus puis, par traitement informatique, à numériser et reconstruire des images en 2 et 3D. Elle permet d'exclure les principaux diagnostics différentiels (tumeurs cérébrales par exemple) et dépister les contre-indications à la thrombolyse, avec une sensibilité élevée pour les hémorragies aiguës. L'angio-TDM est une méthode efficace pour évaluer rapidement le système vasculaire artériel intracrânien et ainsi détecter les thrombus. La TDM de perfusion fournit, quant à elle, des données avec une résolution spatiale correcte sur le débit sanguin cérébral afin de déterminer la zone ischémiée. La combinaison des deux modes permet donc un diagnostic pertinent de la pathologie (Varadharajan et al., 2016 ; Figure 18).

Cependant, la capacité de résolution spatiale de la TDM classique est limitée, surtout pour les petits AVC en phase précoce, ce qui rend parfois difficile le travail d'interprétation. Mais sa disponibilité élevée, ainsi que sa relative facilitée d'utilisation font de la TDM l'examen le plus souvent réalisé à la phase aiguë d'un infarctus cérébral. L'American Stroke Association recommande sa réalisation dans les 25 minutes suivant l'arrivée du patient aux urgences (Jauch et al., 2013).

✓ L'Imagerie par résonance magnétique (IRM) :

L'IRM est une technique multimodale d'imagerie médicale mettant en jeu un champ magnétique puissant et stable qui crée une magnétisation des tissus biologiques par alignement des protons présents dans les molécules d'eau. A l'instar de la TDM, l'IRM donne la possibilité d'utiliser plusieurs séquences rapides apportant différentes informations cliniques. L'avantage majeur de l'IRM par rapport au scanner est sans doute l'utilisation des séquences dites de diffusion et de perfusion qui permettent de détecter après interprétation l'ischémie cérébrale dès les premières minutes après l'ischémie. Tandis que l'imagerie de diffusion fournit

des informations précises sur le volume de l'infarctus, l'imagerie de perfusion permet l'observation du tissu sous-perfusé encore sauvable (zone péri-lésionnelle). En 2018, une méta-analyse a montré que l'IRM de diffusion est utilisée à raison dans l'identification des patients éligibles au traitement pharmacologique (tPA) et ceci même quand l'heure d'apparition des premiers symptômes est inconnue (Thomalla *et al.*, 2018). Le TOF (Angiographie Time Of Flight) est une séquence IRM permettant l'évaluation du système vasculaire intracrânien et donc la détection de l'éventuel thrombus et la séquence T2* (ou écho de gradient) permet la visualisation des hémorragies cérébrales, qu'elles soient bénignes ou non (Figure 18).

Le protocole séquentiel d'urgence pour un patient arrivant à l'hôpital comporte les quatre séquences suivantes :

- Diffusion (DWI) : Cette séquence permet la visualisation de l'infarctus cérébral de manière très précoce (quelques minutes après occlusion) sous la forme d'une hyper-intensité systématisée à un territoire artériel. Elle permet le calcul du coefficient apparent de diffusion (ADC) donnant une idée quantitative de la zone et l'intensité de l'ischémie.
- T2/FLAIR : Cette séquence permet la visualisation de l'infarctus cérébral récent de quelques heures et plus anciens
- T2* (ou écho de gradient) : Cette séquence permet de visualiser les lésions hémorragiques cérébrales.
- Time of flight (« temps de vol », ou 3D-TOF) : Cette séquence angiographique, réalisée sans injection de produit de contraste, est utile pour la visualisation d'une éventuelle occlusion artérielle.

La séquence de perfusion, non obligatoire et réservée à quelques centres spécialisés, visualise la zone hypo-perfusée. La soustraction entre perfusion et diffusion permet d'identifier la zone ischémiée où les lésions sont réversibles ; zone qui constitue la cible des stratégies thérapeutiques de reperfusion (González, 2012).

Notons que l'ensemble de ces séquences appliquées ou applicables en clinique sont parfaitement réalisables en préclinique, et donc réalisées sur les modèles animaux dans le cadre de mes travaux de thèse.

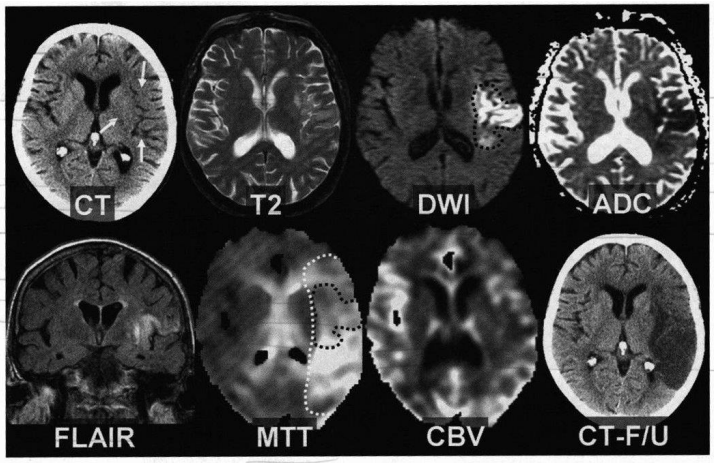


Figure 18 : Séquences d'imagerie de l'AVC ischémique. La séquence CT montre une faible atténuation dan le putamen gauche, l'insula et le cortex sylvien (flèches). Sur la séquence T2, la matière grise corticale montre un œdème modéré, confirmé pour être de nature cytotoxique sur les images en DWI (diffusion weighted image) et en ADC (apparent diffusion coefficient). La séquence FLAIR montre un œdème cortical dans l'ACM. Les séquences MTT (mean transit time) et CBV (cerebral blood flow) montre une zone à risque (pénombre) plus étendue, allant jusqu'au lobe pariétal. La séquence de suivi CT-F/U montre l'extension de la zone ischémiée dans la pénombre identifiée en MTT (https://myradnotes).

3. Les traitements actuels de l'AVC ischémique

Les traitements en phase aiguë de l'AVC ischémique ont pour objectif de réduire le risque de décès ou de dépendance lorsque l'AVC sera davantage installé, et précèdent la prévention secondaire individuelle qui a pour objectif de réduire le risque d'un nouvel événement vasculaire. Il existe deux types de traitements actuellement : la thrombectomie mécanique chirurgicale et la thrombolyse pharmacologique consistant en l'injection dans la circulation sanguine de tPA. En fonction des données issues de l'imagerie d'urgence, le praticien choisit le traitement adéquat en se basant sur les recommandations de la Haute Autorité de Santé, sachant que les deux stratégies peuvent être combinées dans certains cas. Développons.

a. La thrombectomie

La thrombectomie chirurgicale est une stratégie endovasculaire consistant en un retrait mécanique du thrombus artériel *in situ*. Il est soit aspiré par succion, soit retiré à l'aide d'un filament au bout duquel est fixé un stent. Le filament est inséré par voie fémorale, remonte jusqu'au cœur afin de passer par l'aorte pour enfin arriver au niveau des principales artères qui irriguent le cerveau (Raychev and Saver, 2012 ; Figure 19).

En 2015, l'essai MR-CLEAN a révolutionné la prise en charge des AVC ischémiques en prouvant les bénéfices de la thrombectomie, en association ou non avec la thrombolyse pharmacologique (Broderick et al., 2015). Cette stratégie améliore considérablement l'efficacité du tPA qui peut alors être injecté i*n situ* jusqu'à 6 heures post- AVC ischémique (au lieu de 4 heures 30 normalement, Berkhemer et al., 2015). Deux ans plus tard, l'essai clinique THRACE a montré que le couplage des deux stratégies permettait effectivement une meilleure récupération fonctionnelle tout en n'ayant aucun effet sur la mortalité post-traitement (Bracard et al., 2016; Morelli et al., 2017). Pour finir, citons une méta-analyse qui a confirmé en parallèle que ce double traitement permet une meilleure recanalisation de l'artère bouchée, ainsi qu'une diminution significative de la mortalité comparée à la seule thrombolyse par tPA (Mistry et al., 2017). La stratégie endovasculaire s'est donc implantée dans le paysage comme un traitement de référence depuis 2016 (Bracard *et al.*, 2016), améliorant nettement la prise en charge des patients (Figure 19).

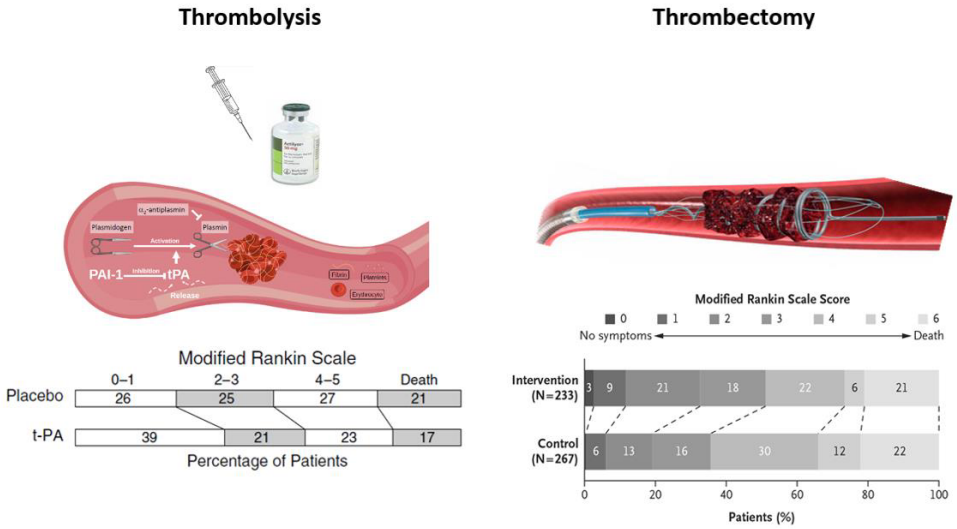


Figure 19 : Evaluation de la récupération fonctionnelle selon le traitement reçu (thrombolyse/thrombectomie) avec l'échelle modifiée de Rankin. La thrombolyse utilisant le tPA (Actilyse) permet l'activation du plasminogène en plasmine qui pourra alors dégrader le caillot. La thrombectomie permet de retirer mécaniquement le sanguin. La recanalisation induite dans les deux cas permet la reperfusion du tissu et augmente la récupération fonctionnelle. Les scores fonctionnels indiqués proviennent de l'essai MR CLEAN. Les scores inférieurs à 1 sont synonymes d'une bonne récupération fonctionnelle. On observe ici une meilleure récupération chez les sujets ayant reçu une administration de tPA en comparaison avec leurs homologues ayant reçu du placebo. Il en est de même pour les sujets ayant subi une thrombectomie en comparaison avec leur homologue n'ayant pas subi d'intervention.

Concernant la fenêtre thérapeutique, des effets bénéfiques jusqu'à 24 heures après la survenue de l'AVC ont été reportés avec un meilleur pronostic des patients à 90 jours de l'AVC (Nogueira et al., 2018).

Toutefois, il faut noter que cette intervention est relativement peu pratiquée pour le moment. En effet, elle requiert des neuroradiologues interventionnels formés et des centres adaptés associés (140 praticiens dans 37 centres en 2016 en France). Qui plus est, les patients éligibles doivent obligatoirement voir l'occlusion artérielle se produire sur les grosses artères à la base du cerveau par souci d'accessibilité (Lapergue et al., 2018). Il est donc absolument nécessaire de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant couvrir un spectre plus large de la population touchée par l'AVC ischémique.

b. La thrombolyse pharmacologique

Après les premiers symptômes, chaque minute compte. Cette phrase, certes accrocheuse, reste néanmoins particulièrement vraie quand on parle de thrombolyse et de sa fenêtre thérapeutique limitée (jusqu'à 4 heures 30 après l'AVC ou 6 heures si couplé à la thrombectomie). Un patient reçu dans un délai court en unité neuro-vasculaire à l'hôpital implique un diagnostic rapide ; il augmente alors ses chances de bénéficier de la thrombolyse souvent accompagné d'un co-traitement anticoagulant ou antiagrégant plaquettaire. Cette stratégie à la phase aiguë consiste en l'administration de tPA recombinant (rtPA) dans la circulation sanguine des patients afin de promouvoir la fibrinolyse. A savoir qu'en clinique on parle de tPA recombinant (rtPA) car la protéase est produite massivement sous cette forme (donc recombinante) à partir d'une lignée cellulaire d'ovaires de hamster chinois. Comme nous le verrons dans la partie II., le tPA active le plasminogène en plasmine, elle-même capable de dégrader la fibrine, constituant majeur de la plupart des thrombi (Figure 19).

C'est en 1995, que l'étude du National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS, 1995) a mis en évidence l'effet bénéfique du tPA. Les patients atteints d'AVC ischémique de cette étude qui reçurent l'injection intraveineuse (IV) de rtPA à la dose de 0,9 mg/kg (10% en bolus et 90% en infusion pendant une heure) ont vu leurs déficits neurologiques réduits de 11 à 13% comparés aux patients traités au placebo. N'oublions pas d'ajouter que dans cette même étude, le tPA augmente le risque hémorragique de 6,4%, sans toutefois modifier la mortalité à 3 mois. À la suite de cet essai clinique, le tPA a été autorisé comme

traitement de la phase aiguë des AVC ischémiques dans la plupart des pays, en suivant ce même mode d'administration et cette même dose dans les 3 heures après le début des symptômes. Cette restriction temporelle permet de garder un ratio bénéfice/risque positif à l'instar des critères restrictifs qui ont été mis en place (âges <80 ans, haute sévérité de l'AVC, haute PA, glycémie élevée et autres paramètres biologiques).

L'étude European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) III de 2008 a ensuite permis d'étendre la fenêtre thérapeutique jusqu'à 4 heures 30 après le début des symptômes (Hacke et al., 2008). Bien que l'essai clinique récent EXTEND suggère l'utilisation sans danger du tPA jusqu'à 9 heures après le début de l'AVC (Campbell et al., 2019), l'allongement de la fenêtre thérapeutique est surtout limitée par les complications hémorragiques parfois symptomatiques.

Ceci-dit, le traitement des AVC ischémiques par le tPA présente des limites importantes. Le taux de recanalisation après traitement aigu au tPA est globalement assez faible : 66% pour une occlusion distale de l'ACM, 35% pour une occlusion proximale et moins de 10% pour une occlusion de la carotide interne). Car l'efficacité du tPA dépend directement du délai d'administration, de l'état de la circulation collatérale, de la localisation, la nature et la taille des thrombi et de l'état de santé du patient (Riedel et al., 2011; Berkhemer et al., 2015; Coutinho et al., 2017). De plus, le risque de TH après tPA est multiplié jusqu'à 10 dans certaines études cliniques (Zhang et al., 2014; Yaghi et al., 2017; guodon et al., 2021) et la mortalité augmente s'il est utilisé trop tardivement (Wardlaw et al., 2012). Le tPA est également pro-excitotoxique par son interaction avec les NMDAR neuronaux (Lesept *et al.*, 2016) et pro-épileptique (Bentes et al., 2017). Les effets délétères du tPA, en particulier le risque de TH, sont traités plus en détail dans la partie II de ce manuscrit.

Ainsi, malgré l'utilité clinique du tPA, moins de 20% des patients ayant subi un AVC ischémique sont éligibles à la thrombolyse pharmacologique. Il existe donc un besoin essentiel de prévenir les effets secondaires de ce thrombolytiques et/ou de déterminer de nouveaux candidats thérapeutiques plus efficaces et moins dangereux dans le traitement de l'AVC ischémique (voir III.).

II. L'activateur tissulaire du plasminogène : le tPA

Il existe plusieurs enzymes endogènes, à l'instar du tPA, capables d'entraîner la cascade fibrinolytique en « activant » le plasminogène en plasmine pour aboutir à la dégradation des caillots riches en fibrine : citons la streptokinase et l'uPA (activateur du plasminogène de type urokinase). Dans cette partie, nous allons nous intéresser au tPA car son rôle dans la thrombolyse lui a conféré son rôle d'unique traitement pharmacologique de la phase aigüe des AVC ischémiques (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Le tPA est donc une enzyme : une sérine protéase produite et libérée dans la circulation sanguine par les cellules endothéliales.

Mais le compartiment vasculaire n'est pas le seul siège du tPA. Il est également retrouvé dans le compartiment cérébral et plus spécifiquement dans les neurones, les oligodendrocytes, les astrocytes et la microglie. Nous verrons ci-après que cette enzyme aux multiples facettes est impliquée dans de nombreux processus cellulaires dépendants, ou non, de son activité catalytique (Thiebaut *et al.*, 2018).

A. Historique

Au beau milieu du siècle des lumières, l'anatomiste italien J-B. Morgagni (1682-1771) s'intéresse, parmi tant d'autres choses, à l'apoplexie (ancien terme désignant l'AVC, rappelons-nous). D'ailleurs au cours de cette période où la pathologie reste mal comprise, ce professeur des universités est l'un des seuls à distinguer « l'apoplexie séreuse » de « l'apoplexie sanguine ». Nous sommes tentés de voir ici les prémices de la dichotomie entre AVC ischémique et hémorragique, acceptée deux siècles plus tard. Quoi qu'il en soit, il remarque également au cours de ses nombreuses séances d'autopsies, des problèmes de coagulation sanguine chez des patients décédés subitement, sans pour autant mettre en évidence les mécanismes mis en jeu. Attendons le XIXème siècle pour que le médecin français P.S. Denis (1799-1863) pousse l'investigation sur la « dissolution » spontanée du sang. Son compatriote G. Andral (1797-1876), considéré comme le fondateur de l'hématologie, se base sur des observations similaires pour apporter une première ébauche de la compréhension d'un système protéolytique mis en jeu dans cette dissolution en 1843. La seconde moitié du XIXème siècle verra alors l'explosion de nombreux articles scientifiques s'intéressant à ce sujet jusqu'à ce que A. Dastre (1844-1917) introduise le terme de « fibrinolyse » sanguine pour expliquer le

procédé de dissolution spontané des caillots sanguins (Marder, 2011). En 1902, Conradi observe pour la première fois, la dégradation des caillots sanguins par l'ajout d'extrait de différents organes ; il propose au monde scientifique l'implication d'une enzyme sanguine dans ce phénomène : la fibrikinase (Chevilley et al., 2015). Cette enzyme, capable d'activer le plasminogène, sera appelée plus tard, tPA.

En parallèle, en 1903, Hedin révèle l'activité protéolytique de la plasmine, enzyme principale de la dégradation de la fibrine, sans encore la nommer (Hedin, 1903). Christensen et Macleod ont ensuite proposé que le plasminogène, précurseur de la plasmine, circulant et inactif peut-être activé par la streptokinase (et la fibrikinase, nous l'avons compris ; Christensen and Macleod, 1945) et c'est en 1948 que le schéma de la cascade d'activation du plasminogène fût complétée (Macfarlane and Biggs, 1948).

La fibrikinase est isolée pour la première fois à partir d'un cœur de porc en 1952 (Astrup and Stage, 1952) puis purifiée en 1979 à partir de vaisseaux sanguins humains (Binder, Spragg and Austen, 1979; Rijken et al., 1979).

C'est en 1981, que la fibrikinase, rebaptisée pour l'occasion « activateur tissulaire du plasminogène », fut purifiée à partir de cellules de mélanome humain grâce aux travaux conjoints de Rijken et Collen, permettant ainsi sa caractérisation (Rijken and Collen, 1981). Fort de toutes ces avancées scientifiques, en 1981, W. Weimar traite deux patients victimes de thrombose de la veine rénale avec du tPA injecté par IV (Weimar et al., 1981). Deux ans plus tard, D. Pennica parvient à cloner le gène du tPA, ouvrant la voie à la grande production de rtPA par des cellules eucaryotes (Pennica et al., 1983). Grâce à cela fut menée la première étude clinique sur des patients souffrant d'infarctus du myocarde et l'injection IV de tPA permit une recanalisation complète des artères coronaires (Van de Werf, Nobuhara and Collen, 1986). Pour finir, c'est en 1995 que l'étude NINDS a évalué avec succès la possibilité d'utilisation du tPA comme agent thrombolytique dans le cadre de l'ischémie cérébrale (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Aujourd'hui le tPA est le seul agent pharmacologique autorisé dans le traitement aigu des ischémies cérébrales, associé ou non à la thrombectomie.

B. Structure du tPA

Le tPA est une sérine protéase, codée par le gène PLasminogen Activator Tissue type (PLAT), située sur le chromosome 8 (Yang-Feng et al., 1986), capable d'hydrolyser les liaisons peptidiques d'autres protéines. Il a une masse moléculaire d'environ 69 kDa et est composé de 527 acides aminés (Pennica et al., 1983). Le tPA possède un site d'O-glycosylation (Harris et al., 1991) ainsi que trois sites de N-glycosylations. On peut considérer qu'il existe alors deux types de tPA : le tPA de type I avec trois N-glycosylations et le tPA de type II avec uniquement deux N-glycosylations (Pohl et al., 1984; Mori et al., 1995). La structure tridimensionnelle de cette protéine, maintenue par 17 ponts disulfures, peut être divisée en 5 domaines, répartis sur une chaîne lourde A et légère B. Plusieurs fonctions ont été identifiées pour chacun des domaines (Figure 20).

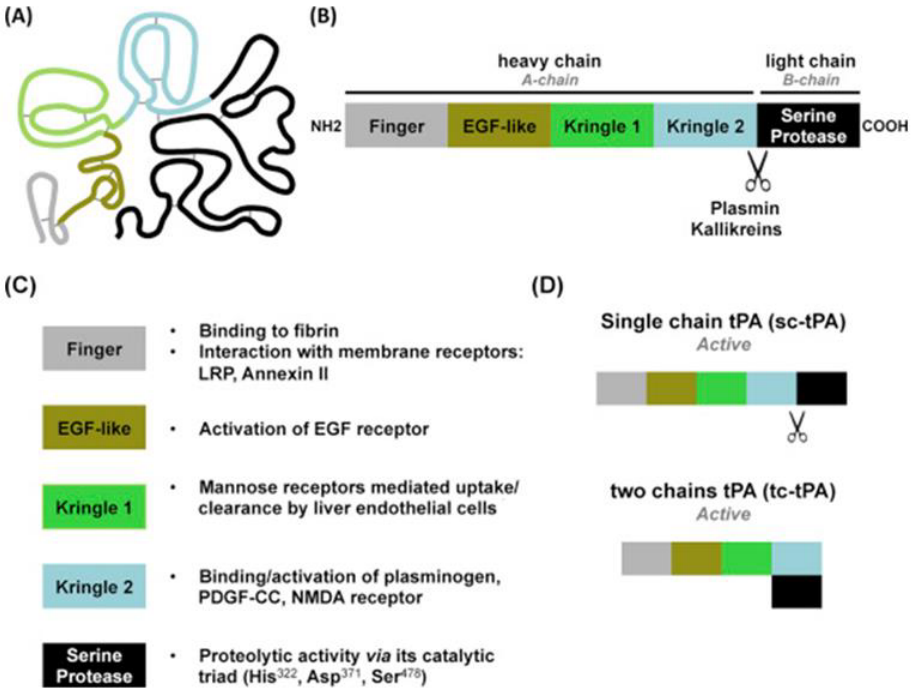


Figure 20 : Structure et fonctions du tPA. La séquence de 527 acides aminés de la protéine peut être subdivisée en cinq domaines qui sont représentés comme suit : le « domaine Finger » en gris clair, le « domaine de type EGF » en vert foncé, le domaine « Kringle 1 » en vert clair, le domaine « Kringle 2 » en bleu, et enfin le domaine « serine protease » en noir. Les 17 ponts disulfures sont représentés par des lignes grises. (B) Le tPA est composé de deux chaînes : la chaîne lourde (également appelée chaîne A), commençant à l'extrémité amino-terminale de la protéine et contenant les chaînes « Finger », « EGF-like », « Kringle 1 » et « Kringle 2 » et la chaîne légère (également appelée chaîne B), se terminant à l'extrémité carbocyl-terminale de la protéine et ne contenant que le domaine « sérine protéase ». La plasmine et les kallikréines peuvent cliver le tPA à la jonction entre ces deux chaînes. (C) Rôles principaux des cinq domaines. (D) Le clivage du tPA par la plasmine et les kallikréines permet la conversion de la forme « tPA à chaîne unique » (sc-tPA) en une forme « tPA à deux chaînes » (tc-tPA). Contrairement aux autres sérine protéases, les deux formes de tPA sont protéolytiquement actives (Hébert et al., 2016).

1. La chaîne lourde du tPA (chaîne A) :

- ✓ **Le domaine finger** (ou fibronectine) permet la liaison du tPA à la fibrine, formant un complexe tertiaire avec le plasminogène (M. Hoylaerts et al., 1982; Kagitani et al., 1985). C'est également *via* ce domaine que le tPA se lie aux lipoprotéines de faible densité (LRP), induisant ainsi la clairance de la protéine par les cellules hépatiques ou les astrocytes (Vivien et al., 2011). En outre, ce domaine active également diverses voies de signalisation intracellulaire en interagissant avec des récepteurs membranaires, comme l'annexine II aboutissant par exemple à l'activation microgliale, la fibrinolyse et la néoangiogenèse (Zhu et al., 2019).
- ✓ **Le domaine EGF**, très conservé entre les espèces, est capable d'activer les récepteurs à l'epidermal growth factor (EGFR) par phosphorylation (Hurtado et al., 2007; Correa et al., 2011), potentialisant ainsi le système trophique et les voies mitogènes (Zhu et al., 2019).

- ✓ **Le domaine Kringle 1** est caractérisé par la présence d'une zone active ayant une forte affinité pour la lysine (*lysine binding site*, LBS) formant une poche dans la structure tertiaire du tPA. Ce site LBS, assez peu étudié à l'instar du domaine Kringle 1, semble néanmoins non-fonctionnel. Une étude suggère l'implication du domaine dans la recapture du tPA *via* les récepteurs au mannose des cellules endothéliales hépatiques (Smedsrød, Einarsson and Pertoft, 1988; Kuiper et al., 1996). Ce domaine pourrait également être aussi impliqué dans l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales (Kim et al., 2003).

- ✓ **Le domaine Kringle 2** possède une haute affinité pour le plasminogène, stabilisant ainsi le complexe tertiaire du tPA avec le plasminogène et la fibrine (lié au domaine Finger). Lui aussi possède un LBS avec l'avantage d'être actif. Grâce à lui, le tPA peut se lier et activer de nombreuses protéines, telles que le plasminogène, la sous-unité GluN1 des NMDAR ou encore le facteur de croissance dérivé des plaquettes (*platelet-derived growth factor*, PDGF) (Fredriksson et al., 2004; Lopez-Atalaya et al., 2008; Roussel et al., 2011).

2. La chaîne légère du tPA (chaîne B) :

Cette chaîne ne comprend qu'un unique domaine catalytique, qui va assurer la conversion du plasminogène en plasmine. C'est également le site de liaison de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1), l'un des inhibiteurs endogènes du tPA comme nous le verrons (voir II.D. ; Pennica et al., 1983; Zhu et al., 2019).

Comme toutes les sérines protéases, le tPA existe sous deux formes : la forme synthétisée simple chaîne (*single-chain*, sc-tPA) et une forme clivée double chaîne (*two-chain*, tc-tPA ; Rijken, Hoylaerts and Collen, 1982). Les deux chaînes sont séparées au niveau d'un site de clivage entre l'Arginine^{275} et l'Isoleucine^{276}, souvent après l'interaction de la protéine avec la plasmine. Une fois clivées, les deux chaînes du tc-tPA sont maintenues par un pont disulfure entre la cystéine^{299} et la cystéine^{430}. De manière étonnante, le tPA sous ses deux formes présente la même activité protéolytique et fibrinolytique (Thelwell and Longstaff, 2007).

C. Expression du tPA

1. Dans la circulation sanguine

Comme nous l'avons vu dans l'historique du tPA, ce dernier a tout d'abord été décrit dans le compartiment vasculaire au sein duquel il est produit et libéré par les cellules endothéliales. Chez l'Homme, il est retrouvé dans la circulation sanguine à une concentration d'environ 70 picomolaire (Rijken and Lijnen, 2009). Bien que sa localisation exacte au sein des cellules endocytaire est difficile à déterminer, la protéine semble être stockée au sein des corps de Weibel-Palade au plus près du VWF (Huber, 2002).

La libération du tPA par les cellules endothéliales peut se faire de façon constitutive ou en réponse à un certain nombre de stimuli comme l'hypoxie ou l'activation par des facteurs de la cascade de coagulation (Emeis et al., 1997; Knipe et al., 2010). Ce mécanisme physiologique est un moyen naturel de lutter contre la formation de thrombi occlusifs.

La demi-vie du tPA dans la circulation est relativement courte, entre 5 et 10 minutes chez l'Homme. Cette courte demi-vie s'explique d'une part par l'action constitutive de PAI-1 et d'autre part grâce à l'absorption par le foie du tPA (Verstraete et al., 1985). La clairance hépatique du tPA s'effectue par endocytose, grâce à des récepteurs membranaires situés sur les hépatocytes et les cellules endothéliales hépatiques. Plusieurs récepteurs sont impliqués

dans cette recapture : les récepteurs au mannose (Kuiper et al., 1988), les récepteurs LRP (Yepes, Sandkvist, Elizabeth G Moore, et al., 2003), ainsi qu'une voie dépendante des galectines (Nagaoka et al., 2002).

2. Dans le SNC

Dans le SNC, l'expression du tPA a d'abord été mise en évidence chez le rongeur au début des années 1980 (Soreq and Miskin, 1981) puis confirmée dans le cerveau en développement et adulte chez l'Homme. En somme, on retrouve une expression ubiquitaire du tPA dans le SNC : dans les neurones (Soreq and Miskin, 1981; Sallés and Strickland, 2002), les astrocytes (Cassé et al., 2012), les oligodendrocytes (Correa et al., 2011), les épendymocytes (Ware, Dibenedetto and Pittman, 1995) et les cellules microgliales (Rogove et al., 1999 ; Figure 21).

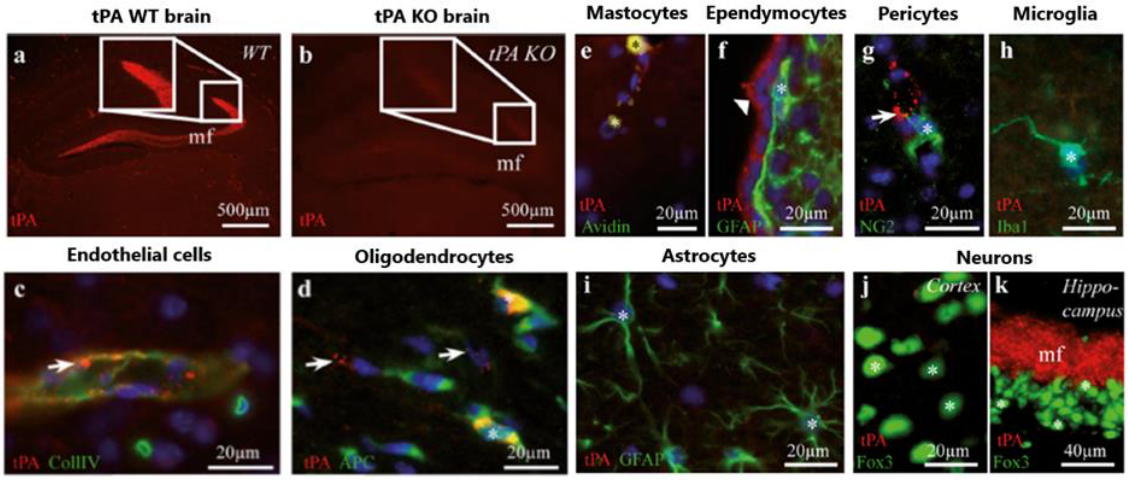


Figure 21 : Expression du tPA dans les cellules du SNC. Le tPA, représenté ici en rouge, est exprimé par les mastocytes, les épendymocytes, les péricytes, la microglie, les cellules endothéliales, les oligodendrocytes, les astrocytes et les neurones (Louessard *et al.*, 2016).

- ✓ Dans les neurones : le tPA est particulièrement présent dans les dendrites (Lenoir *et al.*, 2019) où il est stocké dans des vésicules présynaptiques et libéré dans les synapses lors de l'activation neuronale (Janis E. Lochner et al., 2006). Une fois à la synapse, le tPA peut interagir avec les NMDAR et moduler la potentialisation à long-terme (*long-term potentiation*, LTP), un processus de renforcement synaptique essentiel dans les fonctions d'apprentissage et de mémoire (D Baranes et al., 1998; Janis E Lochner et al., 2006). Il

semble que tous les neurones ne soient pas capables d'exprimer du tPA, et que son expression soit réduite aux neurones glutamatergiques excitateurs pyramidaux (Louessard et al., 2016).

- ✓ Dans les astrocytes : ils vont capter une partie du tPA libéré dans la fente synaptique *via* leurs récepteurs LRP et le domaine Kringle 1 protéique. Les astrocytes seraient capables de relibérer ce tPA endocyté ; ce mécanisme pourrait être à l'origine de la clairance du tPA au sein du SNC (Cassé et al., 2012).

- ✓ Dans les oligodendrocytes : le tPA est majoritairement présent dans les oligodendrocytes matures dans lesquels son expression involue avec l'âge (Louessard et al., 2016; Leonetti et al., 2017). De récents travaux ont montré que le tPA des oligodendrocytes est impliqué dans la migration des précurseurs oligodendrocytaires au cours du développement et durant la remyélinisation suite à une lésion de la substance blanche (Leonetti et al., 2017).

- ✓ Dans la microglie : Au sein de cette vaste population cellulaire, le tPA jouerait un rôle dans l'activation microgliale lors des processus immunitaires ou de neurodégénération (Siao and Tsirka, 2002).

Dans un souci d'exhaustivité, rajoutons que la présence du tPA a également été mise en évidence au sein des péricytes, des mastocytes et des épendymocytes dans le SNC (Louessard et al., 2016).

3. Dans la périphérie

Bien que l'expression du tPA ait été observée en premier lieu dans la circulation sanguine, elle a ensuite été détectée dans de nombreux organes tels que les poumons, le cœur, les testicules, l'utérus ou les muscles (Rouf, Moo-Young and Chisti, 1996). Son expression est souvent associée à un remodelage des tissus et de leur vascularisation, par exemple lors de la mise en place de l'endomètre utérin (Lockwood and Schatz, 1996).

D. Inhibition du tPA : les serpines

Les diverses fonctions du tPA, y compris la fibrinolyse endogène, sont notamment régulées par certains membres appartenant à une superfamille de protéines, les serpines,

connues historiquement pour leur capacité à inhiber les protéases à sérine. Ces dernières sont des protéines monomériques glycosylées d'environ 350-400 acides aminés avec un poids moléculaire de 40 à 60 kDa. La caractéristique principale des serpines est de posséder une boucle spéciale, appelée boucle du centre réactif (*Reactive Center Loop,* RCL), permettant leur fixation sur les protéases. Une fois fixées, les serpines circulantes possédant une activité de type protéase clivent la RCL forgeant une liaison covalente entre les deux molécules. Ainsi, un complexe stable se forme permettant l'inhibition de l'activité de la protéase. C'est pourquoi, ces serpines sont des inhibiteurs dits « suicides » ou à usage unique car elles sont caractérisées par cette transformation conformationnelle irréversible après leur action. Les serpines peuvent aussi exister sous une forme latente, avec laquelle l'interaction avec la protéase n'est pas possible (Huntington, Read and Carrell, 2000; Silverman *et al.*, 2001 ; Figure 22).

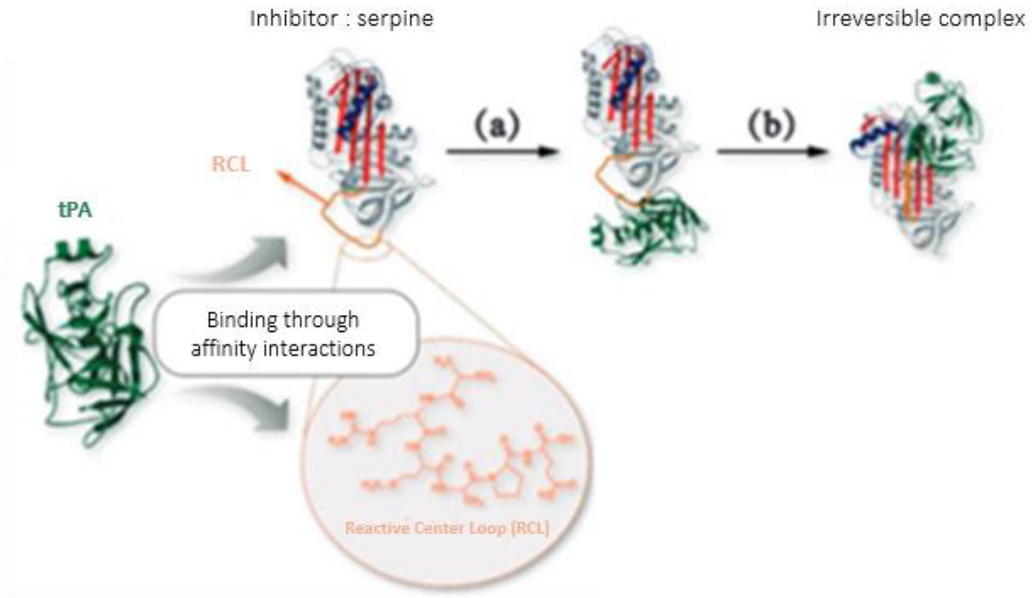


Figure 22 : Mécanismes d'action des serpines. Les serpines interagissent avec le tPA au niveau de la boucle RCL (Reactive Chain Loop). Le tPA peut alors cliver cette boucle et s'insérer au niveau du feuillet bêta de la serpine (a). Le tPA est amené au pôle opposé, permettant la formation d'une liaison covalente entre la serpine et le tPA (b). Cette liaison covalente et la formation d'un complexe irréversible entre ces deux protéines provoque l'inhibition du tPA.

Quatre serpines sont connues pour inhiber le tPA : PAI-1, PAI-2, la neuroserpine (NS) et la protéase nexine-1 (PN-1). Dans la circulation sanguine PAI-1 est le principal inhibiteur du tPA tandis que dans le parenchyme cérébral, PAI-1 occupe également cette fonction mais cette fois accompagné par la NS peu ou pas présente dans le compartiment vasculaire (Miranda and

Lomas, 2006). Dans le SNC, la NS est massivement exprimée de manière constitutive par les neurones et les astrocytes, alors que PAI-1 est exprimé par ces cellules seulement dans certaines conditions de stress par les astrocytes réactifs (Docagne et al., 1999; Hino et al., 2001).

Dans la circulation, PAI-1 est physiologiquement présent en excès par rapport au tPA. La majorité du tPA vasculaire (aussi bien sc-tPA que tc-tPA) est ainsi complexé à cette serpine, ce qui inhibe son activité (Rijken and Lijnen, 2009). Les complexes formés entre le tPA et PAI-1 étant très stables, l'inhibition du tPA capturé semble quasiment définitive et cette complexation ne gêne aucunement la clairance du tPA (Zhou et al., 2001; Nagaoka et al., 2002). De par sa grande expression et efficacité, PAI-1 est le principal inhibiteur physiologique du tPA.

La NS et le tPA (sc-tPA et tc-tPA) sont également très souvent co-exprimés (donc complexés) dans le SNC (Teesalu et al., 2004). Mais contrairement à PAI-1, l'inhibition du tPA par la NS est peu stable. Par conséquent, il est tout à fait possible que le tPA, après sa libération, puisse retrouver son activité (Barker-Carlson, Lawrence and Schwartz, 2002).

E. Les rôles du tPA

1. Le tPA vasculaire

a. L'activité thrombolytique du tPA et la résistance plaquettaire

Le système fibrinolytique, ou la fibrinolyse, est la mise en place d'une cascade enzymatique capable de dégrader les caillots ou thrombi riches en fibrine formés dans la circulation sanguine. L'enzyme clef de ce processus est la plasmine en mesure de dégrader directement la fibrine. La plasmine est sécrétée au niveau hépatique sous la forme d'une pro-enzyme, le plasminogène. Ce précurseur protéique est inactif et requiert l'intervention d'un activateur extérieur pour remplir sa fonction thrombolytique. Chez l'Homme, il existe deux activateurs du plasminogène : le tPA et l'uPA (M Hoylaerts et al., 1982). Une fois activée après le clivage protéolytique de son précurseur, le plasminogène, la plasmine est rapidement inhibée par des serpines présentes en grande quantité dans le plasma : l'a2-antiplasmine, l'a2-macroglobuline et PN-1 (celui-ci étant également un inhibiteur du tPA) (Collen and Lijnen, 1991). C'est pourquoi, l'injection IV de plasmine pour induire une thrombolyse, n'a jamais

prouvé son efficacité car la protéine est immédiatement neutralisée par ses inhibiteurs endogènes avant même d'atteindre le thrombus. C'est pour cela que beaucoup de fibrinolytiques utilisés en clinique ou en développement ont le même principe d'action : ils activent le plasminogène à proximité des thrombi (Figure 23).

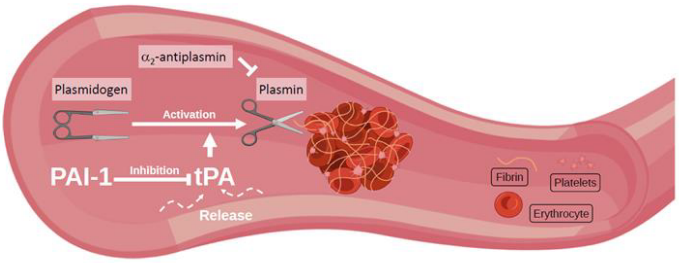


Figure 23 : Mécanisme d'action de la fibrinolyse endogène. Le tPA, sécrété par les cellules endothéliales dans la circulation sanguine, est capable de d'activer le plasminogène afin de permettre sa conversion en plasmine, à proximité d'un caillot de fibrine. La plasmine peut alors dégrader la fibrine, permettant la lyse du caillot. Cette fibrinolyse peut être régulée par inhibition de la plasmine (*via* α2-antiplasmine) ou du tPA (*via* PAI-1).

Comme nous l'avons vu, le tPA est habituellement complexé avec un de ses inhibiteurs et ne semble donc pas être un activateur du plasminogène très efficace. C'est sans compter la présence du co-facteur indispensable du tPA : lorsqu'il est à proximité de fibrine, son activité est alors multipliée par 100 (M Hoylaerts et al., 1982). En effet, les domaines Finger et Kringle 2 du tPA ont été identifié comme les principaux sites de liaison avec la fibrine. Cette interaction permet alors la formation d'un complexe tertiaire, au sein duquel la capacité du tPA à cliver son ligand est nettement augmentée. On comprend également que cette nouvelle conformation va également protéger le tPA de ses inhibiteurs. De ces faits, le plasminogène va être converti en plasmine spécifiquement au niveau du thrombus (Medved and Nieuwenhuizen, 2003).

Toutefois, rappelons que dans le contexte de la thrombolyse thérapeutique, le taux de recanalisation est assez faible soulevant les mêmes limites que le tPA endogène. Comme discuté précédemment, la composition des thrombi varie beaucoup entre les patients et notamment en fonction de l'origine de l'AVC ischémique : globalement fibrineux dans le cas d'un AVC d'origine cardioembolique et plutôt plaquettaire dans le cas d'un AVC d'origine athéromateuse. Les caillots ne sont pas uniquement constitués de cette partie dense en fibrine

et en plaquettes mais également de globules rouges et de cellules immunitaires parfois en grande proportion. Ainsi, la composition du thrombus conditionne la capacité thrombolytique du tPA. Un caillot pauvre en fibrine et riche en plaquette explique bien souvent la résistance des thrombi au tPA, et ce par plusieurs mécanismes (Jang et al., 1989).

Premièrement, la capacité du tPA à activer le plasminogène est directement dépendante de sa capacité à se complexer avec la fibrine. Lorsque qu'un caillot présente beaucoup de plaquettes, le tPA peut peiner à se lier avec son cofacteur préférentiel moins disponible à la surface du thrombus. On peut donc observer cette « résistance » même si le thrombus est riche en fibrine (et encore plus si le thrombus est pauvre ou dépourvu de fibrine). Deuxièmement, les plaquettes sécrètent des serpines en grande quantité (PAI-1 et PN-1 notamment) qui vont réduire drastiquement l'activité locale du tPA et celle de la plasmine (Boulaftali et al., 2011). En présence de fibrine ou non, l'efficacité de la fibrinolyse au sein des caillots plaquettaires est souvent faible, circonstanciant ainsi la grande limite de la fibrinolyse identifiée depuis longtemps (Coller, 1990). Pire, dans le cas des thrombi plaquettaires de l'infarctus du myocarde, la fibrinolyse thérapeutique entraîne une diminution de la perfusion tissulaire distale (Zalewski and Nessler, 2011). L'embolisation des fragments insolubles du thrombus, constitués de plaquettes agrégées, pourrait être à l'origine de la baisse de perfusion observée et donc de cet effet délétère des fibrinolytiques.

Nous discuterons de l'utilisation, des bénéfices et des risques du rtPA utilisé en clinique pour traiter l'AVC ischémique dans la partie II.F.

b. L'activité du tPA sur la BHE et les TH

La BHE constitue une barrière physiologique sélective formant un manchon autour des vaisseaux du SNC. Elle est formée par les cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées, des péricytes, des pieds astrocytaires et une lame basale composée majoritairement de collagène IV, de laminine et de fibronectine. La BHE empêche le passage des molécules du sang vers le tissu cérébral, à l'exception de celles nécessaires au fonctionnement du SNC. Cette barrière permet également l'élimination des molécules délétères du cerveau tels que les déchets métaboliques et les toxines (Obermeier, Verma and Ransohoff, 2016).

Dans le contexte de l'AVC ischémique, le tPA va induire une altération de cette BHE de 3 façons principales :

- ✓ En interagissant avec les récepteurs LRP à la surface des cellules endothéliales. Cette interaction tPA/LRP va provoquer une rétraction des pieds astrocytaires accolés à la lame basale provoquant in fine ainsi l'ouverture de la BHE (D'Souza et al., 2021). Le fait que l'expression des récepteurs LRP augmente rapidement après le début de l'ischémie explique en partie l'altération de la BHE et le risque de TH, menant alors de surcroît, au passage du tPA vasculaire vers le parenchyme cérébral (Yepes, Sandkvist, Elizabeth G Moore, et al., 2003).

- ✓ *Via* l'activation de MMPs, notamment MMP-9, 2 et 3 (Lijnen, 2001). Différents modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale ont montré que l'injection IV de tPA induit une extravasation plus importante de sang dans le parenchyme et ceci accompagné d'une surexpression/suractivation de MMP (Wang et al., 2003; Suzuki, Nagai and Umemura, 2016). Ces dernières participent à la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), fragilisent les jonctions serrées des cellules endothéliales, altèrent les lames basales de la BHE favorisant ainsi son ouverture. En accord avec cela, les animaux déficients en MMP-9 et MMP-3 sont protégés de l'ouverture de la BHE post-thrombolyse (Minoru Asahi et al., 2000; Cheng et al., 2006; Suzuki et al., 2007).

- ✓ En activant ce facteur de croissance présent dans le SNC, le PDGF, *via* le domaines catalytique et Kringle 2 de la protéase. Le facteur de croissance peut ensuite stimuler ses récepteurs (PDGFR) localisés à la surface des péricytes et astrocytes de la BHE, altérant ainsi sa perméabilité et le risque hémorragique (Fredriksson et al., 2004; Su et al., 2008). De fait, la co-injection de tPA et d'un inhibiteur des PDGFR diminue les effets pro-hémorragiques du tPA chez la souris (Fang et al., 2007; Lewandowski et al., 2016 ; Figure 24).

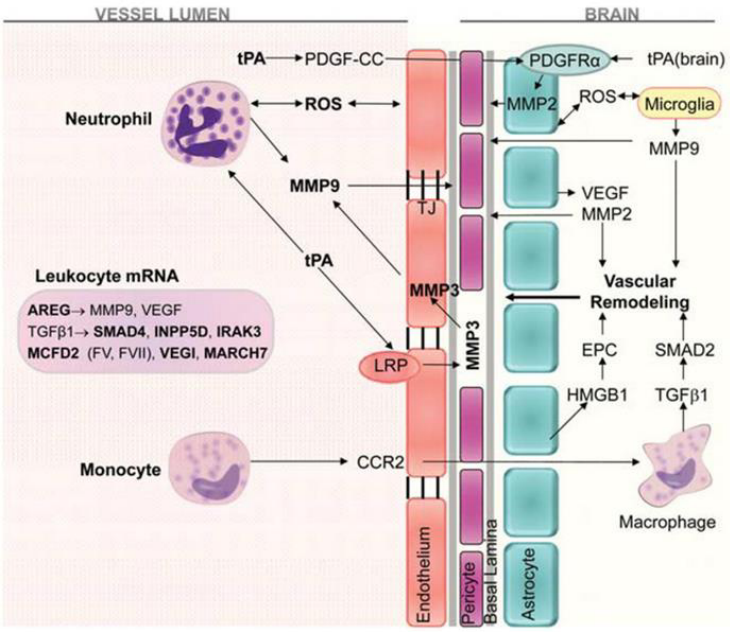


Figure 24 : Implication du tPA dans les TH. Le tPA exogène est capable d'agir sur les récepteurs LRP des cellules endothéliales afin de permettre l'augmentation de MMP-3 et sur les neutrophiles, à l'origine de la production de MMP-9. Il agit également sur les PDGF-CC afin d'augmenter MMP-2 *via* les récepteurs des astrocytes PDGFRα. AREG, amphiréguline; CCR2, récepteur de chimiokine C-C de type 2 ; EPC, cellule progénitrice endothéliale; HMGB1, boîte-groupe-haute-mobilité-1 ; INPP5D, phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate 5-phosphatase 1 ; IRAK3, kinase 3 associée au récepteur de l'interleukine-1 ; MARS7, annulaire associé à la membrane (C3HC4) 7 ; MCFD2, facteur de coagulation multiple D2 ; PDGF-CC, facteur de croissance dérivé des plaquettes CC; PDGFRα, récepteur alpha du facteur de croissance dérivé des plaquettes; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; SMAD, mères contre homologues décapentaplégiques ; TGFβ1, facteur de croissance transformant β1 ; VEGI, inhibiteur de la croissance endothéliale vasculaire (Jickling *et al.*, 2014).

En réalité, une simple injection de tPA dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) en condition physiologique suffit à augmenter la perméabilité vasculaire cérébrale, corroborant le fait que le tPA est un régulateur naturel du tonus et de la perméabilité vasculaire (Benchenane *et al.*, 2005; Fredriksson, Lawrence and Medcalf, 2016; Mehra *et al.*, 2016).

2. Le tPA dans le SNC

En parallèle de ses fonctions vasculaires, le très largement exprimé tPA présente de nombreux rôles dans le SNC (Tsirka et al., 1995; Hultman et al., 2008; Louessard et al., 2016). Nous allons dans cette partie de décrire au mieux les principales fonctions du tPA.

a. Le rôle du tPA dans le développement cérébral

La génération de neurones et de cellules gliales matures résulte d'un processus développemental complexe que nous ne souhaitons pas voir développer dans ce manuscrit.

Sommairement, le développement neural embryonnaire consiste en une succession quasi-chronométrée de différentes phases cellulaires : prolifération, différenciation, migration, pour finir par la mise en place de connexions et d'interactions entre les différents types cellulaires (van den Ameele et al., 2014). Bien qu'il soit certain que le tPA ait un rôle dans chacune de ses phases, il reste encore beaucoup à découvrir et à comprendre quant à la fonction du tPA dans le développement. Discutons succinctement d'exemples fonctionnels.

Citons son influence certaine dans différentes migrations cellulaires neurales avec l'observation d'un retard de cette migration chez les souris déficientes en tPA. Il a été postulé que cet effet serait dû à l'activation de la plasmine (Seeds, Basham and Haffke, 1999; Basham and Seeds, 2001) qui dégraderait la MEC influençant, par ce biais, les processus de développement dynamique et de remodelage tissulaire (Lu et al., 2011). Des études menées dans notre laboratoire montrent par exemple que le tPA est impliqué dans la migration des futurs neurones et dans la migration des progéniteurs d'oligodendrocytes au cours du développement (Leonetti *et al.*, 2017; Pasquet *et al.*, 2019 ; Figure 25).

Le tPA est également impliqué dans la pousse neuritique des neurones. Au cours du développement, les cônes de croissance, situés à l'extrémité des futurs axones et dendrites, forment des structures mobiles et transitoires explorant l'environnement extracellulaire afin de chercher de futures connexions synaptiques. L'inhibition ou l'absence de tPA bloque cette croissance axonale dans des cultures de neurones, tandis que sa surexpression engendre une augmentation de la pousse neuritique (Pittman, Ivins and Buettner, 1989; D Baranes et al., 1998; Minor, Phillips and Seeds, 2009). Le mécanisme d'action semble être le même mis en jeu lors de la migration neurale régie par le tPA. Également exprimé au niveau de ces cônes de croissance, la protéase permet la libération locale de MMP après avoir activé le plasminogène. La dégradation locale de la MEC facilite la pousse neuritique aboutissant ainsi à la formation des synapses (Zhuo Qian *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996). Une autre hypothèse sur le rôle du tPA dans la pousse neuritique implique l'activation du facteur de croissance hépatocytaire (hepatocyte growth factor ou HGF). Le tPA serait capable d'activer l'HGF participant à l'élongation des axones (Thewke and Seeds, 1999).

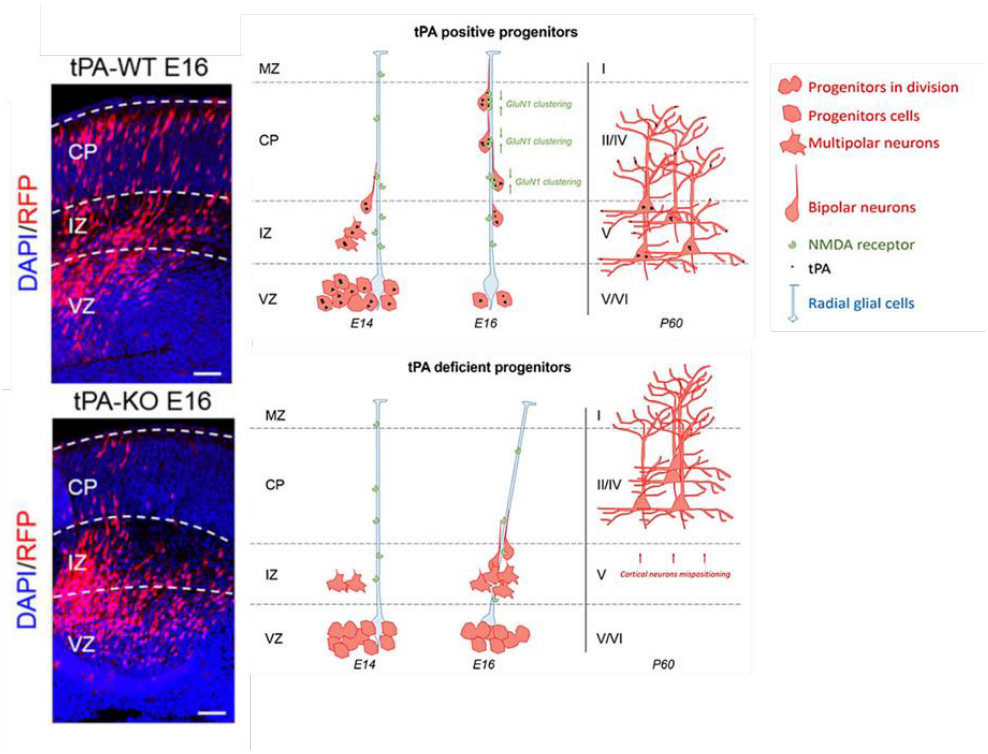


Figure 25 : Le tPA est impliqué dans la corticogenèse. Les images à gauche, obtenues en microscopie confocale, représentent les cellules neuronales électroporées (en rouge) dans le cortex de souris sauvages (tPA-WT) et déficientes en tPA (tPA-KO) à E16. Le tPA est produit et libéré par les progéniteurs neuraux et favorise la migration des cellules de la glie radiaire *via* l'activation des NMDAR. En l'absence de tPA, on observe un retard de migration des cellules de la glie radiaire. Ce retard de migration observée en l'absence de tPA neuronal a conduit à une stratification altérée des couches corticales II – IV et V chez l'adulte (Pasquet *et al.*, 2019).

b. Le tPA et la modulation glutamatergique

Comme nous l'avons vu précédemment, le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau. Ainsi, à la majorité des synapses excitatrices, le glutamate diffuse dans la fente synaptique après sa libération vésiculaire par le neurone présynaptique *via* un mécanisme dépendant des ions Ca^{2+} (Birnbaumer et al., 1994).

Lors de l'activité neuronale glutamatergique, la libération du glutamate dans la fente synaptique est suivie voire synchrone avec l'exocytose du tPA provenant des neurones présynaptiques (Fernández-Monreal et al., 2004; Echeverry et al., 2010). Le tPA libéré module alors la signalisation du récepteur glutamatergique de type NMDA. En effet, la fixation du tPA *via* son domaine Kringle 2 à la sous-unité GluN1 du récepteur va cliver le fragment N-terminal des NMDAR (Lopez-Atalaya et al., 2008). A savoir que seule la forme simple chaîne du tPA est

capable d'induire ce clivage (Parcq *et al.*, 2012). Ce clivage accompagné de la présence de glutamate va potentialiser l'influx calcique permis par les NMDAR renforçant l'influx nerveux (O. Nicole *et al.*, 2001). Le tPA se comporte alors comme un neuromodulateur.

De plus, certaines études montrent que la libération de tPA dans la fente synaptique déclenche également le cycle vésiculaire synaptique en favorisant l'exocytose du glutamate (Wu et al., 2015) ainsi que sa recapture et intégration dans les vésicules synaptiques (Yepes et al., 2016).

Pour finir sur ce point, le tPA a également un rôle de « gliotransmetteur » au niveau de la synapse. Il peut être capturé par les astrocytes *via* les récepteurs LRP, puis exocyté de manière régulée dans la synapse toujours dans un but de modulation de la transmission synaptique liée au glutamate (Cassé et al., 2012). La modulation glutamatergique des NMDAR par le tPA va être mise en jeu dans des processus physiologiques comme la mémoire, l'apprentissage (Benchenane et al., 2007; Obiang et al., 2012) mais également pathologiques comme l'excitotoxicité et l'épilepsie (Zhuo Qian *et al.*, 1993; O. Nicole *et al.*, 2001; Obiang *et al.*, 2012; Parcq *et al.*, 2012). Développons.

c. Le tPA responsable de l'excitotoxicité ?

La suractivation des récepteurs au glutamate et en conséquence l'entrée massive de Ca^{2+} dans les neurones provoque un gonflement puis la mort neuronale postsynaptique, dite excitotoxique (voir I.E.3.b.). Prouvons ici la responsabilité du tPA dans ce phénomène délétère.

Tsirka et collaborateurs en 1995 ont observé la résistance accrue face à la neurotoxicité glutamatergique après suractivation des NMDAR cérébraux chez des souris déficientes en tPA, en comparaison avec le phénotype sauvage (Tsirka et al., 1995). La réduction des volumes de lésion après l'occlusion intraluminale mécanique de la MCA fut ensuite observée chez des souris déficientes en tPA par Wang et collaborateurs en 1998 (Wang et al., 1998). Dans cette dernière étude, les auteurs nous montrent également qu'une injection de tPA dans la circulation après l'AVC fait augmenter le volume de lésion cérébrale. Dans ce modèle de MCAo mécanique, l'effet thrombolytique du tPA ne peut être attendu, bien entendu par rapport à l'absence de thrombus (voir 5.B.1.). Toujours chez des souris déficientes en tPA, soumises cette fois à des modèles thromboemboliques d'ischémie cérébrale, l'absence de tPA est bénéfique

au regard de l'excitotoxicité, mais délétère pour la fibrinolyse endogène. Ainsi, la diminution de l'efficacité de la fibrinolyse provoque une augmentation du volume de lésion (Nagai et al., 1999). Pour résumé, lors d'une ischémie cérébrale, le tPA est plutôt bénéfique dans le compartiment vasculaire mais délétère dans le parenchyme cérébral.

L'effet pro-excitotoxique du tPA endogène et exogène est bien documenté, toutefois ses mécanismes d'actions restent parfois discutés. En effet la capacité du tPA à activer le plasminogène et la microglie aurait directement des effets excitotoxiques (Wang et al., 1998; Rogove et al., 1999). Certains auteurs mettent plutôt en cause la capacité du tPA à se lier aux récepteurs LRP des neurones post-synaptiques et ainsi augmenter le flux calcique (Martin et al., 2008; Samson et al., 2008). Et bien sûr, comme vu juste avant, la capacité du sc-tPA à activer les NMDAR explique en grande partie ces phénomènes d'excitotoxicité (Z Qian *et al.*, 1993; O Nicole *et al.*, 2001; Parcq *et al.*, 2012; T Bertrand *et al.*, 2015).

De nombreuses études sur ce sujet ont été réalisées dans notre laboratoire et ont toutes montré l'aptitude du sc-tPA à se lier aux NMDAR pour promouvoir l'excitotoxicité (O. Nicole et al., 2001; Parcq et al., 2012; Lesept et al., 2016; Macrez et al., 2016 ; Figure 26). Pour cela, le tPA se lie à l'extrémité N-terminal (distal N-terminal domain, NTD) de la sous-unité GluN1 des NMDAR, au niveau de la lysine^{178}. Cette interaction est donc responsable de l'influx calcique délétère dans les neurones (Lesept *et al.*, 2016). L'anticorps Glunomab élaboré dans notre laboratoire cible la NTD des sous-unités GluN1 ; il a pour but de bloquer l'effet pro-excitotoxique du tPA (Lesept *et al.*, 2016; Macrez *et al.*, 2016) sans affecter l'effet basal des NMDAR ni l'effet thrombolytique recherché du tPA. Nous parlerons plus amplement du Glunomab dans la partie III.D., les résultats et la discussion de ce manuscrit.

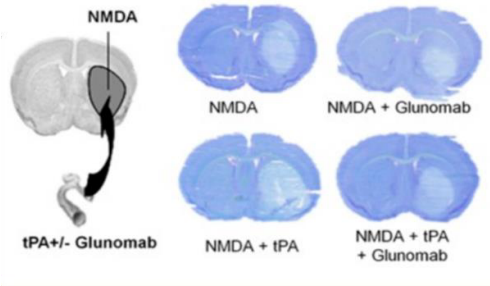


Figure 26 : Le tPA est impliqué dans l'excitotoxicité. Représentation de l'injection striatale de NMDA (gauche) et coupes histologiques de cerveau représentant les lésions excitotoxiques dans plusieurs conditions (Lesept *et al.*, 2016).

Après cela, nous n'avons aucun doute sur la pro-excitotoxicité du tPA mais de récentes recherches démontrent que dans certaines circonstances le tPA endogène est également anti-excitotoxique. L'explication est relativement simple. En réalité le tPA n'augmente l'excitotoxicité qu'à des concentrations anormalement élevées (dans des conditions où l'on injecterait du rtPA par exemple) (Wu et al., 2013). Mais à une faible concentration (5 à 10 nM, concentration physiologique du tPA dans le SNC), le sc-tPA ainsi que le tc-tPA protègent les neurones corticaux en culture de l'excitotoxicité induite par la suractivation des NMDAR (Wu et al., 2013; T. Bertrand et al., 2015; Yepes, 2015). Est-il possible de conclure que le tPA endogène protègerait les neurones de l'excitotoxicité lors d'un AVC ischémique ? En tout cas on peut le penser.

Cet effet anti-excitotoxique du tPA serait indépendant de l'activité enzymatique du tPA et ferait intervenir les NMDAR extra-synaptiques contenant la sous-unité Glun2A. Ces récepteurs sont responsables de l'activation la voie Erk1/2-CREB-ATF3 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2 - cAMP response element binding protein - activating transcription factor 3* ; Wu et al., 2013). Cette voie de signalisation favorise la neuroprotection durable contre une activité synaptique prolongée (Papadia et al., 2005).

De plus, à l'inverse des nombreuses études prouvant les effets toxiques du tPA, certaines études prônent les effets bénéfiques du tPA pouvant contrecarrer les phénomènes d'excitotoxicité (en partie causé par lui-même, nous l'avons compris). Le tPA favoriserait l'adaptation au stress métabolique (Wu et al., 2012), régulerait les mécanismes gérant la transmission synaptique excitatrice et inhibitrice (Jeanneret et al., 2016) et protègerait la

population post-synaptique des effets délétères des lésions ischémiques (Jeanneret et al., 2018).

Comment conclure cette partie ? Les effets opposés du tPA sur l'excitotoxicité pourraient être expliqués par une multitude de facteurs qui diffèrent dans les études citées dans cette partie : le type de neurones étudiés, le modèle de mort ou la dose de tPA (Thiebaut *et al.*, 2018). De plus, il semble bien que le sc-tPA et le tc-tPA ont des effets opposés ; le sc-tPA serait plutôt pro-excitotoxique contrairement au tc-tPA. Ce dernier, par sa capacité à diminuer l'influx calcique neuronal *via* son interaction avec le récepteur à l'EGF, jouerait un rôle neuroprotecteur (Parcq *et al.*, 2012; T. Bertrand *et al.*, 2015).

d. tPA et plasticité synaptique

La plasticité synaptique est la capacité des synapses à faire et défaire des connexions cellulaires avec le temps, et ceci en fonction de l'activité neuronale. Dans les processus de mémoire et d'apprentissage, le processus de renforcement de l'efficacité synaptique durable est également appelé potentialisation à long terme (LTP ; Nabavi et al., 2014). La LTP survient après des stimulations excitatrices répétées et a particulièrement lieu dans l'hippocampe et l'amygdale, régions centrales de la mémorisation et de l'apprentissage. La LTP se divise en deux phases : la phase précoce qui dure quelques heures et implique des mécanismes enzymatiques modulant l'efficacité synaptique et la phase tardive. Cette dernière persiste plusieurs jours et contribue à l'amélioration de l'efficacité synaptique en se reposant sur la synthèse de protéines *de novo* (Bliss and Lomo, 1973; Nicoll, 2017).

Le système glutamatergique a un rôle central dans la LTP, impliquant tout particulièrement les NMDAR. Suite à une stimulation neuronale à haute fréquence, le neurone présynaptique libère une grande quantité de glutamate allant ensuite activer les récepteurs glutamatergiques postsynaptiques. Les AMPAR sont les premiers activés, induisant une dépolarisation locale ayant pour résultat l'expulsion des ions Mg^{2+} bloquant le canal des NMDAR. Ainsi activés à leur tour, s'en suit logiquement l'entrée de Ca^{2+} dans les neurones postsynaptiques, responsables du renforcement synaptique (Collingridge, Kehl and McLennan, 1983).

De manière intéressante, le tPA est fortement exprimé dans l'hippocampe et l'amygdale (Teesalu et al., 2004). Une augmentation rapide des ARN messagers (ARNm) codant pour le tPA est observée suite à l'activation des neurones hippocampiques (Qian et al., 1993 ; Figure 27) et dans les neurones du cervelet lors de l'apprentissage de tâches motrices (Seeds, Williams and Bickford, 1995). Des études *in vitro* ont également montré que l'ajout d'inhibiteurs du tPA (PAI-1 par exemple) interfère avec la phase tardive de la LTP tandis que l'ajout de tPA potentialise le processus (Danny Baranes et al., 1998). Des travaux menés au laboratoire ont montré que les effets du tPA sur la LTP sont davantage médiés par le sc-tPA que par le tc-tPA (Parcq *et al.*, 2012). L'implication du tPA dans la LTP transparaît sur le plan comportemental dans les études précliniques. Chez la souris, l'augmentation de la LTP par surexpression du tPA dans les neurones augmente les performances d'apprentissage (Madani et al., 1999). À l'inverse, les souris déficientes en tPA présentent un déficit d'apprentissage, réversible par infusion de tPA dans la circulation (Pawlak et al., 2002).

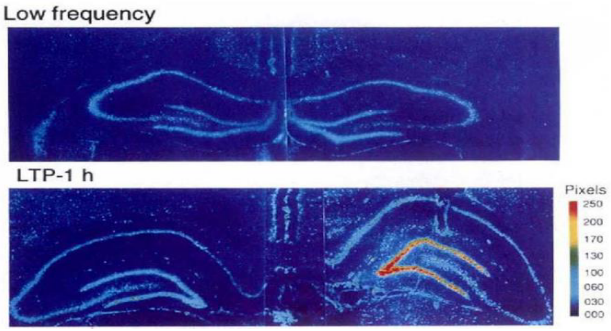


Figure 27 : Expression des ARNm du tPA dans l'hippocampe de rat, avant et après stimulation neuronale. Le niveau d'expression des ARNm du tPA augmente chez le rat 1 heure après stimulation des neurones du gyrus denté (Zhuo Qian *et al.*, 1993).

Très rapidement, l'impact du tPA sur la LTP peut se justifier par différents mécanismes :

- ✓ Comme souvent, par son interaction avec les NMDAR, activant davantage ceux-ci (Zhuo Qian *et al.*, 1993).
- ✓ Par son interaction avec les récepteurs LRP, facilitant la pousse neuritique et la formation de nouvelles synapses (Zhuo et al., 2000; Lee et al., 2014).
- ✓ Par la dégradation de la MEC, favorisant indirectement la formation de nouvelles synapses (Danny Baranes et al., 1998).

- ✓ Par sa capacité à activer le facteur neurotrophique issu du cerveau (*Brain Derived Neurotrophic Factor*, BDNF) essentiel à la LTP (Pang and Lu, 2004).

- ✓ Par sa capacité à cliver la réeline, une protéine importante dans la régulation des fonctions synaptiques (Trotter et al., 2014).

e. L'importance du tPA dans des exemples de processus cognitifs

La fonction du tPA dans la plasticité synaptique est bien documentée *in vitro* et *ex vivo* et est en lien direct avec le précèdent paragraphe sur la plasticité synaptique. En effet le tPA, en agissant sur la LTP de l'hippocampe, *via* les mécanismes expliqués juste au-dessus, a un impact sur les processus de mémoire et d'apprentissage (Teesalu et al., 2004). De fait, des souris déficientes en tPA présentent des altérations de la mémoire spatiale (Calabresi et al., 2000), une tâche impliquant à la fois l'hippocampe et le cortex entorhinal (Parron and Save, 2004). Restons toutefois prudent car d'autres études utilisant une méthodologie similaire n'ont pas observé de phénotypes particuliers (Huang et al., 1996; Pawlak et al., 2002). Nous faisons probablement face ici à des soucis (bien connus) de translations et de reproductibilités des tests comportementaux précliniques.

Une étude réalisée au sein de notre laboratoire (Hébert et al., 2017) a montré que le blocage sélectif de l'interaction entre tPA et NMDAR dans le cortex entorhinal pour mettre en évidence le mécanisme utilisé par le tPA dans la mémorisation et l'encodage d'informations spatiales. Cette étude parmi d'autres permet d'affirmer l'implication du tPA dans l'apprentissage et la mémoire spatiale (Madani et al., 1999; Obiang et al., 2011, 2012; Nabavi et al., 2014).

Le tPA est également exprimé dans l'amygdale et dans le noyau de la strie terminale qui sont des régions régissant les processus de stress et de peur (Pawlak et al., 2003; Matys et al., 2004 ; Figure 28). Plusieurs études ont prouvé son importance dans l'acquisition et le rappel au contexte de peur (Huang et al., 1996; Calabresi et al., 2000; Barnes and Thomas, 2008). En effet, les souris déficientes en tPA ont un comportement moins anxieux que les souris sauvages (Pawlak et al., 2003; Matys et al., 2004).

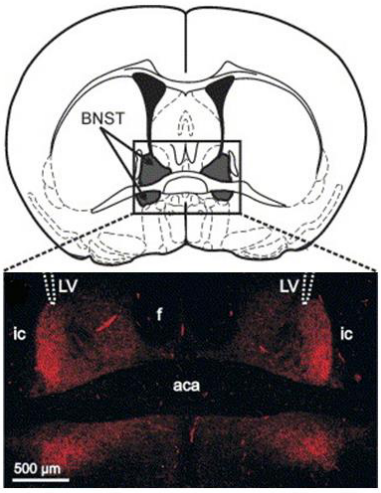


Figure 28 : Expression du tPA dans le noyau de la strie terminale. Le tPA (en rouge) est exprimé dans le noyau de la strie terminale, région régissant les processus de peur et de stress. BNST : bed nucleus of stria terminalis ; LV : lateral ventricles ; ic : internal capsule ; aca : anterior comissure ; f : fornix (Pawlak *et al.*, 2003).

f. Le tPA : davantage anti que pro-apoptotique

L'apoptose est la mort cellulaire programmée caractérisée par l'autodestruction des cellules en réponse à un signal. Elle est, entre autres, essentielle dans le développement neuronal et au cours de nombreuses pathologies cérébrales (notamment dans la formation de la lésion ischémique ; voir I.E.).

Tandis que certaines études suggèrent un effet pro-apoptotique du tPA sur les cellules endothéliales humaines et les neurones corticaux de souris (M. P. Flavin, Zhao and Ho, 2000; Liu et al., 2004), d'autres avancent le contraire. Par exemple, Liot et collaborateurs dans une étude du laboratoire, montrent un effet anti-apoptotique du tPA sur des cultures de neurones corticaux en privation de sérum (Liot et al., 2006). Cet effet se traduit par une réduction de l'activité de la caspase 3, Bad et Bax, acteurs de la cascade apoptotique tout en augmentant l'expression des marqueurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-XL (Correa et al., 2011). Les auteurs mettent plutôt en cause la capacité de la protéase à activer les voies neuroprotectrices intracellulaires PI3K/Akt (Siao and Tsirka, 2002 ; Lee et al., 2007). Cet effet serait dépendant de l'interaction du tPA avec les récepteurs à l'EGF (T. Bertrand et al., 2015; Lemarchand et al., 2016), avec l'annexine II (Lee et al., 2007b) et les NMDAR (Echeverry et al., 2010).

Pour finir, la capacité du tPA à cliver le plasminogène en plasmine, jouerait également un rôle contre l'apoptose. La plasmine est capable à son tour d'activer le pro-BDNF en BDNF mature ; ce qui engendre une activation du récepteur Kinase à la tropomyosine B (*Tropomyosin receptor kinase B,* Trk-B) et une diminution de l'apoptose (Head et al., 2009).

g. Le lien entre tPA et inflammation

Comme nous l'avons vu dans la partie I.E, la réaction inflammatoire joue un rôle prépondérant dans l'apparition et la progression de l'AVC. Pendant l'occlusion vasculaire cérébrale, à l'instar du tPA, l'inflammation participe à la dégradation de la BHE, favorisant alors la survenue des TH (Minoru Asahi et al., 2000; Polavarapu et al., 2007 ; Figure 24). La microglie est la population immunitaire la plus importante du SNC et ces cellules résidentes sont les premières à répondre aux modifications physiopathologiques induites par l'AVC ischémique. Bien qu'il soit admis que cette activation microgliale lors de la phase aigüe de l'AVC ischémique est délétère (Hu et al., 2015), de récentes études mettent en avant les bénéfices plus tardifs de cette activation. En effet, en permettant la neurogenèse, l'angiogenèse et le remodelage synaptique, la microglie favoriserait à moyen terme la récupération fonctionnelle après une ischémie cérébrale (Qin et al., 2019).

Plusieurs études montrent l'implication directe du tPA dans les réponses immunitaires lors d'un AVC ischémique grâce à l'interaction avec la microglie (Hickey, Vass and Lassmann, 1992; Kreutzberg, 1996; Vivien et al., 2011; Lenglet et al., 2014). En effet, lors d'une lésion excitotoxique, le tPA est sécrété par les neurones mais également par la microglie à l'échelle locale. A ce moment, la protéase agirait comme une cytokine pour continuer à activer la microglie (M P Flavin, Zhao and Ho, 2000; Siao and Stella E Tsirka, 2002). Le tPA est donc capable d'amplifier la réaction immunitaire lorsque l'inflammation est présente (Rogove et al., 1999; Lenglet et al., 2014) mais serait également capable d'activer la microglie en condition physiologique (Siao and Stella E. Tsirka, 2002). Ce recrutement microgliale serait permis par la liaison entre le domaine Finger du tPA avec l'annexine II membranaire de la microglie (Siao and Stella E. Tsirka, 2002) ou le LRP (Zhang et al., 2009). Cette suractivation microgliale au cours des phases précoces de l'AVC serait impliqué dans les processus neurodégénératifs et dans la dégradation de la MEC et de la BHE (Siao, Fernandez and Tsirka, 2003; Qin et al., 2019). Dans une étude de préclinique de 2009, les auteurs ont observé, après l'occlusion mécanique de la

MCA, que les souris ne possédant pas de récepteurs LRP sur leurs cellules microgliales ont un œdème cérébral réduit et une élévation du taux de MMP-9 moins importante. De plus, l'injection de tPA chez ces souris n'induit aucune augmentation de l'activation microgliale comparativement aux souris sauvages (Zhang et al., 2009).

Les astrocytes jouent également un rôle clé dans la réponse inflammatoire post-AVC. La gliose est un processus au cours duquel les astrocytes vont s'activer en réponse à un événement pathologique (Pekny and Nilsson, 2005). Le tPA favoriserait la gliose dans des conditions d'ischémie (Yip et al., 2016).

En réalité, Le tPA est capable de mobiliser de nombreux types cellulaires du système immunitaire lors d'un AVC ischémique. Dans une étude de 2021, les auteurs ont démontré que le tPA est capable de mobiliser rapidement sur site ischémié les neutrophiles et les lymphocytes T circulants chez le rongeur et chez l'Homme, augmentant significativement l'apparition de TH (Shi et al., 2021). Ce recrutement est encore permis par l'interaction du domaine Finger du tPA avec l'Annexine II porté par une large proportion de cellules immunitaires. Le ciblage pharmacologique de l'Annexine II atténue ces TH et améliore les scores neurologiques des individus s'il est associé à l'administration de tPA en tant que thrombolytique.

La recherche dans le domaine de l'AVC ischémique s'intéresse depuis quelques années de plus en plus massivement à ces mécanismes inflammatoires et à son lien avec le tPA. Nul doute que ce pan de la connaissance sur les fonctions du tPA est probablement celui qui évoluera le plus dans les prochaines années. D'ailleurs de nombreux médicaments ayant pour but de moduler l'inflammation exacerbée par le tPA ont atteint le stade d'essai clinique de phase II ou de phase III en 2022 ; bien que pour l'instant aucun n'a prouvé son efficacité clinique. Probablement juste une question de temps.

h. Le tPA et la substance blanche

La substance blanche du SNC est principalement constituée d'axones myélinisés, d'astrocytes, de cellules endothéliales et, surtout, d'oligodendrocytes. Ces derniers sont les cellules responsables de la formation de la gaine de myéline autour des axones, permettant ainsi l'accélération de l'influx nerveux. La mort des oligodendrocytes survient lors des atteintes

du SNC, lors d'une ischémie cérébrale ou dans le cadre de la sclérose en plaques (SEP) par exemple.

Après atteintes de la substance blanche, le tPA est impliqué dans les processus de remyélinisation et de régénération axonale. Prenons l'exemple de la SEP, avec ses dépôts caractéristiques de fibrine qui se forment au niveau des lésions cérébrales. Ces plaques aggravent la réponse inflammatoire et accentuent la dégénération axonale. Le tPA, par son action pro-fibrinolytique, est alors capable de réduire les dommages axonaux (Akassoglou et al., 2000; Gveric et al., 2001, 2003). Dans des modèles animaux de SEP, les souris déficientes en tPA ont des symptômes plus sévères et une moins bonne récupération (Lu, Bhasin and Tsirka, 2002; East et al., 2005) tandis que la déficience en PAI-1 permet de meilleurs résultats précliniques (East et al., 2008).

Pour être complet sur ce sujet, le tPA est aussi impliqué dans la dégradation des protéoglycanes de type chondroïtine sulfate (CSPG), protéines de la MEC ayant un effet inhibiteur sur la repousse axonale (Bukhari et al., 2011). Une étude réalisée au laboratoire montre que le tPA est capable d'activer ADAMTS-4 (A *Desintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Motifs*), une protéase capable de dégrader les CSPG, et ainsi d'améliorer la repousse axonale et la récupération fonctionnelle après un traumatisme de la moelle épinière (Lemarchant et al., 2014).

Enfin, le tPA promeut la migration et la survie des oligodendrocytes en cas de lésion de la substance blanche, *via* son domaine EGF (Correa et al., 2011; Leonetti et al., 2017 ; Figure 29).

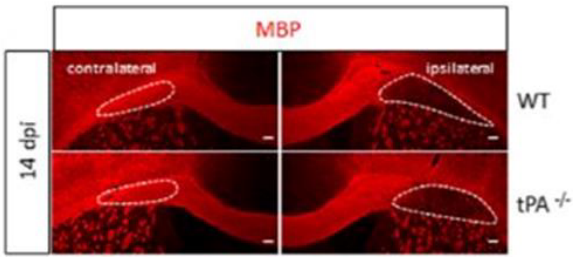


Figure 29 : Le tPA est impliqué dans la remyélinisation de la substance blanche chez l'adulte. La zone de remyélinisation (représentée en rouge avec la MBP et délimitée en pointillés) est plus importante 14 jours après injection de lisolécithine (agent démyélinisant) dans l'hémisphère contralatéral (à gauche) des animaux sauvages (WT) en comparaison avec les animaux déficients en tPA (-/- ; Leonetti *et al.*, 2017).

i. Le tPA et le couplage neurovasculaire

L'activité cérébrale entraîne des modifications hémodynamiques ; c'est le couplage neurovasculaire (CNV). Ce phénomène est essentiel pour assurer un apport énergétique suffisant au cerveau, qui consomme 20% de l'énergie corporelle totale. Le CNV met en jeu plusieurs types cellulaires qui communiquent entres eux tels que les neurones, les astrocytes, les cellules endothéliales ou bien les péricytes (Iadecola, 2017). Le tPA circulant a la capacité de moduler ces changements hémodynamiques. En effet, une étude du laboratoire a mis en évidence la diminution de la réponse hémodynamique lors de l'activation du cortex somatosensoriel chez les souris déficientes en tPA en comparaison avec des souris au phénotype sauvage (Anfray et al., 2019). Ce déficit peut être compensé par l'application de tPA directement au niveau du cortex sensoriel (Park et al., 2008). Park et collaborateurs ont conclu que ce phénomène était dépendant de l'interaction du tPA avec les NMDAR post-synaptiques résultant (entre autres donc) en la production de monoxyde d'azote par la nNOS (Park et al., 2008).

Dans la circulation sanguine, Nasser et collaborateurs ont montré que le tPA peut induire soit une vasoconstriction, soit une vasodilatation selon son site d'interaction avec les cellules endothéliales (Nassar *et al.*, 2004). Il a été montré que lors d'une ischémie cérébrale chez le rat, l'interaction du tPA circulant avec les NMDAR diminue la réactivité vasculaire, pouvant contribuer aux effets délétères de la reperfusion post-ischémie (Cipolla et al., 2000). Le tPA interagirait avec les NMDAR des cellules endothéliales pour activer la voie MAPK/ERK (Armstead, 2003; Armstead et al., 2011, 2016).

F. Le tPA comme traitement de l'AVC

La polyvalence de ce tPA pléiotrope ne doit pas cependant pas éclipser sa qualité première qui lui confère le rôle d'unique traitement autorisé dans la phase aigüe des AVC ischémiques chez l'Homme, sa capacité thrombolytique (voir I.H.3. et II.E.1.). Nous n'exagérons aucunement en soulignant le caractère rare du tPA qui contraste tant avec la multitude de neuroprotecteurs prometteurs chez l'animal, décevants chez l'Homme (Neuhaus et al., 2017). Selon la revue systématique Cochrane, 27 études cliniques ont testé des agents thrombolytiques dans le but de traiter des AVC ischémiques (Wardlaw et al., 2014) parmi lesquels des activateurs du plasminogène comme le rtPA, l'urokinase, la streptokinase, et la

desmoteplase. Force est de constater qu'à l'heure actuelle, seule l'administration de tPA (0,9 mg/kg) par injection IV (10% en bolus intraveineux puis infusion pendant au moins 30 minutes) est autorisée comme intervention médicamenteuse (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Sur la base de ce seul succès, et de manière assez peu surprenante, de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'optimisation du tPA sont en cours d'étude dans le monde de l'AVC comme nous le verrons ci-après. Ces tentatives font également suite aux principales limites de l'utilisation du tPA dans les AVC ischémiques que l'on rappellera ici :

- ✓ La fenêtre thérapeutique étroite : 4 à 5 heures après le début des symptômes de l'AVC (Hacke et al., 2008).
- ✓ Le faible taux de recanalisation du tPA (Bhatia et al., 2010).
- ✓ Le risque de d'altération de la BHE et donc d'hémorragie parenchymateuse symptomatique (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995).

Attardons-nous sur ce dernier point d'une importance capitale car les TH symptomatiques après AVC ischémiques sont considérées comme la complication la plus sévère d'un traitement thrombolytique, avec une plus forte incidence dans les premières 24 heures et un taux de mortalité supérieure à 50% (Yaghi, Willey, Cucchiara, Goldstein, Gonzales, Khatri, Kim, Mayer, Sheth and Schwamm, 2017). Nous pouvons de nouveau citer la méta-analyse de 27 études de Wardlaw et collaborateurs dans le but de souligner le fait que les patients thrombolysés après un AVC ischémique développe quatre fois plus d'hémorragies cérébrales que les patients n'ayant reçu aucun traitement (Wardlaw et al., 2014). La capacité du tPA et des autres activateurs du plasminogène à induire des TH est dose-dépendante (Anderson et al., 2016). L'étude TARGET-STROKE, impliquant 71 169 patients victimes d'un AVC ischémique traités par infusion intraveineuse de tPA, montre qu'une réduction du délai de traitement entraîne une baisse de la prévalence de la transformation hémorragique (Fonarow et al., 2014). Il faut cependant se montrer prudent sur l'importance de la fenêtre thérapeutique du tPA dans les TH car, selon une méta-analyse de grande envergure, le délai de traitement n'est significativement pas associé au risque de TH (Demchuk et al., 2012).

Les nouvelles stratégies pharmacologiques basées sur le tPA font suite à l'accumulation de nouvelles connaissances sur la structure et les fonctions du tPA couplé aux progrès du génie génétique. Il a été montré dans les laboratoires et en clinique que certaines protéines apparentées au tPA, présentant des mutations ont des caractéristiques pharmacologiques plus avantageuses que la molécule de base. Aujourd'hui, on dispose d'activateurs du plasminogène encore plus spécifiques pour la fibrine que le tPA. Prenons l'exemple du desmoteplase ayant échoué en essai clinique et du prometteur tenecteplase, objet de plusieurs essais cliniques depuis quelques années (Figure 30).

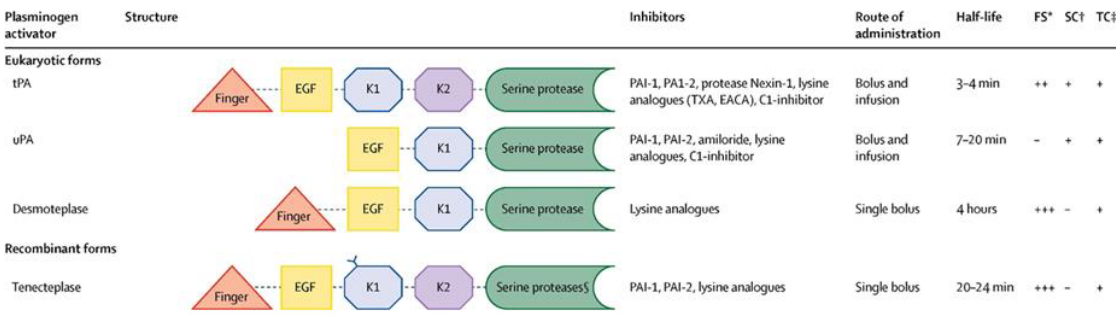


Figure 30 : Exemples d'activateur du plasminogène. Le tPA, l'uPA et le desmoteplase sont des formes eucaryotes tandis que le tenecteplase est une forme recombinante d'activateur du plasminogène. Ces activateurs du plasminogène présentent des caractéristiques différentes (structure, inhibiteurs, spécificité de la fibrine) c'est pourquoi leur voie d'administration et leur demi-vie diffèrent. EACA = acide ε-aminocaproïque. EGF = facteur de croissance épithélial. Finger = domaine finger. FS = spécificité de la fibrine. K = domaine de Kringle. TXA = acide tranexamique. * L'activateur du plasminogène n'a pas de spécificité pour la fibrine (-), une faible (+), une modérée (++) ou une forte (+++) spécificité pour la fibrine. † L'activateur du plasminogène a (+) ou n'a pas la forme (-) sc. ‡ L'activateur du plasminogène a (+) ou n'a pas (-) une forme tc. § Substitution d'acide aminé dans le domaine de la sérine protéase : Lys296Ala, Hys297Ala, Arg298Ala, Arg299Ala. (adapté de Thiebaut et al., 2018)

✓ Le desmoteplase :

Cette forme particulière du tPA est isolée à partir de de la chauve-souris vampire mexicaine, qui l'utilise pour fluidifier le sang de ses proies. On a ici un analogue du tPA ne possédant pas le domaine Kringle 2 à la demi-vie plasmatique de près de 4 heures (contre 5 minutes pour le tPA) et avec une plus forte affinité pour la fibrine (Elmaraezy et al., 2017). Plusieurs essais cliniques ont été réalisés dans une fenêtre thérapeutique de 3 à 9 heures, en comparaison avec un placebo, après sélection des patients par IRM de perfusion (Figure 31).

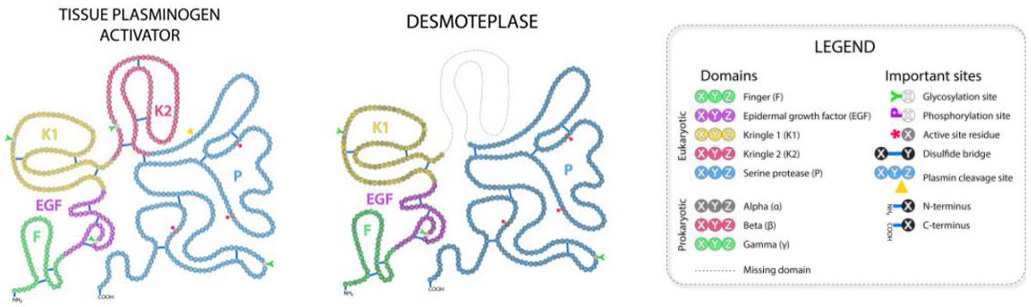


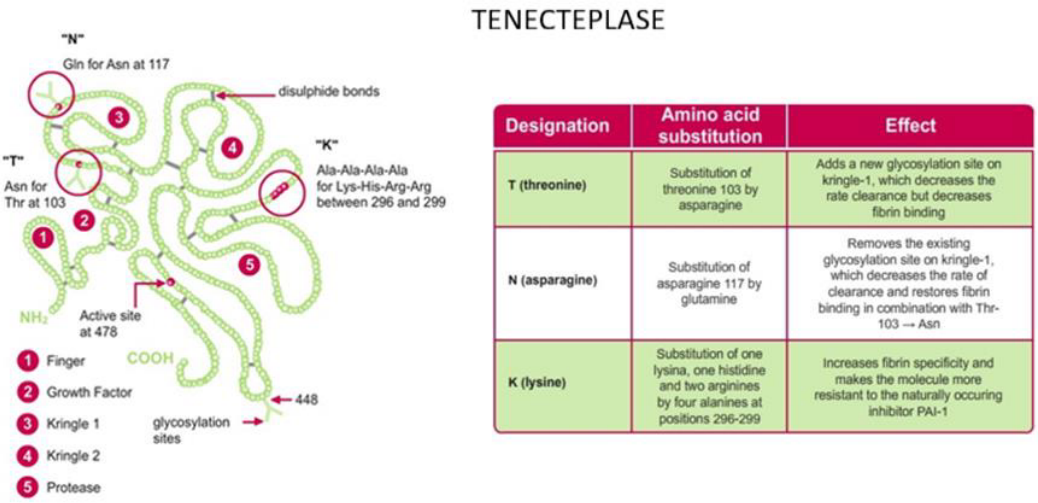
Figure 31 : Comparaison de la structure du tPA avec celle du Desmoteplase. Le desmoteplase est composé de domaines Finger, EGF-like, Kringle 1 et sérine protéase à l'instar du tPA mais ne possède pas le domain Kringle 2 présent dans la structure du tPA (Mican *et al.*, 2019).

Les premiers essais cliniques de phase II (DIAS et DEDAS) au début des années 2000 ont montré une association entre le traitement et un taux plus élevé de reperfusion accompagné de meilleurs scores neurologiques et d'un faible taux de TH symptomatiques à des doses importantes allant jusqu'à 125 µg/kg (Hacke et al., 2005; Furlan et al., 2006, 2006). Cependant, l'étude suivante DIAS II n'a pas retrouvé ces résultats bénéfiques et a conclu que le thrombolytique à la dose maximale de 125 µg/kg augmentait l'apparition des TH symptomatiques de 30% (Hacke et al., 2008, 2009). Les auteurs ont expliqué cette différence par des soucis méthodologiques et d'admission des patients. Ainsi en 2009 ont eu lieu deux nouveaux tests cliniques (DIAS-3 et DIAS-4) dans lesquels les patients soigneusement admis ont été traités à une dose de 90 µg/kg de desmoteplase ou au placebo, toujours dans une fenêtre temporelle de 3 à 9 heures. En 2014, les résultats de DIAS-3 se sont avérés « neutres » ; c'est-à-dire sans bénéfices du desmoteplase. Ces résultats décevants ont été rapidement suivi par l'arrêt prématuré de l'étude DIAS-4 en raison de l'absence d'améliorations fonctionnelles des patients 3 mois après l'AVC malgré une meilleure recanalisation artérielle permise par le thrombolytique lors de la phase aigüe de l'ischémie (von Kummer et al., 2016).

On a ici la preuve que l'amélioration des paramètres physiologiques lors de la phase aigüe des AVC (meilleure reperfusion, recanalisation en particulier) n'est pas forcément corrélée à une meilleure récupération fonctionnelle pour les patients. Cela rend encore plus délicate la recherche sur les AVC, et la translation préclinique/clinique, à l'instar de la plupart des maladies neurodégénératives.

✓ Le tenecteplase (TNK) :

Ce mutant du tPA fût élaboré grâce au génie génétique. Deux mutations ponctuelles dans le domaine Kringle 1 et une dans le domaine protéase donnent à cette protéase une spécificité pour la fibrine 14 fois supérieure à celle du tPA. Le TNK a également une demi-vie plasmatique plus longue (au-delà de 20 minutes) et une résistance 80 fois supérieure au tPA à l'inhibition par PAI-1. Cette demi-vie allongée permet au tenecteplase d'être injecté sous la forme d'un bolus unique, rendant le traitement clinique plus aisé qu'une longue infusion de rtPA (Warach, Dula and Milling, 2020 ; Figure 32). Pour information, pour traiter en urgence l'infarctus du myocarde, le TNK est préféré à l'Altéplase (rtPA) du fait de la commodité de son administration car les effets engendrés par les deux thrombolytiques sont les mêmes pour cette pathologie (Van de Werf, 1999). La pandémie de COVID-19 et les restrictions associées ont encore plus mis en évidence l'importance de cet avantage pratique du TNK, en ce sens qu'il réduit l'exposition du personnel à la contagion (Warach and Saver, 2020).



Designation	Amino acid substitution	Effect
T (threonine)	Substitution of threonine 103 by asparagine	Adds a new glycosylation site on kringle-1, which decreases the rate clearance but decreases fibrin binding
N (asparagine)	Substitution of asparagine 117 by glutamine	Removes the existing glycosylation site on kringle-1, which decreases the rate of clearance and restores fibrin binding in combination with Thr-103 → Asn
K (lysine)	Substitution of one lysina, one histidine and two arginines by four alanines at positions 296-299	Increases fibrin specificity and makes the molecule more resistant to the naturally occuring inhibitor PAI-1

Figure 32 : Structure et effets du Tenecteplase. Le tableau sur la droite représente les mutations du TNK en comparaison avec le tPA, et indique les différentes fonctions de ces mutations (https://www.stemi-care.com).

Dans le traitement de l'AVC ischémique, la spécificité améliorée pour la fibrine du TNK permet théoriquement une lyse plus rapide qu'avec l'utilisation de tPA. C'est le seul fibrinolytique a avoir fait l'objet d'essais cliniques randomisés en comparaison avec le rtPA (Parsons et al., 2012). De très nombreuses études cliniques ont eu lieu dans le monde avec des

résultats parfois contradictoires. Par exemple Logallo et collaborateurs, dans une investigation clinique norvégienne de phase III, concluent que le TNK n'est pas « supérieur » à l'Altéplase et présente un profil d'innocuité similaire (Logallo et al., 2017). *A contrario*, une étude clinique australienne a montré que le TNK injecté dans les 4,5 heures après AVC ischémique induit une reperfusion plus élevée (22% *versus* 10%) et une meilleure récupération fonctionnelle par rapport au groupe traité avec le rtPA (Campbell et al., 2018). De plus, cette étude nous montre que le TNK ne change pas l'incidence des hémorragies intracérébrales.

Une méta-analyse récente portant sur 4 essais cliniques utilisant des doses de TNK allant de 0.25 à 0.9 mg/kg, compare les deux thrombolytiques sur différents résultats : l'amélioration neurologique majeure précoce, l'évaluation fonctionnelle à 3 mois, les taux de TH symptomatiques et la mortalité à 3 mois ont été comparés (Thelengana et al., 2018). Dans cette étude, comparativement au groupe traité au rtPA, le groupe avec tenecteplase présente une amélioration neurologique précoce plus importante, sans différence dans la récupération fonctionnelle à 90 jours, dans le taux d'hémorragie intracérébrale, et la mortalité.

Lors de l'ESOC (*European Stroke Organisation Conference*) 2022 à Lyon, de nombreux résultats d'études cliniques (AcT, NOR-TEST 2, TASTE-A et TWIST ; Bivard et al., 2022; Kvistad et al., 2022; Menon et al., 2022) ont souligné les bénéfices et l'innocuité du TNK à une dose de 0.25 mg/kg (dose recommandée dans les guidelines de l'ESOC 2021). L'organisation du congrès a conclu que ces effets très prometteurs doivent encore être renforcés par les résultats d'autres essais en cours pour 2023 avant de conclure en la faveur de l'utilisation du TNK comme traitement de l'AVC ischémique aigu.

Afin d'essayer d'être complet sur les méthodes de potentialisation du tPA, on peut également citer les stratégies basées sur l'inactivation des inhibiteurs du tPA. Pour favoriser la fibrinolyse locale, des chercheurs ont proposé d'utiliser le « diabody », un anticorps ciblant PAI-1, ainsi que l'inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine (*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitors,* TAFI ; Wyseure et al., 2015). Dans un modèle murin d'AVC ischémique, l'administration de « diabody » améliore l'efficacité du tPA sans augmenter le risque de TH (Wyseure et al., 2015). D'autres molécules inhibant PAI-1 ont été décrites comme prometteuses sur des modèles animaux d'AVC ischémique (Vaughan, 2011; Frederik Denorme et al., 2016) mais aucune de ces molécules n'a été testée chez des patients à ce jour.

III. Les nouvelles stratégies basées sur la thrombolyse de l'AVC ischémique

Pour résumer en une phrase ; le faible taux d'efficacité du tPA et de ses dérivés, couplé à leurs complications hémorragiques et la faible proportion de patients éligibles à la thrombolyse constituent les limites majeures de l'utilisation des activateurs du plasminogène dans l'AVC ischémique (Maïer, Desilles and Mazighi, 2020). Deux principales nécessités découlent de ce constat et ont conduit aux choix stratégiques dans le traitement des AVC précliniques de ce projet :

- ✓ Le besoin de développer d'autres thrombolytiques, potentiellement meilleurs que le tPA, avec moins d'effets négatifs et pouvant être injectables à un plus large spectre de la population touchée par l'AVC ischémique.

- ✓ En dépit de l'intérêt évident de développer des mutants du tPA, il sera toujours nécessaire d'évaluer les effets secondaires des thrombolytiques, notamment les TH symptomatiques.

Ainsi, nous avons testé deux stratégies thérapeutiques dans ce projet dans le but d'augmenter l'utilisation et l'efficacité des traitements thrombolytiques en clinique auprès d'un plus grand pourcentage de patients.

A. La stratégie basée sur la dégradation des autres constituants du thrombus : La N-Acétylcystéine (NAC)

Comme vu bien plus haut dans ce manuscrit, la fibrine ne représente qu'une partie du thrombus et le tPA n'a que très peu d'efficacité sur les thrombi riches en plaquettes. Dans les années 2000, plusieurs essais cliniques ont cherché à déterminer l'efficacité et l'innocuité de la co-administration du tPA avec des agents antiplaquettaires (Adams et al., 2008; Zinkstok and Roos, 2012). Malheureusement, beaucoup de ces essais furent des échecs après avoir montré la faible efficacité ainsi que le risque accru de TH de ces co-traitements. Certaines stratégies antiplaquettaires semblent toutefois prometteuses. Citons pour exemple une stratégie inhibitrice de GPVI, une glycoprotéine plaquettaire dont le ciblage par le glenzocimab a montré son efficacité sur la reperfusion tissulaire et son innocuité en combinaison ou non avec le tPA

dans un modèle murin d'AVC et dans un essai clinique de phase I (Voors-Pette et al., 2019; Bieber et al., 2021).

Chez l'animal, il a été démontré que l'agrégation plaquettaire artérielle implique des récepteurs et des protéines spécifiques, qui ne sont pas indispensables à l'hémostase dans le cerveau, tels que le VWF et la glycoprotéine GpIb-α (Momi *et al.*, 2013; Le Behot *et al.*, 2014). Par conséquent et en théorie, les stratégies ciblant spécifiquement ces composants peuvent induire une recanalisation artérielle sans augmenter substantiellement le risque de TH (Le Behot *et al.*, 2014). Ainsi, les stratégies pharmacologiques qui ciblent le VWF, très présent dans la majorité des thrombi à l'instar de ADAMTS-13, (F. Denorme et al., 2016) ou la NAC (Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017) sont prometteuses.

La NAC est un composé contenant des sulfhydryles aux propriétés mucolytiques, breveté en 1960 et d'abord utilisé comme médicament contre la toux et la mucoviscidose dans les années 60 (Lillibridge, Docter and Eidelman, 1967; Gracey, Burke and Anderson, 1969). Depuis, l'utilisation de la NAC a été étendue pour traiter le surdosage au paracétamol et les obstructions pulmonaires chroniques. Les champs de possibilités cliniques de cette molécule continuent d'être explorés, avec un regain d'intérêt ces dernières années dans le domaines des maladies neurodégénératives, psychiatriques, pulmonaires, gastrointestinales, entres autres (Schwalfenberg, 2021). Parmi les nombreuses propriétés de ce composé, citons ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, et sa capacité à réduire les ponts disulfure des protéines (Schwalfenberg, 2021).

Il existe ainsi de très nombreuses évidences sur l'effet protecteur de la NAC face aux maladies neurodégénératives comme Parkinson, la SEP et bien entendu l'AVC ischémique de par ses propriétés thrombolytiques (Figure 33). Récemment, la NAC a été utilisée avec succès comme agent de dégradation du VWF sur des patients présentant un purpura thrombotique thrombocytopénique, maladie causant la formation de « microthrombi » riches en plaquettes dans les petits vaisseaux chez l'Homme (Cabanillas and Popescu-Martinez, 2016). De plus, on sait depuis presque 30 ans que la NAC a également des effets bénéfiques chez les patients atteints d'un infarctus aigu du myocarde. En effet, dans une étude clinique de 1995, les auteurs avaient déjà observé une meilleure reperfusion coronarienne chez les patients traités avec la NAC (Arstall et al., 1995). Plus récemment et pour cette même pathologie cardiaque, l'essai

NACIAM a démontré que l'utilisation précoce de la NAC améliore effectivement la reperfusion tissulaire et réduit la douleur et la taille de l'infarctus de 33% au cinquième jour par rapport aux patients traités avec le placebo (Alexander, 2016). La capacité thrombolytique de la NAC semble donc être la clef des bénéfices observés dans ces maladies.

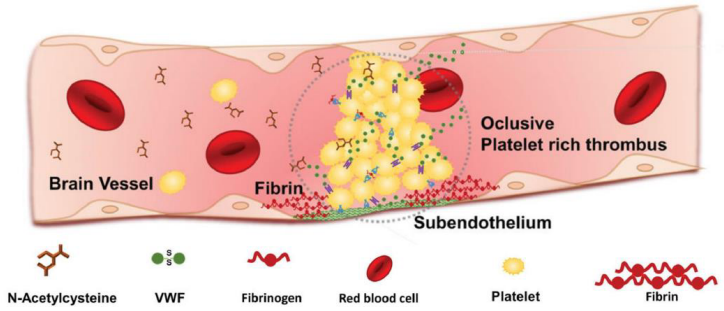


Figure 33 : Mécanisme d'action de la NAC. La NAC agit comme agent de dégradation du VWF *via* sa capacité à réduire les ponts disulfures et permet ainsi la lyse des caillots riches en plaquettes (Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017).

En se basant sur ces travaux, des membres de notre laboratoire PhIND ont voulu tester ce médicament dans l'AVC ischémique et ces travaux précliniques font l'objet d'un article paru en 2017 dans *Circulation*. Journal dans lequel les auteurs ont démontré que la NAC (400 mg/kg), injectée en bolus 20 minutes après l'AVC, a la capacité de réduire la taille des multimères du VWF structurant les plaquettes à l'intérieur des thrombi artériels. Cette réduction des multimères du VWF a alors permis la dissolution de ces derniers et la recanalisation artérielle, sans présenter de risque de TH (Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017). Dans cette étude, la NAC baisse significativement la taille de lésion ischémique à 24 heures dans des modèles de MCAo induisant des thrombi riches en fibrines ou en plaquettes, contrairement au tPA efficace uniquement face aux thrombi pauvres en plaquettes (Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017). Il est important de noter que la NAC n'aggrave pas l'expansion de l'hématome dans un modèle d'hémorragie intracrânienne, suggérant davantage encore son rapport bénéfice-risque favorable dans l'AVC ischémique. D'autres travaux sur les rongeurs montrent les bénéfices de la NAC dans différents modèles de MCAo (Cuzzocrea et al., 2000; Khan et al., 2004; von Kummer et al., 2016; Karuppagounder et al., 2018; Sabetghadam et al., 2020).

Un essai clinique est désormais en cours pour tenter de fournir la preuve définitive de l'efficacité et l'innocuité de la NAC administrée en IV dans la phase aigüe de l'AVC ischémique chez des patients (ClinicalTrials.gov Identifier : NCT04918719).

B. La stratégie basée sur la régulation des effets délétères du tPA : Le glunomab

Comme nous l'avons vu, au-delà de son activité fibrinolytique vasculaire, le tPA est également connu pour influencer la survie et la mort neuronale dans des conditions pathologiques, pour moduler les processus inflammatoires et l'intégrité de la BHE favorisant alors les TH. Tous ces effets peuvent en partie être attribués à la capacité du tPA à moduler la signalisation neuronale et endothéliale des NMDAR (Lesept *et al.*, 2016; Macrez *et al.*, 2016). Pour cibler spécifiquement cette interaction sans affecter les autres fonctions (notamment la fonction fibrinolytique), notre laboratoire a conçu et produit un anticorps monoclonal, le Glunomab, qui bloque spécifiquement l'interaction du tPA avec les NMDAR à la fois dans les neurones et les cellules endothéliales (Louet et al., 2022). Pour bloquer cette signalisation tPA/NMDAR, le Glunomab concurrence le site de liaison du tPA au niveau domaine N-terminal de la sous-unité GluN1 du NMDAR, sans jamais bloquer l'activité basale du récepteur (Macrez et al., 2016 ; Figure 34).

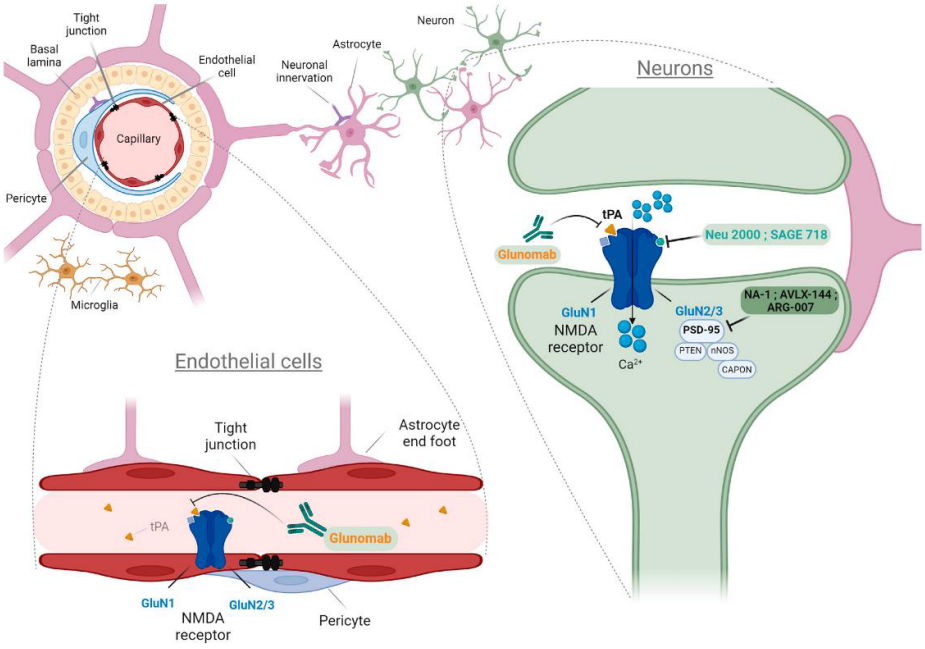


Figure 34 : Mécanisme d'action du Glunomab. Le Glunomab est capable de se lier à la sous unité GluN1 des NMDAR présents à la surface des cellules endothéliales et des neurones. La liaison Glunomab-NMDAR permet de concurrencer la liaison du tPA aux NMDAR et ainsi d'inhiber l'interaction tPA-NMDAR probablement à l'origine des effets délétères induits par le tPA dans le traitement de l'AVC ischémique (Seillier et al., 2022).

Dans un article du laboratoire de 2016, Lesept et collaborateurs ont observé que l'interaction du tPA avec les NMDAR favorisent l'influx de Ca^{2+} dans les neurones postsynaptiques de souris en culture, influençant effectivement la plasticité synaptique et la survie neuronale (Lesept *et al.*, 2016). Les auteurs ont ensuite appliqué sur ces neurones du Glunomab pour alors observer la réduction sélective de l'interaction tPA/NMDAR dans la synapse entraînant une chute significative de la neurotoxicité *in vitro*. Cette étude a également permis de montrer confirmer la diminution de la neurotoxicité du Glunomab *in vivo.*

L'utilisation de cet anticorps combat également l'ouverture pathologique de la BHE chez la souris et l'Homme en conditions inflammatoires, limitant ainsi le passage des cellules immunitaires dans le parenchyme cérébral. En effet, une équipe du laboratoire a prouvé que le Glunomab réduisait la transmigration des leucocytes humains dans un modèle *in vitro* de BHE (Macrez et al., 2011). Ainsi, cette même équipe a ensuite testé les effets du Glunomab dans un modèle expérimental de SEP chez la souris (Macrez et al., 2016). Notons également que dans cette pathologie, le tPA aurait un effet démyélinisant délétère de par son action protéolytique mais également un rôle dans l'exacerbation de l'inflammation et l'altération de la BHE à cause de son interaction avec les NMDAR (Lopes Pinheiro et al., 2016). Les auteurs ont réalisé une injection IV contenant le Glunomab sur des animaux traités avec du tPA ou non et ont observé que la progression des troubles moteurs est bloquée lorsqu'il est co-administré avec du tPA. Chez les souris traitées avec le thrombolytique, cet effet est associé à une diminution de l'infiltration des lymphocytes dans le tissu nerveux, et à une importante réduction de la démyélinisation. En prévenant ainsi la destruction de la myéline par les cellules immunitaires et en bloquant certains effets délétères du tPA endogène et exogène, cette stratégie pourrait représenter une thérapie prometteuse pour lutter contre la SEP en clinique.

Ainsi et théoriquement, les propriétés du Glunomab semblent intéressantes dans le cadre de l'AVC ischémique traité avec du tPA. Au cours de ma thèse, je me suis donc intéressé aux effets du Glunomab, en administration seule ou couplé à un thrombolytique (tPA ou NAC), sur des modèles de MCAo murins.

IV. La recherche préclinique sur les AVC ischémiques

A. L'utilisation des modèles animaux pour la recherche

Pour étudier une pathologie, plusieurs approches sont possibles. Pour simplifier, les outils dont disposent la recherche biomédicale sont les tissus ou cellules cultivés *in vitro*, les simulations informatiques, les modèles spontanés ou induits chez les animaux possédant des similitudes avec l'Homme et bien entendu les échantillons prélevés chez les patients.

Aujourd'hui le développement et l'utilisation de méthodes alternatives à l'expérimentation animale dans le monde sont fortement encouragés par les instances universitaires et législatives, dans un souci du bien-être animal. Cependant de nombreuses questions scientifiques ne peuvent, à l'heure actuelle, pas trouver de réponses sans étudier les mécanismes physiopathologiques *in vivo*. Les maladies neurodégénératives, à l'instar des AVC, ne dérrogent pas à la règle. Bien au contraire car et les atteintes sensori-motrices et la récupération fonctionnelle des patients sont les axes d'amélioration les plus importants, impossibles à évaluer *in vitro*.

En recherche biomédicale, un modèle animal doit permettre l'étude de données sur la biologie, un comportement, ou un processus pathologique spontané ou induit, ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales. Or, certaines pathologies, et particulièrement l'AVC, sont hétérogènes et multifactorielles. De ce fait, bien que les modèles animaux aient fourni de précieuses informations sur cette pathologie, les connaissances acquises lors des expérimentations précliniques ne sont pas toujours transférables à la pratique clinique. Nous discuterons de la valeur translationnelle des modèles murins d'AVC après les avoir décrits.

B. Modélisation de l'ischémie cérébrale chez le rongeur

On peut distinguer 3 différentes familles de modèles expérimentaux d'AVC ischémiques :

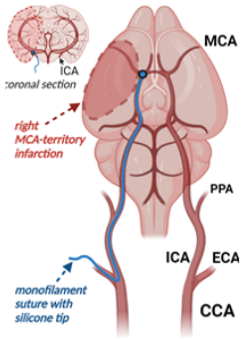
- ✓ Les modèles d'occlusion permanente (électrocoagulation, filament intraluminal laissé en place, caillots non fibrinolysés)

- ✓ Les modèles d'occlusion transitoire mécanique (filament intraluminal, occlusion mécanique par pression externe)
- ✓ Les modèles d'occlusion thrombotique (caillot autologue, micro-emboli, photo-thrombose, stress oxydant, application d'endothéline, injection *in situ* de thrombine, microsphères biodégradables)

Nous allons décrire ici uniquement les modèles utilisés pour ces travaux de thèses.

1. Modèle monofilament

L'occlusion par filament de l'ACM est probablement le modèle le plus fréquemment utilisé en recherche expérimentale sur les AVC. C'est un modèle purement mécanique qui a initialement été développé par Koizumi et collaborateurs en 1986 chez le rat (Koizumi *et al.*, 1986). En pratique, ce modèle consiste en l'insertion d'un filament en nylon dans la carotide interne, que l'on fait remonter jusqu'au niveau de la bifurcation de l'ACM pour l'occlure à sa base. Le temps d'occlusion peut être soit transitoire (variant souvent de 30 à 90 minutes), soit le filament peut être laissé de manière permanente. L'importance de la lésion obtenue induit des déficits fonctionnels chez les animaux qui peuvent être facilement visualisables par des tests comportementaux (Belayev, Endres and Prinz, 2016). Dans l'ensemble, ce modèle présente des éléments qui semblent modéliser la majorité des infarctus cérébraux provenant de l'occlusion d'une artère proximale chez l'homme et a l'avantage du contrôle exact de la reperfusion par l'expérimentateur. Ainsi, la connaissance de la physiopathologie des AVC ischémiques chez l'animal est beaucoup basée sur ces modèles ; plus de la moitié des études de traitements neuroprotecteurs ont été réalisées en utilisant exclusivement ce modèle (Hossmann, 2012 ; Figure 35).



Benefits	Disadvantages
• Possibility of inducing permanent ischemia • Control of ischemia time • Preservation of skull integrity • Ease of execution • Neurological deficits easy to asses	• Severe lesions (cortex and striatum) • Does not allow studies of thrombolytic agents • Secondary microthrombosis at filament removal • Deleterious tPA-induced fibrinolysis

Figure 35 : Modèle monofilament. Illustration technique du modèle filament et tableau descriptif des avantages et inconvénients rencontrés dans ce modèle.

Il est cependant important de noter que dans ce protocole expérimental, la fibrinolyse par tPA est uniquement délétère, ce qui ne correspond pas à la réalité clinique (Wang *et al.*, 1998). La taille des lésions ainsi que la mortalité sont plus élevées et plus variables que dans les autres modèles que nous utilisons dans notre laboratoire (Lebrun *et al.*, 2022). Il a été démontré que 70% du volume de ces grandes lésions est dû en réalité à la formation de microthrombi secondaires lors du retrait du monofilament (Gauberti *et al.*, 2014; Pham *et al.*, 2010).

2. Modèle électrocoagulation

La méthode d'AVC préclinique par électrocoagulation, développée par Akira Tamura et collaborateurs à Glasgow en 1981, est devenue l'une des deux méthodes standard pour la MCAo proximale permanente chez le rat et le souris (Tamura *et al.*, 1981). L'approche sub-temporale nécessite une craniotomie pour mettre en évidence la MCA puis une stimulation électrique qui provoque l'électrocoagulation de l'artère isolée qui est ensuite coupée pour éviter toute recanalisation éventuelle. Le succès de ce modèle repose sur une lésion reproductible et une faible mortalité des animaux. La lésion est plus petite que dans le modèle de monofilament et se cantonne, généralement, à la zone corticale. Dans ce modèle, une injection précoce (30 minutes) de tPA ne semble pas compromettre l'intégrité de la BHE comme dans le modèle monofilament mais ne permet évidemment pas non plus la recanalisation (Benchenane *et al.*, 2005). Une occlusion par électrocoagulation de l'ACM d'une souris

modélise l'occlusion thrombotique permanente de l'ACM chez un patient, sans reperfusion (Macrae,2016 ;Figure 36).

Benefits	Disadvantages
• Reproducible model	• Required craniotomy
• Ease of execution	• Pathophysiological differences
• Low mortality	• Neurological deficits difficult to assess
	• Does not allow studies of thrombolytic agents

Figure 36 : Modèle électrocoagulation. Illustration technique du modèle électrocoagulation et tableau descriptif des avantages et inconvénients rencontrés dans ce modèle.

Il est possible, par la même approche, d'induire une interruption du débit sanguin par l'application d'un clip, ou par réalisation d'une suture autour de l'ACM. Ce modèle a l'avantage d'être réversible mais ne permet toujours pas d'étudier la fibrinolyse.

3. Modèles thromboemboliques

Plusieurs types de modèles thromboemboliques existent :

- ✓ Un caillot préalablement formé (par du sang autologue ou hétérologue) peut être dirigé jusqu'à la base de l'ACM à l'aide d'un cathéter :

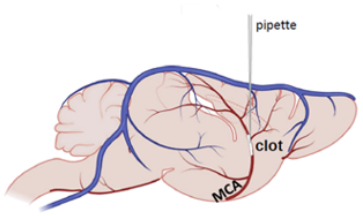
Le modèle thromboembolique par injection de caillot autologue a été développé chez la souris par Krueger and Busch, 2002. Du sang est prélevé d'un animal (200µL par exemple pour un rat Sprague-Dawley pesant 250 grammes) et est laissé deux heures dans un tube à 37°C jusqu'à coagulation. Le caillot est ensuite récupéré et placé dans une boite de pétri contenant du sérum physiologique pendant 22 heures. Le lendemain, le même animal est opéré sous anesthésie générale et le thrombus formé la veille est libéré dans l'artère carotide interne *via* un cathéter.

- ✓ L'occlusion de l'ACM peut être réalisée par la formation d'un caillot en appliquant du chlorure de fer ($FeCl_3$) de manière focale ou distale (Karatas *et al.*, 2011) :

Une approche sub-temporale est réalisée par l'incision de la peau entre l'œil et l'oreille de l'animal, puis la résection du muscle masséter droit et enfin la réalisation d'une craniotomie localisée. L'occlusion distale de l'ACM est réalisée en appliquant du papier Whatman imbibé de $FeCl_3$ qui va occasionner la formation d'un caillot riche en plaquettes (Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017 ; Figure 37).

- ✓ L'injection de thrombine murine directement dans la lumière de l'ACM. Ce dernier modèle d'AVC thromboembolique a été développé et caractérisé au laboratoire (Orset *et al.*, 2007)

Ici dans le modèle thrombine, la même approche sub-temporale chirurgicale est réalisée. Ensuite, à l'aide d'une micropipette en verre, la thrombine (1µL à 1UI) est injectée directement dans l'ACM, provoquant ainsi la formation locale, rapide et stable d'un thrombus riche en fibrine dans cette artère (Figure 37). Une diminution du DSC à un niveau résiduel et stable d'environ 20% de la valeur de base est observée (Orset *et al.*, 2007). L'analyse du profil de l'ACM par score angiographique (IRM) montre une recanalisation artérielle induite par le tPA, soit au début (20 minutes après MCAo), soit à la fin de l'administration (4 heures après MCAo). Il y a généralement une reperfusion spontanée chez tous les animaux à 24 heures. Cette technique d'occlusion provoque une zone de lésion limitée à la partie corticale de l'hémisphère ipsilatéral (cortex somato-sensoriel). Ce modèle a été choisi, et utilisé dans les 3 études de cette thèse car il présente l'intérêt majeur de permettre une recanalisation par thrombolyse et ainsi de reproduire la prise en charge clinique des patients atteints d'AVC ischémique : l'administration intraveineuse de rtPA réduit le volume lésionnel mesuré à 24 heures comparé à une administration de sérum physiologique. Cependant, il est à noter que l'administration tardive de tPA a un effet néfaste et augmente le volume de lésion et le taux de TH dans certaines études (Karatas *et al.*, 2011; Orset *et al.*, 2016; García-Culebras *et al.*, 2017).



Benefits	Disadvantages
• Reproducible and non-serious lesions • Low mortality rate • Relevant physiopathology • Allow studies of thrombolytic agents	• Required craniotomy • Neurological deficits difficult to assess

Figure 37 : Modèle thrombolytique par injection de thrombine ou application de $FeCl_3$. Illustration technique du modèle thrombolytique et tableau descriptif des avantages et inconvénients rencontrés dans ce modèle.

C. Discussion sur la pertinence de l'expérimentation animale dans l'AVC

Bien que les modèles animaux aient fourni de précieuses informations sur la physiopathologie de l'AVC, les connaissances acquises lors d'expériences précliniques ne sont pas toujours transférables à la pratique clinique. Par exemple, les essais cliniques testant des médicaments neuroprotecteurs qui ont donné des résultats prometteurs sur le modèle de MCAo avec monofilament n'ont jamais abouti chez l'Homme. Il est de plus impossible de fermer les yeux sur ce constat sans appel : sur les plus de 1000 molécules thérapeutiques (thrombolytiques et neuroprotecteurs confondus) testées chez l'animal, aucune n'a montré d'efficacité dans des tests cliniques mis à part le tPA, cette exception (O'Collins *et al.*, 2006).

Très logiquement, de nombreuses voix se sont élevées ces 25 dernières années pour débattre de l'utilité des modèles animaux dans la recherche sur les AVC. En effet, une étude préclinique s'avérant non-translationnelle implique un déploiement inutile de temps et d'argent, des espoirs vains pour les patients et un questionnement éthique quant à l'expérimentation animale dans la recherche sur les AVC (Lindauer, 2016). Le grand public, les autorités politiques, et les cliniciens peuvent parfois se montrer sceptiques à propos de nos expériences sur les animaux. Certains affirment que les animaux sont tout simplement trop différents de l'espèce humaine.

Il est vrai que le modèle animal reproduit seulement un ou plusieurs aspects conservés et communs d'une pathologie et est, par définition, une reproduction imparfaite de la pathologie humaine. Chacun des exemples de modèles décrits plus haut possède ses avantages et ses inconvénients que nous avons tenté de synthétiser. En ayant conscience de cela, il est important que le choix du modèle soit déterminé par la question scientifique posée. Est-ce que

mon modèle animal permet d'étudier les mêmes mécanismes retrouvés chez l'Homme ? Est-il prédictif ? Chaque chercheur doit se poser cette question au moment de la conceptualisation de son étude, s'il souhaite que ses futurs résultats soient translationnels.

Ceci étant dit, certaines pathologies, et particulièrement l'AVC, sont hétérogènes et multifactorielles, comme expliqué précédemment dans cette introduction. Ceci rend le choix du modèle quasiment impossible et le questionnement sur l'utilité des rongeurs toujours d'actualité, du fait des variabilités et spécificités inter-espèces.

1. Les spécificités interspécifiques des rongeurs limitant la recherche sur l'AVC

Les processus biologiques fondamentaux tels que la survie et la mort cellulaire sont fortement conservés d'un point de vue évolutif. Et dans le cas qui nous intéresse, les mécanismes moléculaires sous-jacents à la mort ischémique chez les rongeurs sont également similaires à ceux observés chez les humains. En fait, les mécanismes de l'apoptose, importants dans les AVC, sont même conservés chez les non-vertébrés tels que le nématode *Caenorhabditis elegans* (Danial and Korsmeyer, 2004).

Les modèles animaux d'AVC ont été établis dans de plusieurs espèces, mais généralement, ce sont les petits animaux tels que les rongeurs qui sont choisis par les chercheurs. En effet, le petit animal permet une manipulation « facile », à moindre coût par rapports aux gros animaux, et s'avère moins sujet aux controverses d'un point de vue éthique que les primates et les mammifères supérieurs. D'un point de vue scientifique, les rongeurs sont préférés par les chercheurs pour leur homogénéité génétique et pour la large caractérisation expérimentale de l'espèce. De surcroît, les techniques de génération transgénique peuvent être réalisées aisément sur ces animaux, notamment la souris. Les modèles d'AVC chez le rongeur se sont ainsi montrés d'un grand intérêt pour la caractérisation des mécanismes de mort neuronale et de récupération cellulaire, mais il existe un grand nombre de caractéristiques distinguant l'Homme du rongeur, souvent sous-estimé (Herson and Traystman, 2014; Li and Zhang, 2021). Citons ici les principales.

- ✓ Les spécificités physio(patho)logiques :

Les rongeurs ne possèdent que très peu de substance blanche en comparaison à l'Homme, et leur substance grise ne présentent pas de gyri. Chez l'Homme, le pourcentage de substance blanche représente 60% du cerveau, pour environ 35% chez le chien, 20% chez le lapin, 15% chez le rat et ne dépasse pas les 10% chez la souris (Krafft *et al.,* 2012). Les études sur la neuroprotection se sont concentrées pendant longtemps quasi-exclusivement sur les répercussions de l'AVC sur la substance grise (Hoyte, Kaur and Buchan, 2004) alors que les lésions ischémiques de la substance blanche jouent un rôle important dans le pronostic post-AVC chez l'Homme (Ahmad *et al.*, 2015). Dans les modèles animaux, l'accent est encore très souvent mis sur la taille de l'infarctus afin d'étudier la réussite des traitements testés, tandis qu'en clinique la recanalisation/reperfusion et les déficits neurologiques sont plus étudiés.

- ✓ Les spécificités vasculaires et hémodynamiques :

Bien qu'un plan d'organisation vasculaire puisse être défini plus ou moins précisément pour les cerveaux des mammifères, il existe un large spectre de variations entre espèces et même entre souches concernant le nombre et le diamètre des collatérales de l'arborisation artérielle cérébrale. La capacité de remodelage après l'occlusion du vaisseau varie aussi beaucoup entre les espèces (Maeda *et al.*, 2000).

Le flux sanguin cérébral chez la souris est 2 à 3 fois plus élevé que chez l'Homme, tandis que le flux collatéral et terminal est limité chez les rongeurs, ce qui explique les ischémies sévères obtenues lors de l'utilisation des modèles d'occlusions proximaux (Maeda *et al.*, 2000).

Certains rongeurs présentent des anomalies importantes du polygone de Willis, comme les souris C57Bl /6J, très utilisées dans la recherche (McColl *et al.*, 2004). Autre exemple, les rats Sprague-Dawley, tellement utilisés avec le modèle de MCAo monofilament, présentent une ramification atypique de l'ACM dans près de 20% des cas (Fox *et al.*, 1993). Ceci explique, en partie, la grande variabilité des tailles d'infarctus, même au sein d'une même espèce ou d'une même souche après l'occlusion de la MCA.

- ✓ Les spécificités du système immunitaire :

Alors qu'au cours de la dernière décennie, la réaction inflammatoire post-AVC a suscité un vif intérêt, les différences énormes entre les rongeurs et l'Homme ont été mises en évidence.

Le pourcentage de neutrophiles chez les souris et les rats est d'environ 10 à 20%, contre 50 à 70% chez l'Homme, alors que la situation inverse s'observe pour les lymphocytes, qui représentent environ 50 à 100% chez les rongeurs contre 20 à 40% chez l'Homme (Haley, 2003). De plus, les sous-réseaux de chimiokines/cytokines dans les cellules cérébrales chez l'Homme et chez les rongeurs après un modèle d'ischémie *in vitro* diffèrent beaucoup (Du *et al.*, 2017) ; même constat pour la population microgliale (Smith and Dragunow, 2014). Ces quelques exemples ne permettent pas de prendre l'entière mesure de l'importance des différences dans les processus inflammatoires entre les espèces. Il convient, particulièrement dans ce cas, de toujours rester conscient de ce biais translationnel lorsque l'on étudie l'inflammation après l'AVC sur les modèles animaux (Sommer, 2017).

Pour conclure cette partie, ces spécificités couplées aux différences génétiques et épigénétiques entre chaque espèce expliquent les problèmes translationnels obligatoirement rencontrés avec l'expérimentation animale. Ces défauts de translationalité semblent irrémédiables, il est donc nécessaire de progresser sur les défauts « évitables » des modèles expérimentaux.

2. Les progrès et les axes d'améliorations des études précliniques

Malgré les défauts inhérents aux modèles animaux, la recherche préclinique sur les AVC progresse beaucoup depuis ces 15 dernières années et la plupart des avancées sont dues aux recherches menées par l'intermédiaire de ces modèles animaux. Car les chercheurs ont mis le doigt sur de nombreux soucis méthodologiques évitables dans des études précliniques du XXème et du début XIXème afin de déterminer des axes de progressions au début de notre millénaire :

- ✓ Les expérimentations précliniques doivent être randomisées et se faire en double-aveugle. Elles doivent se montrer reproductibles et la taille des échantillons et des animaux doit être planifiée en amont de l'expérimentation, à l'instar des critères d'exclusion.

- ✓ Les tests comportementaux adaptés doivent être utilisés pour étudier les atteintes neurologiques et la récupération fonctionnelle à court, moyen et long-terme.
- ✓ Les procédures d'administration des traitements doivent être translationnelles avec celles de la clinique en respectant la fenêtre d'administration caractérisée dans le modèle de MCAo choisi.
- ✓ Des études sur des espèces gyrencéphaliques doivent compléter les expérimentations sur les rongeurs.

Ces recommandations ont été élaborées par la communauté scientifique pour améliorer les études précliniques et comprennent les recommandations citées plus haut (Fisher *et al.*, 2009) ; ce sont les recommandations STAIR (Stroke Treatment Academic Industry Roundtable : STAIR guidelines) . De plus, et ceci concerne l'expérimentation animale dans sa globalité, un groupe de chercheurs (Kilkenny *et al.*, 2010) a posé un constat frappant sur le manque de qualité dans la publication des études précliniques (59% ne posent pas leur objectif principal, 87% ne reportent pas de randomisation et 86% ne mentionnent pas la pratique de l'aveugle). Ces chercheurs ont donc proposé une grille de publication : les recommandations ARRIVE (*Animals in Research : Reporting In vivo Experiments*).

Le développement d'un neuroprotecteur avait alors suivi scrupuleusement l'ensemble de ces recommandations : le NXY-059. Et malgré tous les efforts effectués pour respecter les critères STAIR et l'importance de la littérature expérimentale supportant un effet bénéfique de cette molécule, l'essai clinique n'a montré aucun bénéfice de la molécule (Shuaib *et al.*, 2007). C'est pourquoi de nouvelles propositions émergent depuis quelques années pour améliorer encore les modèles animaux dans la recherche sur l'AVC. Citons les directives IMPROVE (*Ischaemia Models : Procedural Refinements Of in Vivo Experiments*) qui ont été proposées en 2017 avec des critères de qualités toujours plus robustes dans la quête translationnelle (Percie du Sert *et al.*, 2017).

La recherche préclinique sur les AVC semble aller dans le bon sens. Mais la communauté scientifique est unanime sur l'existence des deux principaux biais retrouvés encore aujourd'hui dans la plupart des études sur les animaux.

- ✓ Le défaut majeur de tous les modèles de MCAo : l'influence de l'anesthésie générale (AG) sur les résultats biologiques.

L'anesthésie et l'analgésie sont essentielles pour assurer le bien-être animal dans les modèles expérimentaux d'AVC. Cependant, les effets des AG, notamment, sur la neurobiologie et la physiologie sont profonds et variables, responsables d'une autre différence fondamentale entre les modèles expérimentaux et la réalité des AVC chez l'Homme. Ces AG sont effectivement une source de biais puisqu'elles modifient, entre autres, le DSC, la PA, la ventilation pulmonaire, la thermorégulation, la circulation du LCR, le métabolisme du glucose, le CNV, etc...

Depuis quelques années, quelques laboratoires essayent de mettre en place des modèles vigiles de MCAo (Seto *et al.*, 2014; Xie, Kang and Nedergaard, 2016). C'est également le projet de plusieurs membres de notre laboratoire qui ont mis en place et caractérisé un modèle d'AVC thromboembolique robuste chez la souris vigile afin de permettre l'étude d'agents thérapeutiques en préclinique.

- ✓ La non prise en compte des comorbidités, de l'âge et du sexe dans la méthodologie :

L'utilisation de rongeurs mâles jeunes et en bonne santé (souvent sans variabilité génétique car issues d'une même lignée) dans la grande majorité des articles scientifiques sur l'AVC est un facteur de biais majeur. Par conséquent, au cours des dernières années, plusieurs tentatives ont été faites pour utiliser des modèles animaux présentant les comorbidités les plus fréquentes telles que le diabète sucré, l'hypertension, l'athérosclérose, l'hyperlipidémie, l'obésité ou l'infection. De plus, des animaux âgés et des animaux des deux sexes commencent à être utilisés dans notre laboratoire pour mimer la réalité avec plus de précision.

Des études expérimentales menées sur des animaux âgés ont montré que l'atteinte neurologique augmentait alors que la capacité de régénération diminuait par rapport aux animaux plus jeunes (Buga, Di Napoli and Popa-Wagner, 2013). Il existe de plus en plus de preuves cliniques que le lien entre l'âge et les diverses comorbidités citées ci-dessus aboutit à un profil inflammatoire élevé conduisant à un état de prédisposition aux AVC (Murray *et al.,* 2013 ; Sandu *et al.,* 2015). Le sexe est un autre facteur important affectant de manière significative l'incidence et les résultats de l'AVC (Herson and Hurn, 2010 ; Sommer, 2017).

Lors de la modélisation des facteurs de risque et des comorbidités de l'AVC, deux stratégies expérimentales principales peuvent être envisagées :

- ✓ L'approche la plus translationnelle serait de développer une cohorte d'animaux avec plusieurs facteurs de risques pouvant éventuellement entraîner un AVC spontané. Dans les faits cette méthode existe mais est largement limitée aux modèles animaux hypertendus (Nabika et al., 2012; Kudo, Zhao and Nowak, 2016). Bien qu'ils imitent de près le contexte pathologique humain, ces modèles demandent un investissement énorme en termes de temps et d'argent. A l'heure actuelle, la faisabilité d'un tel projet semble utopique.

- ✓ L'autre option consiste à induire un AVC ischémique chez les animaux avec des comorbidités préexistantes ou induites. Nous avons discuté des études précliniques prenant en considération le diabète en tant que comorbidité dans la partie I.H. Disons simplement ici que parmi les études pharmacologiques récentes utilisant des animaux hyperlipidémiques, diabétiques ou hypertendus, nombreuses sont celles qui montrent une efficacité moindre de certains traitements comparées à celle observées chez des animaux en bonne santé (Zechariah et al., 2013 ; Chen et al., 2011 ; O'Collins et al., 2013). Ces résultats soulignent le fait que les comorbidités devraient probablement être considérées dans les modèles animaux avant l'initiation des grandes études cliniques (Hermann and Chopp, 2012).

Le principal défi de l'induction d'un AVC ischémique couplé à une ou plusieurs comorbidité consiste à trouver l'équilibre entre la complexité élevée de nombreux paramètres en interaction, comme chez l'Homme, et des études gérables de manière pragmatique pour répondre à des problèmes scientifiques spécifiques, sans biais (Sommer, 2017).

Pour faire une brève synthèse de cette partie sur la pertinence des modèles animaux :

- ✓ Il est nécessaire de renforcer la communication entre cliniciens et scientifiques. L'effort d'intégration des connaissances scientifiques dans la pratique clinique et la prévention d'erreurs dans la conception des études précliniques ne peuvent être que profitables à la recherche et donc, par la suite, aux patients.

- ✓ La recherche sur les animaux doit être représentative et généralisable pour être applicable à une grande variété de contextes. De nombreuses études sur des animaux ne portent que sur une seule espèce (chez le rongeur généralement), alors qu'il est évident qu'un bénéfice apporté à une seule espèce ne le sera pas nécessairement pour d'autres.

OBJECTIFS

Comme décrit dans la première partie de ce manuscrit, les AVC ischémiques surviennent dans la majorité des cas chez des individus âgés atteints de comorbidités, et bien sûr chez la femme et l'homme. Or, la majorité des études réalisées aux stades précliniques pour tester de nouvelles molécules thérapeutiques utilise des animaux mâles, jeunes et en bonne santé ; induisant automatiquement des résultats discutables d'un point de vue translationnel. Ce défaut méthodologique est l'une des principales causes des nombreuses prédictions précliniques erronées concernant les effets potentiels des traitements novateurs chez l'Homme, puisque seul le rtPA a montré son efficacité dans les tests cliniques à l'heure actuelle.

Cependant, cet unique traitement autorisé pour traiter la phase aigüe des AVC ischémiques chez l'Homme, présente des risques de transformations hémorragiques. C'est une complication clinique majeure, exacerbée chez les patients présentant une ou plusieurs comorbidités, à l'instar du diabète.

Ainsi, le premier objectif de ces travaux de thèse est d'améliorer la valeur prédictive des modèles animaux en utilisant un modèle animal avec une comorbidité répandue. Nous avons choisi d'étudier l'effet du diabète de type I entraînant une hyperglycémie chronique dans un modèle murin d'AVC thromboembolique.

En continuité, le deuxième objectif est de valider un modèle de transformations hémorragiques spontanée à la suite de l'AVC ischémique en suivant notre méthodologie en testant l'efficacité mais également l'innocuité du traitement pharmacologique de référence : le rtPA.

Troisièmement et après validation, ce modèle a été utilisé pour tester deux stratégies innovantes, en combinaison ou non avec le traitement actuel de référence, le rtPA : la N-acétyl-cystéine (NAC), impliquée dans la dégradation de composants des caillots sanguins et le Glunomab, anticorps développé au sein du laboratoire PhIND, visant à bloquer l'interaction entre le tPA et les NMDAR, à l'origine des effets délétères induits par le tPA dans le cadre du traitement de l'AVC.

Tout cela dans le but d'obtenir un modèle pertinent qui permettra, nous l'espérons, d'établir des essais précliniques plus pertinents pour l'évaluation de candidats médicamenteux avec une application directe au sein de l'industrie pharmaceutique.

RÉSULTATS

BLOCKADE OF THE ENDOTHELIAL tPA-NMDA RECEPTORS SIGNALING PREVENTS INFLAMMATORY PROCESSES AND RISKS OF HEMORRHAGIC TRANSFORMATIONS TRIGGERED BY ISCHEMIC STROKE IN DIABETIC MICE

Florent Lebrun[1, 2], Damien Levard[1], Eloïse Lemarchand[1], Mervé Yetim[1], Jonathane Furon[1], Fanny Potzeha[1], Flavie Lesept[3], Manuel Blanc[3], Benoit Haelewyn[4], Marina Rubio[1], Carine Ali[1], Annelise Letourneur[2], Nicolas Violle[2], Cyrille Orset[1]*, Denis Vivien[1,5*$]

[1]Normandie University, UNICAEN, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP Cyceron, Institute Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), Caen, France;

[2]STROK@LLIANCE, ETAP-Lab, 2 rue des Rochambelles, 14000 Caen, France.

[3]Lys Therapeutics, HQ : Cyceron, Boulevard Henri Becquerel, 14000 CAEN, France ; main offices : 56 rue Saint-Jean-De-Dieu, 69007 LYON, France.

[4]GIP Cyceron, Boulevard Henri Becquerel, 14000 CAEN, France.

[5]Department of clinical research, Caen-Normandie University Hospital, CHU, Avenue de la côte de Nacre, Caen, France.

* Equal contribution

Clinical Perspective

What Is New?

• This study proposes a relevant model of thromboembolic stroke associated to a major risk factor for stroke, diabetes.

• In this model, the gold standard thrombolytic agent rtPA worsens inflammation and carries a high risk of hemorrhagic transformations.

• Both side effects of rtPA are prevented by an immunotherapy (Glunomab) blocking the endothelial tPA-NMDAR signaling.

What Are the Clinical Implications?

• Glunomab, a monoclonal antibody preventing the tPA-dependent NMDAR signaling appears as an innovative adjunct treatment to currently available thrombolytic agents (such as rtPA and its derivatives). Glunomab is under development with clinical purposes.

• Overcoming clot resistance to conventional thrombolytics is now possible by the combination of N-Acetylcysteine (NAC) targeting vWf (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04918719) and Glunomab, thus enlarging the proportion of patients safely and efficiently treated, irrespective of the etiology of their stroke.

Abstract

Background and aim: The only FDA-approved drug treatment of ischemic stroke relies on the intravenous injection of the recombinant tissue-type plasminogen activator (rtPA, Alteplase/Actilyse®) alone or combined with thrombectomy. However, despite its clinical utility, a larger use of rtPA is still debated, especially because of the risk of hemorrhagic transformations. This deleterious effects of tPA on the neurovascular unit have been attributed, at least in part, to its ability to influence endothelial N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) signaling, contributing to a lack of the integrity of the blood brain barrier and neuroinflammatory processes. We thus investigated here, the possibility that the deleterious effects of both recombinant and endogenous tPA, including hemorrhagic transformations and pro-inflammatory processes, could be prevented by blocking the endothelial tPA-dependent NMDAR signaling. We also tested the possibility to use the safer thrombolytic, N-Acetylcysteine (NAC), combined with Glunomab instead of rtPA.

Methods: To counteract the deleterious effect of tPA, we developed a novel strategy relying on a monoclonal antibody, Glunomab, targeting the tPA-dependent NMDAR signaling. We then evaluated its efficacy in a model of thromboembolic stroke in mice, combined with comorbidity (diabetes) either alone or combined with either rtPA or NAC causing thrombolysis. Magnetic Resonance Imaging (MRI), speckle contrast imaging, flow cytometry and behavioral tasks were used to evaluate stroke outcomes.

Results: In diabetic animals, rtPA-treatment was associated with lower recanalization rates and higher hemorrhagic transformations. After a single administration either in standalone or combined with rtPA-induced thrombolysis, Glunomab reduced brain lesion volumes along with hemorrhagic transformations, translating in improved neurological outcomes. Moreover, the therapeutic synergy of Glunomab with another thrombolytic strategy such as NAC was also demonstrated in diabetic animals.

Conclusions: Counteracting the tPA-dependent endothelial NMDAR signaling drastically limits ischemic damages induced by both endogenous and recombinant tPA, including hemorrhagic transformations and inflammatory processes following ischemic stroke associated with diabetes as a comorbidity.

Introduction

In acute ischemic stroke, prompt reestablishment of vessel patency is necessary to alleviate tissue injuries and patient deficits (Warburton et al., 2011; Katsanos et al., 2021; Roaldsen, Lindekleiv and Mathiesen, 2021). Current pharmacological strategies to promote rapid reperfusion of injured tissue rely on the use of recombinant tissue-type plasminogen activator (rtPA) or its mutant Tenecteplase (TNK), either alone or combined with endovascular thrombectomy (Orset et al., 2007, 2016; Sandset and Tsivgoulis, 2022). However, despite their clinical utility, the wider use and development of thrombolytics whether or not related to rtPA is still debated, especially because of the risk of hemorrhagic transformations (HT). Today, the percentage of patients with an ischemic stroke who are eligible to a pharmacological thrombolysis remains limited to less than 20% (Fang, Cutler and Rosen, 2010; Messé et al., 2016; Kaesmacher et al., 2019). Moreover, the rate of early arterial recanalization after rtPA administration remains low (less than 30%, depending on the clinical study), especially when occlusive thrombi are rich in platelets (L.L.Yeo and Sharma, 2013; Wang et al., 2015; Kaesmacher et al., 2018, 2019). The low eligibility and efficacy rate of thrombolytics coupled with their hemorrhagic complications constitute major limitations of these pharmacological approaches (Maïer, Desilles and Mazighi, 2020). There is therefore a clinical need for preventing the side effects of thrombolytics, to increase their use and efficiency in clinic to a larger percentage of patients.

Other thrombolytics are under development with preclinical data and ongoing clinical trials demonstrating their possible superiority over rtPA, in particular their safer profiles regarding the risk of HT. Among them, we previously demonstrated that N- Acetylcysteine (NAC) contained in HIDONAC® reduce the size of von-Willebrand factor (vWf) multimers that cross-link platelets inside arterial thrombi, thus promoting thrombus dissolution and arterial recanalization, without risk of bleeding (Martinez de Lizarrondo et al., 2017).

tPA is characterized by its ability to activate plasminogen into plasmin and thus to promote vascular fibrinolysis (Collen and Lijnen, 1991; Docagne et al., 2015; Powers et al., 2018). Beyond its vascular fibrinolytic activity, tPA is also known to influence neuronal survival and death in pathological conditions (Parcq et al., 2012; Chevilley et al., 2015; Lesept et al., 2016) to modulate the integrity of the blood brain barrier (BBB) and inflammatory processes (Fredriksson, Lawrence and Medcalf, 2016; Macrez et al., 2016; Drieu et al., 2018; Mehra et al., 2020). All these functions of tPA have been attributed to modulations of either neuronal or endothelial N-Methyl-D-Aspartate receptors (NMDARs) signaling (O Nicole et al., 2001; Kvajo et al., 2004; Chevilley et al., 2015; Samson et al., 2015; Lesept et al., 2016). In order to specifically target this interaction without affecting any other function of tPA, we have designed and produced a monoclonal antibody, Glunomab, that has been shown to block the tPA-dependent NMDAR interaction both on neurons and on endothelial cells (Lesept et al., 2016; Macrez et al., 2016; Louet et al., 2022).

Furthermore, inflammatory and immune dysregulations play key roles in stroke outcomes. It is well admitted that developing an inflammatory response after an ischemic stroke is related to higher National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) on hospital admission, worse Glasgow Coma Scale (GCS), and worse subsequent stroke outcome and higher mortality (Lopatkiewicz *et al.*, 2020; Rezaeitalab *et al.*, 2020; Iglesias-Rey *et al.*, 2022). Moreover, recent data support a possible impact of these mechanisms in hemorrhagic strokes (Sturgeon *et al.*, 2008; Saand *et al.*, 2019; Tschoe *et al.*, 2020). Interestingly, there is growing evidence suggesting that both endogenous and exogenous tPA may contribute to the inflammatory processes following stroke (Boehme *et al.*, 2013; Chu, Chen and Lin, 2020; Shi *et al.*, 2021). For instance, tPA-NMDAR mechanisms at the endothelial cells may contribute to the infiltration of peripheral immune cells to the brain parenchyma (Zhang *et al.*, 2018; Seillier *et al.*, 2021; Shi *et al.*, 2021).

It is also well admitted that bad outcomes following stroke are directly correlated with comorbidities such as diabetes mellitus, high blood pressure or smoking (Herson and Traystman, 2014; O'Donnell et al., 2016; Nelson et al., 2017). For example, a metanalysis from seven independent studies revealed that patients with diabetes display worse cognitive and functional outcomes at 3 to 6 months after stroke (Lo et al., 2020). Accordingly, diabetes or chronic hyperglycaemia are associated with an increased risk of haemorrhagic development in people treated with thrombolysis for ischemic stroke (Jiang, Han, et al., 2021). Furthermore, diabetes increases of 1.5 fold the risk to have a stroke (Ergul et al., 2012).

Thus, we investigated here, in a model of thromboembolic stroke in mice combined with chronic hyperglycemia as a comorbidity, the possible deleterious effects of rtPA, including HT and pro-inflammatory processes that could be prevented by blocking the endothelial tPA-NMDARs dependent signaling. We also tested the possibility to use the safer thrombolytic, NAC, instead of rtPA.

Materials and Methods

Animals. All procedures were performed in compliance with the ethical rules of the European Directive of 22 September 2010 concerning animal experimentation (2010/63/EU). The protocol was submitted for ethic approval to the Ministry of Higher Education and Research to obtain a project authorization for using animals for scientific purposes. The experiments have been reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Animal Research: Reporting in Vivo Experiments) and received the agreement number #21620.

All experiments were performed on male Swiss mice (6 weeks at receipt, ± 30g, Janvier Lab, Le Genest-Sainte-Isle). Throughout the experiments, animals were maintained in standard husbandry conditions (temperature: 22 ± 2°C; hygrometry: 50 ± 20%) under light-dark cycle (light from 8:00 to 20:00) with ad libitum access to water and food (except on the days of blood glucose levels assessments for which animals fasted for 5 hours). Animals were housed at 5 per cage in the presence of enrichment. Mice were randomized before tests. Trained experimenters performed both the study and analyzes blindly.

Thromboembolic stroke. To induce proximal occlusion of the middle cerebral artery (MCA) we used the in situ thromboembolic stroke model consisting in the injection of thrombin directly into the MCA as described before (Orset et al., 2007). Briefly, under aseptic conditions, animals were anesthetized with isoflurane 5% and maintained with 2% isoflurane in a 70%/30% mixture of NO_2/O_2. Buprenorphine (analgesic) was injected subcutaneously (0.5 mg/kg) and local anesthesia was performed by instillation of lidocaine (spray 10%) in both ears. Rectal temperature was controlled and maintained at 37±0.5 °C throughout the surgical procedure using a heating pad. Mice were placed in a stereotaxic frame, the skin between the right eye and ear was incised, the MCA was exposed through a small craniotomy (performed above MCA bifurcation) and the dura was excised. A pulled glass micropipette was introduced into the lumen of the MCA and 1µl (1 UI/µl) of purified murine alpha-thrombin (Stago, Belgium) was injected to induce MCA occlusion (MCAo) by the in-situ formation of a fibrin-rich clot. The pipette was removed 10 minutes after, when the clot had stabilized (Anfray et al., 2021).

Hyperglycemia. To obtain insulin deficiency, hyperglycemia, polydipsia and polyuria, which are characteristic of human type 1 diabetes mellitus, we used repeated low doses of streptozotocin (STZ, Tocris) suspended in HBSS (pH 6.7 – 7.8) in mice (40 mg/kg, i.p., on 5 consecutive days ; Deeds et al., 2011; Furman, 2015). Control animals were treated with HBSS. These multiple, low-dose STZ injections induce partial damages to pancreatic islets, triggering an inflammatory process that causes a progressive loss of β-cell activity, ultimately leading to insulin deficiency and hyperglycemia.

Drugs and treatments. After stroke induction, a catheter was inserted into the tail vein to allow the intravenous administration of 200 µL of treatments or their vehicle 20 minutes or 4 hours after the injection of thrombin. rtPA (Actilyse®, Boehringer Ingelheim) at 10 mg/kg was infused at 10% bolus and 90% perfusion for 40 minutes. For NAC injection, mice received 400 mg/kg of NAC (Sigma-Aldrich) in phosphate buffered saline. In addition, 300 µg of Glunomab were administered as a slow intravenous bolus before infusion of rtPA or its vehicle. Administration of NAC was performed as a slow intravenous bolus through the tail vein catheter before the other treatments.

Speckle contrast imaging. After removing the pipette, 10 minutes before treatments and up to 40 minutes after the start of treatments, we used laser Doppler speckle to assess the superficial cerebral blood flow (CBF). Images were acquired using a Laser Speckle Contrast Imager (moorFLPI-2, Moor Instruments; Sample interval: 1 Hz, exposure time: 60s, FOV = 14.6 mm x 11.3 mm, images resolution = 752x580, 1 frame per second). Images were then analyzed using the moorFLPIReviewV40 software (moorFLPI-2, Moor Instruments). The average of images obtained during acquisitions allowed to obtain pseudo-colored representative maps of the CBF, highlighting CBF changes on the ipsilateral hemisphere compared to the contralateral hemisphere depending on the area of interest. The average CBF signals of these areas were then extracted, and the percentages of decrease of CBFs were calculated based on the contralateral signal during the acquisition times. Color intensities go from blue (low CBF) to red (high CBF).

Magnetic Resonance Imaging. Lesion volumes, angiographic score of MCA (angioscore) and HT were quantified with a Pharmascan 7-Tesla/12 cm Magnetic Resonance Imaging (7T-MRI, Bruker) 24 hours after stroke onset. Mice were deeply anesthetized with 5% isoflurane and maintained with 1.5-2% isoflurane 30%O2/70%N2O during the acquisitions. T2-weighted images were used to analyze lesion sizes and acquired using a multi-slice multi-echo sequence: TE/TR 33 ms/2500 ms. T2*-weighted sequences were used to control if animals underwent hemorrhagic events. 3-dimensional time-of-flight angiographies (TE/TR, 12 ms/7 ms) were acquired for the analyses of angioscore. Lesion sizes were quantified on these images using ImageJ software. We used a hemorrhagic score with 3 items to assess hemorrhagic events at 24 hours after stroke onset (No hemorrhage, Petechial hemorrhage (and hemorrhage on the area of the surgery), and parenchymal hemorrhage. The angioscore is inspired by the TICI grade flow scoring (Fugate, Klunder and Kallmes, 2013). No recanalization of MCA = complete occlusion; partial recanalization = incomplete filling of the distal bed; complete recanalization = complete filling of the distal bed.

Flow cytometry. 5 days after stroke onset, and after transcardiac perfusion with ice-cold PBS, brains were roughly minced and homogenized with a potter tissue grinder in Hanks' balanced salt solution (HBSS) containing 15 mM HEPES buffer and 0.54% glucose. Whole brain homogenate was separated by 37% Percoll gradient centrifugation at 800g for 30 min at 4 °C (with no brake). The pellet containing leukocytes at the bottom of the tube was then collected and washed once with PBS containing 2% FCS before staining. Fc receptors were blocked with CD16/32 (553142, BD Biosciences) for 10 min at 4 °C before incubation with the primary antibodies. Cells were stained with antibodies directed against CD11b (M1/70, BioLegend), CD45 (30-F11, BD Biosciences), Ly6G (1A8, BD Biosciences), CD3e (145-2C11, BD Biosciences), CD4 (RM4-5, BD Biosciences), CD8a (53-6.7, BD Biosciences) and CD206 (C068C2, BioLegend) for 45 min at 4 °C. After washing, samples were analyzed by a FACSVerse flow cytometer (BD Biosciences). Appropriate isotype control antibodies were used to establish sorting parameters. Data were analyzed with the FlowJo 7.6.5 software (TreeStar Inc.).

Functional recovery assessment by modified grip strength test. The grip strength test (BIOSEB) assesses the neuromuscular function in mice by determining the strength displayed by the animal relative to the forepaw-grasping reflex (Lebrun et al., 2022). Grip strength test is a reference tasks to evaluate the functional deficits related to injuries restricted to the somatosensory cortex, as induced by our present stroke model (Anfray et al., 2021). This test is of particular interest because: 1) each animal is its own control before and after stroke allowing for longitudinal evaluation, 2) comparison between right (i.e. heathy) and left (i.e. disabled) paws allows to avoid misleading effects of surgery or procedure on general strength and 3) mice have no possibility of compensation and/or habituation to the task. Mice, held by the tail, were dropped on a T-shaped-bar and gently removed by the experimenter. In this context of unilateral (right) ischemic lesion due to stroke, the individual strength of each forepaw was assessed with a wrench connected to the device, while a fake wrench (unconnected to the electronic device) was placed on the other side. In addition, we measured the strength of both forepaws to assess the general health state of animals. A total of 4 trials per side and 4 trials with both paws were performed per mouse, with a 1-min rest between each assay. Then, mean strength was calculated for each and both paws. Measurements were picked up the day before MCAo surgery (baseline acquisition) and following MCA occlusion surgery on day 1, day 3 and day 7. Data were assessed in grams and converted in % of baseline for both paws measurements in order to normalize each mouse with its own baseline value (=100%). Moreover, a paw strength ratio was calculated for each animal (left/right paw strength ; Anfray et al., 2021; Lebrun et al., 2022).

Statistical analyses. Differences were considered significant at a probability level of $p < 5\%$. In the figures, results are expressed as means ± SEM. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 9.0 software. Because all data concerning lesion size passed normality

tests, we used 1-way Anova to compare all the groups followed by a Post-hoc test. We used the same methodology for analyzing Laser Doppler Speckle and cytometry, and when data did not meet normality assumptions, we used the non-parametric Kruskall-Wallis test to compare groups followed by a Post-hoc test. Grip-test, body weight and glycemia data were compared across groups and time by 2-ways repeated ANOVA, followed by multiple comparison test. When there were some missing values (for weight and glycemia during time because of exclusions, Supp. 1A Fig1-3) we used a mixed effect analysis and a Holm-Šídák's multiple comparisons test. The Log-rank (Mantel-Cox) test was used to compare survival curves generated with the Kaplan-Meier method.

Results

tPA loses its beneficial effect and increases the risk of HT in hyperglycemic mice

We have previously developed and phenotyped a thromboembolic ischemic stroke model in mice, but never in conjunction with a major comorbidity of stroke. Here we thus associated chronic hyperglycemia as a diabetes-like comorbidity. We expected to recapitulate in this model the more severe brain damages as well as rtPA-induced HT observed in the clinical situation (Broderick *et al.*, 1995; Won *et al.*, 2011). STZ induced hyperglycemia was confirmed in an independent cohort with blood glucose levels reaching 347.5 +/-42.7 mg/dl 14 days after the first day of STZ treatment (compared to 157.3 +/-7.2 mg/dl for the control groups, $p<0.05$, Supp. 1A). This increase in blood glucose levels was accompanied by a loss of weight in animals treated with STZ (33.2 g in the STZ group, 38.8 in Vehicle group, 14 days after the end of STZ treatment, $p<0.0001$, Supp. 1A- Fig. A). 27 days after STZ treatments, there was no longer statistical difference between the two groups in terms of body weight (35.7 g in the STZ group, 37.9 in the Vehicle group). The significant hyperglycemia (controlled in all our experimental groups as well as body weight; Supp. 1A-2-3A-5A-6A) is maintained until day 14, on which stroke was induced (Supp. 1A - Fig. E) and for all the following time period on which stroke outcomes were measured. We then measured lesion volumes, recanalization, reperfusion rates and HT using *in vivo* magnetic resonance imaging and Doppler speckle flowmetry, at D1 after stroke onset (Fig. 1A). A modified Grip-test task was also used to evaluate functional outcomes. No mortality was observed whatever the group of animals (Suppl. Fig. 1E). Like in humans, hyperglycemic animals (STZ) displayed bigger ischemic lesion volumes (23.38 mm^3 in the Ctrl group versus 36.00 mm^3 in the STZ group, n=12-13, $p=0.0017$, Fig. 1B-C). Early intravenous administration of rtPA (10 mg/kg, 20 minutes after MCAo) diminished the lesion size by 44.9% in the non-hyperglycemic animals, while it had no effect in the hyperglycemic ones (23.38mm^3 in Ctrl vs 12.88mm^3 in Ctrl-tPA, $p<0.01$ and 36mm^3 in STZ group vs 39.58 mm^3 in STZ-tPA, $p=0.7$, n=13). Regarding recanalization and subsequent reperfusion rates, hyperglycemic animals displayed a similar rtPA-mediated reperfusion of the injured tissues at 40 minutes post-treatment than non-hyperglycemic animals (+15.91% in Ctrl-tPA versus +14.06 in STZ-tPA, n=12-13, $p=0.87$, suppl.2A – Fig C). However, data obtained 24 hours after MCAo using angioscore (Fig. 1D) revealed that non-hyperglycemic animals responded to rtPA treatment in

terms of recanalization, whereas hyperglycemic animals recover lower red but not as well (37% of complete recanalization in Ctrl groups vs 83% of complete recanalization in Ctrl-tPA group, and 17% of complete recanalization in STZ groups vs 53% in STZ-tPA groups, n= 12-13). In parallel, hyperglycemic animals displayed a high level of HT assessed by using T2* MRI (Fig. 1E). This phenomenon was not observed in non-hyperglycemic animals (38% with signs of HT - 15% of parenchymal HT in Ctrl-tPA, n=13 vs 67% with signs of HT - 25% of parenchymal HT in STZ-tPA group, n=12). A parallel behavior task, the grip test, was performed on days 1, 3 and 7 post-stroke onset (Fig. 1F-G). On day 1 (D1), the ratio of the strength of left/right paws was significatively improved in the Ctrl-tPA group (0.90, n=12) compared to the STZ-tPA group (0.79, n=12). On D3, the ratio was still different from the baseline in STZ and STZ-tPA groups while Ctrl and Ctrl-tPA groups showed a better recovery (Fig. 1F). Concerning the strength of both paws compared to baseline, tPA allowed better outcome in non-hyperglycemic mice on D1 and D7 but not in hyperglycemic mice. For this parameter, we also observed a better improvement in non-hyperglycemic mice compared to hyperglycemic mice (on D1: 88.09% in Ctrl-tPA, n= 12 versus 74.74% in STZ-tPA group, n=12; on D3: 91.07% in Ctrl-tPA versus 82.87% in STZ-tPA group; on D7: 95.42% in Ctrl-tPA versus 87.63% in STZ-tPA group, Fig. 1G). This first set of data demonstrate the robustness of our thromboembolic stroke model in mice, combined with chronic hyperglycemia. As in the clinical setting, chronic hyperglycemia leads to worse outcomes compared to normoglycemia, including larger lesion volumes, partial lack of response to rtPA-induced recanalization at 24 hours, a higher rate of HT and poorer functional outcomes.

Figure 1

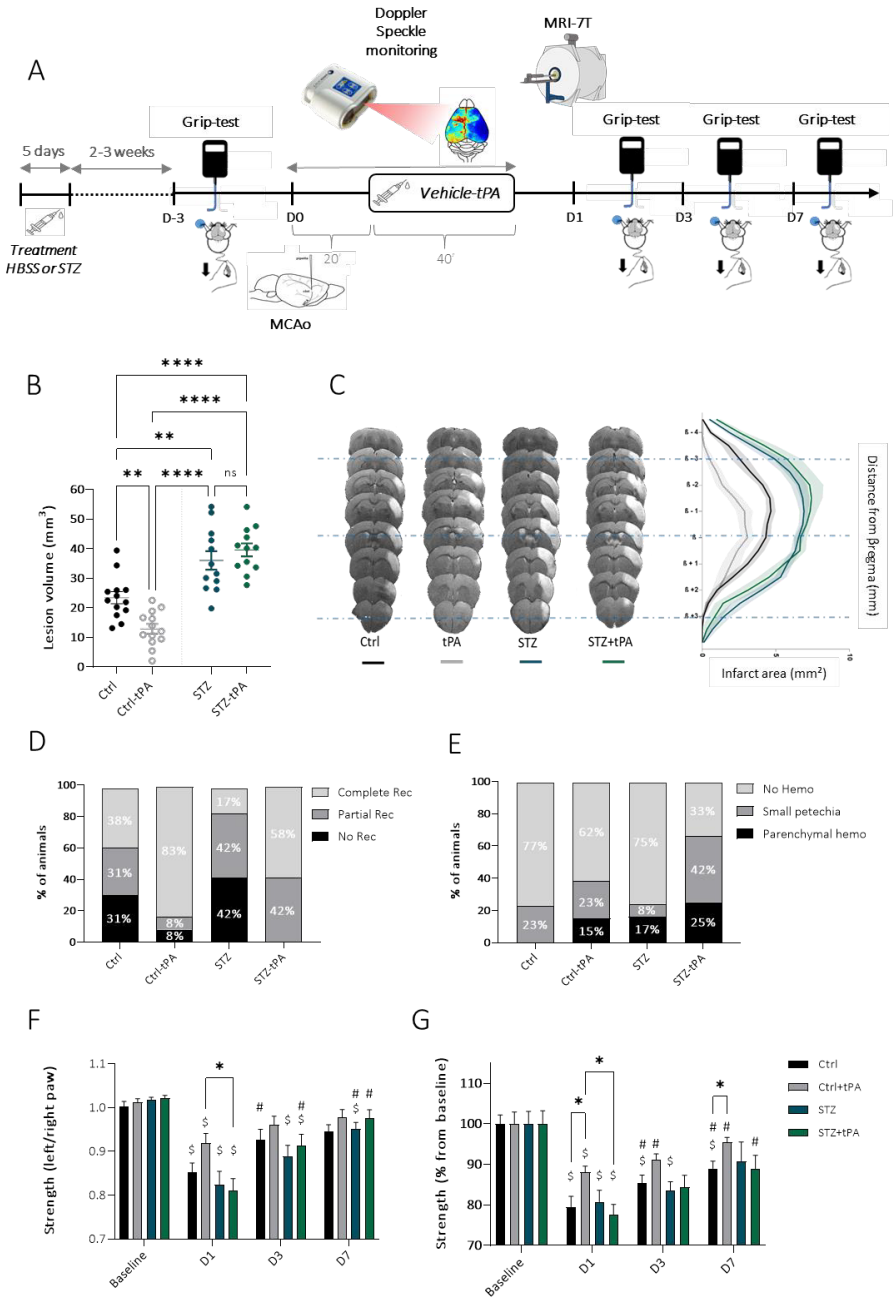


Figure 1 : Chronic hyperglycemia induces rtPA resistance and increases HT in a mouse model of thromboembolic stroke. A) Schematic representation of the experimental protocol. B) Quantification of ischemic lesion volume 24 hours after MCAo assessed by T2-weighted imaging (7T MRI) in saline or rtPA treated (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes) on non-hyperglycemic mice (Ctrl) or on hyperglycemic mice (STZ). Individual values, means and SEM are plotted. 23.38mm^3 for Ctrl group (n=13); 12.88mm^3 for Ctrl-tPA group (n=13); 36mm^3 for STZ group (n=12); 39.58mm^3 for STZ-tPA group (n=12). Ordinary one-way ANOVA (p<0,001); Tukey multiple comparisons (** p<0.01; **** p<0.001). C) Representative T2-weighted 7T MRI brain images (left)

and representation of the lesion distribution around bregma (right) 24 hours after MCAo in Ctrl, Ctrl-tPA, STZ and STZ-tPA groups. D) Percentage of angiographic scores 24 hours after MCAo assessed by FLASH_TOF_2D imaging (7T MRI) in Ctrl (n=13), Ctrl-tPA (n=13), STZ (n=12) and STZ-tPA (n=12) groups. No recanalization = complete occlusion (black); partial recanalization = incomplete filling of the distal bed (dark grey); complete recanalization = complete filling of the distal bed (light grey). E) Percentage of HT 24 hours after MCAO assessed by T2*-weighted imaging (deoxyhemoglobin; 7T MRI) in Ctrl (n=13), Ctrl-tPA (n=13), STZ (n=12) and STZ-tPA (n=12) groups. F) Quantification of the specific left paw strength deficit measured by grip-test ratio (strength of left/right paws) of Ctrl, Ctrl-tPA, STZ and STZ-tPA groups (n=12) before MCAo and on d1, D3 and D7 after MCAo. Data were assessed in grams. Results are represented in mean ± SEM. 2-way ANOVA: Time x Group effect =0,0211; Tukey test for multiple comparison (*<0.05 between groups; $<0,5 vs baseline: impact of Stroke; #<0,5 vs D1: recuperation). G) Quantification of the global strength deficit measured by grip-test of forepaws of Ctrl, Ctrl-tPA, STZ and STZ-tPA groups (n=12) before and on D1, D3 and D7 after MCAo. Data were assessed in grams and converted in % normalized for each animal with the corresponding baseline value (before MCAo). Results are represented in mean ± SEM. 2-way ANOVA: Time factor<0.0001 and group factor<0.001; Tukey test for multiple comparison (*<0.05 between groups; $<0,5 vs baseline: impact of Stroke; #<0,5 vs D1: recuperation)

It is well known in clinic that rtPA-induced thrombolysis is beneficial in a limited therapeutic window (4.5 hours when used alone and 6 to 12 hours when combined with thrombectomy), because its efficiency decreases quickly while side effects such as HT increase (Peña *et al.*, 2017). We previously reported a similar therapeutic window for rtPA treatment in the present thromboembolic stroke model (90 minutes after stroke onset maximum, ideally 20 minutes Orset *et al.*, 2016). We thus tested rtPA at two times after stroke onset, within the therapeutic window (i.e. 20 minutes) and outside of this therapeutic window (i.e. 4 hours), to evaluate if the rate of HTs was also increased with the time-to-treatment in hyperglycemic mice. Our data (Fig. 2) confirmed our previous data (Fig. 1), with both early rtPA and late rtPA-treatments leading to higher level of HT in hyperglycemic animals, with no brain protection, despite efficient recanalization rates compared to the STZ control group (80% of parenchymal and petechial hemorrhages for early and late rtPA treated animals, n=5 compared to 30% in non-treated animals, n=10). Altogether, this data show that chronic hyperglycemia leads to resistance to rtPA-treatment and to a higher risk of HT, which is not aggravated when thrombolysis is delayed.

Figure 2

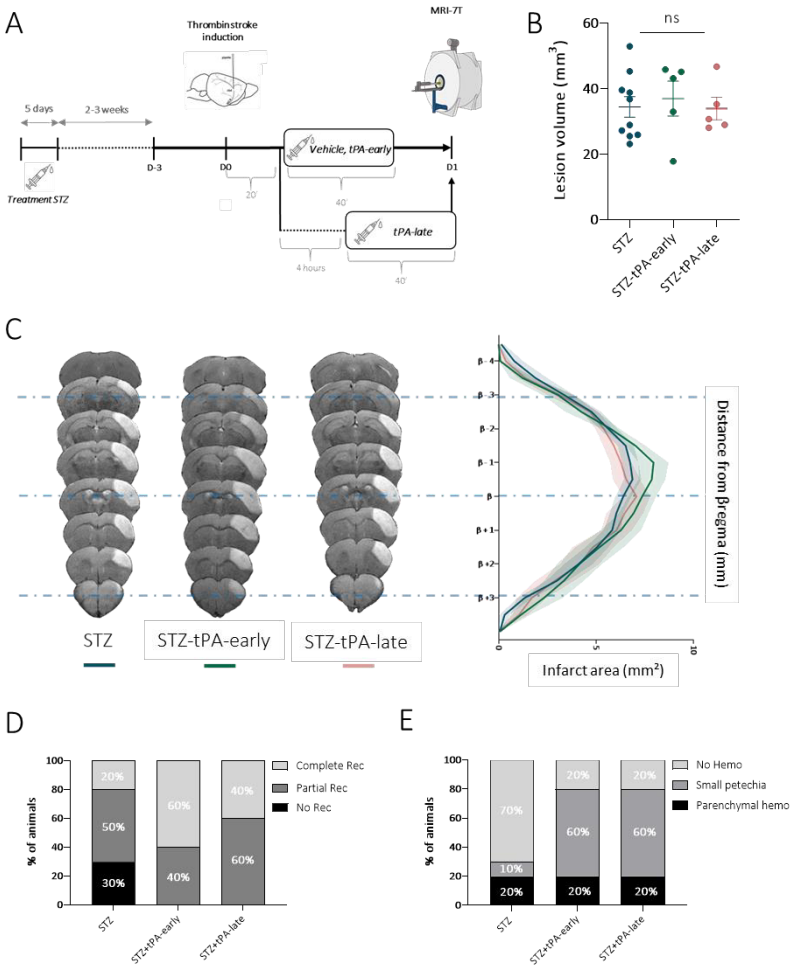


Figure 2 : Chronic hyperglycemia induces rtPA resistance and increases HT independently of the therapeutic window. A) Schematic representation of the experimental protocol. B) Quantification of ischemic lesion volume 24 hours after MCAo assessed by T2-weighted imaging (7T MRI) in hyperglycemic mice treated with saline (STZ group) or rtPA (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes), in early 20 minutes after MCAo (STZ-tPA-early) or in late 4 hours after MCAo (STZ-tPA-late). Individual values, means and SEM are plotted. 34.45mm^3 for STZ group (n=10); 37.01mm^3 for STZ-tPA-early group (n=5); 33.98mm^3 for STZ-tPA-late group (n=5). Ordinary one-way ANOVA (p=0.1442). C) Representative T2-weighted 7T MRI brain images (left) and representation of the lesion distribution around bregma (right) 24 hours after MCAo in STZ, STZ-tPA-early and STZ-tPA-late groups. D) Percentage of angiographic scores 24 hours after MCAO assessed by FLASH_TOF_2D imaging (7T MRI) in STZ (n=10), STZ-tPA-early (n=5), and STZ-tPA-late (n=5) groups. No recanalization = complete occlusion (black); partial recanalization = incomplete filling of the distal bed (dark grey); complete recanalization = complete filling of the distal bed (light grey). E) Percentage of HT 24 hours after MCAO assessed by T2*-weighted imaging (deoxyhemoglobin; 7T MRI) in STZ (n=10), STZ-tPA-early (n=5) and STZ-tPA-late (n=5) groups.

N-Acetylcysteine induces recanalization after acute thrombosis in hyperglycemic/diabetic animals without risk of HT

We previously demonstrated that intravenous NAC administration, by targeting vWf, promotes lysis of arterial thrombi that are resistant to the gold standard treatment rtPA (Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017) Thus, we decided to investigate whether NAC treatment could also improve ischemic lesion size, recanalization and tissue reperfusion, risk of HT and neurological outcomes in hyperglycemic mice after stroke. To these aims, we injected 400 mg/kg of NAC, 20 minutes after occlusive thrombus formation in STZ-pretreated mice (Fig. 3A). As expected, rtPA and NAC either alone or combined, increased the angiographic score measured by 7T-MRI (STZ=14% of complete recanalization; STZ-tPA=77%; STZ-NAC=64%; STZ-NAC-tPA=79%, Fig. 3D). More interestingly, NAC significantly reduced ischemic lesion sizes in hyperglycemic mice (-33% in STZ-NAC group versus STZ group, $p<0.05$, n=14, Fig. 3B-C) while rtPA alone had no effect as reported above (40.20mm^3 in STZ groups vs 40.43mm^3 in STZ-tPA group, $p>0.99$, n=14). Moreover, rtPA did not reduce nor enhance NAC beneficial effects when co-administered (26.92mm^3 in STZ-NAC group vs 21.59mm^3 in STZ-NAC-tPA group, p=0.58, n=14). Interestingly, NAC-induced beneficial effects were not associated with an increase of HT (21% of parenchymal hemorrhage in STZ and STZ-NAC groups, n=14), in contrast to the effect of rtPA either alone or combined with NAC (43% in STZ-tPA group and 36% in STZ-NAC-tPA group, n=14, Fig. 3E). Accordingly, NAC-treatment led to better functional outcomes when compared to rtPA alone. Regarding the functional recovery test, on D1 STZ-NAC group was significantly less impacted by stroke than the untreated group (0.84 in STZ group vs 0.91 in STZ-NAC group, n=14, $p<0.01$, Fig. 3F). On D3 the functional recuperation was better in groups treated with NAC concerning the left/right ratio and both paws (0.86 in STZ group vs 0.94 in STZ-NAC and STZ-NAC-tPA groups, n=14, $p<0.05$, Fig.4F ; 84.33 in STZ group vs 94.24 in STZ-NAC group and 93.46 in STZ-NAC-tPA group, n=14, $p<0.05$, Fig.4G). On D7, for both parameters, only animals treated with the combination of NAC and rtPA presented a better recovery compared to D1 (Fig. 3F-G). These data suggest that targeting vWf with NAC could be a relevant thrombolytic strategy for stroke patients, especially in the presence of a comorbidity such as chronic hyperglycemia to reduce the risk of HT.

Figure 3

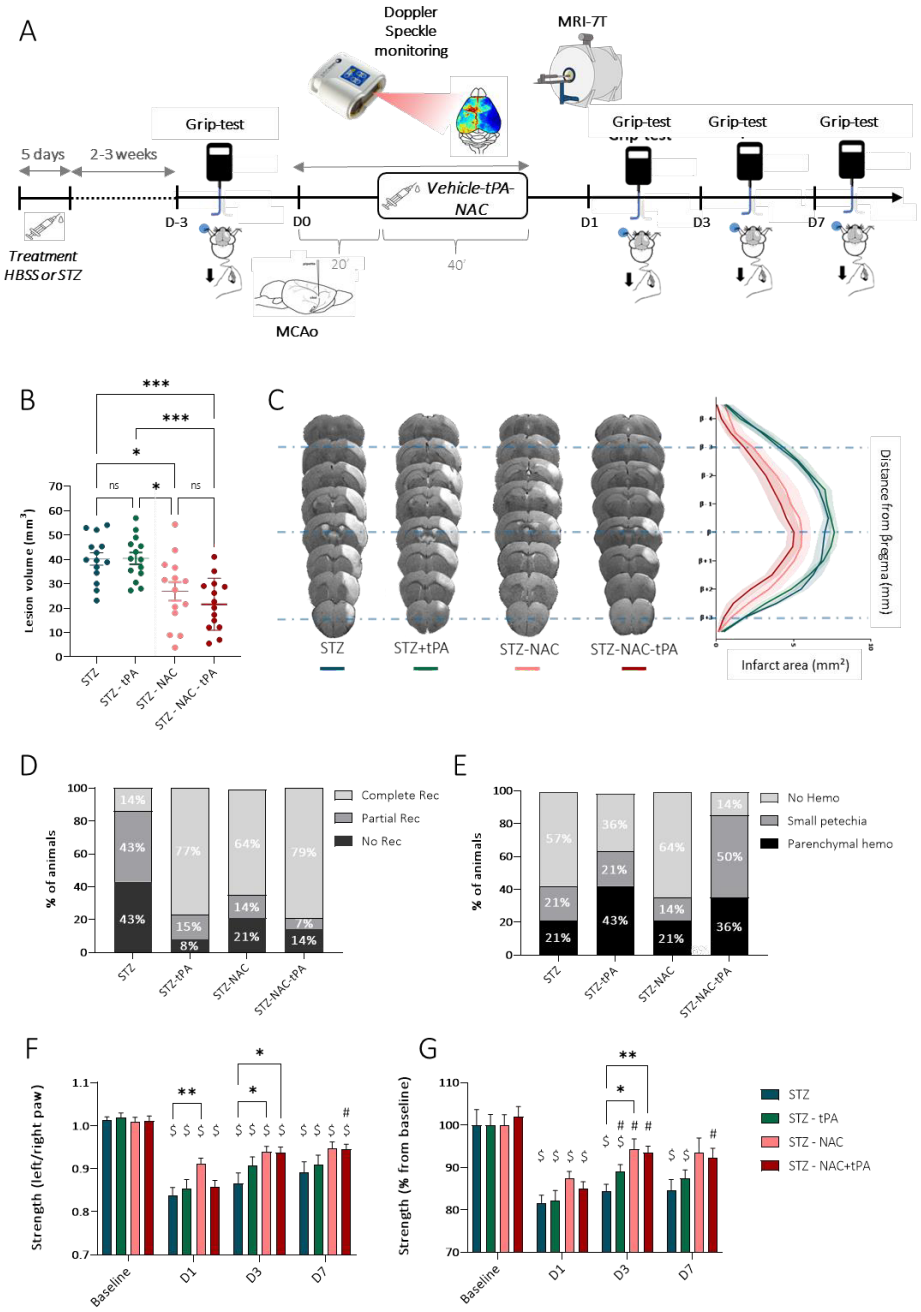


Figure 3 : N-Acetyl-Cysteine Induces Recanalization after Acute Thrombosis in chronically hyperglycemic animals without risk of HT. A) Schematic representation of the experimental protocol. B) Quantification of ischemic lesion volume 24 hours after MCAo assessed by T2-weighted imaging (7T MRI) in hyperglycemic mice treated after stroke with saline (STZ) or rtPA (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes; STZ-tPA group), NAC (400 mg/kg, slow bolus during 60 seconds; STZ-NAC group) or a combination of NAC and tPA (STZ-NAC-tPA group). 40.20mm^3 for STZ group (n=14); 40.43mm^3 for STZ-tPA group (n=14); 26.92mm^3 for STZ-NAC group (n=14); 21.59mm^3 for STZ-NAC-tPA group (n=14). C) Representative T2-weighted 7T MRI brain images (left) and

representation of the lesion distribution around bregma (right) 24 hours after MCAo in STZ, STZ-tPA, STZ-NAC and STZ-NAC-tPA groups. D) Percentage of angiographic scores 24 hours after MCAO assessed by FLASH_TOF_2D imaging (7T MRI) in STZ, STZ-tPA, STZ-NAC and STZ-NAC-tPA groups (n=14/group). No recanalization = complete occlusion (black); partial recanalization = incomplete filling of the distal bed (dark grey); complete recanalization = complete filling of the distal bed (light grey). E) Percentage of HT 24 hours after MCAO assessed by T2*-weighted imaging (deoxyhemoglobin; 7T MRI) in STZ, STZ-tPA, STZ-NAC and STZ-NAC-tPA groups (n=14/group). F) Quantification of the specific left paw strength deficit measured by grip-test ratio (strength of left/right paws) on day before and on D1, D3 and D7 after MCAo in STZ, STZ-tPA, STZ-NAC and STZ-NAC-tPA groups (n=14/group). Data were assessed in grams. Results are represented in mean ± SEM. 2-way ANOVA: Time factor<0.0001 and group factor<0.001; Tukey test for multiple comparison (*<0.05 between groups; $<0,5 *vs* baseline: impact of Stroke; #<0,5 *vs* D1 : recuperation). G) Quantification of the global strength deficit measured by grip-test of forepaws before and on D1, D3 and D7 after MCAo in STZ, STZ-tPA, STZ-NAC and STZ-NAC-tPA groups (n=14/group). Data were assessed in grams and converted in % normalized for each animal with the corresponding baseline value (before MCAo). Results are represented in mean ± SEM. 2-way ANOVA: Time factor<0.0001 and group factor<0.001; Tukey test for multiple comparison (*<0.05 between groups; $<0,5 *vs* baseline: impact of Stroke; #<0,5 *vs* D1 : recuperation).

Targeting endothelial tPA-dependent NMDAR signaling increases the benefit of rtPA-mediated thrombolysis

Some of the deleterious effects of exogenous rtPA and endogenous tPA following stroke are mediated by their abilities to promote the activity of neuronal and/or endothelial NMDA (Lesept *et al.*, 2016; Macrez *et al.*, 2016; Mehra *et al.*, 2020). To prevent these side effects of rtPA/tPA, we generated a monoclonal antibody, named Glunomab, which blocks the interaction of tPA with the amino-terminal domain of the GluN1 subunit of NMDAR and subsequent signaling (Lesept *et al.*, 2016). We thus investigated whether Glunomab alone or combined with rtPA may counteract the deleterious effects of tPA following ischemic stroke. We first tested Glunomab and/or rtPA in non-hyperglycemic animals (Fig. 4). As expected, early intravenous administration of rtPA diminished the lesion size by 44% compared to non-treated animals (n= 12, p<0.05, Fig. 4B). Glunomab alone led to a brain protection (-52%, n= 12, p<0.01), also observed in the presence of rtPA (-49%, n= 12, p<0.01). rtPA treatment promoted superficial tissue reperfusion (57%, n= 12, p<0.05 compared to Control, Supp. 4, Fig. C) and recanalization at 24 hours (76% of partial and complete recanalization, n= 12, Fig. 4C), either alone or combined with Glunomab (48%, n=12, p=0.07 compared to control for tissue reperfusion (Supp. 4, Fig. C) and 93% of partial and complete recanalization at 24 hours, n=12 for (Fig. 4C). Interestingly, Glunomab alone improved recanalization at 24 hours (91% of partial and complete recanalization at 24 hours, n= 12, Fig. 4C). Also, Glunomab-induced beneficial effects were associated with no HT (0% of parenchymal hemorrhage for Glunomab alone when compared to the 14% of parenchymal hemorrhages of rtPA alone).

Figure 4

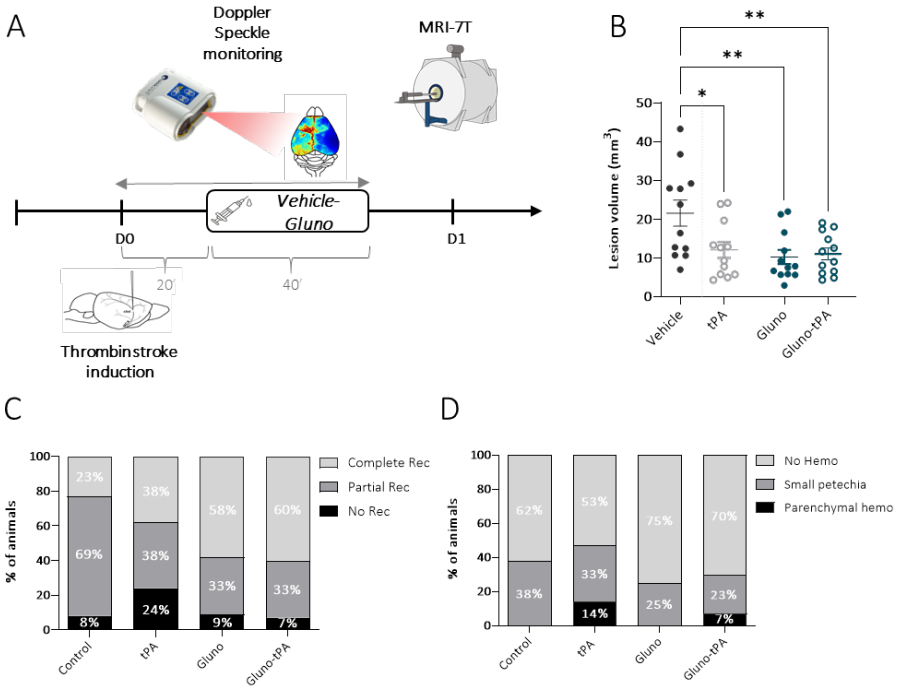


Figure 4 : Targeting endothelial tPA-dependent NMDAR signaling with Glunomab increases the benefit of rtPA-mediated thrombolysis on non-hyperglycemic mice. A) Schematic representation of the experimental protocol. B) Quantification of ischemic lesion volume 24 hours after MCAo assessed by T2-weighted imaging (7T MRI) in mice treated with saline (Vehicle group), rtPA (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes; tPA group), Glunomab (300µg, 100% bolus; Gluno group) or a combination of Glunomab-tPA (Gluno-tPA group). Individual values, means and SEM are plotted. 21.57mm^3 for Vehicle group (n=12); 12.07mm^3 for tPA group (n=12); 10.26mm^3 for Gluno group (n=12); 11.04mm^3 for Gluno-tPA group (n=12). Ordinary one-way ANOVA (p=0.0035); Tukey multiple comparisons (* p<0.05; ** p<0.01). C) Percentage of angiographic scores 24 hours after MCAO assessed by FLASH_TOF_2D imaging (7T MRI) in Vehicle, tPA, Gluno and Gluno-tPA groups (n=12/groups). No recanalization = complete occlusion (black); partial recanalization = incomplete filling of the distal bed (dark grey); complete recanalization = complete filling of the distal bed (light grey). D) Percentage of HT 24 hours after MCAO assessed by T2*-weighted imaging (deoxyhemoglobin; 7T MRI) in Vehicle, tPA, Gluno and Gluno-tPA groups (n=12/groups).

In hyperglycemic animals (Fig. 5), as reported above, intravenous administration of rtPA failed to reduce the lesion size (-4% compared to STZ group, n=15-16, p=0.99, Fig. 5B-C). However, co-treatment with Glunomab and rtPA led to a dramatic reduction of the lesion volumes (-46% in STZ-Gluno-tPA group compared to STZ group, n=15-16, p<0.01 and -43% compared to rtPA alone n=15-16, p<0.01, Fig. 5B). Interestingly, Glunomab alone also led to a brain protection (-31% n=15-16, p<0.05 when compared only to the control group, Fig. 5C). rtPA-mediated reperfusion/recanalization (+10% for time-real tissue reperfusion compared to -1% for STZ group, n=15-16, p<0.05 (Supp. 5C); and 57% of complete recanalization at 24 hours in STZ-tPA group, n=15-16, Fig. 5D), were associated with a higher rate of HT (27% of parenchymal

hemorrhage in STZ-tPA group n=15, Fig. 5E). Interestingly, the association of Glunomab with rtPA improved these outcomes (67% of complete recanalization at 24 hours, n=16, Fig. 5E, +9% for time-real tissue reperfusion compared to control group, n=16, $p<0.05$, Supp. 5B, and 6% of parenchymal hemorrhage n=16 compared to STZ group = 18% of parenchymal hemorrhage, n=16, Fig. 5E). This led to improved functional outcomes (Fig. 5F-G). For the strength of both paws on day 7, STZ-Gluno-tPA group improved better than STZ and STZ-tPA group (on D7: 97% from the baseline in STZ-Gluno-tPA, compared to 88% from the baseline in STZ group and 88% in STZ-tPA group n=15-16, $p<0.05$). Concerning the ratio of left/right paw strength, on D7, Glunomab alone or combined with rtPA allowed the animals to recover better than STZ and STZ-tPA groups with ratios significantly different from the values on D1 (on D7: STZ=0.92, STZ-tPA=0.91, STZ-Gluno=0.96, STZ-Gluno-tPA=0.96, n=15-16, $p<0.05$, Fig. 5F-G). These data suggest that side effects of recombinant and endogenous tPA are in part mediated by the endothelial tPA-NMDARs signaling.

Figure 5

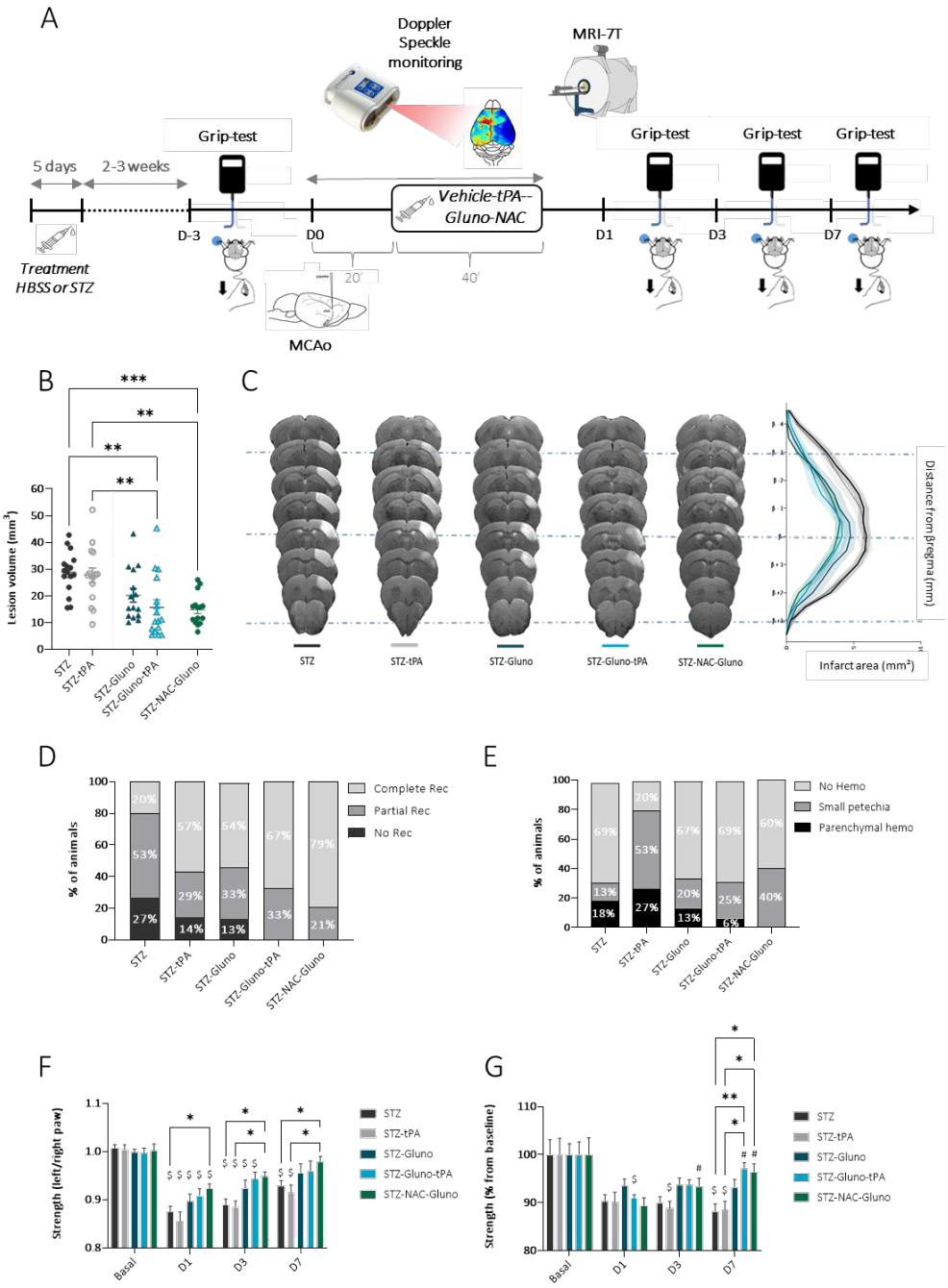


Figure 5 : Glunomab coupled with a thrombolytic agent improves stroke outcome and protects against HT in chronically hyperglycemic animals A) Schematic representation of the experimental protocol. B) Quantification of ischemic lesion volume 24 hours after MCAo assessed by T2-weighted imaging (7T MRI) in mice treated with saline (STZ group), rtPA (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes; STZ-tPA group), Glunomab (300µg, 100% bolus; STZ-Gluno group), a combination of Glunomab and rtPA (STZ-Gluno-tPA group) and a combination of Glunomab and NAC (400mg/kg, slow bolus) on hyperglycemic mice. Individual values, means and SEM are plotted. 28.80mm^3 for STZ group (n=16); 27.66mm^3 for STZ-tPA group (n=15); 20.14mm^3 for STZ-Gluno group (n=15); 15.64mm^3 for STZ-Gluno-tPA group (n=16) and 14.88mm^3 for STZ-NAC-Gluno group (n=15).

Ordinary one-way ANOVA (p<0,001); Tukey multiple comparisons (** p<0.01; *** p<0.001). C) Representative T2-weighted 7T MRI brain images (left) and representation of the lesion distribution around bregma (right) 24 hours after MCAo in STZ, STZ-tPA, STZ-Gluno, STZ-Gluno-tPA and STZ-NAC-Gluno groups. D) Percentage of angiographic scores 24 hours after MCAO assessed by FLASH_TOF_2D imaging (7T MRI) in STZ (n=16), STZ-tPA (n=15), STZ-Gluno (n=15), STZ-Gluno-tPA (n=16) and STZ-Gluno-NAC (n=15) groups. No recanalization = complete occlusion (black); partial recanalization = incomplete filling of the distal bed (dark grey); complete recanalization = complete filling of the distal bed (light grey). E) Percentage of HT 24 hours after MCAO assessed by T2*-weighted imaging (deoxyhemoglobin; 7T MRI) in STZ (n=16), STZ-tPA (n=15), STZ-Gluno (n=15), STZ-Gluno-tPA (n=16) and STZ-Gluno-NAC (n=15) groups. F) Quantification of the specific left paw strength deficit measured by grip-test ratio (strength of left/right paws) of STZ (n=16), STZ-tPA (n=15), STZ-Gluno (n=15), STZ-Gluno-tPA (n=16) and STZ-Gluno-NAC (n=15) groups one day before and on D1, D3 and D7 after MCAo. Data were assessed in grams. Results are represented in mean ± SEM. 2-way ANOVA: Time effect<0.0001 and Group effect<0.01; Tukey test for multiple comparison (*<0.05 between groups; $<0,5 *vs* baseline: impact of Stroke; #<0,5 *vs* D1 : recuperation). G) Quantification of the global strength deficit measured by grip-test of forepaws of STZ (n=16), STZ-tPA (n=15), STZ-Gluno (n=15), STZ-Gluno-tPA (n=16) and STZ-Gluno-NAC (n=15) groups one day before and on D1, D3 and D7 after MCAo. Data were assessed in grams and converted in % normalized for each animal with the corresponding baseline value (before MCAo). Results are represented in mean ± SEM. 2-way ANOVA: Time factor<0.0001; Tukey test for multiple comparison (*<0.05 between groups; $<0,5 *vs* baseline: impact of Stroke; #<0,5 *vs* D1 : recuperation)

Combination of the thrombolytic NAC with Glunomab as a new hope for treatment of ischemic stroke

We also tested Glunomab in combination with NAC in our model of thromboembolic stroke in hyperglycemic animals (Fig. 5). Early intravenous administration of NAC and Glunomab diminished the lesion size by 48% compared to non-treated STZ animals (n= 15-16, p< 0.005, Fig. 5B) or rtPA treated STZ-animals (-46.2%, n= 15-16, p<0.01, Fig 5B). Accordingly, NAC combined with Glunomab promoted 24 hours-recanalization (79% of complete recanalization, n= 16, Fig. 5D). These beneficial effects were accompanied by the absence of HT (0% of parenchymal hemorrhage, Fig. 5E), also in agreement with the improved functional outcomes (Fig. 5F-G). For the ratio of strength (Fig. 5F), on day 1, 3 and 7 NAC combined with Glunomab provided significantly better outcomes than STZ and STZ-tPA groups (on D1: STZ-NAC-Gluno=0.92, STZ=0.87, STZ-tPA=0.85, p<0.05; on D3: STZ-NAC-Gluno=0.95, STZ=0.89, STZ-tPA=0.89, p<0.05; on D7: STZ-NAC-Gluno=0.98, STZ=0.93, STZ-tPA=0.91, n=15-16, p<0.05). Concerning the strength of both paws, on D7 we observed a better middle-term recuperation of STZ-NAC-Gluno compared to STZ and STZ-tPA (on D7: STZ-NAC-Gluno=96, STZ=88, STZ-tPA=88, n=15-16, p<0.05, Fig. 5G).

Targeting endothelial tPA-dependent NMDARs signaling reduces infiltration of circulating inflammatory cells in the ischemic brain

Previous data have shown that Glunomab, by inhibiting the tPA-dependent endothelial NMDAR interaction, was able to reduce immune cell migration across the BBB both *in vitro* and *in vivo*

(Lesept *et al.*, 2016; Mehra *et al.*, 2020). We thus hypothesized that Glunomab could also mediate therapeutic effects later in the course of stroke by reducing immune cells infiltration (Drieu, Buendia, Levard, Hélie, Brodin, Vivien and Rubio, 2020). Flow cytometry analyses were performed from brain tissues of non-hyperglycemic mice and hyperglycemic mice subjected to thromboembolic stroke, either treated with or without rtPA and Glunomab, at 5 days after stroke onset (n=5-6, Fig. 6). It is important to note that animals used for the present analysis (5 days post-stroke onset) displayed the same outcomes than observed in the precedent figures measured at 24 hours post-stroke in term of lesion volumes, angiographic scores HT and real-time reperfusion tissue (n=5-6, Supp. 6). We analyzed $CD11b^{+}/CD45^{low}$ microglial cells; $CD11b^{+}/CD45^{high}$ activated microglial cells or infiltrated macrophages; $CD11^{+}/CD45^{+}/Ly6G^{+}$ neutrophils; $CD3^{+}$ T cells; $CD8^{+}$ T cells and $CD4^{+}$ T cells (Fig. 6). As expected, ischemia led to an increased inflammatory status for almost all the types of cells analyzed (Fig. 6). Hyperglycemia also increased infiltration of CD8 positive T-cells and neutrophils in the ipsilateral hemisphere (+97.5% of CD8+ T cells, $p<0.01$ and +98.9% of neutrophils, $p=0.4783$ for the non rtPA-treated animals and +76.1% of CD8+ T cells, $p=0.0528$ and +198.3% of neutrophils, $p<0.05$ for the rtPA-treated animals). Five days after stroke onset, the levels of neutrophils and CD8+ T cells were increased in the ipsilateral hemisphere of hyperglycemic mice, especially after tPA treatment (Fig. 6). The administration of Glunomab led to a reduction of the infiltration of both cell types, especially when associated with tPA (-8.4% of neutrophils, $p=0.99$ and -22.1% of CD8+ T cells, $p=0.55$ for the Glunomab-treated hyperglycemic mice compared to vehicle-treated hyperglycemic mice; -50.8% of neutrophils, $p=0.49$ and -47.8% of CD8+ T cells, $p<0.05$ for Glunomab- and rtPA-treated hyperglycemic mice compared to the vehicle-treated hyperglycemic mice and -67.2% of neutrophils, $p<0.05$ and -41.4% of CD8 positive T cells, $p=0.0854$ for the hyperglycemic Glunomab- and rtPA-treated mice compared to the hyperglycemic rtPA-treated mice). These data reveal that the beneficial effects of Glunomab on the different outcomes following stroke are associated with reduced invasion of the brain tissue by circulating inflammatory cells.

Figure 6

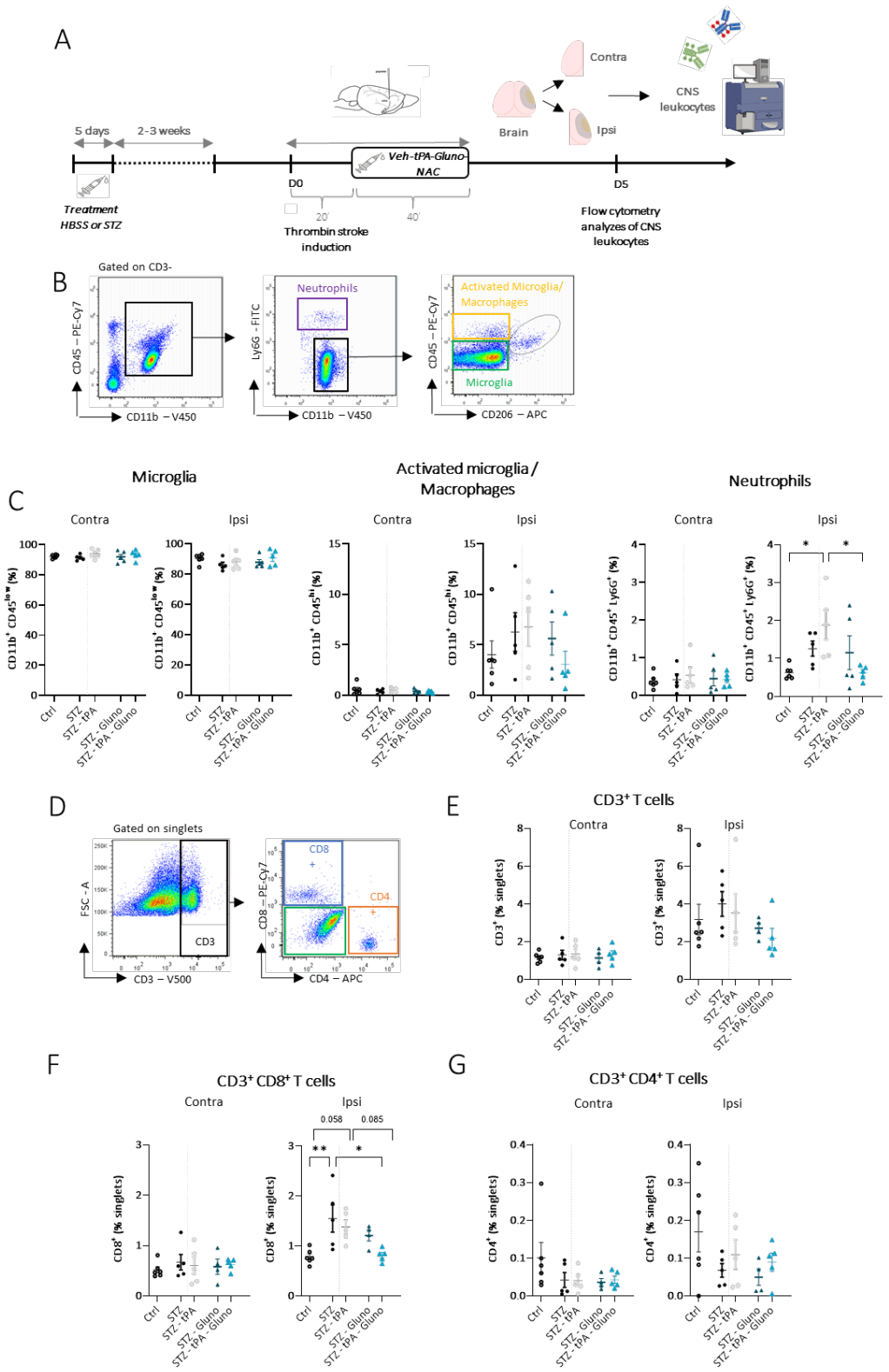

A
5 days
2-3 weeks
Treatment
HBSS or STZ
D0
Veh-tPA-Gluno-NAC
20'
40'
Thrombin stroke induction
Brain
Contra
Ipsi
CNS leukocytes
D5
Flow cytometry analyzes of CNS leukocytes
B
Gated on CD3-
CD45 – PE-Cy7
CD11b – V450
Ly6G - FITC
Neutrophils
Activated Microglia/ Macrophages
Microglia
CD206 – APC
C
Microglia
Activated microglia / Macrophages
Neutrophils
Contra
Ipsi
Ctrl
STZ
STZ - tPA
STZ - Gluno
STZ - tPA - Gluno
D
Gated on singlets
FSC - A
CD3 – V500
CD8 – PE-Cy7
CD4 – APC
E
CD3⁺ T cells
F
CD3⁺ CD8⁺ T cells
G
CD3⁺ CD4⁺ T cells

Figure 6 : Targeting endothelial tPA-dependent NMDAR signaling with Glunomab reduces invasion of the ischemic brain tissues by circulating inflammatory cells. A) Schematic representation of the experimental protocol. B) Representative flow cytometry dot-plots and gating strategy used for quantification of $CD11b^+$ $CD45^{low}$ microglia, $CD11b^+$ $CD45^{hi}$ active microglia and $CD11b^+$ $CD45^+$ $Ly6G^+$ neutrophils 5 days after stroke in ipsilateral and contralateral mice brain. C) Flow cytometry quantification of microglia, active microglia and neutrophils 5 days after stroke in mice brain in Ctrl group (n=6), STZ group (n=5), in STZ-tPA group (n=5), in STZ-Gluno group (n=5) and in STZ-Gluno-tPA group (n=5); * $p<0.05$; Ordinary one-way ANOVA; Tukey multiple comparisons. D) Representative flow cytometry dot-plots and gating strategy used for quantification of $CD3^+$ T cells, $CD3^+CD8^+$ cytotoxic T cells and $CD3^+CD4^+$ regulatory/helper T cells 5 days after stroke in mice brain. E) Flow cytometry quantification of $CD3^+$ T cells 5 days after stroke in mice brain in Ctrl group (n=6), STZ group (n=5), in STZ-tPA group (n=5), in STZ-Gluno group (n=5) and in STZ-Gluno-tPA group (n=5); * $p<0.05$; Ordinary one-way ANOVA; Tukey multiple comparisons. F) Flow cytometry quantification of $CD3^+CD8^+$ cytotoxic T cells 5 days after stroke in mice brain in Ctrl group (n=6), STZ group (n=5), in STZ-tPA group (n=5), in STZ-Gluno group (n=5) and in STZ-Gluno-tPA group (n=5); * $p<0.05$; Ordinary one-way ANOVA; Tukey multiple comparisons. G) Flow cytometry quantification of $CD3^+CD4^+$ regulatory/helper T cells 5 days after stroke in mice brain in Ctrl group (n=6), STZ group (n=5), in STZ-tPA group (n=5), in STZ-Gluno group (n=5) and in STZ-Gluno-tPA group (n=5); * $p<0.05$; Ordinary one-way ANOVA; Tukey multiple comparisons.

Altogether, our data reveal for the first time in a thromboembolic experimental stroke model responsive to rtPA treatment, that hyperglycemia leads to a failure of rtPA treatment, promotes rtPA-associated risk of HT and increased inflammatory status. These side effects are mediated by the endothelial tPA-NMDARs signaling. We thus demonstrate here the clinical relevance of Glunomab, a monoclonal antibody generated to block the interaction of both recombinant and endogenous tPA with endothelial NMDARs (Lesept et al., 2016; Macrez et al., 2016; Mehra et al., 2020), either combined with the gold standard thrombolytic rtPA or with NAC, a new thrombolytic approach currently under evaluation (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04918719).

Discussion

In the present study, we observe that the most feared complications of rtPA-treatment following ischemic stroke, inflammation and HT, depend on tPA interaction with endothelial NMDARs. We also provide support to adjunct/alternative candidates, which should render thrombolysis safer and more efficient, for a wider proportion of patients, including those at risk like diabetic patients.

To demonstrate this, we used a preclinical model of thromboembolic stroke in mice, in which chronic hyperglycemia led to a resistance to the gold standard rtPA treatment, and increased both brain inflammation and HT. Chronic hyperglycemia was induced by multiple injections of low doses of STZ. Due to its high toxicity for pancreatic beta cells, STZ raises blood glucose levels between 250 and 600 mg/dl in mice, which could be considered as moderate to severe hyperglycemia in humans (Deeds *et al.*, 2011; King, 2012; Furman, 2015).

To block the tPA-dependent endothelial NMDAR signaling, we used Glunomab, a monoclonal antibody able to compete the binding site of tPA to the GluN1 subunit of NMDAR (Lesept *et al.*, 2016; Macrez *et al.*, 2016). Glunomab, through its humanized form, is currently in development for a future clinical application in ischemic stroke patients. As thrombolytics, we used either the clinically gold standard rtPA (Actilyse) or NAC previously demonstrated to promote lysis of rtPA-resistant clots by targeting the vWf contained in platelet-rich clots (Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017). A clinical trial is ongoing (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04918719) to demonstrate the safety and efficacy of NAC in stroke patients in combination with the gold standard treatments, thrombolysis mediated by rtPA with or without endovascular thrombectomy.

The dose of human rtPA used in this study was 10 mg/kg, with an intravenous injection as in the clinic, i.e. 10 % in bolus and 90% in infusion (40 minutes). We used the dose of 10 mg/kg instead of 0.9 mg/kg in human, since human tPA displays a ten-fold less affinity for murine plasminogen *versus* human plasminogen (Orset *et al.*, 2007, 2016). At a dose of 160 µg per mice, Glunomab is known to block the tPA-dependent activation of endothelial NMDAR and thus inflammatory processes in an *in vivo* model of multiple sclerosis (Macrez *et al.*, 2016). Regarding the efficacy of Glunomab after stroke, we have determined, in a preliminary experiment, that the most effective dose in normoglycemic mice in the same thromboembolic model was 300ug. NAC was injected at the dose of 400 mg/kg as a slow bolus, as we did in our previous preclinical stroke study (Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017). This corresponds to a dose which is only slightly higher (but more rapidly injected) than the dose used to treat acetaminophen poisoning in human (300 mg/kg). All drugs were used 20 minutes after stroke onset within a previously estimated therapeutic window of 90 minutes for the preclinical model used here (Orset *et al.*, 2007; Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017). All these treatments were administered in agreement with their potential clinical use, supporting the translational relevance of our present findings.

When performed in animals with no comorbidities, the thromboembolic stroke model induced by thrombin leads to a fibrin rich clot sensitive to rtPA treatment with no HT (Orset *et al.*, 2007, 2016; Anfray *et al.*, 2021; van Moorsel *et al.*, 2022), when thrombolysis is performed early (20 minutes after stroke onset) or late (4 hours after stroke onset ; Orset *et al.*, 2016; Drieu, Buendia, Levard, Hélie, Brodin, Vivien and Rubio, 2020), even some studies reported HT after late thrombolysis (García-Yébenes *et al.*, 2011; García-Culebras *et al.*, 2017).

Interestingly, we also used a thromboembolic stroke model initiated by the formation of a platelet-rich clot (application of $FeCl_3$ on the endothelium of the M2 segment of MCA ; Karatas *et al.*, 2011; Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017) a model which is resistant to rtPA, but sensitive to thrombolytics capable of prevent platelet aggregates (Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017). This model is relevant, as new drugs for rtPA-resistant stroke etiologies are needed. Promising results have been reported, including an antibody targeting the platelet receptor Gp1B-alpha (Wu *et al.*, 2002; De Meyer *et al.*, 2011; Schuhmann *et al.*, 2017), N-acetylcysteine targeting vWf (Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017; Uemura *et al.*, 2018; Sabetghadam *et al.*, 2020) or a new fibrinolytic, Microlyse, made by the combination of an antibody targeting fibrin and urokinase (de Maat *et al.*, 2022).

Here, we show that chronic hyperglycemia, a common co-morbidity in the population of stroke patients (up to 50% of patients ; Lindsberg and Roine, 2004a; McCormick *et al.*, 2008) converts rtPA-sensitive clots to partially rtPA-resistant ones, thus worsening stroke outcomes. This preclinical model displays also a higher rate of HT following rtPA treatment. The risk of HT following ischemic stroke in human is one of the most important (if not the most important) limitation to treat more patients and it narrows the therapeutic window (Messé *et al.*, 2016; Peña *et al.*, 2017; Kaesmacher *et al.*, 2018; Maïer, Desilles and Mazighi, 2020). Thus, our study provides a preclinical tool to better understand the mechanisms leading to HT and to screen more accurately the safety profile of new thrombolytics candidates before clinical transfer.

In this context, we demonstrate that Glunomab may be a good candidate to counteract the deleterious effect of rtPA, including the risk of HT, which may be related to reduced inflammatory processes. We also show that NAC, a potent thrombolytic targeting vWf in clots, is capable to lyse clots resistants to rtPA, without improving HT. It is interesting to note that Glunomab either alone (thereby targeting the endogenous tPA) or combined with either exogenous rtPA or NAC, also reduces ischemic lesion volumes and infiltration of inflammatory cells into the injured brain tissue, thus improving functional recovery.

The clinical relevance of our results is also supported by the fact that NAC was reported to improve outcomes in patients with acute myocardial infarction treated with streptokinase and nitroglycerine, an effect associated with a trend toward faster coronary reperfusion in NAC-treated patients (–39% ; Arstall *et al.*, 1995; Sochman, 2002; Marenco and Frye, 2019). Similarly, the NACIAM trial (N-Acetylcysteine in Acute Myocardial Infarction) demonstrated that the use of NAC in patients with ST-segment–elevation myocardial infarction led to an accelerated tissue

reperfusion, a more rapid chest pain resolution, and a reduction of 33% of the myocardial infarct size in comparison with placebo-treated controls (Pasupathy *et al.*, 2017).

The brain contains different subsets of resident cells, which could contribute to inflammation following ischemic stroke when they are activated including microglia and border-associated macrophages (BAMs ; Pedragosa *et al.*, 2018; Drieu, Buendia, Levard, Hélie, Brodin, Vivien and Rubio, 2020a; Rajan *et al.*, 2020). Other cells can contribute to the inflammatory processes following ischemic stroke, especially circulating immune cells as circulating macrophages, neutrophils and T cells (Chen *et al.*, 2021; Kumari and Sinha, 2021; Wanrooy, Wen and Wong, 2021), which can cross the injured BBB and then reach the brain parenchyma (Drieu, Buendia, Levard, Hélie, Brodin, Vivien and Rubio, 2020; Qiu *et al.*, 2021; Candelario-Jalil, Dijkhuizen and Magnus, 2022). Briefly, although CD8 positive T cells are mainly considered to be toxic, the CD8 negative (CD4 positive) T cells are mainly protective (including the T regulatory and T helper lymphocytes ; Zhang *et al.*, 2021). The roles of macrophages and neutrophils are still debated with functions that would differ depending on time after stroke onset (Chiba and Umegaki, 2013; Jian *et al.*, 2019; Han, Liu and Gao, 2020). Based on a previous study (Drieu, Lanquetin, Levard, Glavan, Campos, Quenault, Lemarchand, *et al.*, 2020), we have investigated the presence of these different cell types on different treatment conditions, 5 days after stroke onset. As expected, stroke increases the inflammatory status of the injured brain parenchyma, a phenomenon worsened by chronic hyperglycemia and rtPA exposure. As demonstrated previously in a preclinical model of multiple sclerosis (Louet *et al.*, 2022), Glunomab reduce the infiltration of CD8 positive T cells and neutrophils. Even there is a evidences of an impact of systemic inflammatory and immune responses in hemorrhagic strokes (Saand *et al.*, 2019; Spronk *et al.*, 2021), it is difficult in our study to determine which phenomenon occur first between alteration of the integrity of the BBB (HT measured here one day post-stroke onset) and infiltration of inflammatory cells (measured 5 days post-stroke onset) to explain the protective effect of Glunomab. Nevertheless, we can hypothesize that the two phenomena contribute to the deficits observed post-stroke. These data are in agreement with the well-accepted concept that targeting the immune system dysregulation may be a good strategy to promote brain recovery post-stroke. In fact, Glunomab is not directly targeting the inflammatory cells, but rather is closing-down the ”entry door” these cells use to cross the BBB (Macrez et al., 2016; Mehra et al., 2020), thus probably lowering the risk of secondary deleterious effects (Drieu, Buendia, Levard, Hélie, Brodin, Vivien and Rubio, 2020a). Targeting tPA-dependent endothelial NMDARs is thus an interesting strategy which needs to be further investigated, in a dedicated clinical trial.

tPA was first characterized as a fibrinolytic based on its ability to activate circulating plasminogen into plasmin (*Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke | NEJM*, 1995). Our present study confirms this function of tPA, unfortunately not optimal in conditions of chronic hyperglycemia. The functions of tPA are not limited to this pro-fibrinolytic activity, the drug is now considered as a cytokine-like molecule and a neuromodulator (Hu et al., 2006; Lenoir et al., 2019). About the mechanisms which could explain these new functions of tPA,

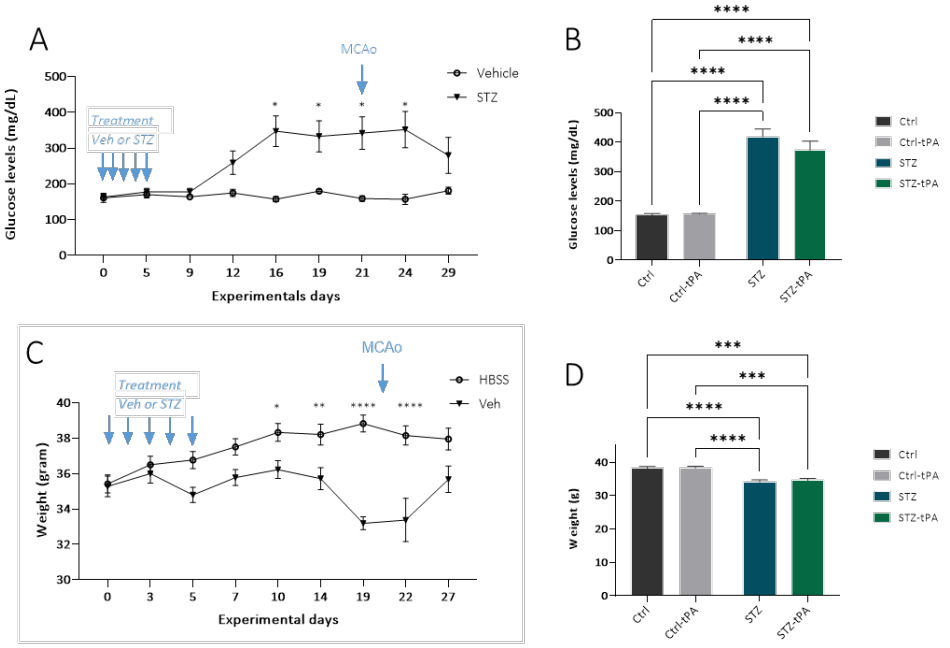
one is related to its ability to modulate NMDAR signaling both in neurons and endothelial cells (Lesept et al., 2016; Macrez et al., 2016; Mehra et al., 2020; Louet et al., 2022). Our present data reveal that the tPA-dependent NMDAR signaling directly contributes to both infiltration of inflammatory cells across the BBB and HT. These processes directly involve endothelial cells, since s Glunomab administered intravenously is reaching, by this mean, its main target, the NMDARs present on vascular endothelial cells. We can then postulate that the off-target functions of tPA after ischemic stroke mainly depend on NMDAR present at the luminal side of endothelial cells.

Although our methodology and our results seem to correspond to clinical observations, this study has some limitations. First, human thrombi may have different structures and more heterogeneities than those reproduced in our present preclinical models. Even if the present data argue that targeting the endothelial tPA-dependent NMDAR signaling with Glunomab during stroke could be of interest in clinic, the relevance of preclinical models for translation to clinic is still debated. However, we believe that our thromboembolic stroke model, which is responsive to the gold-standard rtPA, is as close as possible to clinical situations. Second, the model of chronic hyperglycemia induced by using STZ may not fully reproduce the clinical situations such as diabetes. Even the multiple injection of low doses of STZ produce a situation closer to a type-1 diabetes in term of pathogenesis and morphologic changes than a treatment with a single high dose of STZ (Kolb, 1987; Weide and Lacy, 1991; Furman, 2015). Third, even if we considered chronic hyperglycemia as a comorbidity of stroke, other comorbidities would be interesting to include, such as high blood pressure and ageing. Fourth, increased levels of circulating Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-1) were reported in type 2 diabetic patients, which could interfere with tPA effects, although this does not necessarily hold true for type 1 diabetes (Altalhi, Pechlivani and Ajjan, 2021). Anyway, further investigations about endogenous PAI-1 and tPA levels would be interesting to perform in a future study. Fifth, it would be also important to consider the two sexes in future investigations and not only males as we performed here.

Further preclinical data and, hopefully, clinical trials are now needed to provide evidence that targeting endothelial tPA-dependent NMDAR would improve the treatment of ischemic stroke patients. It is also important to keep in mind that both endogenous and recombinant tPA can interact with endothelial NMDAR, suggesting that this strategy may be relevant for patients non treated with rtPA and for patients treated with derivatives of rtPA such as Tenecteplase, which also interacts with NMDA receptors (López-Atalaya *et al.*, 2007).

Supplementary data

Supplementary 1A

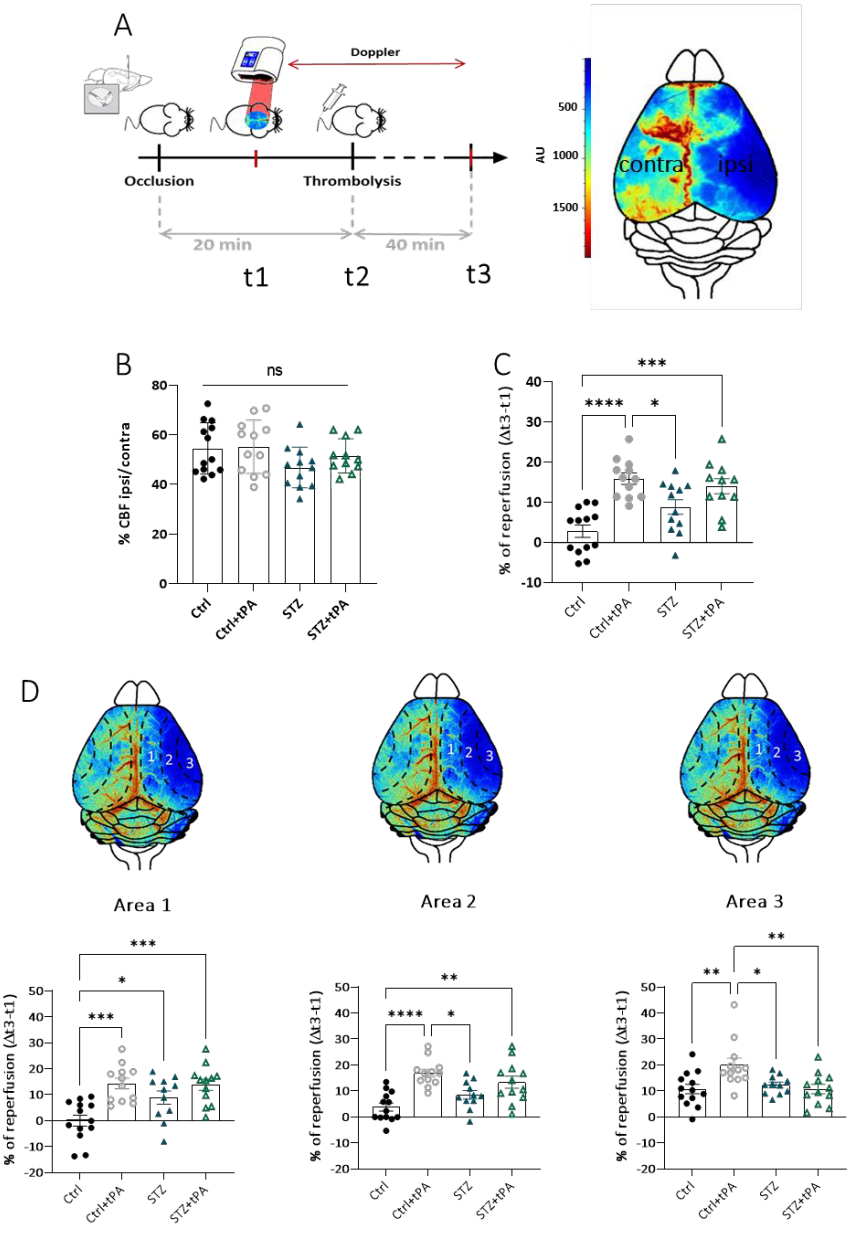


E

Group	Animal included	Mortality before 24h	Mortality after 24h	% mortality
Ctrl	13	0	0	0
Ctrl-tPA	13	0	0	0
STZ	12	0	0	0
STZ-tPA	12	0	0	0

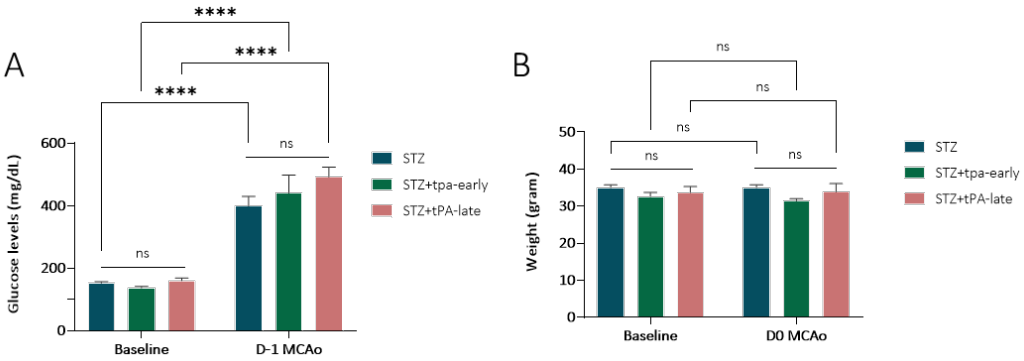
Supplementary 1A. A) Time course of blood glucose level after multiple low-dose STZ injection in an independent cohort of mice. Mice were treated with STZ (40mg/kg) or wit HBSS (Vehicle) for 5 consecutive days (n=10 per group at the beginning of the experimentation). Mixed-effects model: Time x Group<0,0001; Holm-Šídák's multiple comparisons test; * p<0,05. B) Mean of blood glucose level 24 hours before MCAo (D-1) of Ctrl (152,8mg/dL; n=13), Ctrl-tPA (156,9mg/d; n=13), STZ (418,3mg/dL ; n=12)and STZ-tPA (373mg/dL ; n=12). Results are represented in mean ± SEM. Figure in relation to Fig. 1. C) Time course of weight after multiple low-dose STZ injection in an independent cohort of mice. Mice were treated with STZ (40mg/kg) or wit HBSS (Vehicle) for 5 consecutive days (n=10 per group). Mixed-effects model: Time x Group<0,0001; Holm-Šídák's multiple comparisons test; **** p<0,0001. D) Mean animal weight on MCAo day (D0) of Ctrl (38,15 ; n=13), Ctrl-tPA (38,26; n=13), STZ (34,13; n=12)and STZ-tPA (34,56; n=12). Results are represented in mean ± SEM. Figure in relation to Fig. 1. E) Table of inclusion and mortality.

Supplementary 1B



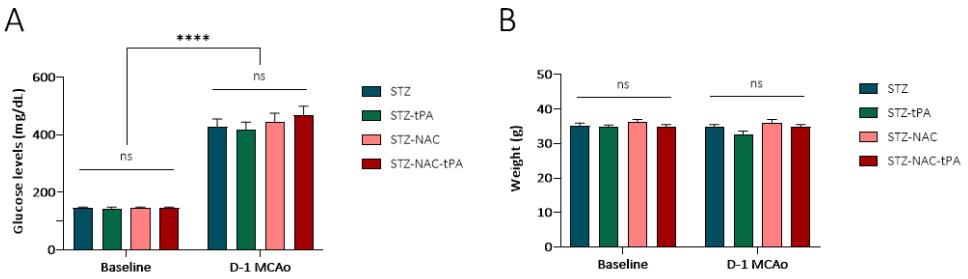
Supplementary 1B. A) Schematic representation of the experimental protocol and pseudo colored representative maps of the superficial CBF, highlighting CBF change on the ipsilateral compared to the contralateral hemisphere after MCAO and before treatment. The color scale represents CBF values and has no unit. B) Quantification of the CBF difference between ipsilateral and contralateral hemisphere extracted from Doppler speckle images after MCAo and before treatment (between t1 and t2 on the Fig. 1A) in Ctrl (n=13), Ctrl-tPA (n=13), STZ (n=12) and STZ-tPA (n=12) groups. Individual values, means and SEM are plotted. 55% for Ctrl group (n=13); 55% for Ctrl-tPA group (n=13); 47% for STZ group (n=12); 52% for STZ-tPA group (n=12). Ordinary one-way ANOVA p=0,12. No differences between groups C) Delta of the % of reperfusion between t1 (10-15 minutes after stroke onset) and t3 (40 minutes after stroke onset) in saline or rtPA treated (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes) on non-hyperglycemic mice (Ctrl) or on hyperglycemic mice (STZ). CBF signal measured in the ipsilateral side was expressed as a % of the CBFs on the contralateral side. Individual values, means and SEM are plotted. 3% for Ctrl group (n=13); 16% for Ctrl-tPA group (n=13); 9% for STZ group (n=12); 15% for STZ-tPA group (n=12). Ordinary one-way ANOVA (p<0,0001); Tukey multiple comparisons (* p<0.05; *** p<0.001; **** p<0.001). D) Delta of the % of reperfusion between t1 (10-15 minutes after stroke onset) and t2 (40minutes after stroke onset) in saline or rtPA treated (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes) on non-hyperglycemic mice (Ctrl) or on hyperglycemic mice (STZ) depending on specific areas. CBF signal measured in the ipsilateral side was expressed as a % of the CBFs on the contralateral side. Individual values, means and SEM are plotted. Ordinary one-way ANOVA (p<0,01); Tukey multiple comparisons * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001). Ipsilateral and contralateral hemispheres were divided in 3 symmetrical areas; The ipsilateral Area 1 is the superficial zone farthest from the core, Area 2 corresponds to the superficial perilesional area and Area 3 corresponds to the surface area of the core.

Supplementary 2



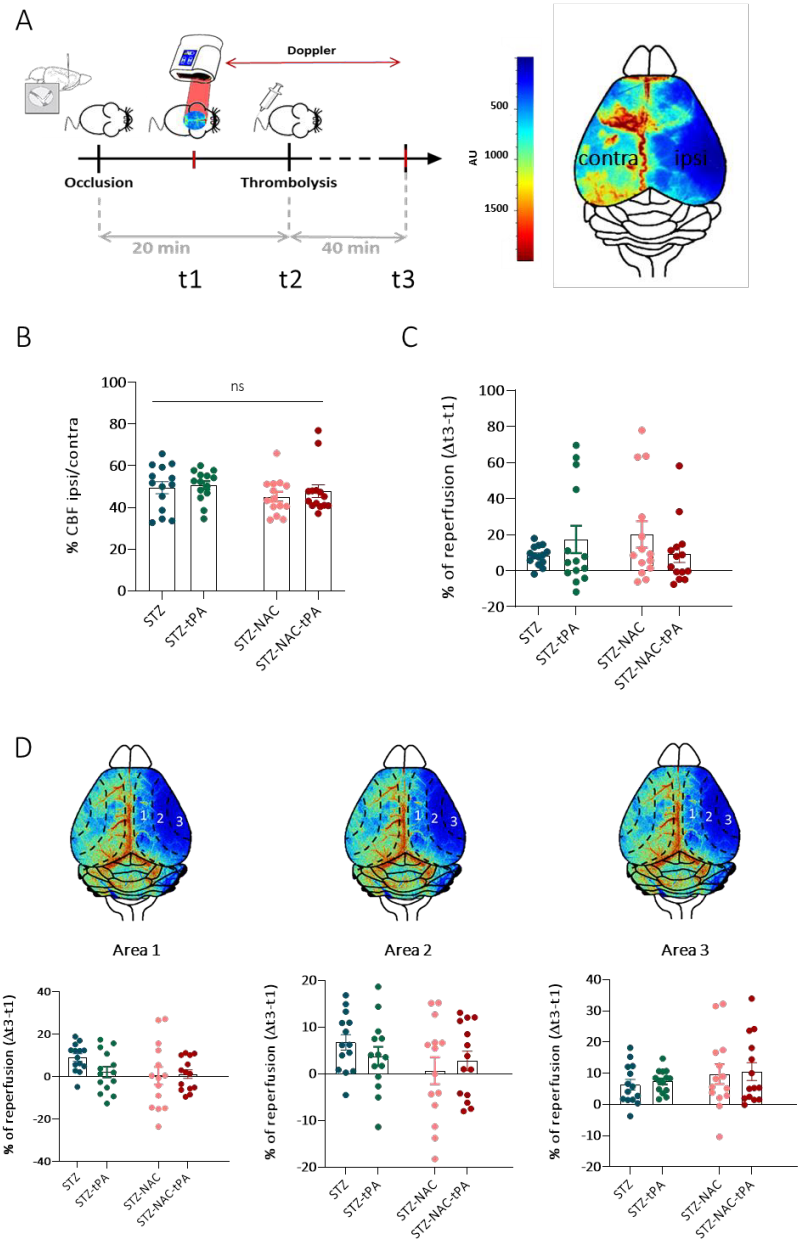
Supplementary 2. A) Mean of blood glucose level at the receipt of the animals (3-4 weeks before MCAo) and 24 hours before MCAo (D-1) of STZ group (n=10), STZ-tPA-early group (n=5) and STZ-tPA-late group (n=5). Results are represented in mean ± SEM. Baseline values: STZ=153mg/dl; STZ-tPA-early=137 and STZ-tPA-late=160. Do MCAo values: STZ=399mg/dl; STZ-tPA-early=440 and STZ-tPA-late=492. 2-way ANOVA: Time factor<0.0001; Šídák's multiple comparisons test for multiple comparison, **** p<0.0001. B) Mean of weight at the receipt of the animals (3-4 weeks before MCAo) and 24 hours before MCAo (D-1) of STZ group (n=10), STZ-tPA-early group (n=5) and STZ-tPA-late group (n=5). Results are represented in mean ± SEM. Baseline values: STZ=34.9g; STZ-tPA-early=32.6 and STZ-tPA-late=33.6. Do MCAo values: STZ=35.0g; STZ-tPA-early=31.4 and STZ-tPA-late=33.8. 2-way ANOVA: Time factor=0.52.

Supplementary 3A



Supplementary 3. A) Mean of blood glucose level at the receipt of the animals (3-4 weeks before MCAo) and 24 hours before MCAo (D-1) of STZ, STZ-tPA, STZ-NAC and STZ-NAC-tPA groups (n=14). Results are represented in mean ± SEM. Baseline values: STZ=146mg/dl, STZ-tPA=144, STZ-NAC= 144 and STZ-NAC-tPA=146. Do MCAo values: STZ=428mg/dl; STZ-tPA=416, STZ-NAC=444 and STZ-NAC-tPA=469. 2-way ANOVA: Time factor<0.0001; Bonferroni's multiple comparisons test for multiple comparison, **** p<0.0001. B) Mean of weight at the receipt of the animals (3-4 weeks before MCAo) and 24 hours before MCAo (D-1) of STZ, STZ-tPA, STZ-NAC and STZ-NAC-tPA groups (n=14). Results are represented in mean ± SEM. Baseline values: STZ=35.1g, STZ-tPA=34.9, STZ-NAC=36.1and STZ-NAC-tPA=34.9. Do MCAo values: STZ=35.0g, STZ-tPA=32.5, STZ-NAC=36.4 and STZ-NAC-tPA=34.8. 2-way ANOVA: Time factor=0.17.

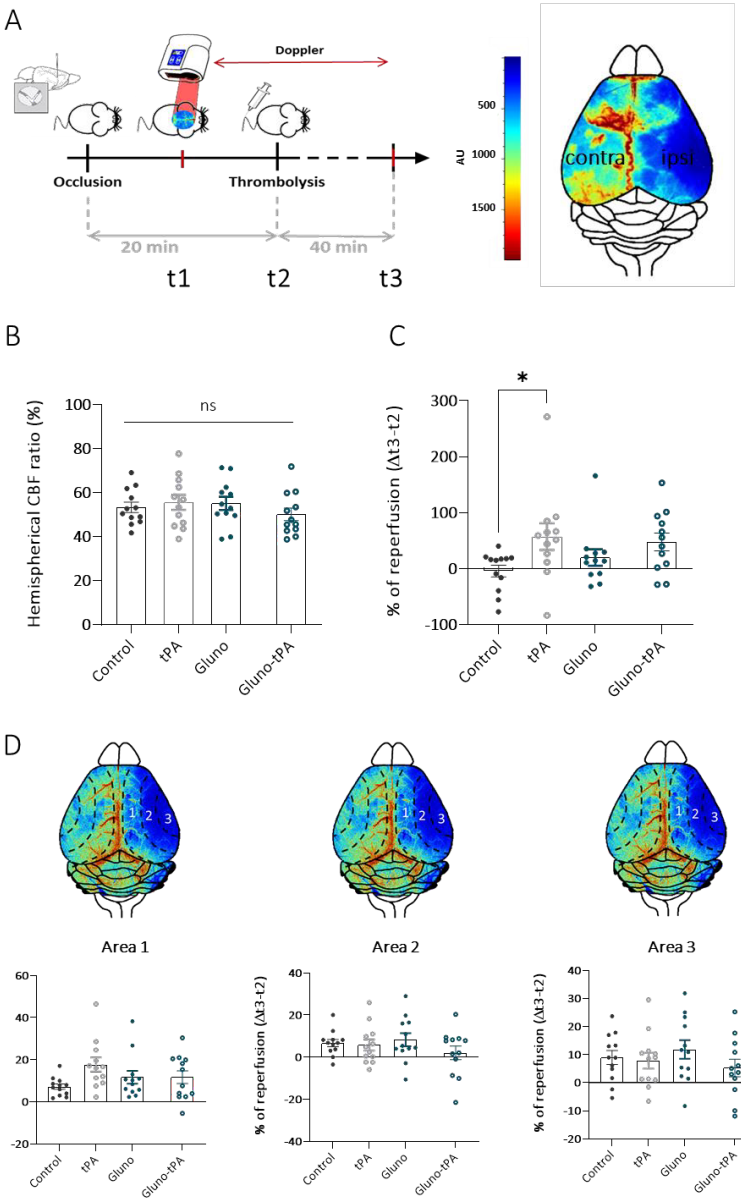
Supplementary 3B



Supplementary 3B. A) Schematic representation of the experimental protocol and pseudo colored representative maps of the superficial CBF, highlighting CBF change on the ipsilateral compared to the contralateral hemisphere after MCAO and before treatment. The color scale represents CBF values and has no unit. B) Quantification of the CBF difference between ipsilateral and contralateral hemisphere extracted from Doppler speckle images after MCAo and before treatment (between t1 and t2 on the Fig. 1A) in STZ, STZ-tPA, STZ-NAC and STZ-NAC-tPA groups (n=14). Individual values, means and SEM are plotted. 50% for STZ group (n=14); 51% for STZ-tPA group (n=14); 45% for STZ-NAC group (n=14); 48% for STZ-NAC-tPA group (n=14). Kruskal-Wallis, p=0,19. No differences between groups C) Delta of the % of reperfusion between t1 (10-15 minutes after stroke onset) and t3 (40 minutes after stroke onset) in hyperglycemic mice treated with saline (STZ group), rtPA (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90%

perfusion during 40 minutes; STZ-tPA group), NAC (400 mg/kg, slow bolus during 60 seconds; STZ-NAC group) or a combination of NAC and tPA (STZ-NAC-tPA group). CBF signal measured in the ipsilateral side was expressed as a % of the CBFs on the contralateral side. Individual values, means and SEM are plotted. 8% for STZ group (n=14); 17% for STZ-tPA group (n=14); 20% for STZ-NAC group (n=14); 9% for STZ-NAC-tPA group (n=14). Kruskal-Wallis test p=0.69. D) Delta of the % of reperfusion between t1 (10-15 minutes after stroke onset) and t2 (40 minutes after stroke onset) in saline or tPA treated (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes) and NAC treated (400mg/kg in a slow bolus) on hyperglycemic mice (STZ) in specific areas. CBF signal measured in the ipsilateral side was expressed as % of the CBFs on the contralateral side. Individual values, means and SEM are plotted, n=14. Kruskal-Wallis <0.05 for Area 1 and >0.05 for Area 2 and 3. No differences between groups. Ipsilateral and contralateral hemispheres were divided in 3 symmetrical areas; The ipsilateral Area 1 is the superficial zone farthest from the core, Area 2 corresponds to the superficial perilesional area and Area 3 corresponds to the surface area of the core.

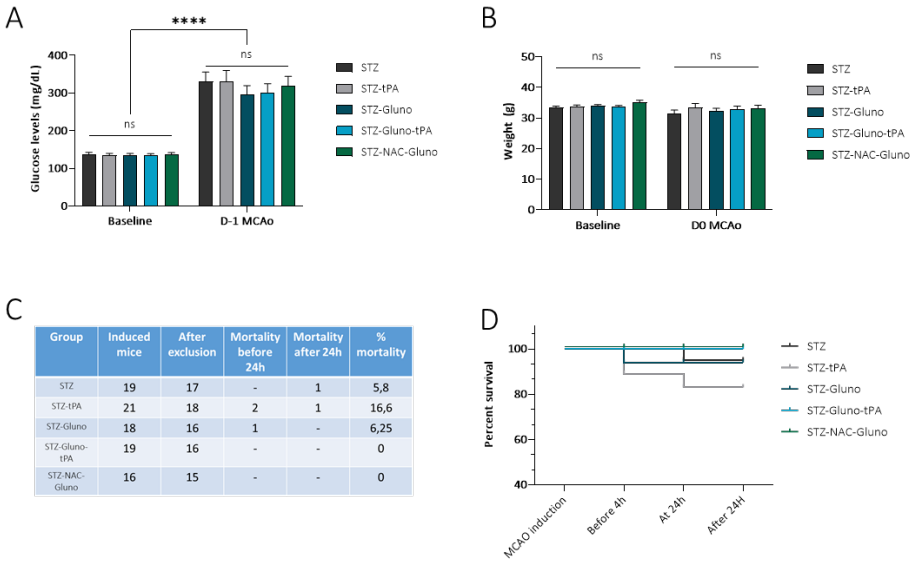
Supplementary 4



Supplementary 4. A) Schematic representation of the experimental protocol and pseudo colored representative maps of the superficial CBF, highlighting CBF change on the ipsilateral compared to the contralateral hemisphere after MCAO and before treatment. The color scale represents CBF values and has no unit. B) Quantification of the CBF difference between ipsilateral and contralateral hemisphere extracted from Doppler speckle images after MCAo and before treatment (between t1 and t2 on the Fig. 1A) in Control (n=12), tPA (n=12), Gluno (n=12) and Gluno-tPA (n=12) groups. Individual values, means and SEM are plotted. 55% for Control group (n=12); 55% for tPA group (n=12); 56% for Gluno group (n=12); 50% for STZ-tPA group (n=12). Ordinary one-way ANOVA p=0,73. No differences between groups C) Delta of the % of reperfusion between t2 (15-20 minutes after stroke onset) and t3 (40 minutes after stroke onset) in mice treated with saline (Vehicle group), tPA (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes; tPA group), Glunomab (300µg, 100% bolus; Gluno group) or a combination of Glunomab-tPA (Gluno-tPA group). CBF signal measured in the ipsilateral side was expressed as a % of the CBFs on the contralateral side. Individual values, means and SEM are plotted. -4% for Control group

(n=12); 57% for tPA group (n=12); 20% for Gluno group (n=12); 48% for Gluno-tPA group (n=12). Kruskal-Wallis test (p<0,05); Dunn's multiple comparisons test (* p<0.05). D) Delta of the % of reperfusion between t1 (10-15 minutes after stroke onset) and t2 (40 minutes after stroke onset) in mice treated with saline (Vehicle group), tPA (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes; tPA group), Glunomab (300µg, 100% bolus; Gluno group) or a combination of Glunomab-tPA (Gluno-tPA group) depending on specific areas. CBF signal measured in the ipsilateral side was expressed as a % of the CBFs on the contralateral side. Individual values, means and SEM are plotted, n=12. Ordinary one-way Anova test (p>0,05). Ipsilateral and contralateral hemispheres were divided in 3 symmetrical areas; The ipsilateral Area 1 is the superficial zone farthest from the core, Area 2 corresponds to the superficial perilesional area and Area 3 corresponds to the surface area of the core.

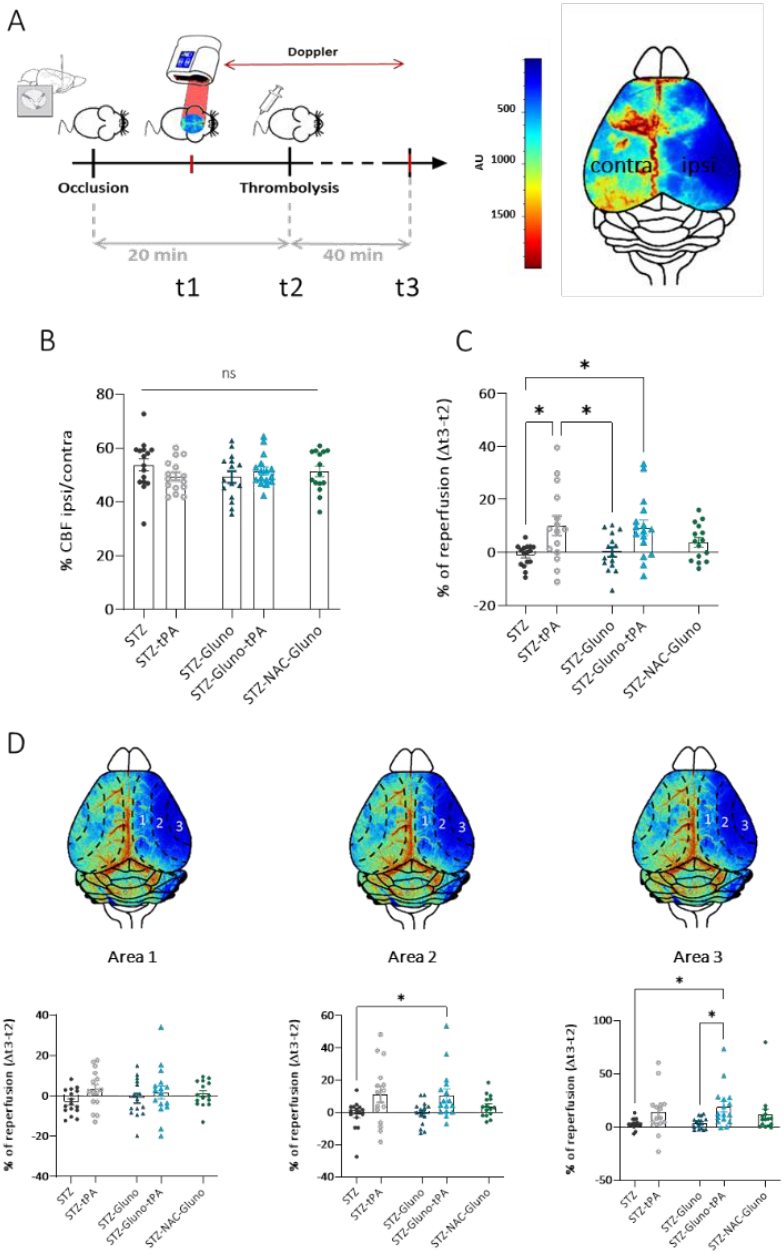
Supplementary 5A



Group	Induced mice	After exclusion	Mortality before 24h	Mortality after 24h	% mortality
STZ	19	17	-	1	5,8
STZ-tPA	21	18	2	1	16,6
STZ-Gluno	18	16	1	-	6,25
STZ-Gluno-tPA	19	16	-	-	0
STZ-NAC-Gluno	16	15	-	-	0

Supplementary 5A. A) Mean of blood glucose level at the receipt of the animals (3-4 weeks before MCAo) and 24 hours before MCAo (D-1) of STZ group (n=16), STZ-tPA group (n=15), STZ-Gluno group (n=15), STZ-Gluno-tPA group (n=16) and STZ-NAC-Gluno group (n=15). Results are represented in mean ± SEM. Baseline values: STZ=138mg/dl; STZ-tPA=134; STZ-Gluno=136; STZ-Gluno-tPA=134 and STZ-NAC-Gluno=136. D-1 MCAo values: STZ=340mg/dl; STZ-tPA=330; STZ-Gluno=295; STZ-Gluno-tPA=302 and STZ-NAC-Gluno=318. 2-way ANOVA: Time factor<0.0001; Šídák's multiple comparisons test for multiple comparison, **** p<0.0001. B) Mean of weight at the receipt of the animals (3-4 weeks before MCAo) and the day of MCAo (D0) of S STZ group (n=16), STZ-tPA group (n=15), STZ-Gluno group (n=15), STZ-Gluno-tPA group (n=16) and STZ-NAC-Gluno group (n=15). Results are represented in mean ± SEM. Baseline values: STZ=33.4g; STZ-tPA=33.7; STZ-Gluno=33.9; STZ-Gluno-tPA=33.5 and STZ-NAC-Gluno=35.2. D0 MCAo values: STZ=31.5g; STZ-tPA=33.3; STZ-Gluno=32.33; STZ-Gluno-tPA=32.94 and STZ-NAC-Gluno=33.26. 2-way ANOVA: Time factor<0.05. C) Table of inclusion and mortality. D) Effects of STZ and treatments on survival from D0 (MCAo) to D7 (p=0.23; Log-rank of Mantel-Cox test).

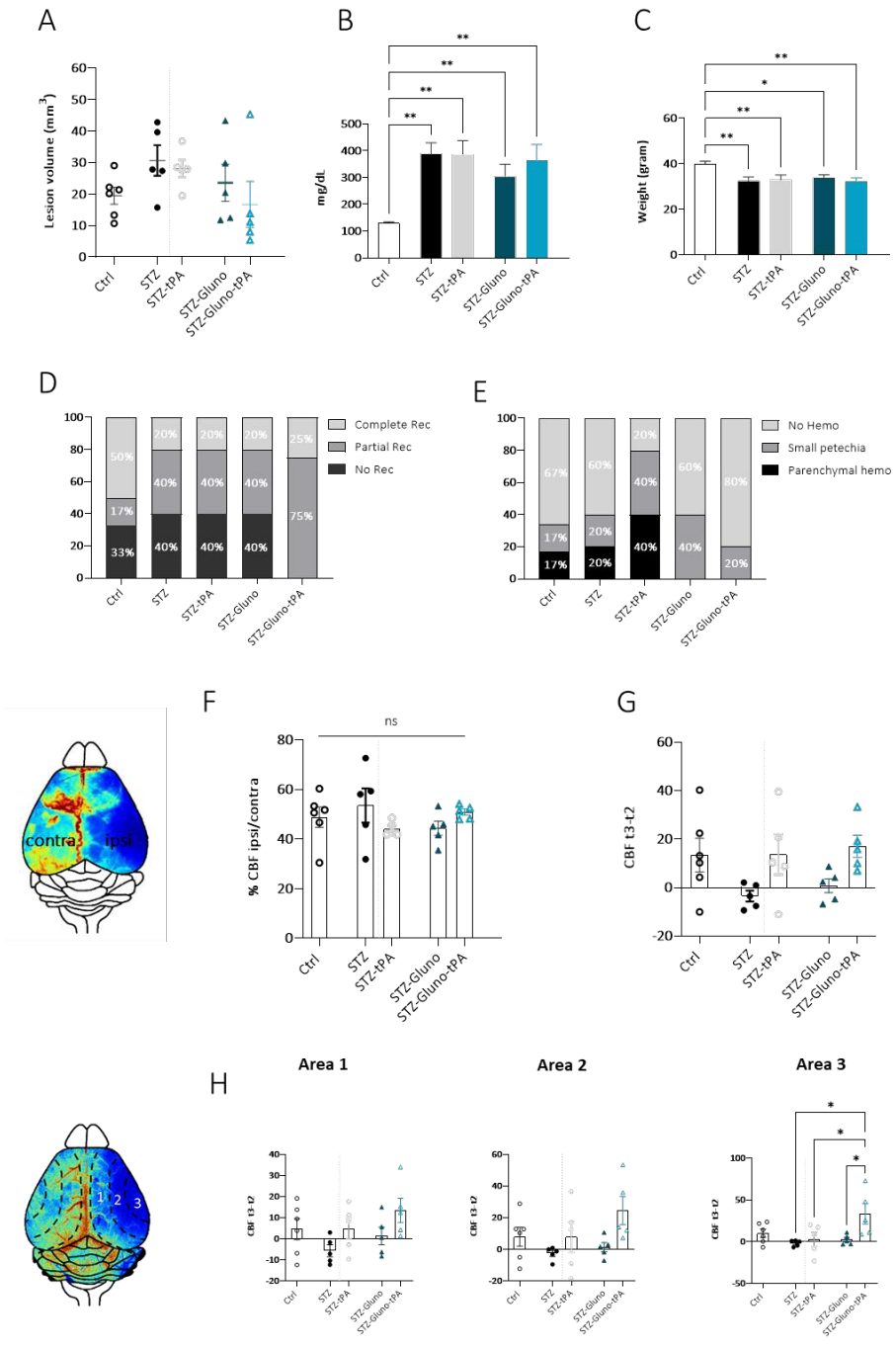
Supplementary 5B



Supplementary 5B. A) Schematic representation of the experimental protocol and pseudo colored representative maps of the superficial CBF, highlighting CBF change on the ipsilateral compared to the contralateral hemisphere after MCAO and before treatment. The color scale represents CBF values and has no unit. B) Quantification of the CBF difference between ipsilateral and contralateral hemisphere extracted from Doppler speckle images after MCAo and before treatment (between t1 and t2 on the Fig. 1A) n STZ (n=16), STZ-tPA (n=15), STZ-Gluno (n=15), STZ-Gluno-tPA (n=16) and STZ-Gluno-NAC (n=15) groups. Individual values, means and SEM are plotted. 54% for STZ group; 49% for STZ-tPA group; 49% for STZ-Gluno group; 51% for STZ-Gluno-tPA group and 51% for STZ-NAC-Gluno group. Ordinary one-way ANOVA p=0,91. No differences between groups C) Delta of the % of reperfusion between t2 (15-20 minutes after stroke onset) and t3 (40 minutes after stroke onset) in mice treated with saline

(STZ group), tPA (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes; STZ-tPA group), Glunomab (300µg, 100% bolus; STZ-Gluno group), a combination of Glunomab and rtPA (STZ-Gluno-tPA group) and a combination of Glunomab and NAC (400mg/kg, slow bolus) on hyperglycemic mice. CBF signal measured in the ipsilateral side was expressed as a % of the CBFs on the contralateral side. Individual values, means and SEM are plotted. -1% for STZ group (n=16); 10% for STZ-tPA group (n=15); 0% for Gluno group (n=15); 9% for STZ-Gluno-tPA group (n=16) and 4% for STZ-NAC-Gluno group. Ordinary one-way ANOVA test p<0,01); Tukey's multiple comparisons test (* p<0.05). D) Delta of the % of reperfusion between t2 (15-20 minutes after stroke onset) and t3 (40 minutes after stroke onset) in mice treated with saline (STZ group), tPA (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes; STZ-tPA group), Glunomab (300µg, 100% bolus; STZ-Gluno group), a combination of Glunomab and tPA (STZ-Gluno-tPA group) and a combination of Glunomab and NAC (400mg/kg, slow bolus) on hyperglycemic mice depending on specific areas. CBF signal measured in the ipsilateral side was expressed as a % of the CBFs on the contralateral side. Individual values, means and SEM are plotted. Kruskal-Wallis test p<0,05 and Dunn's test compared to STZ for area 2 and Kruskal-Wallis test p<0,01 and Tukey's multiple test for area 3, (* p<0.05). Ipsilateral and contralateral hemispheres were divided in 3 symmetrical areas; The ipsilateral Area 1 is the superficial zone farthest from the core, Area 2 corresponds to the superficial perilesional area and Area 3 corresponds to the surface area of the core.

Supplementary 6



Supplementary 6. A) Quantification of ischemic lesion volume 24 hours after MCAo assessed by T2-weighted imaging (7T MRI) in mice treated with saline (Ctrl group), with STZ (STZ group), tPA (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes; STZ-tPA group), Glunomab (300µg, 100% bolus; STZ-Gluno group) and a combination of Glunomab and tPA (STZ-Gluno-tPA group). Individual values, means and SEM are plotted. 19.43mm^3 for Ctrl group (n=6); 30.63mm^3 for STZ group (n=5); 28.04mm^3 for STZ-tPA group (n=5); 23.55mm^3 for STZ-Gluno group (n=5) and 16.7mm^3 for STZ-Gluno-tPA group (n=5). Kruskall-Wallis test; n=0.25. B) Mean of blood glucose level 24 hours before MCAo (D-1) of Ctrl group (n=6), STZ group (n=5), STZ-tPA group (n=5), STZ-Gluno

group (n=5), and STZ-Gluno-tPA group (n=5). Results are represented in mean ± SEM. D-1 MCAo values: Ctrl=129mg/dl; STZ=387; STZ-tPA=386; STZ-Gluno=304 and STZ-Gluno-tPA=364. 1-way ANOVA<0.001; Holm-Šídák's multiple comparisons test ** p<0.01. C) Mean of weight 24 hours before MCAo (D-1) of Ctrl group (n=6), STZ group (n=5), STZ-tPA group (n=5), STZ-Gluno group (n=5), and STZ-Gluno-tPA group (n=5). Results are represented in mean ± SEM. D-1 MCAo values: Ctrl=39.9g; STZ=32.2; STZ-tPA=32.8; STZ-Gluno=33.8 and STZ-Gluno-tPA=32.2. 1-way ANOVA<0.001; Holm-Šídák's multiple comparisons test *p<0.05; ** p<0.01. D) Percentage of angiographic scores 24 hours after MCAO assessed by FLASH_TOF_2D imaging (7T MRI) in Ctrl (n=6), STZ (n=5), STZ-tPA (n=5), STZ-Gluno (n=5) and STZ-Gluno-tPA (n=5) groups. No recanalization = complete occlusion (black); partial recanalization = incomplete filling of the distal bed (dark grey); complete recanalization = complete filling of the distal bed (light grey). E) Percentage of HT 24 hours after MCAO assessed by T2*-weighted imaging (deoxyhemoglobin; 7T MRI) in Ctrl (n=6), STZ (n=5), STZ-tPA (n=5), STZ-Gluno (n=5) and STZ-Gluno-tPA (n=5) groups. F) Quantification of the CBF difference between ipsilateral and contralateral hemisphere extracted from Doppler speckle images after MCAo and before treatment in Ctrl (n=6), STZ (n=5), STZ-tPA (n=5), STZ-Gluno (n=5), and STZ-Gluno-tPA (n=5) groups. Individual values, means and SEM are plotted. 49% for Ctrl group, 53% for STZ group; 44% for STZ-tPA group; 44% for STZ-Gluno group and 51% for STZ-Gluno-tPA group. Ordinary one-way ANOVA p=0,40. No differences between groups G) Delta of the % of reperfusion between t2 (15-20 minutes after stroke onset) and t3 (40 minutes after stroke onset) in mice treated with saline (Ctrl group), STZ, tPA (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes; STZ-tPA group), Glunomab (300µg, 100% bolus; STZ-Gluno group), a combination of Glunomab and tPA (STZ-Gluno-tPA group). CBF signal measured in the ipsilateral side was expressed as a % of the CBFs on the contralateral side. Individual values, means and SEM are plotted. 13.4% For Ctrl (n=6), -3.5% for STZ group (n=5); 13.6% for STZ-tPA group (n=5); 1% for Gluno group (n=5); 17%% for STZ-Gluno-tPA group (n=5). Ordinary one-way ANOVA test p=0,07). H) Delta of the % of reperfusion between t2 (15-20 minutes after stroke onset) and t3 (40 minutes after stroke onset) in mice treated with saline (Ctrl group), STZ, tPA (10mg/kg; Actilyse, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes; STZ-tPA group), Glunomab (300µg, 100% bolus; STZ-Gluno group), a combination of Glunomab and tPA (STZ-Gluno-tPA group) depending on specific areas. CBF signal measured in the ipsilateral side was expressed as a % of the CBFs on the contralateral side. Individual values, means and SEM are plotted. 1-way ANOVA test p<0,05 and Tukey's multiple comparisons test for area 3 (* p<0.05). Ipsilateral and contralateral hemispheres were divided in 3 symmetrical areas; The ipsilateral Area 1 is the superficial zone farthest from the core, Area 2 corresponds to the superficial perilesional area and Area 3 corresponds to the surface area of the core.

References

Abumiya, T. *et al.* (2005) 'Aggravation of hemorrhagic transformation by early intraarterial infusion of low-dose vascular endothelial growth factor after transient focal cerebral ischemia in rats', *Brain Research*, 1049(1), pp. 95–103. Available at: https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.05.011.

Adams, H.P. *et al.* (2008) 'Emergency administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: results of an international phase III trial: Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial (AbESTT-II).', *Stroke*, 39(1), pp. 87–99. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.106.476648.

Ahmad, A.S. *et al.* (2015) 'Considerations for the Optimization of Induced White Matter Injury Preclinical Models', *Frontiers in Neurology*, 6. Available at: https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00172.

Ahmed, N., Näsman, P. and Wahlgren, N.G. (2000) 'Effect of intravenous nimodipine on blood pressure and outcome after acute stroke', *Stroke*, 31(6), pp. 1250–1255. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.31.6.1250.

Akassoglou, K. *et al.* (2000) 'Tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis protects against axonal degeneration and demyelination after sciatic nerve injury', *The Journal of Cell Biology*, 149(5), pp. 1157–1166. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.149.5.1157.

Alexander, W. (2016) 'European Society of Cardiology Congress', *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 41(10), pp. 645–649.

Alloubani, A., Saleh, A. and Abdelhafiz, I. (2018) 'Hypertension and diabetes mellitus as a predictive risk factors for stroke', *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 12(4), pp. 577–584. Available at: https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.03.009.

Altalhi, R., Pechlivani, N. and Ajjan, R.A. (2021) 'PAI-1 in Diabetes: Pathophysiology and Role as a Therapeutic Target', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), p. 3170. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms22063170.

Amarenco, P. *et al.* (2009) 'Classification of Stroke Subtypes', *Cerebrovascular Diseases*, 27(5), pp. 493–501. Available at: https://doi.org/10.1159/000210432.

van den Ameele, J. *et al.* (2014) 'Thinking out of the dish: what to learn about cortical development using pluripotent stem cells', *Trends in Neurosciences*, 37(6), pp. 334–342. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.03.005.

Anderson, C.S. *et al.* (2016) 'Low-Dose versus Standard-Dose Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke', *New England Journal of Medicine*, 374(24), pp. 2313–2323. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMoa1515510.

Anfray, A. *et al.* (2019) 'Circulating tPA contributes to neurovascular coupling by a mechanism involving the endothelial NMDA receptors', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism:*

Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, p. 271678X19883599. Available at: https://doi.org/10.1177/0271678X19883599.

Anfray, A. *et al.* (2021) 'Single- and two- chain tissue type plasminogen activator treatments differentially influence cerebral recovery after stroke', *Experimental Neurology*, 338, p. 113606. Available at: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113606.

Anrather, J. and Iadecola, C. (2016) 'Inflammation and Stroke: An Overview', *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 13(4), pp. 661–670. Available at: https://doi.org/10.1007/s13311-016-0483-x.

Antillon, D. and Towfighi, A. (2011) 'No Time to "Weight": The Link between Obesity and Stroke in Women', *Women's Health*, 7(4), pp. 453–463. Available at: https://doi.org/10.2217/WHE.11.36.

Armstead, W.M. (2003) 'PTK, ERK and p38 MAPK contribute to impaired NMDA-induced vasodilation after brain injury', *European Journal of Pharmacology*, 474(2–3), pp. 249–254. Available at: https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)02012-0.

Armstead, W.M. *et al.* (2011) 'tPA contributes to impaired NMDA cerebrovasodilation after traumatic brain injury through activation of JNK MAPK', *Neurological Research*, 33(7), pp. 726–733. Available at: https://doi.org/10.1179/016164110X12807570509853.

Armstead, W.M. *et al.* (2016) 'tPA-A296-299 Prevents Impairment of Cerebral Autoregulation After Stroke Through LRP Dependent Increase in cAMP and p38', *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 47(8), pp. 2096–2102. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.012678.

Arora, S., Ojha, S.K. and Vohora, D. (no date) 'Characterisation of streptozotocin induced diabetes mellitus in swiss albino mice', *Global J. Pharmacol. 2009*, pp. 81–84.

Arstall, M.A. *et al.* (1995) 'N-Acetylcysteine in Combination With Nitroglycerin and Streptokinase for the Treatment of Evolving Acute Myocardial Infarction', *Circulation*, 92(10), pp. 2855–2862. Available at: https://doi.org/10.1161/01.CIR.92.10.2855.

Asahi, M. *et al.* (2000) 'Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(12), pp. 1681–1689. Available at: https://doi.org/10.1097/00004647-200012000-00007.

Asahi, Minoru *et al.* (2000) 'Role for Matrix Metalloproteinase 9 after Focal Cerebral Ischemia: Effects of Gene Knockout and Enzyme Inhibition with BB-94', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 20(12), pp. 1681–1689. Available at: https://doi.org/10.1097/00004647-200012000-00007.

Astrup, T. and Stage, A. (1952) 'Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue', *Nature*, 170(4335), p. 929. Available at: https://doi.org/10.1038/170929a0.

Audibert, G., Charpentier, C. and Mertes, P.-M. (2007) 'Surveillance du métabolisme cérébral (SjO2, PtiO2, microdialyse)', in N. Bruder, P. Ravussin, and B. Bissonnette (eds) *La réanimation neurochirurgicale*. Paris: Springer (Le point sur …), pp. 121–140. Available at: https://doi.org/10.1007/978-2-287-68199-8_7.

Bang, O.Y. *et al.* (2011) 'Collateral Flow Averts Hemorrhagic Transformation After Endovascular Therapy for Acute Ischemic Stroke', *Stroke*, 42(8), pp. 2235–2239. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.604603.

Baranes, D *et al.* (1998) 'Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway.', *Neuron*, 21(4), pp. 813–25.

Baranes, Danny *et al.* (1998) 'Tissue Plasminogen Activator Contributes to the Late Phase of LTP and to Synaptic Growth in the Hippocampal Mossy Fiber Pathway', *Neuron*, 21(4), pp. 813–825. Available at: https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80597-8.

Barker-Carlson, K., Lawrence, D.A. and Schwartz, B.S. (2002) 'Acyl-Enzyme Complexes between Tissue-type Plasminogen Activator and Neuroserpin are Short-lived in Vitro', *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), pp. 46852–46857. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M207740200.

Barnes, P. and Thomas, K.L. (2008) 'Proteolysis of proBDNF is a key regulator in the formation of memory', *PloS One*, 3(9), p. e3248. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003248.

Bas, D.F. *et al.* (2012) 'Plasma 3-nitrotyrosine estimates the reperfusion-induced cerebrovascular stress, whereas matrix metalloproteinases mainly reflect plasma activity: a study in patients treated with thrombolysis or endovascular recanalization', *Journal of Neurochemistry*, 123 Suppl 2, pp. 138–147. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07952.x.

Basham, M.E. and Seeds, N.W. (2001) 'Plasminogen expression in the neonatal and adult mouse brain', *Journal of Neurochemistry*, 77(1), pp. 318–325. Available at: https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.t01-1-00239.x.

Beal, C.C. (2010) 'Gender and stroke symptoms: a review of the current literature', *The Journal of Neuroscience Nursing: Journal of the American Association of Neuroscience Nurses*, 42(2), pp. 80–87.

Becker, K. *et al.* (2001) 'Antibody to the alpha4 integrin decreases infarct size in transient focal cerebral ischemia in rats', *Stroke*, 32(1), pp. 206–211. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.32.1.206.

Belayev, L., Endres, M. and Prinz, V. (2016) 'Focal Cerebral Ischemia in the Mouse and Rat by Intraluminal Suture', in U. Dirnagl (ed.) *Rodent Models of Stroke*. New York, NY: Springer New York (Neuromethods), pp. 31–43. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-5620-3_4.

Belov Kirdajova, D. *et al.* (2020) 'Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, p. 51. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00051.

Benchenane, K. *et al.* (2005) 'Oxygen Glucose Deprivation Switches the Transport of tPA Across the Blood–Brain Barrier From an LRP-Dependent to an Increased LRP-Independent Process', *Stroke*, 36(5), pp. 1059–1064. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000163050.39122.4f.

Benchenane, K. *et al.* (2007) 'Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory', *Journal of Cell Science*, 120(Pt 4), pp. 578–585. Available at: https://doi.org/10.1242/jcs.03354.

Benchoua, A. *et al.* (2001) 'Specific Caspase Pathways Are Activated in the Two Stages of Cerebral Infarction', *The Journal of Neuroscience*, 21(18), pp. 7127–7134. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07127.2001.

Bentes, C. *et al.* (2017) 'Epileptic manifestations in stroke patients treated with intravenous alteplase', *European Journal of Neurology*, 24(6), pp. 755–761. Available at: https://doi.org/10.1111/ene.13292.

Berger, C. *et al.* (2001) 'Hemorrhagic transformation of ischemic brain tissue: asymptomatic or symptomatic?', *Stroke*, 32(6), pp. 1330–1335. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.32.6.1330.

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. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411587.

Bertrand, T *et al.* (2015) 'Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR', *Cell Death & Disease*, 6(10), pp. e1924–e1924. Available at: https://doi.org/10.1038/cddis.2015.296.

Bertrand, T. *et al.* (2015) 'Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR', *Cell Death & Disease*, 6, p. e1924. Available at: https://doi.org/10.1038/cddis.2015.296.

Bevers, M.B. *et al.* (2017) 'Hyperglycemia is associated with more severe cytotoxic injury after stroke', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(7), pp. 2577–2583. Available at: https://doi.org/10.1177/0271678X16671730.

Bhatia, R. *et al.* (2010) 'Low Rates of Acute Recanalization With Intravenous Recombinant Tissue Plasminogen Activator in Ischemic Stroke', *Stroke*, 41(10), pp. 2254–2258. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.592535.

Binder, B.R., Spragg, J. and Austen, K.F. (1979) 'Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates', *The Journal of Biological Chemistry*, 254(6), pp. 1998–2003.

Bir, S.C. *et al.* (2012) 'Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(7), pp. 745–757. Available at: https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.05.003.

Birnbaumer, L. *et al.* (1994) 'The naming of voltage-gated calcium channels.', *Neuron*, 13(3), pp. 505–6.

Bivard, A. *et al.* (2022) 'Tenecteplase versus Alteplase for Stroke Thrombolysis Evaluation Trial in the Ambulance (Mobile Stroke Unit—TASTE-A): protocol for a prospective randomised, open-label, blinded endpoint, phase II superiority trial of tenecteplase versus alteplase for ischaemic stroke patients presenting within 4.5 hours of symptom onset to the mobile stroke unit', *BMJ Open*, 12(4), p. e056573. Available at: https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-056573.

Bliss, T. V and Lomo, T. (1973) 'Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path.', *The Journal of physiology*, 232(2), pp. 331–56. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273.

Blouet, C. *et al.* (2007) 'Dietary cysteine alleviates sucrose-induced oxidative stress and insulin resistance', *Free Radical Biology and Medicine*, 42(7), pp. 1089–1097. Available at: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.006.

Boehme, A.K. *et al.* (2013) 'Systemic Inflammatory Response Syndrome in tPA Treated Patients Is Associated with Worse Short-term Functional Outcome', *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 44(8), pp. 2321–2323. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.001371.

Boulaftali, Y. *et al.* (2011) 'Platelet Protease Nexin-1, a Serpin That Strongly Influences Fibrinolysis and Thrombolysis', *Circulation*, 123(12), pp. 1326–1334. Available at: https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.000885.

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. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30177-6.

Bradley, S.A. *et al.* (2022) 'Role of diabetes in stroke: Recent advances in pathophysiology and clinical management', *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 38(2), p. e3495. Available at: https://doi.org/10.1002/dmrr.3495.

Branston, N.M., Strong, A.J. and Symon, L. (1977) 'Extracellular potassium activity, evoked potential and tissue blood flow. Relationships during progressive ischaemia in baboon cerebral cortex', *Journal of the Neurological Sciences*, 32(3), pp. 305–321. Available at: https://doi.org/10.1016/0022-510x(77)90014-4.

Breyer, M.D. *et al.* (2005) 'Mouse models of diabetic nephropathy', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16(1), pp. 27–45. Available at: https://doi.org/10.1681/ASN.2004080648.

Broderick, J.P. *et al.* (1995) 'Hyperglycemia and Hemorrhagic Transformation of Cerebral Infarcts', *Stroke*, 26(3), pp. 484–487. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.26.3.484.

Broderick, J.P. *et al.* (2015) 'Endovascular Therapy is Effective and Safe for Patients with Severe Ischemic Stroke: Pooled Analysis of IMS III and MR CLEAN Data', *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 46(12), pp. 3416–3422. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.011397.

Brott, T. *et al.* (1989) 'Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale', *Stroke*, 20(7), pp. 864–870. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.20.7.864.

Buga, A.-M., Di Napoli, M. and Popa-Wagner, A. (2013) 'Preclinical models of stroke in aged animals with or without comorbidities: role of neuroinflammation', *Biogerontology*, 14(6), pp. 651–662. Available at: https://doi.org/10.1007/s10522-013-9465-0.

Bukhari, N. *et al.* (2011) 'Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(42), pp. 14931–14943. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3339-11.2011.

Cabanillas, G. and Popescu-Martinez, A. (2016) 'N-Acetylcysteine for Relapsing Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: More Evidence of a Promising Drug', *American Journal of Therapeutics*, 23(5), pp. e1277-1279. Available at: https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000000386.

Calabresi, P. *et al.* (2000) 'Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory', *The European Journal of Neuroscience*, 12(3), pp. 1002–1012.

Campbell, B.C. V *et al.* (2018) 'Tenecteplase versus Alteplase before Thrombectomy for Ischemic Stroke.', *The New England journal of medicine*, 378(17), pp. 1573–1582. Available at: https://doi.org/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* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31053-0.

Candelario-Jalil, E., Dijkhuizen, R.M. and Magnus, T. (2022) 'Neuroinflammation, Stroke, Blood-Brain Barrier Dysfunction, and Imaging Modalities', *Stroke*, 53(5), pp. 1473–1486. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.122.036946.

Candelario-Jalil, E. and Paul, S. (2021) 'Impact of Aging and Comorbidities on Ischemic Stroke Outcomes in Preclinical Animal Models: A Translational Perspective', *Experimental neurology*, 335, p. 113494. Available at: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113494.

Cassé, F. *et al.* (2012) 'Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(15), pp. 5186–5199. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5296-11.2012.

Castellanos, M. *et al.* (2003) 'Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke', *Stroke*, 34(1), pp. 40–46.

Chamorro, Á. *et al.* (2016) 'Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation', *The Lancet. Neurology*, 15(8), pp. 869–881. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00114-9.

Chauhan, G. and Debette, S. (2016) 'Genetic Risk Factors for Ischemic and Hemorrhagic Stroke', *Current Cardiology Reports*, 18(12), p. 124. Available at: https://doi.org/10.1007/s11886-016-0804-z.

Chen, C. *et al.* (2010) 'Suppression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its downstream genes reduces acute hyperglycemia-enhanced hemorrhagic transformation in a rat model of cerebral ischemia', *Journal of Neuroscience Research*, 88(9), pp. 2046–2055. Available at: https://doi.org/10.1002/jnr.22361.

Chen, D. *et al.* (2020) 'Mouse Models of Autoimmune Diabetes: The Nonobese Diabetic (NOD) Mouse', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2128, pp. 87–92. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0385-7_6.

Chen, J. *et al.* (2011) 'Adverse effects of bone marrow stromal cell treatment of stroke in diabetic rats', *Stroke*, 42(12), pp. 3551–3558. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.627174.

Chen, R. *et al.* (2021) 'New Insight Into Neutrophils: A Potential Therapeutic Target for Cerebral Ischemia', *Frontiers in Immunology*, 12. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.692061 (Accessed: 25 August 2022).

Chen, Y. *et al.* (2003) 'Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(6), pp. 748–755. Available at: https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000071885.63724.20.

Cheng, T. *et al.* (2006) 'Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator–induced brain hemorrhage', *Nature Medicine*, 12(11), pp. 1278–1285. Available at: https://doi.org/10.1038/nm1498.

Chevilley, A. *et al.* (2015) 'Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, p. 415. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00415.

Chiasson, J.L. *et al.* (1998) 'The STOP-NIDDM Trial: an international study on the efficacy of an alpha-glucosidase inhibitor to prevent type 2 diabetes in a population with impaired glucose tolerance: rationale, design, and preliminary screening data. Study to Prevent Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus', *Diabetes Care*, 21(10), pp. 1720–1725. Available at: https://doi.org/10.2337/diacare.21.10.1720.

Chiba, T. and Umegaki, K. (2013) 'Pivotal roles of monocytes/macrophages in stroke', *Mediators of Inflammation*, 2013, p. 759103. Available at: https://doi.org/10.1155/2013/759103.

Christensen, J.O. *et al.* (2004) 'Population-based stepwise screening for unrecognised Type 2 diabetes is ineffective in general practice despite reliable algorithms', *Diabetologia*, 47(9), pp. 1566–1573. Available at: https://doi.org/10.1007/s00125-004-1496-2.

Christensen, L.R. and Macleod, C.M. (1945) 'A PROTEOLYTIC ENZYME OF SERUM: CHARACTERIZATION, ACTIVATION, AND REACTION WITH INHIBITORS', *The Journal of General Physiology*, 28(6), pp. 559–583. Available at: https://doi.org/10.1085/jgp.28.6.559.

Chu, Y.-W., Chen, P.-Y. and Lin, S.-K. (2020) 'Correlation between Immune-Inflammatory Markers and Clinical Features in Patients with Acute Ischemic Stroke', 29(4), p. 11.

Cipolla, M.J. *et al.* (2000) 'Postischemic attenuation of cerebral artery reactivity is increased in the presence of tissue plasminogen activator', *Stroke*, 31(4), pp. 940–945. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.31.4.940.

Clissold, B. *et al.* (2020) 'Current aspects of TIA management', *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 72, pp. 20–25. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.12.032.

Collen, D. and Lijnen, H.R. (1991) 'Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis', *Blood*, 78(12), pp. 3114–3124.

Coller, B.S. (1990) 'Platelets and thrombolytic therapy', *The New England Journal of Medicine*, 322(1), pp. 33–42. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJM199001043220107.

Collingridge, G.L., Kehl, S.J. and McLennan, H. (1983) 'Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus', *The Journal of Physiology*, 334, pp. 33–46. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014478.

Collins, R. *et al.* (2003) 'MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial', *Lancet (London, England)*, 361(9374), pp. 2005–2016. Available at: https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13636-7.

Copin, J.-C. and Gasche, Y. (2008) 'Effect of the duration of middle cerebral artery occlusion on the risk of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator injection in rats', *Brain Research*, 1243, pp. 161–166. Available at: https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.025.

Cordonnier, C. *et al.* (2017) 'Stroke in women — from evidence to inequalities', *Nature Reviews Neurology*, 13(9), pp. 521–532. Available at: https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.95.

Correa, F. *et al.* (2011) 'Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke', *The Journal of Experimental Medicine*, 208(6), pp. 1229–1242. Available at: https://doi.org/10.1084/jem.20101880.

Couret, D. *et al.* (2018) 'A hemorrhagic transformation model of mechanical stroke therapy with acute hyperglycemia in mice', *Journal of Comparative Neurology*, 526(6), pp. 1006–1016. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.24386.

Coutinho, J.M. *et al.* (2017) 'Combined Intravenous Thrombolysis and Thrombectomy vs Thrombectomy Alone for Acute Ischemic Stroke: A Pooled Analysis of the SWIFT and STAR Studies', *JAMA Neurology*, 74(3), p. 268. Available at: https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.5374.

Craige, S.M. *et al.* (2011) 'NADPH oxidase 4 promotes endothelial angiogenesis through endothelial nitric oxide synthase activation', *Circulation*, 124(6), pp. 731–740. Available at: https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.030775.

Cuzzocrea, S. *et al.* (2000) 'Beneficial effects of n-acetylcysteine on ischaemic brain injury', *British Journal of Pharmacology*, 130(6), pp. 1219–1226. Available at: https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703421.

Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J. (2004) 'Cell death: critical control points', *Cell*, 116(2), pp. 205–219. Available at: https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00046-7.

Daniels Gatward, L.F. *et al.* (2021) 'The use of mice in diabetes research: The impact of physiological characteristics, choice of model and husbandry practices', *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 38(12), p. e14711. Available at: https://doi.org/10.1111/dme.14711.

De Meyer, S.F. *et al.* (2011) 'Platelet glycoprotein Ibα is an important mediator of ischemic stroke in mice', *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 3(1), p. 9. Available at: https://doi.org/10.1186/2040-7378-3-9.

Deeds, M.C. *et al.* (2011) 'Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models', *Laboratory Animals*, 45(3), pp. 131–140. Available at: https://doi.org/10.1258/la.2010.010090.

Demchuk, A.M. *et al.* (2012) 'Prediction of haematoma growth and outcome in patients with intracerebral haemorrhage using the CT-angiography spot sign (PREDICT): a prospective observational study', *The Lancet Neurology*, 11(4), pp. 307–314. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70038-8.

Dennis, M.S. (2003) 'Outcome after brain haemorrhage', *Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)*, 16 Suppl 1, pp. 9–13. Available at: https://doi.org/10.1159/000069935.

Denorme, F. *et al.* (2016) 'ADAMTS13-mediated thrombolysis of t-PA-resistant occlusions in ischemic stroke in mice', *Blood*, 127(19), pp. 2337–2345. Available at: https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-662650.

Denorme, Frederik *et al.* (2016) 'Inhibition of Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Reduces Ischemic Brain Damage in Mice', *Stroke*, 47(9), pp. 2419–2422. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.014091.

Dietrich, W.D., Alonso, O. and Busto, R. (1993) 'Moderate hyperglycemia worsens acute blood-brain barrier injury after forebrain ischemia in rats', *Stroke*, 24(1), pp. 111–116. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.24.1.111.

Dirnagl, U., Iadecola, C. and Moskowitz, M.A. (1999) 'Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view', *Trends in Neurosciences*, 22(9), pp. 391–397. Available at: https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01401-0.

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

Docagne, F. *et al.* (1999) 'Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(11), pp. 1315–1324. Available at: https://doi.org/10.1096/fasebj.13.11.1315.

Docagne, F. *et al.* (2015) 'Understanding the Functions of Endogenous and Exogenous Tissue-Type Plasminogen Activator During Stroke', *Stroke*, 46(1), pp. 314–320. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.006698.

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

Dorado, L. *et al.* (2013) 'Hemorrhagic risk of emergent endovascular treatment plus stenting in patients with acute ischemic stroke', *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association*, 22(8), pp. 1326–1331. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2012.12.006.

Dreier, J.P. and Reiffurth, C. (2015) 'The stroke-migraine depolarization continuum', *Neuron*, 86(4), pp. 902–922. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.04.004.

Drieu, A. *et al.* (2018a) 'Anti-inflammatory treatments for stroke: from bench to bedside', *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 11, p. 1756286418789854. Available at: https://doi.org/10.1177/1756286418789854.

Drieu, A. *et al.* (2018b) 'Anti-inflammatory treatments for stroke: from bench to bedside', *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 11, p. 1756286418789854. Available at: https://doi.org/10.1177/1756286418789854.

Drieu, A., Lanquetin, A., Levard, D., Glavan, M., Campos, F., Quenault, A., Lemarchand, E., *et al.* (2020) 'Alcohol exposure-induced neurovascular inflammatory priming impacts ischemic stroke and is linked with brain perivascular macrophages', *JCI insight* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1172/jci.insight.129226.

Drieu, A., Lanquetin, A., Levard, D., Glavan, M., Campos, F., Quenault, A., Lemarchand, E., *et al.* (2020) 'Alcohol exposure-induced neurovascular inflammatory priming impacts ischemic stroke

and is linked with brain perivascular macrophages', *JCI insight*, 5(4), p. 129226. Available at: https://doi.org/10.1172/jci.insight.129226.

Drieu, A., Buendia, I., Levard, D., Hélie, P., Brodin, C., Vivien, D. and Rubio, M. (2020a) '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. Available at: https://doi.org/10.1007/s12975-019-00733-8.

Drieu, A., Buendia, I., Levard, D., Hélie, P., Brodin, C., Vivien, D. and Rubio, M. (2020b) '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. Available at: https://doi.org/10.1007/s12975-019-00733-8.

D'Souza, A. *et al.* (2021) 'Targeting the blood-brain barrier for the delivery of stroke therapies', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 171, pp. 332–351. Available at: https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.015.

Du, Y. *et al.* (2017) 'Differential subnetwork of chemokines/cytokines in human, mouse, and rat brain cells after oxygen–glucose deprivation', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(4), pp. 1425–1434. Available at: https://doi.org/10.1177/0271678X16656199.

Durukan, A. *et al.* (2009) 'Post-ischemic blood-brain barrier leakage in rats: one-week follow-up by MRI', *Brain Research*, 1280, pp. 158–165. Available at: https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.05.025.

Dzialowski, I. *et al.* (2007) 'Asymptomatic hemorrhage after thrombolysis may not be benign: prognosis by hemorrhage type in the Canadian alteplase for stroke effectiveness study registry', *Stroke*, 38(1), pp. 75–79. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000251644.76546.62.

East, E. *et al.* (2005) 'A role for the plasminogen activator system in inflammation and neurodegeneration in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis', *The American Journal of Pathology*, 167(2), pp. 545–554. Available at: https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62996-3.

East, E. *et al.* (2008) 'Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis (CREAE) in plasminogen activator inhibitor-1 knockout mice: the effect of fibrinolysis during neuroinflammation', *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 34(2), pp. 216–230. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00889.x.

Echeverry, R. *et al.* (2010) 'Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus', *Journal of Clinical Investigation*, 120(6), pp. 2194–2205. Available at: https://doi.org/10.1172/JCI41722.

Ekkert, A. *et al.* (2021) 'Ischemic Stroke Genetics: What Is New and How to Apply It in Clinical Practice?', *Genes*, 13(1), p. 48. Available at: https://doi.org/10.3390/genes13010048.

El Amki, M. and Wegener, S. (2017) 'Improving Cerebral Blood Flow after Arterial Recanalization: A Novel Therapeutic Strategy in Stroke', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), p. E2669. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms18122669.

Elbini Dhouib, I. *et al.* (2016) 'A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches', *Life Sciences*, 151, pp. 359–363. Available at: https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.003.

Elgebaly, M.M., Arreguin, J. and Storke, N. (2019) 'Targets, Treatments, and Outcomes Updates in Diabetic Stroke', *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 28(6), pp. 1413–1420. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.02.005.

Elmaraezy, A. *et al.* (2017) 'Desmoteplase for Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review and Metaanalysis of Randomized Controlled Trials', *CNS & neurological disorders drug targets*, 16(7), pp. 789–799. Available at: https://doi.org/10.2174/1871527315666161213110104.

Emeis, J.J. *et al.* (1997) 'An Endothelial Storage Granule for Tissue-Type Plasminogen Activator', *The Journal of Cell Biology*, 139(1), pp. 245–256. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.139.1.245.

Engelhardt, E. (2017) 'Apoplexy, cerebrovascular disease, and stroke: Historical evolution of terms and definitions', *Dementia & Neuropsychologia*, 11(4), pp. 449–453. Available at: https://doi.org/10.1590/1980-57642016dn11-040016.

Erdmann, E. *et al.* (2007) 'PROactive 07: pioglitazone in the treatment of type 2 diabetes: results of the PROactive study', *Vascular Health and Risk Management*, 3(4), pp. 355–370.

Ergul, A. *et al.* (2012) 'Cerebrovascular Complications of Diabetes: Focus on Stroke', *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 12(2), pp. 148–158.

Etiology of Stroke and Choice of Models - Paul R. Krafft, Emma L. Bailey, Tim Lekic, William B. Rolland, Orhan Altay, Jiping Tang, Joanna M. Wardlaw, John H. Zhang, Cathie L. M. Sudlow, 2012 (no date). Available at: https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1111/j.1747-4949.2012.00838.x?journalCode=wsoa (Accessed: 18 August 2019).

Fan, X. *et al.* (2012) 'A rat model of studying tissue-type plasminogen activator thrombolysis in ischemic stroke with diabetes', *Stroke*, 43(2), pp. 567–570. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.635250.

Fan, X. *et al.* (2013) 'Early Insulin Glycemic Control Combined With tPA Thrombolysis Reduces Acute Brain Tissue Damages In A Focal Embolic Stroke Model Of Diabetic Rats', *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 44(1), pp. 255–259. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.663476.

Fang, B. *et al.* (2007) 'Synergistic interactions between 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and imatinib in patients with chronic myeloid leukemia in blastic phase that is resistant to standard-dose imatinib', *Leukemia Research*, 31(10), pp. 1441–1444. Available at: https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.02.004.

Fang, H. *et al.* (2016) 'Compensatory patterns of collateral flow in stroke patients with unilateral and bilateral carotid stenosis', *BMC neurology*, 16, p. 39. Available at: https://doi.org/10.1186/s12883-016-0560-0.

Fang, M.C., Cutler, D.M. and Rosen, A.B. (2010) 'Trends in Thrombolytic Use for Ischemic Stroke in the United States', *Journal of hospital medicine : an official publication of the Society of Hospital Medicine*, 5(7), pp. 406–409. Available at: https://doi.org/10.1002/jhm.689.

Feigin, V.L. *et al.* (2014) 'Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010', *Lancet (London, England)*, 383(9913), pp. 245–254. Available at: https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)61953-4.

Feigin, V.L. *et al.* (2021) 'Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019', *The Lancet Neurology*, 20(10), pp. 795–820. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00252-0.

Fernández-Monreal, M. *et al.* (2004) 'Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator?', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 25(4), pp. 594–601. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mcn.2003.11.002.

Fiorelli, M. *et al.* (1999) 'Hemorrhagic transformation within 36 hours of a cerebral infarct: relationships with early clinical deterioration and 3-month outcome in the European Cooperative Acute Stroke Study I (ECASS I) cohort', *Stroke*, 30(11), pp. 2280–2284. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.30.11.2280.

Fisher, M. *et al.* (2009) 'Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations', *Stroke*, 40(6), pp. 2244–2250. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.541128.

Flavin, M. P., Zhao, G. and Ho, L.T. (2000) 'Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro', *Glia*, 29(4), pp. 347–354.

Flavin, M P, Zhao, G. and Ho, L.T. (2000) 'Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro.', *Glia*, 29(4), pp. 347–54.

Fonarow, G.C. *et al.* (2014) 'Door-to-Needle Times for Tissue Plasminogen Activator Administration and Clinical Outcomes in Acute Ischemic Stroke Before and After a Quality Improvement Initiative', *JAMA*, 311(16), p. 1632. Available at: https://doi.org/10.1001/jama.2014.3203.

Fox, G. *et al.* (1993) 'Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat', *Stroke*, 24(12), pp. 2087–2092; discussion 2092-2093. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.24.12.2087.

Fraser, P.A. (2011) 'The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability', *Free Radical Biology & Medicine*, 51(5), pp. 967–977. Available at: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.003.

Fredriksson, L. *et al.* (2004) 'Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC.', *The EMBO journal*, 23(19), pp. 3793–802. Available at: https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600397.

Fredriksson, L., Lawrence, D. and Medcalf, R. (2016a) 'tPA Modulation of the Blood–Brain Barrier: A Unifying Explanation for the Pleiotropic Effects of tPA in the CNS', *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 43(02), pp. 154–168. Available at: https://doi.org/10.1055/s-0036-1586229.

Fredriksson, L., Lawrence, D. and Medcalf, R. (2016b) 'tPA Modulation of the Blood–Brain Barrier: A Unifying Explanation for the Pleiotropic Effects of tPA in the CNS', *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 43(02), pp. 154–168. Available at: https://doi.org/10.1055/s-0036-1586229.

Fugate, J.E., Klunder, A.M. and Kallmes, D.F. (2013) 'What Is Meant by "TICI"?', *AJNR: American Journal of Neuroradiology*, 34(9), pp. 1792–1797. Available at: https://doi.org/10.3174/ajnr.A3496.

Furie, B. and Furie, B.C. (2008) 'Mechanisms of Thrombus Formation', *New England Journal of Medicine*, 359(9), pp. 938–949. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMra0801082.

Furlan, A.J. *et al.* (2006) 'Dose Escalation of Desmoteplase for Acute Ischemic Stroke (DEDAS): Evidence of Safety and Efficacy 3 to 9 Hours After Stroke Onset', *Stroke*, 37(5), pp. 1227–1231. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000217403.66996.6d.

Furlan, M. *et al.* (1996) 'Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra', *Annals of Neurology*, 40(2), pp. 216–226. Available at: https://doi.org/10.1002/ana.410400213.

Furman, B.L. (2015) 'Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats', *Current Protocols in Pharmacology*, 70, p. 5.47.1-5.47.20. Available at: https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70.

Furman, B.L. (2021) 'Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats', *Current Protocols*, 1(4), p. e78. Available at: https://doi.org/10.1002/cpz1.78.

de Gaetano, G. *et al.* (2016) 'Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document', *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*, 26(6), pp. 443–467. Available at: https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.03.007.

García-Culebras, A. *et al.* (2017) 'Toll-Like Receptor 4 Mediates Hemorrhagic Transformation After Delayed Tissue Plasminogen Activator Administration in In Situ Thromboembolic Stroke', *Stroke*, 48(6), pp. 1695–1699. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.015956.

García-Yébenes, I. *et al.* (2011) 'A Mouse Model of Hemorrhagic Transformation by Delayed Tissue Plasminogen Activator Administration After In Situ Thromboembolic Stroke', *Stroke*, 42(1), pp. 196–203. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.600452.

Garrido-Urbani, S. *et al.* (2011) 'Targeting Vascular NADPH Oxidase 1 Blocks Tumor Angiogenesis through a PPARα Mediated Mechanism', *PLOS ONE*, 6(2), p. e14665. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014665.

Gauberti, M. *et al.* (2013) 'Ultra-Sensitive Molecular MRI of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Reveals a Dynamic Inflammatory Penumbra After Strokes', *Stroke*, 44(7), pp. 1988–1996. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.000544.

Gauberti, M. *et al.* (2014) 'Lack of secondary microthrombosis after thrombin-induced stroke in mice and non-human primates', *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 12(3), pp. 409–414. Available at: https://doi.org/10.1111/jth.12487.

Gerhard, A. *et al.* (2000) 'In vivo imaging of activated microglia using [11C]PK11195 and positron emission tomography in patients after ischemic stroke', *Neuroreport*, 11(13), pp. 2957–2960. Available at: https://doi.org/10.1097/00001756-200009110-00025.

González, R.G. (2012) 'Clinical MRI of Acute Ischemic Stroke', *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 36(2), pp. 259–271. Available at: https://doi.org/10.1002/jmri.23595.

Gouix, E. *et al.* (2009) 'Reverse glial glutamate uptake triggers neuronal cell death through extrasynaptic NMDA receptor activation', *Molecular and Cellular Neurosciences*, 40(4), pp. 463–473. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.01.002.

Gracey, M., Burke, V. and Anderson, C.M. (1969) 'Treatment of abdominal pain in cystic fibrosis by oral administration of n-acetyl cysteine.', *Archives of Disease in Childhood*, 44(235), pp. 404–405.

Grilli, M. *et al.* (2000) 'Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage', *The European Journal of Neuroscience*, 12(7), pp. 2265–2272. Available at: https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00090.x.

Gurney, K.J., Estrada, E.Y. and Rosenberg, G.A. (2006) 'Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation', *Neurobiology of Disease*, 23(1), pp. 87–96. Available at: https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.02.006.

Gürsoy-Ozdemir, Y., Can, A. and Dalkara, T. (2004) 'Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia', *Stroke*, 35(6), pp. 1449–1453. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000126044.83777.f4.

Gveric, D. *et al.* (2001) 'Plasminogen activators in multiple sclerosis lesions: implications for the inflammatory response and axonal damage', *Brain: A Journal of Neurology*, 124(Pt 10), pp. 1978–1988. Available at: https://doi.org/10.1093/brain/124.10.1978.

Gveric, D. *et al.* (2003) 'Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors', *Brain: A Journal of Neurology*, 126(Pt 7), pp. 1590–1598. Available at: https://doi.org/10.1093/brain/awg167.

Hacke, W. *et al.* (2005) 'The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial (DIAS): A Phase II MRI-Based 9-Hour Window Acute Stroke Thrombolysis Trial With Intravenous Desmoteplase', *Stroke*, 36(1), pp. 66–73. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000149938.08731.2c.

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. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804656.

Hacke, W. *et al.* (2009) 'Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion-diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2): a prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study', *The Lancet. Neurology*, 8(2), pp. 141–150. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70267-9.

Haelewyn, B., Risso, J.-J. and Abraini, J.H. (2010) 'Human recombinant tissue-plasminogen activator (alteplase): why not use the 'human' dose for stroke studies in rats?', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30(5), pp. 900–903. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.33.

Haley, P.J. (2003) 'Species differences in the structure and function of the immune system', *Toxicology*, 188(1), pp. 49–71.

Han, D., Liu, H. and Gao, Y. (2020) 'The role of peripheral monocytes and macrophages in ischemic stroke', *Neurological Sciences*, 41(12), pp. 3589–3607. Available at: https://doi.org/10.1007/s10072-020-04777-9.

Harris, R.J. *et al.* (1991) 'Tissue plasminogen activator has an O-linked fucose attached to threonine-61 in the epidermal growth factor domain.', *Biochemistry*, 30(9), pp. 2311–4. Available at: https://doi.org/10.1021/bi00223a004.

He, F.J., Nowson, C.A. and MacGregor, G.A. (2006) 'Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies', *The Lancet*, 367(9507), pp. 320–326. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68069-0.

Head, B.P. *et al.* (2009) 'Inhibition of p75 neurotrophin receptor attenuates isoflurane-mediated neuronal apoptosis in the neonatal central nervous system.', *Anesthesiology*, 110(4), pp. 813–25. Available at: https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31819b602b.

Hébert, M. *et al.* (2016) 'The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA)', *Revue Neurologique*, 172(3), pp. 186–197. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.10.002.

Hébert, M. *et al.* (2017) 'Distant Space Processing is Controlled by tPA-dependent NMDA Receptor Signaling in the Entorhinal Cortex', *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 27(10), pp. 4783–4796. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhw275.

Hedin, S.G. (1903) 'On the presence of a proteolytic enzyme in the normal serum of the ox', *The Journal of Physiology*, 30(2), pp. 195–201. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.1903.sp000989.

Heo, J.H. *et al.* (1999) 'Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the*

International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 19(6), pp. 624–633. Available at: https://doi.org/10.1097/00004647-199906000-00005.

Hermann, D.M. and Chopp, M. (2012) 'Promoting brain remodelling and plasticity for stroke recovery: therapeutic promise and potential pitfalls of clinical translation', *The Lancet. Neurology*, 11(4), pp. 369–380. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70039-X.

Herson, P.S. and Hurn, P.D. (2010) 'Gender and the injured brain', *Progress in Brain Research*, 186, pp. 177–187. Available at: https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53630-3.00012-9.

Herson, P.S. and Traystman, R.J. (2014) 'Animal models of stroke: translational potential at present and in 2050', *Future Neurology*, 9(5), pp. 541–551. Available at: https://doi.org/10.2217/fnl.14.44.

Hickey, W.F., Vass, K. and Lassmann, H. (1992) 'Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 51(3), pp. 246–256. Available at: https://doi.org/10.1097/00005072-199205000-00002.

Hino, H. *et al.* (2001) 'Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor-1 in rat and human brain tissues', *Neuroscience Letters*, 297(2), pp. 105–108. Available at: https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01679-7.

Hjort, N. *et al.* (2008) 'MRI detection of early blood-brain barrier disruption: parenchymal enhancement predicts focal hemorrhagic transformation after thrombolysis', *Stroke*, 39(3), pp. 1025–1028. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.497719.

Hong, L. *et al.* (2019) 'The blood pressure paradox in acute ischemic stroke', *Annals of Neurology*, 85(3), pp. 331–339. Available at: https://doi.org/10.1002/ana.25428.

Hossmann, K.-A. (2012) 'The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(7), pp. 1310–1316. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.186.

Howard, G. *et al.* (2016) 'Differences in the role of black race and stroke risk factors for first vs recurrent stroke', *Neurology*, 86(7), pp. 637–642. Available at: https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002376.

Hoylaerts, M. *et al.* (1982) 'Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin', *The Journal of Biological Chemistry*, 257(6), pp. 2912–2919.

Hoylaerts, M *et al.* (1982) 'Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin.', *The Journal of biological chemistry*, 257(6), pp. 2912–9.

Hoyte, L., Kaur, J. and Buchan, A.M. (2004) 'Lost in translation: taking neuroprotection from animal models to clinical trials', *Experimental Neurology*, 188(2), pp. 200–204. Available at: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.05.008.

Hu, K. *et al.* (2006) 'Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression', *The Journal of Biological Chemistry*, 281(4), pp. 2120–2127. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M504988200.

Hu, X. *et al.* (2015) 'Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair', *Nature Reviews. Neurology*, 11(1), pp. 56–64. Available at: https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.207.

Huang, Y.Y. *et al.* (1996) 'Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(16), pp. 8699–8704. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8699.

Huber, D. (2002) 'Tissue-type plasminogen activator (t-PA) is stored in Weibel-Palade bodies in human endothelial cells both in vitro and in vivo', *Blood*, 99(10), pp. 3637–3645. Available at: https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3637.

Hultman, K. *et al.* (2008) 'Retinoids and activation of PKC induce tissue-type plasminogen activator expression and storage in human astrocytes', *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 6(10), pp. 1796–1803. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03084.x.

Huntington, J.A., Read, R.J. and Carrell, R.W. (2000) 'Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation.', *Nature*, 407(6806), pp. 923–6. Available at: https://doi.org/10.1038/35038119.

Hurtado, M. *et al.* (2007) 'Activation of the epidermal growth factor signalling pathway by tissue plasminogen activator in pancreas cancer cells', *Gut*, 56(9), pp. 1266–1274. Available at: https://doi.org/10.1136/gut.2006.097188.

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

Iglesias-Rey, R. *et al.* (2022) 'Neurological Instability in Ischemic Stroke: Relation with Outcome, Latency Time, and Molecular Markers', *Translational Stroke Research*, 13(2), pp. 228–237. Available at: https://doi.org/10.1007/s12975-021-00924-2.

Ismael, M.A. *et al.* (2008) 'Blockade of sensory abnormalities and kinin B1 receptor expression by N-Acetyl-l-Cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance', *European Journal of Pharmacology*, 589(1), pp. 66–72. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.05.006.

Ito, M. *et al.* (2001) 'Characterization of low dose streptozotocin-induced progressive diabetes in mice', *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 9(3), pp. 71–78. Available at: https://doi.org/10.1016/s1382-6689(00)00064-8.

Jackson, S.P., Nesbitt, W.S. and Westein, E. (2009) 'Dynamics of platelet thrombus formation', *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 7 Suppl 1, pp. 17–20. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03401.x.

Jang, I.K. *et al.* (1989) 'Differential sensitivity of erythrocyte-rich and platelet-rich arterial thrombi to lysis with recombinant tissue-type plasminogen activator. A possible explanation for resistance to coronary thrombolysis.', *Circulation*, 79(4), pp. 920–928. Available at: https://doi.org/10.1161/01.CIR.79.4.920.

Jauch, E.C. *et al.* (2013) 'Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association', *Stroke*, 44(3), pp. 870–947. Available at: https://doi.org/10.1161/STR.0b013e318284056a.

Jeanneret, V. *et al.* (2016) 'Tissue-type Plasminogen Activator (tPA) Modulates the Postsynaptic Response of Cerebral Cortical Neurons to the Presynaptic Release of Glutamate', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9, p. 121. Available at: https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00121.

Jeanneret, V. *et al.* (2018) 'Tissue-type plasminogen activator protects the postsynaptic density in the ischemic brain', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 38(11), pp. 1896–1910. Available at: https://doi.org/10.1177/0271678X18764495.

Jian, Z. *et al.* (2019) 'The Involvement and Therapy Target of Immune Cells After Ischemic Stroke', *Frontiers in Immunology*, 10. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02167 (Accessed: 25 August 2022).

Jiang, Y., Han, J., *et al.* (2021) 'Diabetes mellitus: A common comorbidity increasing hemorrhagic transformation after tPA thrombolytic therapy for ischemic stroke', *Brain Hemorrhages*, 2(3), pp. 116–123. Available at: https://doi.org/10.1016/j.hest.2020.11.004.

Jiang, Y., Liu, N., *et al.* (2021) 'Diabetes Mellitus/Poststroke Hyperglycemia: a Detrimental Factor for tPA Thrombolytic Stroke Therapy', *Translational Stroke Research*, 12(3), pp. 416–427. Available at: https://doi.org/10.1007/s12975-020-00872-3.

Jickling, G.C. *et al.* (2014) 'Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 34(2), pp. 185–199. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.203.

Johnson, C.O. *et al.* (2019) 'Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016', *The Lancet Neurology*, 18(5), pp. 439–458. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30034-1.

Kaesmacher, J. *et al.* (2018a) 'Rates and Quality of Preinterventional Reperfusion in Patients With Direct Access to Endovascular Treatment', *Stroke*, 49(8), pp. 1924–1932. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.021579.

Kaesmacher, J. *et al.* (2018b) 'Rates and Quality of Preinterventional Reperfusion in Patients With Direct Access to Endovascular Treatment', *Stroke*, 49(8), pp. 1924–1932. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.021579.

Kaesmacher, J. *et al.* (2019) 'Direct mechanical thrombectomy in tPA-ineligible and -eligible patients versus the bridging approach: a meta-analysis', *Journal of NeuroInterventional Surgery*, 11(1), pp. 20–27. Available at: https://doi.org/10.1136/neurintsurg-2018-013834.

Kagitani, H. *et al.* (1985) 'Expression in *E. coli* of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity', *FEBS Letters*, 189(1), pp. 145–149. Available at: https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80860-7.

Kanazawa, M. *et al.* (2011) 'Inhibition of VEGF signaling pathway attenuates hemorrhage after tPA treatment', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(6), pp. 1461–1474. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.9.

Kaneto, H. *et al.* (2001) 'Activation of the Hexosamine Pathway Leads to Deterioration of Pancreatic β-Cell Function through the Induction of Oxidative Stress*', *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), pp. 31099–31104. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M104115200.

Kapral, M.K. *et al.* (2005) 'Sex differences in stroke care and outcomes: results from the Registry of the Canadian Stroke Network', *Stroke*, 36(4), pp. 809–814. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000157662.09551.e5.

Káradóttir, R. *et al.* (2005) 'NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia', *Nature*, 438(7071), pp. 1162–1166. Available at: https://doi.org/10.1038/nature04302.

Karatas, H. *et al.* (2011a) 'Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl3 application: a novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis studies', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(6), pp. 1452–1460. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.8.

Karatas, H. *et al.* (2011b) 'Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl3 application: a novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis studies', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(6), pp. 1452–1460. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.8.

Karuppagounder, S.S. *et al.* (2018) 'N-acetylcysteine targets 5 lipoxygenase-derived, toxic lipids and can synergize with prostaglandin E2 to inhibit ferroptosis and improve outcomes following hemorrhagic stroke in mice', *Annals of Neurology*, 84(6), pp. 854–872. Available at: https://doi.org/10.1002/ana.25356.

Kasner, S.E. (2006) 'Clinical interpretation and use of stroke scales', *The Lancet Neurology*, 5(7), pp. 603–612. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70495-1.

Katsanos, A.H. *et al.* (2021) 'Intravenous Thrombolysis With Tenecteplase in Patients With Large Vessel Occlusions: Systematic Review and Meta-Analysis', *Stroke*, 52(1), pp. 308–312. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.030220.

Kernan, W.N. *et al.* (2013) 'Obesity', *Stroke*, 44(1), pp. 278–286. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.639922.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) 'Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics', *British Journal of Cancer*, 26(4), pp. 239–257. Available at: https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33.

Khan, M. *et al.* (2004) 'Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke', *Journal of Neuroscience Research*, 76(4), pp. 519–527. Available at: https://doi.org/10.1002/jnr.20087.

Khan, M.A. *et al.* (2016) 'Hyperglycemia in Stroke Impairs Polarization of Monocytes/Macrophages to a Protective Noninflammatory Cell Type', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(36), pp. 9313–9325. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0473-16.2016.

Khoshnam, S.E. *et al.* (2017) 'Pathogenic mechanisms following ischemic stroke', *Neurological sciences*, 38(7), pp. 1167–1186. Available at: https://doi.org/10.1007/s10072-017-2938-1.

Kilkenny, C. *et al.* (2010) 'Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research', *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 1(2), pp. 94–99. Available at: https://doi.org/10.4103/0976-500X.72351.

Kim, H.-K. *et al.* (2003) 'Inhibition of endothelial cell proliferation by the recombinant kringle domain of tissue-type plasminogen activator.', *Biochemical and biophysical research communications*, 304(4), pp. 740–6. Available at: https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00656-9.

Kim, J. *et al.* (2016) 'Direct Thrombus Imaging in Stroke', *Journal of Stroke*, 18(3), pp. 286–296. Available at: https://doi.org/10.5853/jos.2016.00906.

Kim, J.-T. *et al.* (2018) 'Impact of Hyperglycemia According to the Collateral Status on Outcomes in Mechanical Thrombectomy', *Stroke*, 49(11), pp. 2706–2714. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.022167.

King, A.J.F. (2012) 'The use of animal models in diabetes research', *British Journal of Pharmacology*, 166(3), pp. 877–894. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x.

Knipe, L. *et al.* (2010) 'A revised model for the secretion of tPA and cytokines from cultured endothelial cells', *Blood*, 116(12), pp. 2183–2191. Available at: https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-276170.

Koizumi, J. *et al.* (1986) 'Experimental studies of ischemic brain edema', *Nosotchu*, 8(1), pp. 1–8. Available at: https://doi.org/10.3995/jstroke.8.1.

Kolb, H. (1987) 'Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice', *Diabetes/Metabolism Reviews*, 3(3), pp. 751–778. Available at: https://doi.org/10.1002/dmr.5610030308.

Krebs, C. *et al.* (2003) 'Functional NMDA receptor subtype 2B is expressed in astrocytes after ischemia in vivo and anoxia in vitro', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(8), pp. 3364–3372.

Kreutzberg, G.W. (1996) 'Microglia: a sensor for pathological events in the CNS', *Trends in Neurosciences*, 19(8), pp. 312–318.

Krueger, K. and Busch, E. (2002) 'Protocol of a thromboembolic stroke model in the rat: review of the experimental procedure and comparison of models', *Investigative Radiology*, 37(11), pp. 600–608. Available at: https://doi.org/10.1097/00004424-200211000-00003.

Kudo, K., Zhao, L. and Nowak, T.S. (2016) 'Peri-infarct depolarizations during focal ischemia in the awake Spontaneously Hypertensive Rat. Minimizing anesthesia confounds in experimental stroke', *Neuroscience*, 325, pp. 142–152. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.049.

Kuiper, J. *et al.* (1988) 'Characterization of the interaction in vivo of tissue-type plasminogen activator with liver cells.', *The Journal of biological chemistry*, 263(34), pp. 18220–4.

Kuiper, J. *et al.* (1996) 'Interaction of mutants of tissue-type plasminogen activator with liver cells: effect of domain deletions.', *The Biochemical journal*, 313 (Pt 3)(3), pp. 775–80. Available at: https://doi.org/10.1042/bj3130775.

Kumari, R. and Sinha, K. (2021) 'Neutrophil in diabetic stroke: emerging therapeutic strategies', *Neural Regeneration Research*, 16(11), pp. 2206–2208. Available at: https://doi.org/10.4103/1673-5374.310677.

von Kummer, R. *et al.* (2016) 'Desmoteplase 3 to 9 Hours After Major Artery Occlusion Stroke: The DIAS-4 Trial (Efficacy and Safety Study of Desmoteplase to Treat Acute Ischemic Stroke)', *Stroke*, 47(12), pp. 2880–2887. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.013715.

Kuroiwa, T. *et al.* (1985) 'Role of extracellular proteins in the dynamics of vasogenic brain edema', *Acta Neuropathologica*, 66(1), pp. 3–11. Available at: https://doi.org/10.1007/BF00698288.

Kurth, T. *et al.* (2002) 'Body Mass Index and the Risk of Stroke in Men', *Archives of Internal Medicine*, 162(22), p. 2557. Available at: https://doi.org/10.1001/archinte.162.22.2557.

Kvajo, M. *et al.* (2004) 'Regulation of Brain Proteolytic Activity Is Necessary for the In Vivo Function of NMDA Receptors', *Journal of Neuroscience*, 24(43), pp. 9734–9743. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3306-04.2004.

Kvistad, C.E. *et al.* (2022) 'Tenecteplase versus alteplase for the management of acute ischaemic stroke in Norway (NOR-TEST 2, part A): a phase 3, randomised, open-label, blinded endpoint, non-inferiority trial', *The Lancet. Neurology*, 21(6), pp. 511–519. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00124-7.

Lapchak, P.A. *et al.* (2002) 'Effects of the Spin Trap Agent Disodium- [tert-butylimino)methyl]benzene-1,3-disulfonate N-Oxide (Generic NXY-059) on Intracerebral

Hemorrhage in a Rabbit Large Clot Embolic Stroke Model', *Stroke*, 33(6), pp. 1665–1670. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000017145.22806.AA.

Lapergue, B. *et al.* (2018) 'First-line use of contact aspiration for thrombectomy versus a stent retriever for recanalization in acute cerebral infarction: The randomized ASTER study protocol', *International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society*, 13(1), pp. 87–95. Available at: https://doi.org/10.1177/1747493017711948.

Larsson, S.C. *et al.* (2016) 'Differing association of alcohol consumption with different stroke types: a systematic review and meta-analysis', *BMC medicine*, 14(1), p. 178. Available at: https://doi.org/10.1186/s12916-016-0721-4.

Le Behot, A. *et al.* (2014) 'GpIbα-VWF blockade restores vessel patency by dissolving platelet aggregates formed under very high shear rate in mice', *Blood*, 123(21), pp. 3354–3363. Available at: https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-543074.

Lebrun, F. *et al.* (2022) 'Post-acute delivery of α5-GABAA antagonist, S 44819, improves functional recovery in juvenile rats following stroke', *Experimental Neurology*, 347, p. 113881. Available at: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113881.

Lee, H.-Y. *et al.* (2007a) 'Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons', *Journal of Neurochemistry*, 101(5), pp. 1236–1247. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04417.x.

Lee, H.-Y. *et al.* (2007b) 'Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons.', *Journal of neurochemistry*, 101(5), pp. 1236–47. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04417.x.

Lee, S.H. *et al.* (2014) 'tPA Regulates Neurite Outgrowth by Phosphorylation of LRP5/6 in Neural Progenitor Cells', *Molecular Neurobiology*, 49(1), pp. 199–215. Available at: https://doi.org/10.1007/s12035-013-8511-x.

Lemarchand, E. *et al.* (2016) 'Stressed neurons protect themselves by a tissue-type plasminogen activator-mediated EGFR-dependent mechanism', *Cell Death & Differentiation*, 23(1), pp. 123–131. Available at: https://doi.org/10.1038/cdd.2015.76.

Lemarchant, S. *et al.* (2014) 'tPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury', *Neurobiology of Disease*, 66, pp. 28–42. Available at: https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.02.005.

Lenglet, S. *et al.* (2014) 'Recombinant Tissue Plasminogen Activator Enhances Microglial Cell Recruitment after Stroke in Mice', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34(5), pp. 802–812. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.9.

Lenoir, S. *et al.* (2019) 'Post-synaptic Release of the Neuronal Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA)', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00164.

Leonetti, C. *et al.* (2017) 'Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination', *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), p. 20. Available at: https://doi.org/10.1186/s13024-017-0160-5.

Lesept, F. *et al.* (2016) 'Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors', *Cell Death & Disease*, 7(11), pp. e2466–e2466. Available at: https://doi.org/10.1038/cddis.2016.279.

Lewandowski, S.A. *et al.* (2016) 'Pharmacological targeting of the PDGF-CC signaling pathway for blood-brain barrier restoration in neurological disorders', *Pharmacology & Therapeutics*, 167, pp. 108–119. Available at: https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.07.016.

Li, H. *et al.* (2000) 'Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats', *Stroke*, 31(1), pp. 176–182. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.31.1.176.

Li, W. *et al.* (2013) 'Comparative analysis of the neurovascular injury and functional outcomes in experimental stroke models in diabetic Goto-Kakizaki rats', *Brain Research*, 1541, pp. 106–114. Available at: https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.10.021.

Li, W.A. *et al.* (2013) 'Hyperglycemia in stroke and possible treatments', *Neurological Research*, 35(5), pp. 479–491. Available at: https://doi.org/10.1179/1743132813Y.0000000209.

Li, Y. and Zhang, J. (2021) 'Animal models of stroke', *Animal Models and Experimental Medicine*, 4(3), pp. 204–219. Available at: https://doi.org/10.1002/ame2.12179.

Liebeskind, D.S. *et al.* (2011) 'CT and MRI early vessel signs reflect clot composition in acute stroke', *Stroke*, 42(5), pp. 1237–1243. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.605576.

Lijnen, H.R. (2001) 'Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling', *Thrombosis and Haemostasis*, 86(1), pp. 324–333.

Lillibridge, C.B., Docter, J.M. and Eidelman, S. (1967) 'Oral administration of n-acetyl cysteine in the prophylaxis of "meconium ileus equivalent"', *The Journal of Pediatrics*, 71(6), pp. 887–889. Available at: https://doi.org/10.1016/s0022-3476(67)80019-2.

Lindauer, U. (2016) 'Ethics of Modeling of Cerebral Ischemia in Small Animals', in U. Dirnagl (ed.) *Rodent Models of Stroke*. New York, NY: Springer New York (Neuromethods), pp. 279–290. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-5620-3_17.

Lindenstrøm, E., Boysen, G. and Nyboe, J. (1993) 'Lifestyle factors and risk of cerebrovascular disease in women. The Copenhagen City Heart Study.', *Stroke*, 24(10), pp. 1468–72.

Lindsberg, P.J. and Roine, R.O. (2004a) 'Hyperglycemia in Acute Stroke', *Stroke*, 35(2), pp. 363–364. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000115297.92132.84.

Lindsberg, P.J. and Roine, R.O. (2004b) 'Hyperglycemia in Acute Stroke', *Stroke*, 35(2), pp. 363–364. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000115297.92132.84.

Liot, G. *et al.* (2006) 'Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity', *Journal of Neurochemistry*, 98(5), pp. 1458–1464. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03982.x.

Liu, D. *et al.* (2004) 'Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C', *Nature Medicine*, 10(12), pp. 1379–1383. Available at: https://doi.org/10.1038/nm1122.

Liu, J. *et al.* (2012) 'Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(9), pp. 3044–3057. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6409-11.2012.

L.L.Yeo, L. and Sharma, V.K. (2013) 'The Quest for Arterial Recanalization in Acute Ischemic Stroke-The Past, Present and the Future', *Journal of Clinical Medicine Research*, 5(4), pp. 251–265. Available at: https://doi.org/10.4021/jocmr1342w.

Lo, E.H. (2008) 'A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke', *Nature Medicine*, 14(5), pp. 497–500. Available at: https://doi.org/10.1038/nm1735.

Lo, J.W. *et al.* (2020) 'Association of Prediabetes and Type 2 Diabetes With Cognitive Function After Stroke', *Stroke*, 51(6), pp. 1640–1646. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.028428.

Lochner, Janis E. *et al.* (2006) 'Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging', *Journal of Neurobiology*, 66(6), pp. 564–577. Available at: https://doi.org/10.1002/neu.20250.

Lochner, Janis E *et al.* (2006) 'Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging.', *Journal of neurobiology*, 66(6), pp. 564–77. Available at: https://doi.org/10.1002/neu.20250.

Lockwood, C.J. and Schatz, F. (1996) 'A biological model for the regulation of peri-implantational hemostasis and menstruation', *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 3(4), pp. 159–165.

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. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30253-3.

Lopatkiewicz, A.M. *et al.* (2020) 'Glucocorticoid Resistance is Associated with Poor Functional Outcome After Stroke', *Cellular and Molecular Neurobiology*, 40(8), pp. 1321–1326. Available at: https://doi.org/10.1007/s10571-020-00818-1.

Lopes Pinheiro, M.A. *et al.* (2016) 'Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1862(3), pp. 461–471. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.018.

López, J.A. and Chen, J. (2009) 'Pathophysiology of venous thrombosis', *Thrombosis Research*, 123, pp. S30–S34. Available at: https://doi.org/10.1016/S0049-3848(09)70140-9.

López-Atalaya, J.P. *et al.* (2007) 'Recombinant *Desmodus rotundus* Salivary Plasminogen Activator Crosses the Blood–Brain Barrier Through a Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-Dependent Mechanism Without Exerting Neurotoxic Effects', *Stroke*, 38(3), pp. 1036–1043. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000258100.04923.84.

Lopez-Atalaya, J.P. *et al.* (2008) 'Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(6), pp. 1212–21. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.14.

Louessard, M. *et al.* (2016) 'Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons', *Molecular Neurobiology*, 53(7), pp. 5000–5012. Available at: https://doi.org/10.1007/s12035-015-9432-7.

Louet, E.R. *et al.* (2022) 'tPA-NMDAR Signaling Blockade Reduces the Incidence of Intracerebral Aneurysms', *Translational Stroke Research* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1007/s12975-022-01004-9.

Lu, A. *et al.* (2008) 'Reperfusion activates metalloproteinases that contribute to neurovascular injury', *Experimental Neurology*, 210(2), pp. 549–559. Available at: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.12.003.

Lu, A. *et al.* (2009) 'Mechanical reperfusion is associated with post-ischemic hemorrhage in rat brain', *Experimental neurology*, 216(2), pp. 407–412. Available at: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.12.020.

Lu, P. *et al.* (2011) 'Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), pp. a005058–a005058. Available at: https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058.

Lu, W., Bhasin, M. and Tsirka, S.E. (2002) 'Involvement of tissue plasminogen activator in onset and effector phases of experimental allergic encephalomyelitis', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(24), pp. 10781–10789.

Lueckgen, A. (2021) 'Animal models of T1D', *Nature Research* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1038/d42859-021-00007-0.

Ma, G. *et al.* (2021) 'Neuroinflammation in hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator thrombolysis: Potential mechanisms, targets, therapeutic drugs and biomarkers', *International Immunopharmacology*, 90, p. 107216. Available at: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107216.

de Maat, S. *et al.* (2022) 'Microlyse: a thrombolytic agent that targets VWF for clearance of microvascular thrombosis', *Blood*, 139(4), pp. 597–607. Available at: https://doi.org/10.1182/blood.2021011776.

MacDougall, N.J.J. and Muir, K.W. (2011) 'Hyperglycaemia and infarct size in animal models of middle cerebral artery occlusion: systematic review and meta-analysis', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(3), pp. 807–818. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.210.

Macfarlane, R.G. and Biggs, R. (1948) 'Fibrinolysis; its mechanism and significance', *Blood*, 3(10), pp. 1167–1187.

Macrae, I.M. (2016) 'Focal Ischemia Models: Middle Cerebral Artery Occlusion Induced by Electrocoagulation, Occluding Devices, and Endothelin-1', in U. Dirnagl (ed.) *Rodent Models of Stroke*. New York, NY: Springer New York (Neuromethods), pp. 45–58. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-5620-3_5.

Macrez, R. *et al.* (2011) 'Antibodies Preventing the Interaction of Tissue-Type Plasminogen Activator With N-Methyl- D -Aspartate Receptors Reduce Stroke Damages and Extend the Therapeutic Window of Thrombolysis', *Stroke*, 42(8), pp. 2315–2322. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.606293.

Macrez, R. *et al.* (2016) 'Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis', *Brain*, 139(9), pp. 2406–2419. Available at: https://doi.org/10.1093/brain/aww172.

Madani, R. *et al.* (1999) 'Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice', *The EMBO Journal*, 18(11), pp. 3007–3012. Available at: https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.3007.

Maeda, K. *et al.* (2000) 'Quantitative measurement of local cerebral blood flow in the anesthetized mouse using intraperitoneal [14C]iodoantipyrine injection and final arterial heart blood sampling', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(1), pp. 10–14. Available at: https://doi.org/10.1097/00004647-200001000-00003.

Maïer, B., Desilles, J.P. and Mazighi, M. (2020) 'Intracranial Hemorrhage After Reperfusion Therapies in Acute Ischemic Stroke Patients', *Frontiers in Neurology*, 11. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2020.599908 (Accessed: 24 August 2022).

Marchal, G., Young, A.R. and Baron, J.C. (1999) 'Early postischemic hyperperfusion: pathophysiologic insights from positron emission tomography', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 19(5), pp. 467–482. Available at: https://doi.org/10.1097/00004647-199905000-00001.

Marder, V.J. (2011) 'Historical perspective and future direction of thrombolysis research: the re-discovery of plasmin', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(s1), pp. 364–373. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04370.x.

Marenco, J.P. and Frye, R.E. (2019) 'The Clinical Use of N-Acetylcysteine in Cardiology', in R.E. Frye and M. Berk (eds) *The Therapeutic Use of N-Acetylcysteine (NAC) in Medicine*. Singapore: Springer, pp. 277–287. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-10-5311-5_16.

Martin, A.M. *et al.* (2008) 'The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 beta-chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(18), pp. 12004–12013. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M707607200.

Martin, R.L., Lloyd, H.G. and Cowan, A.I. (1994) 'The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?', *Trends in Neurosciences*, 17(6), pp. 251–257. Available at: https://doi.org/10.1016/0166-2236(94)90008-6.

Martinez de Lizarrondo, S. *et al.* (2017) 'Potent Thrombolytic Effect of *N* -Acetylcysteine on Arterial Thrombi', *Circulation*, 136(7), pp. 646–660. Available at: https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027290.

Masrur, S. *et al.* (2015) 'Association of Acute and Chronic Hyperglycemia With Acute Ischemic Stroke Outcomes Post-Thrombolysis: Findings From Get With The Guidelines-Stroke', *Journal of the American Heart Association* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002193.

Masrur, S. *et al.* (no date) 'Association of Acute and Chronic Hyperglycemia With Acute Ischemic Stroke Outcomes Post-Thrombolysis: Findings From Get With The Guidelines-Stroke', *Journal of the American Heart Association*, 4(10), p. e002193. Available at: https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002193.

Matarin, M. *et al.* (2008) 'Whole genome analyses suggest ischemic stroke and heart disease share an association with polymorphisms on chromosome 9p21', *Stroke*, 39(5), pp. 1586–1589. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.502963.

Matsumoto, T. *et al.* (1997) 'Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to interleukin-8', *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 77(2), pp. 119–125.

Matys, T. *et al.* (2004) 'Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(46), pp. 16345–16350. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.0407355101.

McBride, D.W. *et al.* (2016) 'Acute Hyperglycemia Is Associated with Immediate Brain Swelling and Hemorrhagic Transformation After Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats', in R.L. Applegate et al. (eds) *Brain Edema XVI: Translate Basic Science into Clinical Practice*. Cham: Springer International Publishing (Acta Neurochirurgica Supplement), pp. 237–241. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-18497-5_42.

McColl, B.W. *et al.* (2004) 'Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice', *Brain Research*, 997(1), pp. 15–23. Available at: https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.10.028.

McCormick, M.T. *et al.* (2008) 'Management of Hyperglycemia in Acute Stroke', *Stroke*, 39(7), pp. 2177–2185. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.496646.

Medved, L. and Nieuwenhuizen, W. (2003) 'Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin', *Thrombosis and Haemostasis*, 89(03), pp. 409–419. Available at: https://doi.org/10.1055/s-0037-1613368.

Mehra, A. *et al.* (2016) 'The plasminogen activation system in neuroinflammation', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862(3), pp. 395–402. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.011.

Mehra, A. *et al.* (2020) 'Nonionotropic Action of Endothelial NMDA Receptors on Blood–Brain Barrier Permeability via Rho/ROCK-Mediated Phosphorylation of Myosin', *The Journal of Neuroscience*, 40(8), pp. 1778–1787. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0969-19.2019.

Menon, B.K. *et al.* (2022) 'Intravenous tenecteplase compared with alteplase for acute ischaemic stroke in Canada (AcT): a pragmatic, multicentre, open-label, registry-linked, randomised, controlled, non-inferiority trial', *Lancet (London, England)*, 400(10347), pp. 161–169. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01054-6.

Meschia, J.F. and Brott, T. (2018) 'Ischaemic stroke', *European Journal of Neurology*, 25(1), pp. 35–40. Available at: https://doi.org/10.1111/ene.13409.

Messé, S.R. *et al.* (2016) 'Why are acute ischemic stroke patients not receiving IV tPA?: Results from a national registry', *Neurology*, 87(15), pp. 1565–1574. Available at: https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003198.

Mi, D. *et al.* (2018) 'Correlation of hyperglycemia with mortality after acute ischemic stroke', *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 11, p. 1756285617731686. Available at: https://doi.org/10.1177/1756285617731686.

Mican, J. *et al.* (2019) 'Structural Biology and Protein Engineering of Thrombolytics', *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, pp. 917–938. Available at: https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.06.023.

Minor, K., Phillips, J. and Seeds, N.W. (2009) 'Tissue plasminogen activator promotes axonal outgrowth on CNS myelin after conditioned injury', *Journal of Neurochemistry*, 109(3), pp. 706–715. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05977.x.

Miranda, E. and Lomas, D.A. (2006) 'Neuroserpin: a serpin to think about', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 63(6), pp. 709–722. Available at: https://doi.org/10.1007/s00018-005-5077-4.

Mistry, E.A. *et al.* (2017) 'Mechanical Thrombectomy Outcomes With and Without Intravenous Thrombolysis in Stroke Patients: A Meta-Analysis', *Stroke*, 48(9), pp. 2450–2456. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.017320.

Mitsios, J.P. *et al.* (2018) 'Relationship Between Glycated Hemoglobin and Stroke Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Journal of the American Heart Association*, 7(11), p. e007858. Available at: https://doi.org/10.1161/JAHA.117.007858.

Molina, C.A. *et al.* (2001) 'Timing of spontaneous recanalization and risk of hemorrhagic transformation in acute cardioembolic stroke', *Stroke*, 32(5), pp. 1079–1084. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.32.5.1079.

Momi, S. *et al.* (2013) 'Reperfusion of cerebral artery thrombosis by the GPIb-VWF blockade with the Nanobody ALX-0081 reduces brain infarct size in guinea pigs', *Blood*, 121(25), pp. 5088–5097. Available at: https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-464545.

Montagne, A. *et al.* (2012) 'Ultra-sensitive molecular MRI of cerebrovascular cell activation enables early detection of chronic central nervous system disorders', *NeuroImage*, 63(2), pp. 760–770. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.07.018.

van Moorsel, M.V.A. *et al.* (2022) 'VWF-targeted thrombolysis to overcome rh-tPA resistance in experimental thrombotic stroke models', *Blood*, p. blood.2022016342. Available at: https://doi.org/10.1182/blood.2022016342.

Morelli, N. *et al.* (2017) 'Mechanical thrombectomy after intravenous thrombolysis for acute ischaemic stroke', *The Lancet. Neurology*, 16(2), pp. 103–104. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30379-9.

Mori, K. *et al.* (1995) 'The activation of type 1 and type 2 plasminogen by type I and type II tissue plasminogen activator.', *The Journal of biological chemistry*, 270(7), pp. 3261–7. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.270.7.3261.

Morikawa, E. *et al.* (1996) 'Treatment of focal cerebral ischemia with synthetic oligopeptide corresponding to lectin domain of selectin', *Stroke*, 27(5), pp. 951–955; discussion 956. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.27.5.951.

Motto, C. *et al.* (1999) 'Hemorrhage after an acute ischemic stroke.MAST-I Collaborative Group', *Stroke*, 30(4), pp. 761–764. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.30.4.761.

Murray, K.N. *et al.* (2013) 'Systemic immune activation shapes stroke outcome', *Molecular and Cellular Neurosciences*, 53, pp. 14–25. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.09.004.

Nabavi, S. *et al.* (2014) 'Engineering a memory with LTD and LTP', *Nature*, 511(7509), pp. 348–352. Available at: https://doi.org/10.1038/nature13294.

Nabika, T. *et al.* (2012) 'The stroke-prone spontaneously hypertensive rat: still a useful model for post-GWAS genetic studies?', *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, 35(5), pp. 477–484. Available at: https://doi.org/10.1038/hr.2012.30.

Nagai, N. *et al.* (1999) 'Role of plasminogen system components in focal cerebral ischemic infarction: a gene targeting and gene transfer study in mice', *Circulation*, 99(18), pp. 2440–2444. Available at: https://doi.org/10.1161/01.cir.99.18.2440.

Nagaoka, M.R. *et al.* (2002) 'Participation of a galectin-dependent mechanism in the hepatic clearance of tissue-type plasminogen activator and plasma kallikrein.', *Thrombosis research*, 108(4), pp. 257–62.

Nakaji, K. *et al.* (2006) 'Matrix metalloproteinase-2 plays a critical role in the pathogenesis of white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rodents', *Stroke*, 37(11), pp. 2816–2823. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000244808.17972.55.

Nassar, T. *et al.* (2004) 'In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone', *Blood*, 103(3), pp. 897–902. Available at: https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1685.

National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995) 'Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke', *The New England Journal of Medicine*, 333(24), pp. 1581–1587. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJM199512143332401.

Navarro-Oviedo, M. *et al.* (2019) 'MMP10 Promotes Efficient Thrombolysis After Ischemic Stroke in Mice with Induced Diabetes', *Translational Stroke Research*, 10(4), pp. 389–401. Available at: https://doi.org/10.1007/s12975-018-0652-9.

Nelson, M.L.A. *et al.* (2017) 'Stroke rehabilitation evidence and comorbidity: a systematic scoping review of randomized controlled trials', *Topics in Stroke Rehabilitation*, 24(5), pp. 374–380. Available at: https://doi.org/10.1080/10749357.2017.1282412.

Neuhaus, A.A. *et al.* (2017) 'Neuroprotection in stroke: the importance of collaboration and reproducibility', *Brain: A Journal of Neurology*, 140(8), pp. 2079–2092. Available at: https://doi.org/10.1093/brain/awx126.

Nicole, O. *et al.* (2001) 'The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling', *Nature Medicine*, 7(1), pp. 59–64. Available at: https://doi.org/10.1038/83358.

Nicole, O *et al.* (2001) 'The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling.', *Nature medicine*, 7(1), pp. 59–64. Available at: https://doi.org/10.1038/83358.

Nicoll, R.A. (2017) 'A Brief History of Long-Term Potentiation', *Neuron*, 93(2), pp. 281–290. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.015.

Nikoletopoulou, V. *et al.* (2013) 'Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1833(12), pp. 3448–3459. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.

Ning, R. *et al.* (2012) 'Tissue plasminogen activator treatment of stroke in type-1 diabetes rats', *Neuroscience*, 222, pp. 326–332. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.018.

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. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706442.

Obermeier, B., Verma, A. and Ransohoff, R.M. (2016) 'The blood-brain barrier', *Handbook of Clinical Neurology*, 133, pp. 39–59. Available at: https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63432-0.00003-7.

Obiang, P. *et al.* (2011) 'Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF', *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(2), pp. 121–129. Available at: https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.03.004.

Obiang, P. *et al.* (2012) 'GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(37), pp. 12726–12734. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6202-11.2012.

O'Collins, V.E. *et al.* (2006) '1,026 experimental treatments in acute stroke', *Annals of Neurology*, 59(3), pp. 467–477. Available at: https://doi.org/10.1002/ana.20741.

O'Collins, Victoria E. *et al.* (2013) 'Hypertension and experimental stroke therapies', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(8), pp. 1141–1147. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.88.

O'Collins, Victoria E *et al.* (2013) 'Hypertension and experimental stroke therapies', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(8), pp. 1141–1147. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.88.

O'Donnell, M.J. *et al.* (2010) 'Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study', *The Lancet*, 376(9735), pp. 112–123. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60834-3.

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. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30506-2.

Office of the Surgeon General (US) and Office on Smoking and Health (US) (2004) *The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General*. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US) (Reports of the Surgeon General). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44695/ (Accessed: 14 October 2022).

Office on Smoking and Health (US) (2006) *The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General*. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US) (Publications and Reports of the Surgeon General). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44324/ (Accessed: 14 October 2022).

Orset, C. *et al.* (2007) 'Mouse Model of In Situ Thromboembolic Stroke and Reperfusion', *Stroke*, 38(10), pp. 2771–2778. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.487520.

Orset, C. *et al.* (2016) 'Efficacy of Alteplase in a Mouse Model of Acute Ischemic Stroke: A Retrospective Pooled Analysis', *Stroke*, 47(5), pp. 1312–1318. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.012238.

Paciaroni, M. *et al.* (2008) 'Early hemorrhagic transformation of brain infarction: rate, predictive factors, and influence on clinical outcome: results of a prospective multicenter study', *Stroke*, 39(8), pp. 2249–2256. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.510321.

Palaiodimou, L. *et al.* (2019) 'Glycemia management in acute ischemic stroke: current concepts and novel therapeutic targets', *Postgraduate Medicine*, 131(7), pp. 423–437. Available at: https://doi.org/10.1080/00325481.2019.1651206.

Pang, P.T. and Lu, B. (2004) 'Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF', *Ageing Research Reviews*, 3(4), pp. 407–430. Available at: https://doi.org/10.1016/j.arr.2004.07.002.

Paoletti, P. (2011) 'Molecular basis of NMDA receptor functional diversity', *The European Journal of Neuroscience*, 33(8), pp. 1351–1365. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07628.x.

Papadia, S. *et al.* (2005) 'Nuclear Ca2+ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(17), pp. 4279–4287. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5019-04.2005.

Parcq, J. *et al.* (2012) 'Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity', *Cell Death and Differentiation*, 19(12), pp. 1983–1991. Available at: https://doi.org/10.1038/cdd.2012.86.

Park, L. *et al.* (2008) 'Key role of tissue plasminogen activator in neurovascular coupling', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(3), pp. 1073–1078. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.0708823105.

Parron, C. and Save, E. (2004) 'Comparison of the effects of entorhinal and retrosplenial cortical lesions on habituation, reaction to spatial and non-spatial changes during object exploration in the rat', *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(1), pp. 1–11. Available at: https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.03.004.

Parsons, M. *et al.* (2012) 'A randomized trial of tenecteplase versus alteplase for acute ischemic stroke', *The New England Journal of Medicine*, 366(12), pp. 1099–1107. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109842.

Pasquet, N. *et al.* (2019) 'Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells', *Cerebral Cortex*, 29(6), pp. 2482–2498. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhy119.

Pasupathy, S. *et al.* (2017) 'Early Use of N-acetylcysteine With Nitrate Therapy in Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention for ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction Reduces Myocardial Infarct Size (the NACIAM Trial [N-acetylcysteine in Acute Myocardial Infarction])', *Circulation*, 136(10), pp. 894–903. Available at: https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027575.

Pawlak, R. *et al.* (2002) 'Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice', *Neuroscience*, 113(4), pp. 995–1001. Available at: https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00166-5.

Pawlak, R. *et al.* (2003) 'Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior', *Nature Neuroscience*, 6(2), pp. 168–174. Available at: https://doi.org/10.1038/nn998.

Pedragosa, J. *et al.* (2018) 'CNS-border associated macrophages respond to acute ischemic stroke attracting granulocytes and promoting vascular leakage', *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), p. 76. Available at: https://doi.org/10.1186/s40478-018-0581-6.

Pekny, M. and Nilsson, M. (2005) 'Astrocyte activation and reactive gliosis', *Glia*, 50(4), pp. 427–434. Available at: https://doi.org/10.1002/glia.20207.

Peña, I. dela *et al.* (2017) 'Strategies to Extend Thrombolytic Time Window for Ischemic Stroke Treatment: An Unmet Clinical Need', *Journal of Stroke*, 19(1), pp. 50–60. Available at: https://doi.org/10.5853/jos.2016.01515.

Pennica, D. *et al.* (1983) 'Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli', *Nature*, 301(5897), pp. 214–221. Available at: https://doi.org/10.1038/301214a0.

Percie du Sert, N. *et al.* (2017) 'The IMPROVE Guidelines (Ischaemia Models: Procedural Refinements Of in Vivo Experiments)', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(11), pp. 3488–3517. Available at: https://doi.org/10.1177/0271678X17709185.

Pham, M. *et al.* (2010) 'Outcome of experimental stroke in C57Bl/6 and Sv/129 mice assessed by multimodal ultra-high field MRI', *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2, p. 6. Available at: https://doi.org/10.1186/2040-7378-2-6.

Pittman, R.N., Ivins, J.K. and Buettner, H.M. (1989) 'Neuronal plasminogen activators: cell surface binding sites and involvement in neurite outgrowth', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 9(12), pp. 4269–4286.

Pohl, G. *et al.* (1984) 'Tissue plasminogen activator: peptide analyses confirm an indirectly derived amino acid sequence, identify the active site serine residue, establish glycosylation sites, and localize variant differences.', *Biochemistry*, 23(16), pp. 3701–7. Available at: https://doi.org/10.1021/bi00311a020.

Poirier, J. and Derouesné, C. (1993) 'Apoplexy and Stroke', in K.F. Kiple (ed.) *The Cambridge World History of Human Disease*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 584–587. Available at: https://doi.org/10.1017/CHOL9780521332866.071.

Polavarapu, R. *et al.* (2007) 'Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit', *Blood*, 109(8), pp. 3270–3278. Available at: https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-043125.

Potter, J.F. *et al.* (2009) 'Controlling hypertension and hypotension immediately post-stroke (CHHIPS): a randomised, placebo-controlled, double-blind pilot trial', *The Lancet. Neurology*, 8(1), pp. 48–56. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70263-1.

Powers, W.J. *et al.* (2018) '2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association', *Stroke*, 49(3). Available at: https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000158.

PROGRESS Collaborative Group (2001) 'Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack', *Lancet (London, England)*, 358(9287), pp. 1033–1041. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06178-5.

Pun, P.B.L., Lu, J. and Moochhala, S. (2009) 'Involvement of ROS in BBB dysfunction', *Free Radical Research*, 43(4), pp. 348–364. Available at: https://doi.org/10.1080/10715760902751902.

Qian, Zhuo *et al.* (1993a) 'Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate–early gene during seizure, kindling and long-term potentiation', *Nature*, 361(6411), pp. 453–457. Available at: https://doi.org/10.1038/361453a0.

Qian, Z *et al.* (1993) 'Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation.', *Nature*, 361(6411), pp. 453–7. Available at: https://doi.org/10.1038/361453a0.

Qian, Zhuo *et al.* (1993b) 'Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate–early gene during seizure, kindling and long-term potentiation', *Nature*, 361(6411), pp. 453–457. Available at: https://doi.org/10.1038/361453a0.

Qin, C. *et al.* (2019) 'Dual Functions of Microglia in Ischemic Stroke', *Neuroscience Bulletin*, 35(5), pp. 921–933. Available at: https://doi.org/10.1007/s12264-019-00388-3.

Qiu, Y. *et al.* (2021) 'Immune Cells in the BBB Disruption After Acute Ischemic Stroke: Targets for Immune Therapy?', *Frontiers in Immunology*, 12. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.678744 (Accessed: 25 August 2022).

Quinn, T.J. *et al.* (2009) 'Reliability of the modified Rankin Scale: a systematic review', *Stroke*, 40(10), pp. 3393–3395. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.557256.

Radak, D. *et al.* (2017) 'Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke', *Current Vascular Pharmacology*, 15(2), pp. 115–122. Available at: https://doi.org/10.2174/1570161115666161104095522.

Rajan, W.D. *et al.* (2020) 'Defining molecular identity and fates of CNS-border associated macrophages after ischemic stroke in rodents and humans', *Neurobiology of Disease*, 137, p. 104722. Available at: https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104722.

Raychev, R. and Saver, J.L. (2012) 'Mechanical thrombectomy devices for treatment of stroke', *Neurology: Clinical Practice*, 2(3), pp. 231–235. Available at: https://doi.org/10.1212/CPJ.0b013e31826af206.

Rehni, A.K. *et al.* (2017) 'Diabetic aggravation of stroke and animal models', *Experimental Neurology*, 292, pp. 63–79. Available at: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.03.004.

Rexrode, K.M. *et al.* (1997) 'A Prospective Study of Body Mass Index, Weight Change, and Risk of Stroke in Women', *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 277(19), p. 1539. Available at: https://doi.org/10.1001/jama.1997.03540430051032.

Rezaeitalab, F. *et al.* (2020) 'Predictive value of inflammatory markers for functional outcomes in patients with ischemic stroke', *Current Journal of Neurology*, 19(2), pp. 47–52. Available at: https://doi.org/10.18502/cjn.v19i2.4940.

Riedel, C.H. *et al.* (2011) 'The importance of size: successful recanalization by intravenous thrombolysis in acute anterior stroke depends on thrombus length', *Stroke*, 42(6), pp. 1775–1777. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.609693.

Rijken, D.C. *et al.* (1979) 'Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 580(1), pp. 140–153. Available at: https://doi.org/10.1016/0005-2795(79)90205-8.

Rijken, D.C. and Collen, D. (1981) 'Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture.', *Journal of Biological Chemistry*, 256(13), pp. 7035–7041.

Rijken, D.C., Hoylaerts, M. and Collen, D. (1982) 'Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator', *The Journal of Biological Chemistry*, 257(6), pp. 2920–2925.

Rijken, D.C. and Lijnen, H.R. (2009) 'New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(1), pp. 4–13. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03220.x.

Roaldsen, M.B., Lindekleiv, H. and Mathiesen, E.B. (2021) 'Intravenous thrombolytic treatment and endovascular thrombectomy for ischaemic wake-up stroke', *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, p. CD010995. Available at: https://doi.org/10.1002/14651858.CD010995.pub3.

Rogove, A.D. *et al.* (1999) 'Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system', *Journal of Cell Science*, 112 (Pt 22), pp. 4007–4016.

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. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.29.10.2189.

Rosso, C. *et al.* (2018) 'The silver effect of admission glucose level on excellent outcome in thrombolysed stroke patients', *Journal of Neurology*, 265(7), pp. 1684–1689. Available at: https://doi.org/10.1007/s00415-018-8896-6.

Rouf, S.A., Moo-Young, M. and Chisti, Y. (1996) 'Tissue-type plasminogen activator: Characteristics, applications and production technology', *Biotechnology Advances*, 14(3), pp. 239–266. Available at: https://doi.org/10.1016/0734-9750(96)00019-5.

Roussel, B.D. *et al.* (2011) 'HMGB-1 promotes fibrinolysis and reduces neurotoxicity mediated by tissue plasminogen activator.', *Journal of cell science*, 124(Pt 12), pp. 2070–6. Available at: https://doi.org/10.1242/jcs.084392.

Saand, A.R. *et al.* (2019) 'Systemic inflammation in hemorrhagic strokes - A novel neurological sign and therapeutic target?', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 39(6), pp. 959–988. Available at: https://doi.org/10.1177/0271678X19841443.

Sabetghadam, M. *et al.* (2020) 'Evidence for a Beneficial Effect of Oral N-acetylcysteine on Functional Outcomes and Inflammatory Biomarkers in Patients with Acute Ischemic Stroke', *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 16, pp. 1265–1278. Available at: https://doi.org/10.2147/NDT.S241497.

Sallés, F.J. and Strickland, S. (2002) 'Localization and Regulation of the Tissue Plasminogen Activator–Plasmin System in the Hippocampus', *The Journal of Neuroscience*, 22(6), pp. 2125–2134. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-06-02125.2002.

Salman, Mohd. *et al.* (2022) 'Acute Hyperglycemia Exacerbates Hemorrhagic Transformation after Embolic Stroke and Reperfusion with tPA: A Possible Role of TXNIP-NLRP3 Inflammasome', *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 31(2), p. 106226. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.106226.

Samson, A.L. *et al.* (2008) 'Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function', *Journal of Neurochemistry*, 107(4), pp. 1091–1101. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05687.x.

Samson, A.L. *et al.* (2015) 'MouseMove: an open source program for semi-automated analysis of movement and cognitive testing in rodents', *Scientific Reports*, 5. Available at: https://doi.org/10.1038/srep16171.

Sandset, E.C. and Tsivgoulis, G. (2022) 'Tenecteplase for acute ischaemic stroke', *The Lancet*, 400(10347), pp. 138–139. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01107-2.

Sandu, R.E. *et al.* (2015) 'Neuroinflammation and comorbidities are frequently ignored factors in CNS pathology', *Neural Regeneration Research*, 10(9), pp. 1349–1355. Available at: https://doi.org/10.4103/1673-5374.165208.

Saver, J.L. (2006) 'Time Is Brain—Quantified', *Stroke*, 37(1), pp. 263–266. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000196957.55928.ab.

Scheen, A.J. (2019) '[Alcohol, protective or risk factor for cardiovascular disease ?]', *Revue Medicale De Liege*, 74(5–6), pp. 314–320.

Schilling, M. *et al.* (2003) 'Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice', *Experimental Neurology*, 183(1), pp. 25–33. Available at: https://doi.org/10.1016/s0014-4886(03)00082-7.

Schuhmann, M.K. *et al.* (2017) 'Blocking of platelet glycoprotein receptor Ib reduces "thrombo-inflammation" in mice with acute ischemic stroke', *Journal of Neuroinflammation*, 14, p. 18. Available at: https://doi.org/10.1186/s12974-017-0792-y.

Schwalfenberg, G.K. (2021) 'N-Acetylcysteine: A Review of Clinical Usefulness (an Old Drug with New Tricks)', *Journal of Nutrition and Metabolism*. Edited by T. Emanuelli, 2021, pp. 1–13. Available at: https://doi.org/10.1155/2021/9949453.

Seeds, N.W., Basham, M.E. and Haffke, S.P. (1999) 'Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), pp. 14118–14123.

Seeds, N.W., Williams, B.L. and Bickford, P.C. (1995) 'Tissue plasminogen activator induction in Purkinje neurons after cerebellar motor learning', *Science (New York, N.Y.)*, 270(5244), pp. 1992–1994. Available at: https://doi.org/10.1126/science.270.5244.1992.

Seillier, C. *et al.* (2021) 'Roles of the tissue-type plasminogen activator in immune response', *Cellular Immunology*, p. 104451. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104451.

Seillier, C. *et al.* (2022) 'Targeting NMDA Receptors at the Neurovascular Unit: Past and Future Treatments for Central Nervous System Diseases', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), p. 10336. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms231810336.

Selmer, R. and Tverdal, A. (1995) 'Body mass index and cardiovascular mortality at different levels of blood pressure: a prospective study of Norwegian men and women.', *Journal of epidemiology and community health*, 49(3), pp. 265–70. Available at: https://doi.org/10.1136/jech.49.3.265.

Seto, A. *et al.* (2014) 'Induction of ischemic stroke in awake freely moving mice reveals that isoflurane anesthesia can mask the benefits of a neuroprotection therapy', *Frontiers in Neuroenergetics*, 6. Available at: https://doi.org/10.3389/fnene.2014.00001.

Sharp, C.D. *et al.* (2003) 'Human Neuroepithelial Cells Express NMDA Receptors', *BMC Neuroscience*, 4(1), p. 28. Available at: https://doi.org/10.1186/1471-2202-4-28.

Shi, K. *et al.* (2021) 'tPA Mobilizes Immune Cells That Exacerbate Hemorrhagic Transformation in Stroke', *Circulation Research*, 128(1), pp. 62–75. Available at: https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317596.

Shinton, R. and Beevers, G. (1989) 'Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke.', *BMJ (Clinical research ed.)*, 298(6676), pp. 789–94. Available at: https://doi.org/10.1136/bmj.298.6676.789.

Shuaib, A. *et al.* (2007) 'NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke', *The New England Journal of Medicine*, 357(6), pp. 562–571. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMoa070240.

Siao, C.-J., Fernandez, S.R. and Tsirka, S.E. (2003) 'Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(8), pp. 3234–42.

Siao, C.-J. and Tsirka, Stella E. (2002) 'Tissue Plasminogen Activator Mediates Microglial Activation via Its Finger Domain through Annexin II', *Journal of Neuroscience*, 22(9), pp. 3352–3358.

Siao, C.-J. and Tsirka, Stella E (2002) 'Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(9), pp. 3352–8. Available at: https://doi.org/20026281.

Silverman, G.A. *et al.* (2001) 'The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature.', *The Journal of biological chemistry*, 276(36), pp. 33293–6. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.R100016200.

Simats, A. and Liesz, A. (2022) 'Systemic inflammation after stroke: implications for post-stroke comorbidities', *EMBO molecular medicine*, 14(9), p. e16269. Available at: https://doi.org/10.15252/emmm.202216269.

Smedsrød, B., Einarsson, M. and Pertoft, H. (1988) 'Tissue plasminogen activator is endocytosed by mannose and galactose receptors of rat liver cells.', *Thrombosis and haemostasis*, 59(3), pp. 480–4.

Smith, A.G. and Rowland Hill, C. (2017) 'Imaging assessment of acute ischaemic stroke: a review of radiological methods', *The British Journal of Radiology*, p. 20170573. Available at: https://doi.org/10.1259/bjr.20170573.

Smith, A.M. and Dragunow, M. (2014) 'The human side of microglia', *Trends in Neurosciences*, 37(3), pp. 125–135. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.12.001.

Sobrino, T. *et al.* (2010) 'Association of growth factors with arterial recanalization and clinical outcome in patients with ischemic stroke treated with tPA', *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 8(7), pp. 1567–1574. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03897.x.

Sochman, J. (2002) 'N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later: What do we know and what would we like to know?!', *Journal of the American College of Cardiology*, 39(9), pp. 1422–1428. Available at: https://doi.org/10.1016/S0735-1097(02)01797-7.

Sommer, C.J. (2017) 'Ischemic stroke: experimental models and reality', *Acta Neuropathologica*, 133(2), pp. 245–261. Available at: https://doi.org/10.1007/s00401-017-1667-0.

Soreq, H. and Miskin, R. (1981) 'Plasminogen activator in the rodent brain', *Brain Research*, 216(2), pp. 361–374. Available at: https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90138-4.

Spronk, E. *et al.* (2021a) 'Hemorrhagic Transformation in Ischemic Stroke and the Role of Inflammation', *Frontiers in Neurology*, 12. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2021.661955 (Accessed: 1 November 2022).

Spronk, E. *et al.* (2021b) 'Hemorrhagic Transformation in Ischemic Stroke and the Role of Inflammation', *Frontiers in Neurology*, 12, p. 661955. Available at: https://doi.org/10.3389/fneur.2021.661955.

Stankiewicz, T.R. and Linseman, D.A. (2014) 'Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, p. 314. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00314.

Strolinsky, D.C. *et al.* (1972) 'Streptozotocin in the treatment of cancer: phase II study', *Cancer*, 30(1), pp. 61–67. Available at: https://doi.org/10.1002/1097-0142(197207)30:1<61::aid-cncr2820300110>3.0.co;2-o.

Sturgeon, J.D. *et al.* (2008) 'Hemostatic and Inflammatory Risk Factors for Intracerebral Hemorrhage in a Pooled Cohort', *Stroke*, 39(8), pp. 2268–2273. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.505800.

Su, E.J. *et al.* (2008) 'Activation of PDGF-CC by Tissue Plasminogen Activator Impairs Blood Brain Barrier Integrity During Ischemic Stroke', *Nature medicine*, 14(7), pp. 731–737. Available at: https://doi.org/10.1038/nm1787.

Suissa, L. *et al.* (2020) 'Effect of hyperglycemia on stroke outcome is not homogeneous to all patients treated with mechanical thrombectomy', *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 194, p. 105750. Available at: https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.105750.

Suofu, Y. *et al.* (2012) 'Matrix metalloproteinase-2 or -9 deletions protect against hemorrhagic transformation during early stage of cerebral ischemia and reperfusion', *Neuroscience*, 212, pp. 180–189. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.036.

Suzuki, H. *et al.* (1999) 'Anti-P-selectin antibody attenuates rat brain ischemic injury', *Neuroscience Letters*, 265(3), pp. 163–166. Available at: https://doi.org/10.1016/s0304-3940(99)00229-3.

Suzuki, Y. *et al.* (2007) 'Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice', *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 5(8), pp. 1732–1739. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02628.x.

Suzuki, Y., Nagai, N. and Umemura, K. (2016) 'A Review of the Mechanisms of Blood-Brain Barrier Permeability by Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment for Cerebral Ischemia', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00002.

Tamura, A. *et al.* (1981) 'Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1(1), pp. 53–60. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.1981.6.

Tanaka, Y. *et al.* (1999) 'Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), pp. 10857–10862. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10857.

Teesalu, T. *et al.* (2004) 'Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system', *Thrombosis and Haemostasis*, 92(2), pp. 358–368. Available at: https://doi.org/10.1160/TH02-12-0310.

Terruso, V. *et al.* (2009) 'Frequency and determinants for hemorrhagic transformation of cerebral infarction', *Neuroepidemiology*, 33(3), pp. 261–265. Available at: https://doi.org/10.1159/000229781.

Thelengana, A. *et al.* (2018) 'Tenecteplase versus alteplase in acute ischemic stroke: systematic review and meta-analysis', *Acta Neurologica Belgica* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1007/s13760-018-0933-9.

Thelwell, C. and Longstaff, C. (2007) 'The regulation by fibrinogen and fibrin of tissue plasminogen activator kinetics and inhibition by plasminogen activator inhibitor 1', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(4), pp. 804–811. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02422.x.

Thewke, D.P. and Seeds, N.W. (1999) 'The expression of mRNAs for hepatocyte growth factor/scatter factor, its receptor c-met, and one of its activators tissue-type plasminogen activator show a systematic relationship in the developing and adult cerebral cortex and hippocampus', *Brain Research*, 821(2), pp. 356–367. Available at: https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01115-4.

Thiebaut, A.M. *et al.* (2018) 'The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond', *The Lancet Neurology*, 17(12), pp. 1121–1132. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30323-5.

Thomalla, G. *et al.* (2007) 'Two Tales: Hemorrhagic Transformation but Not Parenchymal Hemorrhage After Thrombolysis Is Related to Severity and Duration of Ischemia', *Stroke*, 38(2), pp. 313–318. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000254565.51807.22.

Thomalla, G. *et al.* (2018) 'MRI-Guided Thrombolysis for Stroke with Unknown Time of Onset', *The New England Journal of Medicine*, 379(7), pp. 611–622. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMoa1804355.

Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke | NEJM (no date). Available at: https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm199512143332401 (Accessed: 24 August 2022).

Trotter, J.H. *et al.* (2014) 'Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation', *Neuroscience*, 274, pp. 299–307. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.046.

Tschoe, C. *et al.* (2020) 'Neuroinflammation after Intracerebral Hemorrhage and Potential Therapeutic Targets', *Journal of Stroke*, 22(1), pp. 29–46. Available at: https://doi.org/10.5853/jos.2019.02236.

Tsirka, S.E. *et al.* (1995) 'Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator', *Nature*, 377(6547), pp. 340–344. Available at: https://doi.org/10.1038/377340a0.

Tsivgoulis, G. *et al.* (2019) 'Association of Baseline Hyperglycemia With Outcomes of Patients With and Without Diabetes With Acute Ischemic Stroke Treated With Intravenous Thrombolysis: A Propensity Score-Matched Analysis From the SITS-ISTR Registry', *Diabetes*, 68(9), pp. 1861–1869. Available at: https://doi.org/10.2337/db19-0440.

Tuneva, E.O., Bychkova, O.N. and Boldyrev, A.A. (2003) 'Effect of NMDA on production of reactive oxygen species by human lymphocytes', *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 136(2), pp. 159–161. Available at: https://doi.org/10.1023/a:1026366907084.

Turner, R.C. *et al.* (1999) 'Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group', *JAMA*, 281(21), pp. 2005–2012. Available at: https://doi.org/10.1001/jama.281.21.2005.

Tziomalos, K. *et al.* (2017) 'Stress hyperglycemia and acute ischemic stroke in-hospital outcome', *Metabolism*, 67, pp. 99–105. Available at: https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.11.011.

Uemura, T. *et al.* (2018) 'Protective Effects of Brain Infarction by N-Acetylcysteine Derivatives', *Stroke*, 49(7), pp. 1727–1733. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.021755.

Unnithan, A.K.A., M Das, J. and Mehta, P. (2022) 'Hemorrhagic Stroke', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559173/ (Accessed: 9 November 2022).

Usuki, S. *et al.* (2007) 'Effect of pre-germinated brown rice intake on diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats', *Nutrition & Metabolism*, 4, p. 25. Available at: https://doi.org/10.1186/1743-7075-4-25.

Van de Werf, F., Nobuhara, M. and Collen, D. (1986) 'Coronary thrombolysis with human single-chain, urokinase-type plasminogen activator (pro-urokinase) in patients with acute myocardial infarction', *Annals of Internal Medicine*, 104(3), pp. 345–348. Available at: https://doi.org/10.7326/0003-4819-104-3-345.

Varadharajan, S. *et al.* (2016) 'Computed tomography angiography in acute stroke (revisiting the 4Ps of imaging)', *The American Journal of Emergency Medicine*, 34(2), pp. 282–287. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ajem.2015.10.056.

Vaughan, D.E. (2011) 'PAI-1 antagonists: the promise and the peril.', *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 122, pp. 312–25.

Vavra, J.J. *et al.* (1959) 'Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic', *Antibiotics Annual*, 7, pp. 230–235.

Verstraete, M. *et al.* (1985) 'Pharmacokinetics and systemic fibrinogenolytic effects of recombinant human tissue-type plasminogen activator (rt-PA) in humans', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 235(2), pp. 506–512.

Vivien, D. *et al.* (2011) 'Impact of Tissue Plasminogen Activator on the Neurovascular Unit: From Clinical Data to Experimental Evidence', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(11), pp. 2119–2134. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.127.

Wang, D.T. *et al.* (2015) 'Successful recanalization post endovascular therapy is associated with a decreased risk of intracranial haemorrhage: a retrospective study', *BMC Neurology*, 15(1), p. 185. Available at: https://doi.org/10.1186/s12883-015-0442-x.

Wang, X. *et al.* (2003) 'Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator', *Nature Medicine*, 9(10), pp. 1313–1317. Available at: https://doi.org/10.1038/nm926.

Wang, Y.F. *et al.* (1998) 'Tissue plasminogen activator (tPA) increase neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice', *Nature medicine*, 4(2), pp. 228–231.

Wanrooy, B.J., Wen, S.W. and Wong, C.H. (2021) 'Dynamic roles of neutrophils in post-stroke neuroinflammation', *Immunology & Cell Biology*, 99(9), pp. 924–935. Available at: https://doi.org/10.1111/imcb.12463.

Warach, S.J., Dula, A.N. and Milling, T.J. (2020) 'Tenecteplase Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke', *Stroke*, 51(11), pp. 3440–3451. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.029749.

Warach, S.J. and Saver, J.L. (2020) 'Stroke Thrombolysis With Tenecteplase to Reduce Emergency Department Spread of Coronavirus Disease 2019 and Shortages of Alteplase', *JAMA Neurology*, 77(10), pp. 1203–1204. Available at: https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.2396.

Warburton, E. *et al.* (2011) 'Stroke management', *BMJ clinical evidence*, 2011, p. 0201.

Wardlaw, J.M. *et al.* (2012) 'Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis', *The Lancet*, 379(9834), pp. 2364–2372. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60738-7.

Wardlaw, J.M. *et al.* (2014) 'Thrombolysis for acute ischaemic stroke', *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1002/14651858.CD000213.pub3.

Ware, J.H., Dibenedetto, A.J. and Pittman, R.N. (1995) 'Localization of tissue plasminogen activator mRNA in adult rat brain', *Brain Research Bulletin*, 37(3), pp. 275–281. Available at: https://doi.org/10.1016/0361-9230(95)00008-3.

Weide, L.G. and Lacy, P.E. (1991) 'Low-dose streptozocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model', *Diabetes*, 40(9), pp. 1157–1162. Available at: https://doi.org/10.2337/diab.40.9.1157.

Weimar, W. *et al.* (1981) 'Specific lysis of an iliofemoral thrombus by administration of extrinsic (tissue-type) plasminogen activator', *Lancet (London, England)*, 2(8254), pp. 1018–1020. Available at: https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)91217-4.

Weiss, N. *et al.* (2009) 'The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1788(4), pp. 842–857. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.022.

Whiteley, W.N. *et al.* (2016) 'Risk of intracerebral haemorrhage with alteplase after acute ischaemic stroke: a secondary analysis of an individual patient data meta-analysis', *The Lancet. Neurology*, 15(9), pp. 925–933. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30076-X.

Williams, L.S. *et al.* (2002) 'Effects of admission hyperglycemia on mortality and costs in acute ischemic stroke', *Neurology*, 59(1), pp. 67–71. Available at: https://doi.org/10.1212/wnl.59.1.67.

Won, S.J. *et al.* (2011) 'Hyperglycemia promotes tPA-induced hemorrhage by promoting superoxide production', *Annals of neurology*, 70(4), pp. 583–590. Available at: https://doi.org/10.1002/ana.22538.

Wu, D. *et al.* (2002) 'Inhibition of Platelet Glycoprotein Ib, Glycoprotein IIb/IIIa, or Both by Monoclonal Antibodies Prevents Arterial Thrombosis in Baboons', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(2), pp. 323–328. Available at: https://doi.org/10.1161/hq0202.102321.

Wu, F. *et al.* (2012) 'Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(29), pp. 9848–58. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1241-12.2012.

Wu, F. *et al.* (2013) 'Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway', *Molecular and Cellular Neurosciences*, 52, pp. 9–19. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.10.001.

Wu, F. *et al.* (2015) 'Tissue-Type Plasminogen Activator Triggers the Synaptic Vesicle Cycle in Cerebral Cortical Neurons', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(12), pp. 1966–1976. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.155.

Wu, K.K. and Huan, Y. (2007) 'Diabetic atherosclerosis mouse models', *Atherosclerosis*, 191(2), pp. 241–249. Available at: https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.030.

Wu, K.K. and Huan, Y. (2008) 'Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats', *Current Protocols in Pharmacology*, 40(1), p. 5.47.1-5.47.14. Available at: https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s40.

Wyseure, T. *et al.* (2015) 'Innovative thrombolytic strategy using a heterodimer diabody against TAFI and PAI-1 in mouse models of thrombosis and stroke', *Blood*, 125(8), pp. 1325–1332. Available at: https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-588319.

Xie, L., Kang, H. and Nedergaard, M. (2016) 'A Novel Model of Transient Occlusion of the Middle Cerebral Artery in Awake Mice', *Journal of Nature and Science*, 2(2).

Yaghi, S., Willey, J.Z., Cucchiara, B., Goldstein, J.N., Gonzales, N.R., Khatri, P., Kim, L.J., Mayer, S.A., Sheth, K.N., Schwamm, L.H., *et al.* (2017) 'Treatment and Outcome of Hemorrhagic Transformation After Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association', *Stroke*, 48(12), pp. e343–e361. Available at: https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000152.

Yaghi, S., Willey, J.Z., Cucchiara, B., Goldstein, J.N., Gonzales, N.R., Khatri, P., Kim, L.J., Mayer, S.A., Sheth, K.N. and Schwamm, L.H. (2017) 'Treatment and Outcome of Hemorrhagic Transformation After Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association', *Stroke*, 48(12). Available at: https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000152.

Yamamoto, Y. *et al.* (2012) 'Matrix metalloprotein-9 activation under cell-to-cell interaction between endothelial cells and monocytes: possible role of hypoxia and tumor necrosis factor-α', *Heart and Vessels*, 27(6), pp. 624–633. Available at: https://doi.org/10.1007/s00380-011-0214-5.

Yang, Y. *et al.* (2007) 'Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(4), pp. 697–709. Available at: https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600375.

Yang, Y. and Rosenberg, G.A. (2011) 'Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease', *Stroke*, 42(11), pp. 3323–3328. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.608257.

Yang-Feng, T.L. *et al.* (no date) 'Human Tissue-Type Plasminogen Activator Gene Located Near Chromosomal Breakpoint in Myeloproliferative Disorder', p. 9.

Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, Elizabeth G., *et al.* (2003) 'Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein', *The Journal of Clinical Investigation*, 112(10), pp. 1533–1540. Available at: https://doi.org/10.1172/JCI19212.

Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, Elizabeth G, *et al.* (2003) 'Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein.', *The Journal of clinical investigation*, 112(10), pp. 1533–40. Available at: https://doi.org/10.1172/JCI19212.

Yepes, M. (2015) 'Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the central nervous system', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, p. 304. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00304.

Yepes, M. *et al.* (2016) 'Tissue-type plasminogen activator induces synaptic vesicle endocytosis in cerebral cortical neurons', *Neuroscience*, 319, pp. 69–78. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.046.

Yip, H.-K. *et al.* (2016) 'Tissue plasminogen activator deficiency preserves neurological function and protects against murine acute ischemic stroke', *International Journal of Cardiology*, 205, pp. 133–141. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.11.168.

You, R.X. *et al.* (1999) 'Ischemic stroke risk and passive exposure to spouses' cigarette smoking. Melbourne Stroke Risk Factor Study (MERFS) Group.', *American Journal of Public Health*, 89(4), pp. 572–575. Available at: https://doi.org/10.2105/AJPH.89.4.572.

Zabala, A. *et al.* (2020) 'Risk of first stroke in people with type 2 diabetes and its relation to glycaemic control: A nationwide observational study', *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 22(2), pp. 182–190. Available at: https://doi.org/10.1111/dom.13885.

Zaleska, M.M. *et al.* (2009) 'The development of stroke therapeutics: promising mechanisms and translational challenges', *Neuropharmacology*, 56(2), pp. 329–341. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.10.006.

Zalewski, J. and Nessler, J. (2011) '[The endogenous cardioprotection during reperfusion in acute myocardial infarction]', *Kardiologia Polska*, 69 Suppl 3, pp. 67–74.

Zechariah, A., ElAli, A., Hagemann, N., *et al.* (2013) 'Hyperlipidemia attenuates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis, impairs cerebral blood flow, and disturbs stroke recovery via decreased pericyte coverage of brain endothelial cells', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(7), pp. 1561–1567. Available at: https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300749.

Zechariah, A., ElAli, A., Doeppner, T.R., *et al.* (2013) 'Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Pericyte Coverage of Brain Capillaries, Improves Cerebral Blood Flow During Subsequent Focal Cerebral Ischemia, and Preserves the Metabolic Penumbra', *Stroke*, 44(6), pp. 1690–1697. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.000240.

Zenych, A., Fournier, L. and Chauvierre, C. (2020) 'Nanomedicine progress in thrombolytic therapy', *Biomaterials*, 258, p. 120297. Available at: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120297.

Zhang, C. *et al.* (2009) 'The Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Mediates Tissue-Type Plasminogen Activator-Induced Microglial Activation in the Ischemic Brain', *The*

American Journal of Pathology, 174(2), pp. 586–594. Available at: https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080661.

Zhang, C. *et al.* (2018) 'Invasion of Peripheral Immune Cells into Brain Parenchyma after Cardiac Arrest and Resuscitation', *Aging and Disease*, 9(3), pp. 412–425. Available at: https://doi.org/10.14336/AD.2017.0926.

Zhang, D. *et al.* (2021) 'T Cell Response in Ischemic Stroke: From Mechanisms to Translational Insights', *Frontiers in Immunology*, 12. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.707972 (Accessed: 25 August 2022).

Zhang, J. *et al.* (2014) 'Hemorrhagic transformation after cerebral infarction: current concepts and challenges', *Annals of Translational Medicine*, 2(8), p. 81. Available at: https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.08.08.

Zhang, R.L. *et al.* (1994) 'Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat', *Neurology*, 44(9), pp. 1747–1751. Available at: https://doi.org/10.1212/wnl.44.9.1747.

Zhang, Z.G. *et al.* (2000) 'VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain', *The Journal of Clinical Investigation*, 106(7), pp. 829–838. Available at: https://doi.org/10.1172/JCI9369.

Zhang, Z.G. *et al.* (2002) 'Correlation of VEGF and Angiopoietin Expression with Disruption of Blood–Brain Barrier and Angiogenesis after Focal Cerebral Ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 22(4), pp. 379–392. Available at: https://doi.org/10.1097/00004647-200204000-00002.

Zhao, B.-Q. *et al.* (2006) 'Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke', *Nature Medicine*, 12(4), pp. 441–445. Available at: https://doi.org/10.1038/nm1387.

Zhou, H.M. *et al.* (2001) 'Overexpression of plasminogen activator inhibitor type 2 in basal keratinocytes enhances papilloma formation in transgenic mice', *Cancer Research*, 61(3), pp. 970–976.

Zhu, J. *et al.* (2019) 'The role of endogenous tissue-type plasminogen activator in neuronal survival after ischemic stroke: friend or foe?', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(8), pp. 1489–1506. Available at: https://doi.org/10.1007/s00018-019-03005-8.

Zhuo, M. *et al.* (2000) 'Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(2), pp. 542–9.

Zinkstok, S.M. and Roos, Y.B. (2012) 'Early administration of aspirin in patients treated with alteplase for acute ischaemic stroke: a randomised controlled trial', *The Lancet*, 380(9843), pp. 731–737. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60949-0.

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. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.22.10.1276.

del Zoppo, G.J. *et al.* (2012) 'Microglial Cell Activation is a Source of Metalloproteinase Generation during Hemorrhagic Transformation', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(5), pp. 919–932. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.11.

DISCUSSION

Les AVC surviennent principalement chez le sujet âgé atteint de pathologies concomitantes dites comorbidités. Or des années durant, les recherches universitaires et pharmaceutiques ont testé des molécules thérapeutiques sur des animaux mâles, jeunes et en bonne santé, aboutissant à des prédictions erronées concernant les effets potentiels de nouveaux traitements. Ainsi, tous les traitements évalués chez l'animal ont échoué en phase clinique, excepté un : l'Altéplase (tPA). C'est la raison pour laquelle nous voulions étudier une comorbidité de l'AVC chez le rongeur dans le but d'affiner nos modèles expérimentaux.

Pour le projet principal de ma thèse, nous avons alors choisi d'étudier l'AVC ischémique chez des souris (Swiss, Janvier-labs) présentant une comorbidité/facteur de risque fréquemment rencontré en clinique : le diabète (Bradley *et al.*, 2022). Nous avons utilisé un modèle de diabète de type 1 murin représentatif de la pathologie humaine et parfaitement caractérisé depuis de nombreuses années dans la littérature (Ito *et al.*, 2001; Deeds *et al.*, 2011; King, 2012; Furman, 2015). Le protocole consiste en des injections répétées en IP (pendant 5 jours) de faibles doses de Streptozotocine (STZ ; 40 mg/kg) pour aboutir au bout de quelques jours à l'augmentation de la glycémie sanguine et une baisse du niveau de l'insuline (Figure 38). Ce modèle est très utilisé pour étudier les conséquences pathologiques du diabète et évaluer les approches expérimentales pour le traitement de cette pathologie. La STZ est une molécule utilisée traditionnellement comme agent alkylant à visée antinéoplasique ou comme antibiotique (Vavra *et al.*, 1959; Strolinsky *et al.*, 1972). Elle est particulièrement toxique envers les cellules β des îlots de Langerhans qui produisent et sécrètent l'insuline chez les mammifères ; elle est donc employée en recherche préclinique dans l'induction chimique du diabète de type 1 dans les modèles animaux (du diabète de type 2 si l'induction des animaux est couplée à un régime hyper-gras). À des doses élevées (100 à 200 mg/kg) et en injection unique, la STZ entraîne la destruction rapide des cellules β, ainsi que d'autres types cellulaires dans d'autres organes. La régénération spontanée des cellules est toutefois possible, ce qui limite la pertinence du modèle murin à long-terme (King, 2012; Furman, 2015). Injectée à des doses faibles et répétées (40 mg/kg), comme nous l'avons fait pour ce projet, la STZ diminue l'insulinosécrétion sans pour autant entraîner la mort cellulaire, ce qui permet de mimer chez l'animal l'insulite rencontrée dans le diabète de type 1, tout en limitant la toxicité non désirée (Furman, 2021). Ce modèle peut entraîner des complications dites diabétiques, comme la neuropathie, la néphropathie et l'athérosclérose, à l'instar de la pathologie humaine (Breyer *et*

al., 2005; Usuki *et al.*, 2007; Wu and Huan, 2007). Après au moins deux semaines d'attente après la première injection, ce protocole a permis l'augmentation de la glycémie jusqu'à 250 à 600 mg/dl chez nos souris à jeun, ce qui peut être considéré comme une hyperglycémie d'ordre modérée à sévère.

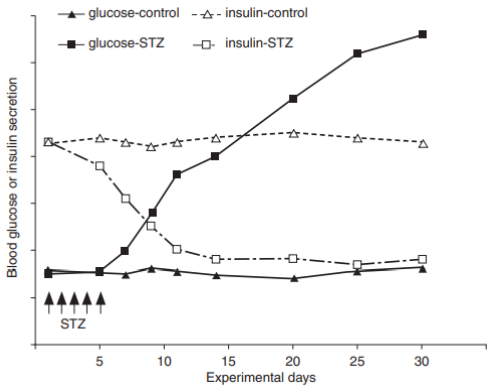


Figure 38 : Effet de l'injection de STZ chez des souris sur le niveau de glucose dans le sang et la sécrétion d'insuline au cours du temps. Les souris ont été traité avec de la STZ (40mg/kg) ou sans STZ (véhicule) pendant 5 jours consécutifs. L'injection de STZ provoque une augmentation du niveau de glucose dans le sang et une diminution de la sécrétion d'insuline (Wu and Huan, 2008).

Le modèle thrombine a été choisi pour cette principale étude car il respecte selon nous le mieux la physiopathologie humaine (avec pour défaut la craniotomie et les effets de l'anesthésie générale). Ce modèle de MCAo présente également l'intérêt majeur de permettre la recanalisation et reperfusion par thrombolyse pharmaceutique et ainsi reproduire la prise en charge clinique des patients atteints d'AVC ischémique. En effet, il a été prouvé maintes fois dans ce modèle que l'administration IV de tPA réduit le volume lésionnel à 24 heures comparé à l'injection de sérum physiologique (Orset *et al.*, 2007, 2016; Karatas *et al.*, 2011; García-Culebras *et al.*, 2017 ; Figure 39).

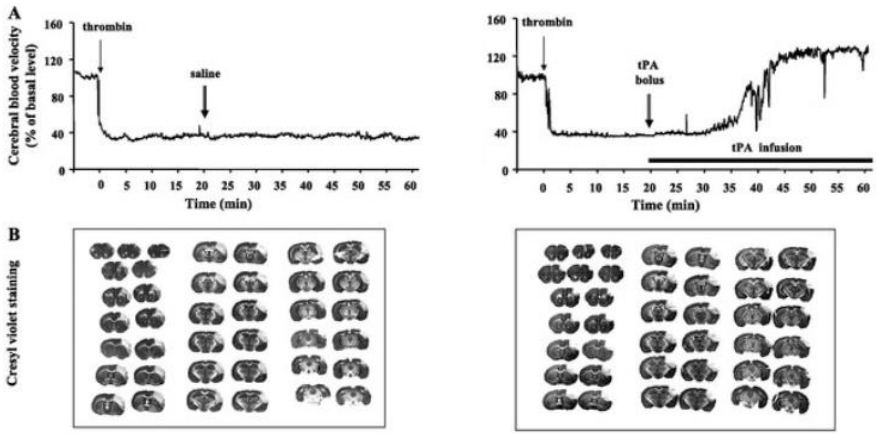


Figure 39 : L'injection du tPA permet une recanalisation et la réduction du volume de lésion ischémique. A. Flux sanguin cérébral après injection de thrombine chez des souris non traitées (saline ; à gauche) et traitées au rtPA (à droite). B. Marquage au crésyl violet de sections coronales post-AVC de souris non traitées (saline, à gauche) et traitées au rtPA (à droite ; Orset *et al.*, 2007).

L'effet du diabète en tant que comorbidité sur l'AVC ischémique préclinique

Dans l'étude présentée dans la partie résultat de ce manuscrit, nous observons que les complications cliniques principales liées au diabète, une comorbidité fréquente dans la population de patients victimes d'un AVC (jusqu'à 50% ; Lindsberg and Roine, 2004; McCormick *et al.*, 2008), sont retrouvées dans notre modèle murin d'AVC ischémique (voir I.H.). En effet, notre modèle de diabète de type 1 expérimental, couplé ou non à l'infusion de tPA, après la MCAo résulte en une augmentation des TH et une exacerbation de l'inflammation cérébrale sans augmenter la mortalité.

Nos résultats montrent que le diabète lié à une hyperglycémie chronique augmente significativement les tailles de lésions ischémiques 24 heures après l'AVC. Dans notre modèle de MCAo, la lésion envahit une part plus importante du cortex en comparaison de celles observées chez les animaux normoglycémiques et s'avère plus étendue dans l'axe antéropostérieur. La recanalisation à 24 heures semble impactée négativement et apparaissent des TH parenchymateuses non observées chez les animaux contrôles. Pour finir, les séquelles et la récupération fonctionnelle à court et à moyen-terme après l'AVC ischémique sont négativement impactées par le diabète. Ces résultats sont en accords avec ceux de la littérature de ces dernières années (MacDougall and Muir, 2011; McBride *et al.*, 2016; Rehni *et al.*, 2017;

Navarro-Oviedo *et al.*, 2019) et permettent ainsi de poursuivre des études mécanistiques sur les processus impliqués dans cette augmentation de la taille de l'infarctus, la réduction du flux sanguin cérébral, et la formation des œdèmes après l'altération de la BHE, aboutissant à ces plus grands déficits cognitifs.

Rajoutons que les animaux diabétiques montrent également un état inflammatoire plus prononcé à 5 jours avec une invasion importante de neutrophiles et lymphocytes dans l'hémisphère ipsilatéral. Nous avons vu précédemment (voir I.F.3.c.) que l'état inflammatoire après un AVC joue un rôle important dans la rupture de la BHE, notamment par l'activité exacerbée des cellules immunitaires, des ROS et des MMP (Spronk *et al.*, 2021). Il est difficile de s'appuyer sur notre étude pour étayer ce lien de causalité car l'inflammation a été observée à 5 jours tandis que les TH ont été observées à 24 heures. De futures expérimentations, concernant les TH et à l'inflammation à différents temps clés s'avéreront intéressantes.

Il était important pour nous de choisir un modèle représentatif de la pathologie humaine (modèle STZ décrit plus haut) plutôt qu'un modèle d'hyperglycémie aiguë ou chronique car les facteurs contribuant à l'exacerbation des TH chez le patient diabétique comprennent effectivement l'hyperglycémie mais également le stress oxydatif vasculaire, l'inflammation et le déséquilibre de la protéolyse extracellulaire (Tsivgoulis *et al.*, 2019). Rappelons que l'hyperglycémie sanguine, causée par les réponses cellulaires face au stress aigu, est fréquemment observée chez les patients non diabétiques lors de leur arrivée à l'hôpital après un AVC ischémique (Christensen *et al.*, 2004). En clinique, l'hyperglycémie, qu'elle soit liée au diabète ou non, est dangereuse car elle conduit à l'augmentation de la taille de l'infarct, à l'apparition plus fréquente de TH symptomatiques et à des déficits fonctionnels plus prononcés (Bevers *et al.*, 2017; Tziomalos *et al.*, 2017; Mi *et al.*, 2018; Rosso *et al.*, 2018; Tsivgoulis *et al.*, 2019). Il sera donc important dans la continuité de mes travaux de thèse, de déterminer l'effet unique de l'hyperglycémie selon la même méthodologie afin de discriminer la responsabilité du seul taux de glucose sanguin élevé sur l'AVC ischémique en phase aigüe. Bien qu'il existe des articles disponibles dans la littérature scientifique sur l'effet de l'hyperglycémie seule sur l'aggravation des AVC ischémiques (Khan *et al.*, 2016; Couret *et al.*, 2018).

Notre modèle murin d'AVC ischémique couplé à l'hyperglycémie chronique induite par le diabète de type 1 pourrait spécifiquement être un bon modèle pour étudier les altérations de la BHE conduisant aux TH, qui sont l'une des conséquences les plus fréquente et importante en termes de dommages cérébraux, autant chez le rongeur que chez les patients. Depuis quelques années, le besoin d'un modèle spontané de TH est de plus en plus pressant pour tester l'innocuité, en plus de l'efficacité, des agents thérapeutiques thrombolytiques et/ou neuroprotecteurs.

L'effet du tPA dans notre modèle d'AVC ichémique chez des animaux diabétiques

Comme nous l'avons développé plus tôt, l'administration IV de tPA en tant que traitement thrombolytique chez les patients présentant une hyperglycémie à l'arrivée à l'hôpital après un AVC ischémique n'est absolument pas préconisée (Jiang, Han, *et al.*, 2021). Premièrement, l'aptitude du tPA à recanaliser lors de la phase aigüe de l'AVC ischémique est sérieusement entravée chez les individus diabétiques et/ou hyperglycémiques du fait d'un taux plasmatique plus élevé d'inhibiteur du tPA (PAI-1), des lésions vasculaires athérogènes chez les diabétiques, ou encore des altérations de la densité du caillot de fibrine dans le sang anormalement sucré (Paciaroni *et al.*, 2008; Jiang, Han, *et al.*, 2021). Et deuxièmement, la capacité du tPA à engendrer des TH dans toutes les populations avec ou sans morbidités (voir II.) est exacerbée dans des conditions hyperglycémiques. En effet, le haut niveau de glucose sanguin provoque l'augmentation de l'acidose lactique dans le sang entraînant l'aggravation de l'œdème cytotoxique et la réduction de la pénombre (Paciaroni *et al.*, 2008).

Dans notre étude préclinique, nous avons également utilisé le tPA en tant que traitement de référence. La dose de rtPA utilisée dans cette étude est de 10 mg/kg, par injection IV comme en clinique, soit 10 % en bolus et 90 % en perfusion pendant 40 minutes. Nous avons utilisé cette dose standardisée chez le rongeur depuis des années au lieu des 0,9 mg/kg chez l'Homme, puisque le rtPA présente une affinité dix fois moindre pour le plasminogène murin par rapport au plasminogène humain (Haelewyn, Risso and Abraini, 2010). Le rtPA, à l'instar de tous les médicaments utilisés dans nos expérimentations, a été administré 20 minutes après le début de l'AVC, respectant ainsi la fenêtre thérapeutique de 90 minutes préconisée pour les modèles précliniques d'AVC ischémiques. Tous nos traitements ont donc

été administrés en accord avec leur utilisation clinique réelle ou potentielle, toujours dans ce fameux but de pertinence translationnelle.

Nos travaux confirment la fonction thrombolytique du tPA dans le modèle thrombine, maintes fois démontrée (Orset *et al.*, 2007, 2016), sur des animaux normoglycémiques avec une action bénéfique sur les tailles de lésions et la recanalisation à 24 heures, sur la reperfusion dans les 30 minutes après injection et sur la récupération fonctionnelle au cours du temps. Dans notre étude, le tPA engendre des TH d'ordre parenchymateuse à 15% des animaux sans comorbidité, ce qui reflète les effets néfastes du tPA bien documentés sur l'intégrité de la BHE en condition pathologique et de traitement (Fredriksson, Lawrence and Medcalf, 2016; Lewandowski *et al.*, 2016; D'Souza *et al.*, 2021).

Dans nos différentes expérimentations, avec des cohortes d'animaux différentes mais en prenant soin de respecter la même méthodologie, nous avons observé l'incapacité du tPA à réduire la taille de l'infarctus chez les animaux hyperglycémiques, tout en augmentant la sévérité et la proportion de TH, aboutissant à des atteintes sensorimotrices à court et moyen terme plus sévères. De manière intéressante, même si la capacité de recanalisation et de reperfusion tissulaire du tPA est altérée par le diabète, elle reste néanmoins présente dans nos expérimentations. Ce qui implique une plus grande sensibilité du cerveau à l'hypoxie et la déprivation énergétique après un AVC chez les animaux diabétiques. On peut donc rapporter que le diabète convertit les caillots sensibles au rtPA en caillots partiellement résistants, aggravant ainsi l'issue de l'AVC dans notre modèle.

Chez les animaux sans comorbidités, le modèle d'AVC thromboembolique induit par la thrombine conduit donc à un caillot riche en fibrine, sensible au traitement de tPA sans apparition significative de TH si la fenêtre thérapeutique est respectée (Orset *et al.*, 2016). Certaines études ont rapporté le fait que l'injection de tPA en dehors de la fenêtre thérapeutique (au-delà de 90 minutes après l'AVC) entraîne des complications hémorragiques majeures chez les animaux (García-Yébenes *et al.*, 2011; García-Culebras *et al.*, 2017). C'est pourquoi nous avons administré le tPA 4 heures après le début de l'AVC chez des animaux diabétiques pour voir si nous pouvions moduler le taux d'apparition et surtout la sévérité des TH. Ceci dans le but de caractériser un modèle de TH avec des degrés de sévérité différente. Cependant, dans nos conditions, aucune différence hémorragique et ischémique n'a pu être

observée entre les animaux diabétiques traités au tPA de façon précoce (*early*, 20 minutes) ou plus retardée (*late,* 4 heures*)*. Dans une méta-analyse de 2016, C. Orset et ses collaborateurs ont toutefois conclu que l'administration du tPA dans le modèle thrombine n'augmente pas significativement la survenue des TH, qu'il soit injecté 20 minutes ou 4 heures après l'AVC. En effet sur 9 études administrant le tPA en dehors de la fenêtre thérapeutique après MCAo, seulement une a rapporté des phénomènes de TH (Orset *et al.*, 2016).

Nos travaux montrent également que la neuroinflammation à 5 jours caractérisée par l'invasion cérébrale par les cellules immunitaires, exacerbée par le diabète n'est pas modulée par le tPA, ni en bien ni en mal. Nous avions discuté dans la partie II.E.g. de l'aptitude du tPA en surdose à mobiliser de nombreux types cellulaires du système immunitaire lors d'un AVC ischémique, augmentant alors les TH (Shi *et al.*, 2021 ; Figure 14). Ce lien direct n'est pas démontré dans nos travaux puisque la fenêtre d'observation des TH est de 24 heures tandis que celle de l'infiltration cérébrale des cellules immunitaires est de 5 jours après l'AVC.

Le risque de TH après un AVC ischémique chez l'Homme est l'une des limites les plus importantes (sinon la plus importante) à l'augmentation de la population éligible au tPA et de sa fenêtre thérapeutique (Messé *et al.*, 2016; Peña *et al.*, 2017; Kaesmacher *et al.*, 2018; Maïer, Desilles and Mazighi, 2020). Ainsi, notre modèle fournit également un outil préclinique utile pour l'étude des mécanismes menant aux TH *via* le diabète et le tPA. Ce modèle permettra également (en tout cas dans notre laboratoire) de filtrer plus précisément le profil d'innocuité des nouveaux candidats thrombolytiques avant le transfert clinique.

La NAC, une alternative au tPA après un AVC ischémique sur des animaux diabétiques ?

Rappelons une dernière fois que la fibrine ne représente qu'une partie du thrombus et que le tPA n'a que très peu d'efficacité sur les thrombi pauvres en fibrines et/ou riches en plaquettes (Adams *et al.*, 2008; Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017). Dans notre modèle de murin d'AVC couplé au diabète, les thrombi deviennent donc partiellement résistants au tPA, qui a également pour fâcheuse conséquence d'augmenter les TH. Il nous semblait alors intéressant de tester le potentiel de la NAC (voir III.) dans notre modèle pour trois raisons principales :

S. Martinez de Lizarrondo et ses collaborateurs ont prouvé en 2017 dans *Circulation* la pertinence de l'utilisation de la NAC dans deux modèles murins thromboemboliques de notre laboratoire. La NAC (400 mg/kg), injectée 20 minutes après l'AVC, a la capacité de réduire la taille des multimères du VWF structurant les plaquettes à l'intérieur des thrombi artériels dans le modèle $FeCl_3$ (riche en plaquette et pauvre en fibrine) et le modèle thrombine (riche en fibrine mais présentant également des plaquettes en quantité variable). La résultante de cette action est la dissolution des thrombi et la recanalisation artérielle, sans présenter de risque de TH (Martinez de Lizarrondo et al., 2017 ; Figure 40). Les auteurs montrent que la NAC baisse significativement la taille de lésion ischémique à 24 heures quelle que soit la composition du clot, contrairement au tPA efficace uniquement face aux thrombi pauvres en plaquettes (Orset *et al.*, 2016). D'autres travaux sur les rongeurs ont montré les bénéfices de la NAC dans différents modèles de MCAo (Cuzzocrea et al., 2000; Khan et al., 2004; von Kummer et al., 2016; Karuppagounder et al., 2018; Sabetghadam et al., 2020).

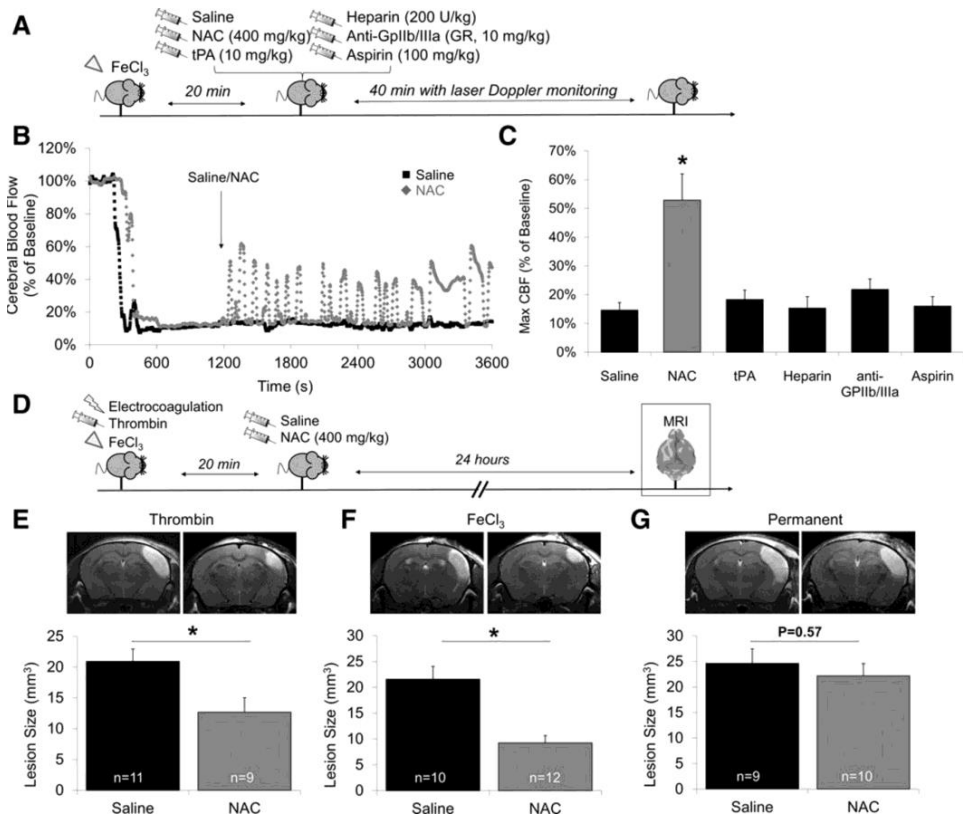


Figure 40 : La NAC restaure la perméabilité des vaisseaux après une thrombose occlusive et améliore l'issue de l'AVC thrombotique. A. Représentation schématique des expériences réalisées en B. et C. B. Débitmétrie Doppler représentative

réalisée après lésion au FeCl3 sur l'ACM chez des animaux traités avec une solution saline ou la NAC (400mg/kg). La flèche indique le temps d'injection intraveineuse de solution saline ou de NAC. C. Valeur moyenne du CBF au cours des 10 dernières minutes de surveillance. D. Représentation schématique des expériences réalisées en E, F et G. E. Taille moyenne des lésions chez les animaux traités avec une solution saline et la NAC (400 mg/kg, 20 minutes après l'occlusion artérielle). 24 heures après l'occlusion de l'ACM dans des modèles d'AVC induits par la thrombine (E), FeCl3(D.)- et l'électrocoagulation permanente (E.), évalués par imagerie pondérée en T2. En haut, images représentatives pondérées en T2 d'animaux traités avec de la solution saline et la NAC (Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017).

Un essai clinique est désormais en cours pour tenter de fournir la preuve définitive de l'efficacité et l'innocuité de la NAC administrée en IV dans la phase aigüe de l'AVC ischémique chez des patients (ClinicalTrials.gov Identifier : NCT04918719) en combinaison avec les traitements de référence, la thrombolyse médiée par le rtPA avec ou sans thrombectomie endovasculaire.

La pertinence clinique de l'utilisation de la NAC dans l'AVC ischémique préclinique est également étayée par le fait que la molécule améliore la condition des patients atteints d'infarctus aigu du myocarde traités à la streptokinase, en permettant une reperfusion coronarienne plus rapide (Arstall *et al.*, 1995; Sochman, 2002; Marenco and Frye, 2019). De même, l'essai clinique NACIAM a démontré que l'utilisation de la NAC chez les patients atteints d'infarctus du myocarde entraîne une reperfusion tissulaire accélérée, une résolution plus rapide de la douleur thoracique et une réduction de 33 % de la taille de l'infarctus du myocarde par rapport aux patients témoins traités avec un placebo (Pasupathy *et al.*, 2017).

Un certain nombre d'études expérimentales et cliniques ont rapporté les effets de la NAC en tant qu'agent thérapeutique dans les diabètes de type 1 et 2 (Elbini Dhouib *et al.*, 2016). Car la NAC est un puissant antioxydant en raison de sa capacité à stimuler la synthèse du glutathion réduit (GSH), donc activé, permettant ainsi la lutte contre le stress oxydatif induit par l'hyperglycémie sanguine. Plusieurs études ont mis en évidence que la supplémentation alimentaire en NAC améliore la sensibilité périphérique à l'insuline, en plus de prévenir le stress oxydatif, chez les rats insulinorésistants (Blouet *et al.*, 2007; Ismael *et al.*, 2008).

De plus, Kaneto et ses collaborateurs ont démontré des effets protecteurs à long-terme de la NAC sur les cellules β pancréatiques des souris génétiquement diabétiques. Dans ce modèle, au fur et à mesure que les souris développent une hyperglycémie sanguine, la teneur en insuline et l'expression de ses gènes diminuent de concert. Le traitement par la NAC est alors associé à une teneur en insuline préservée (Kaneto *et al.*, 2001). Des résultats similaires ont

également été rapportés dans une autre étude, chez les rats gras diabétiques (Tanaka *et al.*, 1999). Enfin, dans une étude chez l'Homme, la perfusion intraveineuse de NAC améliore la sensibilité à l'insuline à court-terme et augmente l'absorption périphérique du glucose.

Pour ce projet, la NAC a été injectée à une dose de 400 mg/kg sous forme de bolus lent, comme l'avaient fait S. Martinez de Lizzarando et collaborateurs. Cela correspond à une dose qui n'est que légèrement plus élevée (car plus rapidement injectée) que la dose utilisée pour traiter l'intoxication au paracétamol chez l'Homme (300 mg/kg). Nous avons prouvé avec le modèle thrombine sur les animaux diabétiques que la NAC est également capable de réduire les tailles des lésions lorsqu'elle est couplée ou non avec le tPA, en favorisant la recanalisation à 24 heures. L'administration de la NAC seule permet de retrouver le niveau basal de TH présenté par les animaux diabétiques non-traités. Et la co-administration de tPA avec la NAC exacerbe de nouveau la proportion et la sévérité des TH. De manière intéressante, les animaux traités avec la NAC seule ainsi que les animaux co-traités avec le tPA et la NAC présentent tous deux une meilleure récupération fonctionnelle au cours du temps.

Surmonter la résistance des thrombi face aux thrombolytiques conventionnels semble désormais possible grâce à l'utilisation de la NAC après un AVC ischémique. Cette molécule a également l'avantage de ne pas augmenter les phénomènes de TH dans notre modèle d'étude.

L'immunothérapie pour potentialiser la thrombolyse et limiter les effets délétères du tPA : le Glunomab

Les complications sévères (telle que l'inflammation et les TH, entre autres) liées au tPA en tant que traitement de l'AVC ischémique ont pour origine directe l'interaction du tPA avec les NMDAR endothéliaux lors de la phase aigüe de l'AVC. En effet, les fonctions du tPA endogène et exogène ne se limitent pas à son activité pro-fibrinolytique ; par exemple, la protéase est maintenant considérée comme une molécule de type cytokine et comme un neuromodulateur des NMDAR du SNC (Hu *et al.*, 2006; Lenoir *et al.*, 2019). Pour bloquer la signalisation des NMDAR endothéliaux dépendant du tPA endogène et exogène, nous avons donc utilisé le Glunomab (voir III.), un anticorps monoclonal capable de concurrencer le site de liaison du tPA à la sous-unité GluN1 des NMDAR sans bloquer l'activité basale du récepteur (Parcq *et al.*, 2012; Chevilley *et al.*, 2015; Lesept *et al.*, 2016; Macrez *et al.*, 2016; Mehra *et al.*,

2020; Seillier *et al.*, 2022). En effet, dans un article publié par le laboratoire en 2016, Lesept et collaborateurs ont observé que l'interaction du tPA avec les NMDAR favorisent l'influx de Ca^{2+} dans les neurones postsynaptiques de souris en culture, influençant effectivement la plasticité synaptique et la survie neuronale (Lesept *et al.*, 2016). Les auteurs ont ensuite appliqué sur ces neurones du Glunomab pour alors observer la réduction sélective de l'interaction tPA/NMDAR dans la synapse entraînant une chute significative de la neurotoxicité *in vitro*. Cette étude a également permis de confirmer la diminution de la neurotoxicité du Glunomab *in vivo* (Figure 41).

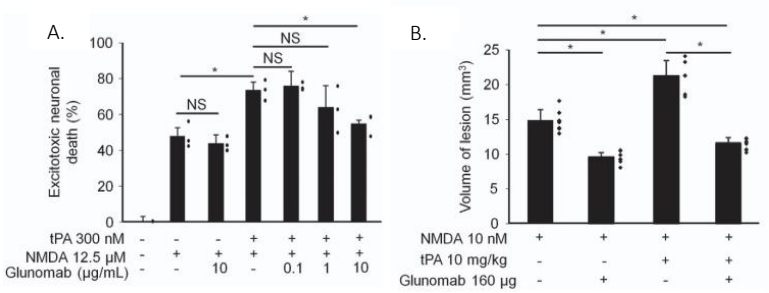


Figure 41 : Le blocage de la liaison tPA-NMDA (sous unité GluN1) prévient les effets pro-excitotoxiques du tPA *in vitro* et *in vivo* sans impacter ses effets anti-apoptotiques. A. La mort neuronale a été évaluée sur des cultures primaires de neurones corticaux en mesurant la libération de LDH dans le milieu de culture après 24h d'exposition au NMDA seul ou combiné au tPA et/ou Glunomab. B. Quantification du volume de lésions excitotoxiques après injection striatale de NMDA seul ou combiné au tPA et/ou Glunomab (Lesept et al., 2016).

À une dose de 160 µg par souris, on sait que le Glunomab bloque l'activation par le tPA des NMDAR endothéliaux et donc les processus inflammatoires, dans un modèle *in vivo* de SEP (Lesept *et al.*, 2016; Macrez *et al.*, 2016). Concernant l'efficacité du Glunomab après AVC ischémique, une étude interne du laboratoire a permis de déterminer que la dose la plus efficace du même modèle thromboembolique était de 300ug (20 minutes après l'AVC en bolus lent). Ainsi, nous avons montré pour ce projet que l'administration du Glunomab couplé au tPA après MCAo chez des animaux normoglycémiques permet au tPA d'exercer son action fibrinolytique de la même façon que s'il est injecté seul, tout en limitant considérablement l'apparition de TH parenchymateuse. De manière intéressante, le Glunomab administré seul réduit également les tailles de lésions : on observe alors l'effet local du tPA endogène sur les thrombi facilité par sa non-interaction avec les NMDAR endothéliaux. Chez les animaux diabétiques, le constat est sensiblement le même avec un effet statistique du Glunomab couplé

ou non au tPA sur les tailles de lésion à 24 heures, contrairement à l'administration seule du tPA. Le Glunomab n'entrave pas la reperfusion en temps réel du tPA exogène et potentialise son effet sur la recanalisation à 24 heures. Retenons surtout dans ces résultats que le Glunomab annule la capacité du tPA à induire des TH dans la population préclinique diabétique. Surlignons le fait que la combinaison de NAC et Glunomab permet d'obtenir la meilleure récupération fonctionnelle des animaux diabétiques après AVC au cours du temps.

Nos données actuelles révèlent ainsi que la signalisation induite par l'interaction entre NMDAR et tPA endogène et exogène contribue directement aux mécanismes d'ouverture de la BHE et des TH, en plus des mécanismes d'excitotoxicité déjà démontrés (Macrez *et al.*, 2016; Louet *et al.*, 2022; Seillier *et al.*, 2022). Ces processus impliquent directement les cellules endothéliales, puisque le Glunomab administré par IV atteint, par ce moyen, sa cible principale, les NMDAR présents sur les cellules endothéliales vasculaires. Nous pouvons alors postuler que les fonctions non-voulues du tPA après un AVC ischémique dépendent principalement du NMDAR présent du côté luminal des cellules endothéliales.

Lien entre Glunomab, AVC ischémique et inflammation

Le cerveau contient différentes populations de cellules résidentes qui peuvent contribuer à l'inflammation à la suite d'un AVC ischémique lorsqu'elles sont activées, comme la microglie et les BAM (*Border Associated Macrophages* ; Pedragosa *et al.*, 2018; Rajan *et al.*, 2020). Mais d'autres cellules peuvent contribuer à l'exacerbation de l'état inflammatoire post-AVC, en particulier les cellules immunitaires circulantes comme les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes T (Chen *et al.*, 2021; Kumari and Sinha, 2021; Wanrooy, Wen and Wong, 2021). Ces cellules ont la capacité de traverser la BHE lésée en condition pathologique pour atteindre ensuite le parenchyme cérébral (Qiu *et al.*, 2021; Candelario-Jalil, Dijkhuizen and Magnus, 2022).

Après cette infiltration et pour simplifier des mécanismes très complexes encore mal compris, on peut résumer les lymphocytes cytotoxiques ($TCD8^+$) à leur rôle toxique aggravant la situation post-AVC tandis que les lymphocytes auxiliaires ($TCD4^+$) seraient principalement neuroprotecteurs (tout comme les lymphocytes T régulateurs ; Zhang *et al.*, 2021). Les rôles des macrophages et des neutrophiles font encore l'objet de débats et leurs fonctions

varieraient selon la fenêtre d'observation après l'AVC (Chiba and Umegaki, 2013; Han, Liu and Gao, 2020).

En se basant sur la méthodologie d'études récentes de notre laboratoire (Drieu *et al.*, 2018b; Drieu, Buendia, Levard, Hélie, Brodin, Vivien and Rubio, 2020; Drieu, Lanquetin, Levard, Glavan, Campos, Quenault, Lemarchand, Mikaël Naveau, *et al.*, 2020), nous avons étudié la présence de ces différents types de cellules dans différentes conditions de traitement, 5 jours après le début de l'AVC. Comme attendu, l'AVC augmente le statut inflammatoire du parenchyme cérébral lésé, phénomène aggravé par l'hyperglycémie chronique et l'exposition au tPA en tant que traitement. De son côté, le Glunomab réduit l'infiltration des neutrophiles et des lymphocytes T cytotoxiques, même dans le cas d'un traitement avec le tPA lors de la phase aigüe.

Même s'il existe des preuves d'un impact des réponses inflammatoires et immunitaires systémiques dans les TH après un AVC ischémique (Saand *et al.*, 2019; Spronk *et al.*, 2021), il est difficile dans notre étude de déterminer quel phénomène se produit en premier entre l'altération de l'intégrité de la BHE (TH mesurée 24 heures après le début de l'AVC) et l'infiltration de cellules inflammatoires dans le parenchyme cérébral (mesurée 5 jours après l'AVC), et ainsi de déterminer temporellement l'effet protecteur du glunomab. Néanmoins, on peut tout de même supposer raisonnablement que les deux phénomènes contribuent aux déficits observés après l'AVC ischémique dans notre modèle.

Ces données concordent avec le concept assez récent mais bien accepté, selon lequel le ciblage de la dysrégulation du système immunitaire pourrait être une bonne stratégie pour favoriser le rétablissement cérébral après un AVC. Même si dans les faits, le Glunomab ne cible pas directement les cellules du système immunitaire, mais fermerait plutôt la « porte d'entrée » que ces cellules utilisent pour traverser le BHE (Macrez *et al.*, 2016; Mehra *et al.*, 2020), réduisant ainsi les TH et l'inflammation cérébrale. Ces mécanismes doivent être étudiés dans une prochaine étude de notre laboratoire.

Après analyse de l'ensemble de nos résultats, nous pouvons conclure que le Glunomab seul (ciblant ainsi le tPA endogène) ou combiné avec un thrombolytique, réduit les volumes de lésions ischémiques et l'apparition des TH dans le tissu cérébral lésé, améliorant ainsi le niveau inflammatoire cérébral et la récupération fonctionnelle à court et moyen-terme chez la

population diabétique. Le ciblage de l'interaction du tPA avec les NMDAR constitue donc une stratégie très intéressante qui doit être étudiée plus en profondeur en préclinique, avant, nous l'espérons, de voir un essai clinique dédié à cette molécule pour la pathologie qui nous intéresse dans ces travaux, l'AVC ischémique. Le Glunomab, sous une forme humanisée, est actuellement en développement pour une application clinique future chez les patients ischémiques.

Les limites de notre étude

Bien que notre méthodologie et nos résultats semblent être en adéquation avec les observations cliniques, nos travaux présentent certaines limites.

- ✓ Les thrombi humains, après un AVC ischémique, peuvent avoir des structures moléculaires complexes très différentes chez les patients, que nous ne pouvons pas reproduire dans notre étude en ayant choisi le modèle de MCAo par injection de thrombine (qui reste au demeurant l'un des modèles les plus respectueux de la physiopathologie humaine).

- ✓ D'ailleurs plus globalement, même si les différentes données de la littérature mettent en exergue le fait que le ciblage de l'interaction du tPA avec les NMDAR pendant l'AVC ischémique pourrait avoir un intérêt clinique, la pertinence des modèles animaux est toujours débattue (voir IV.C.).

- ✓ Bien que l'injection multiple de faibles doses de STZ reproduit *in fine* correctement la pathogénèse et les changements morphologiques rencontrés chez un diabétique en clinique (Kolb, 1987; Weide and Lacy, 1991; Furman, 2021), ce modèle de diabète pseudo-chronique utilisé pour ces travaux peut ne pas reproduire parfaitement les situations d'hyperglycémies chroniques rencontrées en clinique.

  Les modèles murins les plus représentatifs du diabète de type 1 sont sans doute les modèles spontanés (Lueckgen, 2021). Les souris NOD (*non-obese diabetic*) développent spontanément à partir de 3 semaines une insulite après l'autodestruction des cellules β du pancréas pour aboutir à une hyperglycémie à l'âge de 12, 14 semaines (Chen *et al.*, 2020; Daniels Gatward *et al.*, 2021). L'avantage de ce modèle, par rapport au nôtre, est qu'il partage l'étiologie de la maladie auto-immune humaine avec la génération

d'autoanticorps spécifiques aux îlots de Langerhans du pancréas. L'utilisation de ce modèle, beaucoup plus coûteux en termes de temps et de ressources, permettrait d'obtenir des résultats plus translationnels, surtout concernant l'observation de l'inflammation après l'AVC.

L'autre défaut de notre méthodologie est probablement l'induction trop précoce de l'AVC chez nos animaux (3-4 semaines après le début des injections de STZ). Une attente prolongée de quelques semaines renforcerait le côté chronique de la pathologie et permettrait peut-être d'observer les changements vasculaires cérébraux à l'origine des transformations hémorragiques tardives (au-delà des 24 heures) chez les patients diabétiques (Durukan *et al.*, 2009; Sobrino *et al.*, 2010; Tsivgoulis *et al.*, 2019; Jiang, Han, *et al.*, 2021). Cette limite en cachait donc une autre : dans nos prochaines études nous évaluerons également les TH tardives 3 et 5 jours après l'AVC.

- ✓ D'autres comorbidités seraient intéressantes à inclure dans ce genre d'étude, comme l'hypertension artérielle et le vieillissement (voir IV.C.). Il serait également important de tenir compte des deux sexes pour tester de nouveaux agents thérapeutiques et c'est précisément l'objet d'une étude actuelle au laboratoire (fin 2022).

- ✓ Comme nous l'avons vu précédemment, des niveaux accrus d'inhibiteur du plasminogène de type 1 (PAI-1) dans la circulation sanguine ont été signalés chez les patients insulino-résistants (bien que cela ne soit pas forcément vrai pour le diabète de type 1, ce qui pourrait expliquer en partie les défauts fibrinolytiques du tPA dans cette étude (Altalhi, Pechlivani and Ajjan, 2021). Il serait intéressant de mener d'autres études sur les niveaux endogènes de PAI-1 et du tPA dans le cadre d'une étude future pour continuer la caractérisation de ce modèle de diabète.

CONCLUSION

Notre modèle préclinique de MCAo thromboembolique sur des souris induites au diabète insulino-dépendant semble reproduire les principaux effets cliniques de l'hyperglycémie en tant que comorbidité de l'AVC. Les souris diabétiques présentent des lésions plus importantes, un défaut de reperfusion et des déficits sensorimoteurs plus marqués que leurs homologues normoglycémiques. Ajoutons que le tPA, pourtant administré dans sa fenêtre thérapeutique, n'améliore pas ces résultats, comme il le fait pour des animaux sans comorbidités. De surcroît, il favorise l'apparition de TH précoces ainsi que l'exacerbation du statut inflammatoire. Nous avons prouvé que ces effets secondaires sont médiés, en partie, par l'interaction du tPA avec les NMDAR endothéliaux.

Nous démontrons dans ces travaux la pertinence de l'utilisation de la NAC, ayant déjà prouvé son efficacité sur des animaux sans comorbidités, pour la population diabétique. Dans notre modèle, ce thrombolytique a démontré sa capacité à lyser des thrombi devenus partiellement résistants au tPA sans augmenter la proportion de transformations hémorragiques. Cette molécule fait actuellement l'objet d'une étude clinique (ClinicalTrials.gov Identifier : NCT04918719).

De plus, la stratégie thérapeutique impliquant le blocage de l'interaction du tPA endo- et exogène avec les NMDAR semble prometteuse pour les futures patients présentants des facteurs de comorbidités ou non. En effet, l'administration du Glunomab, seule ou en combinaison avec le tPA ou la NAC, lors de la phaise aigüe de l'AVC permet de limiter les dommages ischémiques tout en entravant les effets non-désirés des thrombolytiques.

Pour finir, l'ensemble de nos résultats confirment la valeur translationnelle de notre modèle qui pourra être utilisé à l'avenir pour :

- ✓ Etudier les mécanismes mal connus qui sous-tendent les effets du diabète sur l'évolution et la prise en charge de l'AVC
- ✓ Fournir un modèle préclinique de TH spontanée post AVC ischémique
- ✓ Tester les thérapeutiques de demain

AUTRES TRAVAUX

Experimental Neurology 347 (2022) 113881

Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Neurology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexnr

Research paper

Post-acute delivery of α5-GABAA antagonist, S 44819, improves functional recovery in juvenile rats following stroke

Florent Lebrun [a,b], Nicolas Violle [a], Annelise Letourneur [a], Christophe Muller [a], Nicolas Fischer [a], Anthony Levilly [c], Cyrille Orset [b,c], Aurore Sors [d], Denis Vivien [b,e,*]

[a] ETAP-Lab, STROK@LLIANCE, 13 Rue du Bois de la Champelle, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France
[b] Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @Caen-Normandie (BB@C), UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Caen, France
[c] ESRP (European Stroke Research Platform), Centre Universitaire de Ressources Biologiques (CURB), Université Caen Basse Normandie, Caen, France
[d] Institut de Recherches Internationales Servier, Suresnes, France
[e] Department of Clinical Research, CHU Caen-Normandie, Caen, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Animal model
Behavioural tests
GABA
Recovery
Stroke

ABSTRACT

Hypo-excitability was reported in the peri-infarct tissue following stroke, an effect counteracted by a blockage of α5-GABAA receptors in adult rodents. Our present study aims to evaluate the effect of a selective α5-GABAA receptor antagonist, S 44819, in stroke in juvenile animals. We have set up and characterized an original model of transient ischemic stroke in 28 day-old Sprague-Dawley rats (45-min occlusion of the middle cerebral artery by intraluminal suture). In this model, S 44819 (1, 3 and 10 mg/kg, b.i.d) was orally administered from day 3 to day 16 after stroke onset. Sensorimotor recovery was assessed on day 1, day 9 and day 16 after stroke onset. Results show that rats treated with S 44819 at the doses of 3 and 10 mg/kg displayed a significant improvement of the neurological deficits (neuroscore) on day 9 and day 16, when compared with animals treated with vehicle. Grip-test data analysis reveals that rats treated with S 44819 at the dose of 3 mg/kg displayed a better recovery on day 9 and day 16. These results are in agreement with those previously observed in adult rats, demonstrating that targeting α5-GABAA receptors improves neurological recovery after stroke in juvenile rats.

1. Introduction

Stroke is one of the main causes of mortality worldwide and is the first cause of long-term disability in adulthood with an important socioeconomic impact (Donnan et al., 2008). Academic research and pharmaceutical industry have been focusing on stroke research for decades. Except for thrombectomy, years of research did not widen the scope for improvements at the bedside.

Gamma aminobutyric acid (GABA) is a major inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system, reducing neural excitability by binding to ionotropic GABA type A receptor and metabotropic GABA type B receptor (Szabadics et al., 2006). Preclinical data suggest that the GABAergic system plays a key role in the *post*-acute evolution of ischemic lesions by maintaining hypo-excitability in regions surrounding the infarct area, especially in the motor cortex (Alia et al., 2016; Carmichael, 2012; Clarkson et al., 2010). Whereas elevated tonic inhibition of neural activity in the peri-infarct region may be neuroprotective in the excitotoxic phase of stroke, it may antagonize the neuronal plasticity required for functional recovery afterwards (Clarkson et al., 2010)·(Li et al., 2013). For instance, some studies have demonstrated that targeting GABA type A receptor containing α5 subunits (α5-GABAA) with negative allosteric modulators (NAM) decreased peri-infarct neuronal inhibition and improved stroke-induced motor deficits in rodents (Clarkson et al., 2010)·(Atack et al., 2006)·(Lake et al., 2015). Moreover, Clarkson et al. (2010) have showed that α5-GABAAR knock-out mice displayed a quicker motor recovery after stroke compared to wild type animals (Clarkson et al., 2010). Overall, these results highlight the interest to reduce the excessive GABAergic activity mediated by α5-GABAAR for *post*-stroke functional recovery.

S 44819 is the first selective antagonist of GABAAR that interacts at

Non-standard abbreviations and acronyms: CBF, Cerebral blood flow; GABA, Gamma aminobutyric acid; GABAAR, Gamma aminobutyric acid type A receptor; α5-GABAAR, Gamma aminobutyric acid type A receptor containing α5 subunits; MCAO, Middle cerebral artery occlusion; NOR, Novel object recognition.

* Corresponding author at: U1237-INSERM, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @Caen-Normandie (BB@C), Boulevard Henri Becquerel, Caen 14000, France.
E-mail address: vivien@cyceron.fr (D. Vivien).

https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113881
Received 19 April 2021; Received in revised form 21 September 2021; Accepted 24 September 2021
Available online 29 September 2021
0014-4886/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

the GABA binding-site of α5-GABAAR, without affinity for the benzodiazepine site (Etherington et al., 2017). This novel α5-GABAAR antagonist was reported to reduce sensorimotor deficits and to improve cognition in rats and mice 2 weeks after transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) when the compound is administered sub-chronically from the 3rd day after stroke onset, with benefit maintained after a 14 day-washout period (Wang et al., 2018)·(Gacsályi et al., 2018). S 44819 did not reduce the volume of the infarct but induced peri-infarct brain remodelling, including a decrease of secondary striatal atrophy, reduced astrogliosis and an increase of the brain capillary density (Wang et al., 2018). Whereas tonic inhibition in the acute phase of stroke may protect ischemic tissue from excitotoxic injury, it also impairs neuronal remodelling and plasticity. It is why we decided to start S 44819 treatment at D3 after stroke to avoid interference during acute phase of stroke. Based on this scientific rationale, S 44819 offers a new opportunity to treat functional disorders after stroke. It was thus evaluated in a Phase IIb clinical trial in adult patients after an ischemic stroke, unfortunately with no influence on clinical recovery at 3 months (Chabriat et al., 2020b; Chabriat et al., 2020a).

Ischemic stroke affects 1 to 2 out of 100,000 children every year in Western developed countries, and incidence varies by age and sex (Lehman et al., 2018). In children, stroke-related mortality is estimated at 8.4% in the United States (Fullerton et al., 2002). If children who survive an ischemic stroke have a better functional recovery than adults, they nevertheless suffer of long-term neurological deficits with no treatment identified so far ("Do children really recover better? Neurobehavioural plasticity after early brain insult | Brain | Oxford Academic," n.d.; "Management of Stroke in Infants and Children| Stroke," n.d.). There is up to now no clinical trial with proven drug efficacy in children stroke. It is thus relevant to implement a juvenile model of stroke and to use it to explore new therapeutic strategies, here with a particular interest for the GABAergic system previously evaluated in a model of stroke in adults.

In order to support the use of S 44819 in the paediatric population, the aim of this study was to evaluate the effect of S 44819 on functional recovery in a stroke model in juvenile rats on *post*-natal day 28, corresponding approximatively to 6-years old children regarding the maturation of the CNS (Semple et al., 2013), (Pressler and Auvin, 2013).

2. Materials and methods

2.1. TOP guidelines: data available on request from the authors

2.1.1. Animals

All experiments were performed on male Sprague-Dawley rats (14 days at receipt, 60-75 g, Janvier Lab, Le Genest-Saint-Isle). Rats were housed with their mother at arrival and weaned at 21 day-old. During all the experimentation, animals were maintained in standard husbandry conditions (temperature: 22 ± 2 °C; hygrometry: 50 ± 20%) under reversed light-dark cycle (light from 20:00 to 8:00) with *ad libitum* access to water and food. After MCAO, animals were single-housed for 7 days to improve recovery. During this period, easy-to-eat nutritive gel food (DietGel® Recovery, ClearH2O, Portland, ME, USA) was added in each cage.

Rats were randomized during tests and experiments and analyses were performed blindly by trained experimenters in order to obtain balanced groups in weight and in deficits before treatment. All procedures were performed in compliance with the ethical rules in accordance with the European Directive of 22 September 2010 concerning animal experimentation (2010/63/EU). The protocol was submitted for ethic approval to the Ministry of Higher Education and Research to obtain a project authorization for using animals for scientific purposes. The experiments have been reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Animal Research: Reporting *in Vivo* Experiments).

2.1.2. Drug

S 44819 was provided by Institut de Recherches Internationales Servier (IRIS, Suresnes, France) as a powder containing S44819–11/Aqoat/Magnesium stearate in a proportion of 30/69.5/0.5% (*w*/*w*/w). The powder was resuspended in a water solution containing 2% of hydroxyethyl cellulose (HEC). The vehicle is a water solution containing Aqoat/Magnesium stearate (69.5/0.5, w/w) and 2% HEC.

2.1.3. Animals preparation

Anesthesia was induced using isoflurane (Forene®, AbbVie) in 70% N_2O / 30% O_2 (5% for induction; 2% for maintenance). Body temperature was maintained at 38 °C (±0.5 °C) during surgery. A subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg s.c.) was given 10 min before the surgical procedure for pain management. In addition, local administration of Lidocaine (aguettant®, 5%) was applied in the surgical area in addition to the use of an ophthalmic gel (Lacryvisc®) to prevent eye dryness.

2.1.4. Middle cerebral artery occlusion in rats

To induce proximal occlusion of the middle cerebral artery (MCA) we adapted the model of intraluminal suture developed initially by Koizumi and al. for the rats of 28 day-old (Koizumi et al., 1986; Zhao et al., 1997). Under aseptic conditions, rats were placed on the back, and a midline incision was performed in the neck. Then the common, internal and external right carotid arteries were dissected. The monofilament (Doccol Corporation, Sharon, MA, USA) was inserted through the external carotid artery up to the internal carotid artery to occlude the origin of the MCA. Reperfusion of cerebral tissues was initiated by removing monofilament at a predetermined time after stroke.

2.1.5. Laser Doppler speckle flowmetry

Images were acquired using a Laser Speckle Contrast Imager (moorFLPI-2, Moor Instruments; Sample interval: 1 Hz, exposure time: 60s, FOV = 14.6 mm × 11.3 mm, images resolution = 752 × 580, 1 frame per seconds) as mentioned in the corresponding results sections. Images were then analyzed using the moorFLPIReviewV40 software (moorFLPI-2, Moor Instruments). The average of the images obtained during acquisitions allowed to obtain pseudo-colored representative maps of the cerebral blood flow (CBF), highlighting CBF changes on the ipsilateral hemisphere compared to the contralateral hemisphere depending of the area of interest. The average CBF signals of these area were then extracted, and the percent of decrease of the CBFs were calculated based on the contralateral signal during the acquisition times. Color intensities go from blue (low CBF) to red (high CBF).

2.1.6. Behavioural testing

All tests were performed in quiet rooms under dim light. Animals were moved from husbandry to the testing rooms 30 min before behavioural testing. For each rat, 2 sensorimotor tests were realized: a neuroscore and modified grip-test. Novel Object Recognition (NOR) was also used for validation steps.

2.1.7. Neuroscore

It is an extended neurological examination consisting in a succession of 15 sensorimotor items as previously published (Parent et al., 2015). The apparatus is made of an open-field with 3 walls. A metallic beam (3 mm diameter) was used for visual forelimb placing task. Unilateral hearing was tested with a standardized sound emitted with a customized mini headset connected to a music player. The total score range between 0 and 160 (0 is no deficit).

2.1.8. Modified grip-test

Strength of ipsilateral and contralateral forepaws were individually measured with a modified grip-test device (5 measures on each side). The grip-test device was connected to a computer for automatic recording of trial results. Then, the paw strength ratio was calculated for

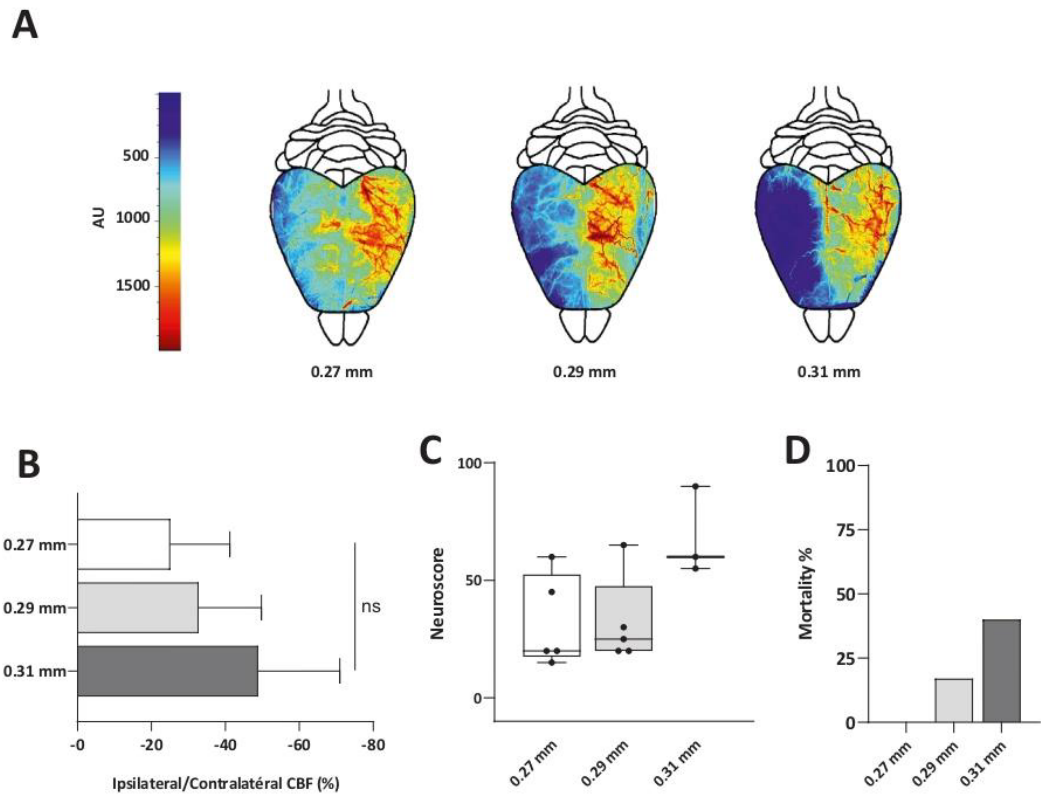


Fig. 1. Selection of monofilament diameter and coating length to induce MCAO on 28 day-old rats. (A) Pseudo colored representative maps of the CBF, highlighting CBF change on the ipsilateral compared to the contralateral hemisphere, after MCAO depending on monofilament diameter (mm). Superficial cerebral blood flow was determined in anesthetized rats 5 min after stroke onset using laser Doppler speckle flowmetry directly through the skull. (B) Quantification of the CBF difference between ipsilateral and contralateral hemisphere extracted from Doppler speckle images (data are represented as Mean ± SD, $n = 5$ per group). (C) Effects of monofilament diameter on neuroscore 24 h after MCAO (boxes represent medians and interquartile ranges. Whiskers represent the Min to Max with all points shown, no statistic was performed on neuroscore of surviving rats 24 h after stroke onset). Ischemia was induced 30 min. (D) Mortality at 24 h after MCAO depending on monofilament diameter (final group size: n = 5 per group). Ischemia duration was induced 30 min.

each animal (left/right paw strength) (Balkaya et al., 2013).

2.1.9. Novel object recognition

The task was performed in a square shaped openfield (60 * 60 cm) surrounded by 40-cm wall. A day before the acquisition, animals were let to explore the apparatus containing 2 objects for 10 min. For the acquisition, animals were placed in the apparatus containing two new objects for 8 min. One hour later, animals were placed for 8 min in the same apparatus for the retrieval test. The 2 objects were at the same location, but one of the familiar objects was randomly replaced by a new one. The time spent to explore the novel and the familiar object during retrieval test were measured from videos. A memory index was calculated as follow: time spent to explore the novel object / time spent to explore both objects *100 (Bour et al., 2004).

2.1.10. Thionin staining

On D17, mice were transcardially perfused with heparinized-saline followed by a freshly prepared fixative solution (2% paraformaldehyde). Brains were cryoprotected (20% sucrose buffer, 24 h, 4 °C) before freezing and then cryostat sectioning. Brain in animals of vehicle and S 44819 3 mg/kg groups were sliced (coronal sections of 20 µm-thick) for covering the whole ischemic lesions and were stained with 0.2% of thionin, prior measurement of the lesion sizes.

2.1.11. Study design

The experimental protocol was done in two steps.

2.1.11.1. Validation of the surgery model. Firstly we had to determine the silicone-coated monofilament (Doccol, Sharon, MA, USA) by comparing 3 following diameters: 0.27, 0.29 and 0.31 mm. Ischemia was induced for 30 min before reperfusion and neuroscore was measured 24 h *post*-stroke to evaluate the sensorimotor deficits. Then, three different ischemia durations were assessed: 30, 45 and 60 min. Sensorimotor deficits were evaluated on D1 and D7 and cognitive deficits were assessed with novel object recognition test (NOR) on D8.

2.1.11.2. Pharmacological study. Rats were randomized in 4 treatment groups as follow: Vehicle, S 44819 (1 mg/kg), S 44819 (3 mg/kg), and S 44819 (10 mg/kg).

After stroke induction, rats were orally treated for 14 days with S 44819 or vehicle, b.i.d from 72 h (D3) and to 16 days (D16) after stroke onset.

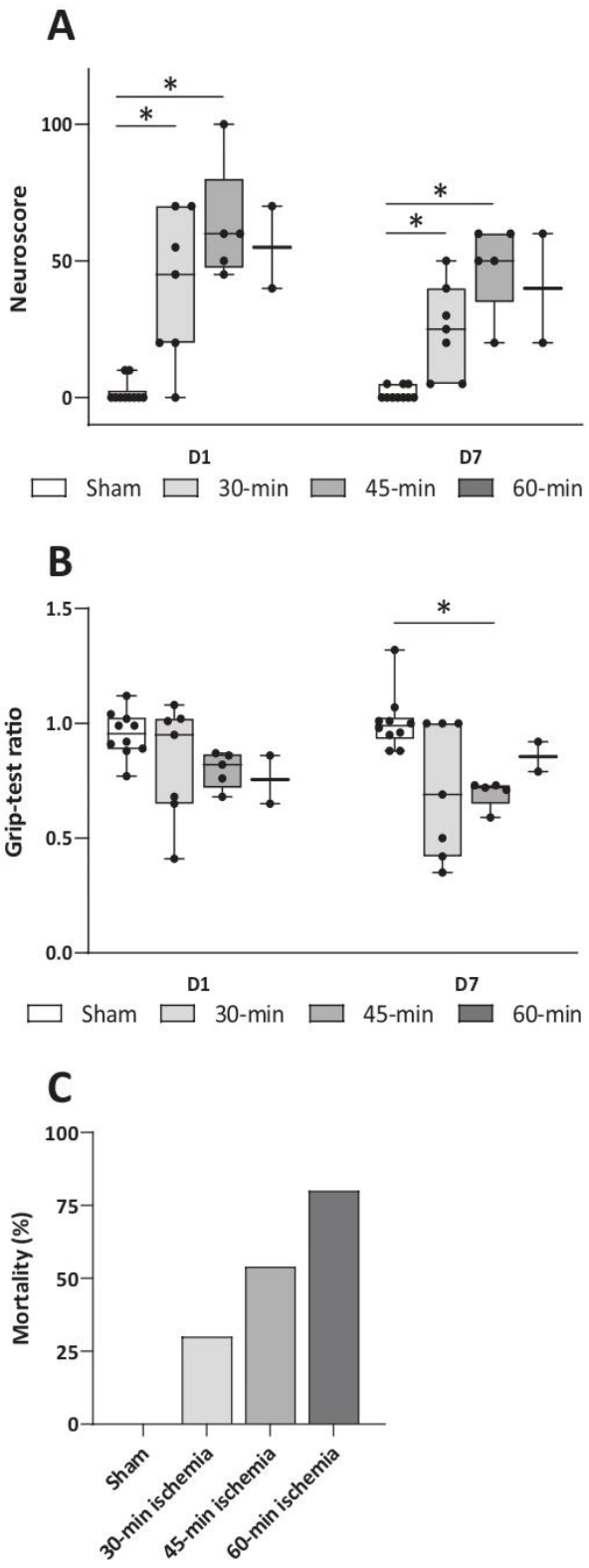
The doses and regimen of S 44819 were chosen in accordance with the previous studies in adult rodents (Wang et al., 2018). We performed neuroscore and grip-test on D1, D9 and D16.

2.1.12. Exclusion criteria

The following exclusion criteria were applied: mortality before the end of the experimentation and neuroscore <20 on D1, *i.e.* before treatment start.

2.1.13. Statistical analysis

Functional deficits induced by MCAO were compared to normal



(caption on next column)

Fig. 2. Selection of ischemia duration and functional deficit assessment on 28 day-old rats. (A) Effects of MCAO duration on neuroscore on D1 and D7 (boxes represent medians and interquartile ranges. Whiskers represent the Min to Max with all points shown, *$P < 0.05$ *vs* sham, Kruskal-Wallis test). (B) Effects of MCAO duration on grip-test *ratio* on D1 and D7 (boxes represent medians and interquartile ranges. Whiskers represent the Min to Max with all points shown, *P < 0.05 *vs* sham, Kruskal-Wallis test). (C) Effects of MCAO duration on survival from D0 to D8 ($p = 0.0024$; Log-rank of Mantel-Cox test; final group size on D8: sham $n = 10$; 30-min $n = 7$; 45-min n = 5; 60-min $n = 2$).

theoretical values using sign-test (neuroscore, grip-test, NOR). The Log-rank (Mantel-Cox) test was used to compare survival curves generated with the Kaplan-Meier method. Body weight was compared across groups and time by 2-ways repeated ANOVA, followed by Student *t*-test with the Dunnett adjustment method. Neuroscore and grip-test ratio were analyzed by using a non-parametric procedure. Groups were compared at each time with Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's test for post-host analysis. Pairwise longitudinal comparisons (*i.e.* time effect) were performed by using either the Wilcoxon or the Friedman tests when number of time points were respectively 2 or above 2. Differences were considered significant at a probability level of $p < 5\%$. In the figures, results are expressed as the mean ± standard deviation (SD).

3. Results

3.1. Validation of a stroke model in juvenile rats

First, we chose the most suited monofilament. A short coating length was selected because longer coating produced 100% mortality in rats. Amongst the 3 filament diameters, the 0.29 mm was selected because it provided a more consistent CBF reduction than the 0.27 mm, while the 50% mortality rate induced by the 0.31 mm filament was judged too severe (Fig. 1). Moreover, the representative maps of CBF show that the 0.31 mm filament allows to occlude the anterior, middle and posterior cerebral arteries, whereas the 0.29 mm filament only affects the MCA (Fig. 1A). We thus decided to use the 0.29 mm filament for next steps to induce proximal occlusion of MCA only with a limited mortality rate.

Then, to determine the best ischemia duration to produce reproducible and sustained deficits, we used 48 rats and assessed neuroscore and grip-test on D1 and D7 after stroke. Forty-five-min ischemia produced a significantly higher neuroscore compared to sham rats on both D1 and D7 and a decrease of the grip strength *ratio* on D7 (Fig. 2A-B). Sixty-min ischemia also produced an important sensorimotor deficit in the two tests. However, it was not significantly different from the sham group because of the very low final group size due to a high mortality rate (Fig. 2C). Finally, 45-min ischemia seemed to present the best compromise between behavioural deficits and mortality rate (Fig. 2).

We performed one more step to confirm the effects of a 45-min ischemia duration on functional deficit. We used 28 more rats to compare sham group to a 45-min ischemia group with 28 more rats. Surgery was successfully achieved in: 12 sham rats and 16 ischemic rats. Three ischemic rats were excluded because they met an exclusion criterion (24 h after MCAO neuroscore <20). On the 13 remaining ischemic rats, 4 (31%) died during the first 8 days following stroke onset (Fig. 3A). No mortality was observed in sham group. The final group size was 12 and 9 for the sham and ischemic groups, respectively.

A significant interaction between groups and time on body weight was detected by 2-way ANOVA (Fig. 3B). The statistical analysis of group effect at each time showed that body weight was similar in sham and in the 45-min ischemia groups before stroke onset (*i.e.* from D-4 to D0), while body weight was significantly higher in the sham group compared to the 45-min ischemia group after stroke onset (*i.e.* from D2 to D8). Moreover, only ischemic rats had their body weight decreased after stroke onset, between D0 and D4. With time, neuroscore was significantly higher in the 45-min ischemia group (D1 = 56.5; D7 = 33; $p < 0.0001$) compared to the sham group (D1 = 3.5; D7 = 1; $p < 0.05$)

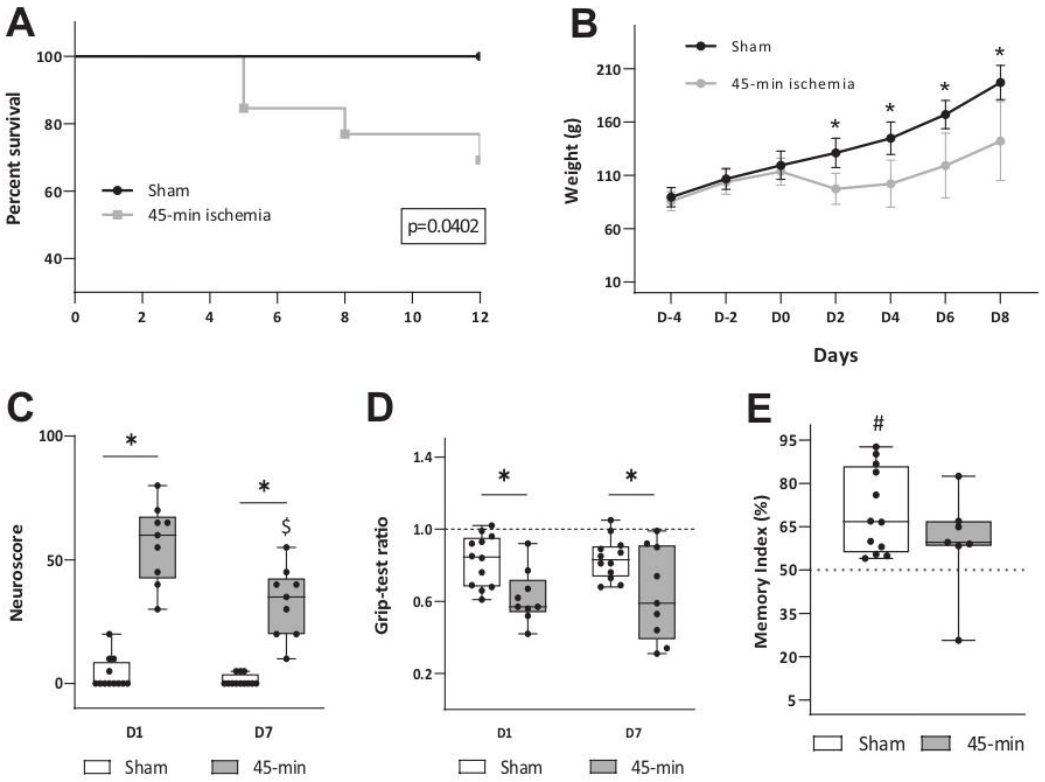


Fig. 3. Effects of 45 min-ischemia duration on functional deficit on 28 day-old rats. (A) Effects of 45-min MCAO (D0) on survival from D0 to D12 ($p = 0.0402$; Log-rank of Mantel-Cox test; final group size on D8: sham $n = 12$; 45-min ischemia $n = 9$). (B) Effects of 45-min ischemia (D0) on body weight evolution from D-4 to D8 (data are represented as Mean ± SD, *P < 0.05 *vs* sham at the same time, Student *t*-test). (C) Effects of 45-min MCAO on neuroscore (boxes represent medians and interquartile ranges. Whiskers represent the Min to Max with all points shown, * P < 0.05 *vs* sham, Mann-Whitney test; $ P < 0.05 *vs* D1, Wilcoxon test). (D) Effects of 45-min MCAO on grip-test *ratio* (boxes represent medians and interquartile ranges. Whiskers represent the Min to Max with all points shown, * P < 0.05 *vs* sham, ANOVA main effect). (E) Effects of 45-min MCAO on novel object recognition test (boxes represent medians and interquartile ranges. Whiskers represent the Min to Max with all points shown, # P < 0.05 *vs* chance of exploration, Sign test).

(Fig. 3C). In addition, the neuroscore was significantly improved in the 45-min ischemia group on D7 *vs* D1 ($p < 0.05$), which represents a spontaneous recovery. Results showed that grip strength *ratio* was also significantly lower in the 45-min ischemia group on D1 (D1 = 0.62; $p < 0.01$) compared to the sham group (D1 = 0.83). However, this difference was no more significant on D7 despite lower values in the 45-min ischemia groups compared to the sham group (0.64 *vs* 0.84 respectively; $p = 0.12$; Fig. 3D). The results confirmed that the 45-min MCAO with the selected suture (0.29 mm) induced significant sensorimotor deficits in 28 day-old rats, measured both with neuroscore and grip-test.

Forty-five-min MCAO failed to produce significant memory deficits in the NOR test compared to sham rats (Fig. 3E). Thus, this test was not performed in the main pharmacological study.

3.2. S 44819 improves functional recovery after stroke in the juvenile rats without impact on the lesion volume

The effect of S 44819 (1, 3 and 10 mg/kg, p.o., b.i.d.) was then assessed on sensorimotor deficits in the previously validated stroke model in 28 day-old rats.

Oral treatment started on D3 after stroke onset and the final group size ranged between 15 and 18 rats per group. During the treatment period, death rate was not significantly different between the 4 groups, with an overall rate of 37% on D16 (vehicle = 42%; S 44819 (1 mg/kg) = 36%; S 44819 (3 mg/kg) = 27%; S 44819 (10 mg/kg) = 42%) (Fig. 4B).

No significant effect between groups and no interaction between groups and time was observed on the body weight of rats. A significant effect of the time *post*-stroke onset was detected and the *post*-hoc analysis showed that the body weight of the rats significantly decreased on D2 compared to D0 ($p < 0.05$) (Fig. 4C).

Stroke induced significant sensorimotor deficits in 28 day-old rats on D1 in all groups. Indeed, the animals displayed a neuroscore significantly different from 0 (no deficit; $p < 0.05$) (Fig. 5A) and a grip strength *ratio* significantly lower than 1 (no deficit; $p < 0.05$) (Fig. 5B) with no difference between groups before treatments.

Concerning the neuroscore, on D1 after stroke, there is no significant difference between groups before treatment (neuroscore on D1: vehicle = 49.5; S 44819 (1 mg/kg) = 46.5; S 44819 (3 mg/kg) = 48; S 44819 (10 mg/kg) = 45.5). After treatment, the neuroscore significantly improved in all groups on D9 and D16 *vs* D1. However, functional deficit was still different from 0 on D16. Dunn's test indicates that animals treated with S 44819 (3 mg/kg) and S 44819 (10 mg/kg) displayed a reduced neurological deficit compared with the animals treated with vehicle on D16, while on S 44819 (10 mg/kg) treated rats displayed a significant reduction of neuroscore on D9 ($p < 0.05$; neuroscore of S 44819 (3 mg/kg): D1 = 48.06; D9 = 12.22; D16 = 5.55; neuroscore of S 44819 (10 mg/kg): D1 = 45.67; D9 = 10.67; D16 = 5.55).

Regarding grip-test data on D1, Kruskal-Wallis test reveals that the strength deficit of the contralateral forepaw was similar in all groups before treatment (grip-test *ratio* on D1: vehicle = 0.74; S 44819 (1 mg/kg) = 0.75; S 44819 (3 mg/kg) = 0.75; S 44819 (10 mg/kg) = 0.75;

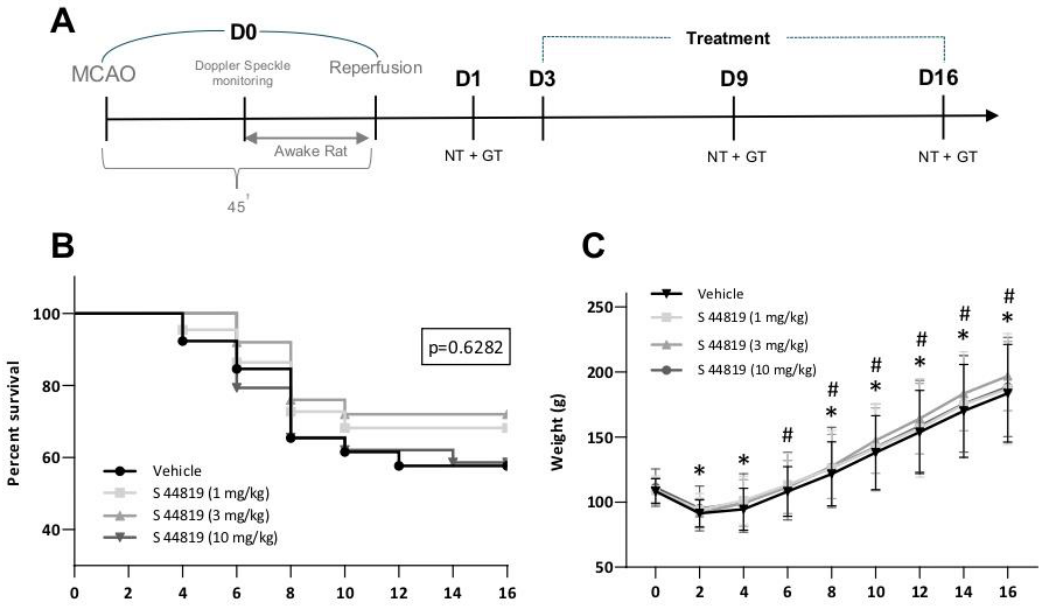


Fig. 4. Global effects of S 44819 after MCAO in a juvenile rats. (A) Schematic representation of the experimental timeline and design. (B) Effects of S 44819 on survival from D0 to D16 ($p = 0.6282$; Log-rank of Mantel-Cox test; final group size on D16: vehicle $n = 15$; S 44819 (1 mg/kg) n = 15; S 44819 (3 mg/kg) $n = 18$; S 44819 (10 mg/kg) $n = 16$). (C) Effects of S 44819 on body weight evolution from D0 to D16 (data are represented as Mean ± SD, *P < 0.05 *vs* D0 in all groups, # P < 0.05 *vs* D2 in all groups, Tuckey test).

Kruskal-Wallis: $p = 0.91$). Regarding contralateral forepaw strength evolution, Friedman test showed that grip test *ratio*, was significantly improved over time in all groups treated with S 44819 (S 44819 (1 mg/kg): $P = 0.014$; S 44819 (3 mg/kg): $P = 0.0002$); S 44819 (10 mg/kg): $p = 0.0007$) while it was not significantly improved in vehicle group ($p = 0.07$). More interestingly, Dunn's test showed that only rats treated with S 44819 (3 mg/kg) displayed significantly better grip strength *ratio* than vehicle on D16 ($p < 0.05$; grip-test *ratio* on D16 for S 44819 (3 mg/kg) =0.94; vehicle = 0.85). So, S 44819 allows a better recovery after stroke especially when it is used at 3 mg/kg.

To determine the impact of S 44819 on lesion volumes, we compared the sham group to the treated group at the most effective dose of 3 mg/kg. S 44819 had no effect on the lesion volume in our model at the end of treatment (Fig. 5C). Furthermore, observation of the spatial distribution of the lesion at D17 shows that the ischemic stroke model transposed to young rats induces injuries similar to those observed in adults (Fig. 5D) (Belayev et al., 1996; Zhao et al., 1997).

4. Discussion

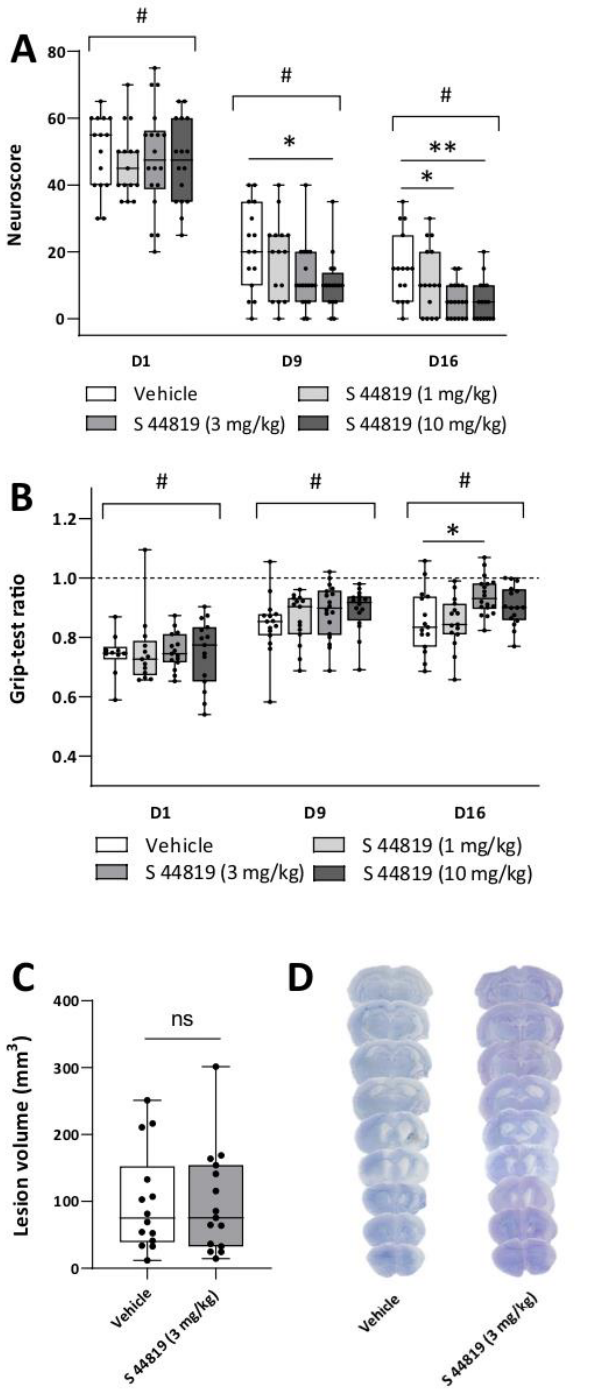
In the paediatric population, enhancing *post*-stroke functional recovery by modulating α5-GABAAR activity could be applicable only in children having achieved an acceptable maturation and stability of the GABAergic system. The frequency of GABAergic postsynaptic responses increases progressively during the first month of life in rodents before reaching a plateau, reflecting the increase in the density of GABAergic synapses and the maturation of this system (Luhmann and Prince, 1991; Rio et al., 1992). In rodents, the GABAergic system in the cortex presents an immunoreactive pattern comparable to that of the adult brain by P16–P21 (Le Magueresse and Monyer, 2013). Overall, GABAergic maturation could be considered acceptable around the ages of 14 days and 6 years in rats and in humans respectively.

In the present study, we established a model of ischemia-reperfusion in juvenile 28 day-old rats allowing to assess the effects of a pharmacological modulation of the GABAergic system on the functional recovery after stroke onset. Pan and al. independently described a MCAO model of 23–25 day-old rats induced with a similar method than ours, excepted that they used post-mortem triphenyl tetrazolium chloride staining to evaluate the lesion size in rats while we control the ischemic volume with laser speckles in the beginning of the protocol, before treatment and behavioural testing, to ensure group comparability. Nevertheless, the results of the two studies are similar and support each other (Pan et al., 2020). Based on data presented in the present paper, the use of a filament of 0.29 mm diameter during 45 min was the best approach to induce reproducible and sustained MCAO.

During the validation phase, the death rate was 54% in our final condition on D8 after MCAO. So, the mortality was more important in 28 day-old rats than the mortality usually reported in Sprague-Dawley adults (Aspey et al., 1998; Neumann-Haefelin et al., 2000; Rewell et al., 2017). It could be hypothesized that young rats are more vulnerable to reduced food and water intake than adult rats after stroke onset (Lourbopoulos et al., 2017). In a complementary study, we used nutritive gel and combined it with the single-housing strategy. That allowed reducing global mortality on D8 from 54% to 31%.

In rats and mice, it has been shown that S 44819 improves memory in a variety of cognitive tests (Gacsályi et al., 2018). Thus, NOR test was included in the MCAO model validation in juvenile rats in order to assess potential stroke-induced learning deficits. NOR is a non-reinforcement based paradigm widely used to study non spatial learning and memory in either healthy or brain-injured rodents (Lucon-Xiccato and Dadda, 2016)·(Goulart et al., 2010)·(Samson et al., 2015). In the present study, 45-min MCAO did not affect learning performance of juvenile rats tested 8 days after stroke onset. In adult rats, some studies reported a decreased of NOR performances after a mechanical MCAO (Bu et al., 2019; Pan et al., 2020). Several studies have reported that young animals show less or no cognitive and memory deficits after a stroke, due to a better cerebral plasticity (de la Torre et al., 1992; Ferreira et al., 2011).

Overall, the functional deficits induced by the 45-min MCAO in 28 day-old rats were sustained and reproducible and in good accordance with those observed in adult (Hafez et al., 2015; Kilic et al., 2008). Thus, a pharmacological study with S 44819 orally administered at three different doses b.i.d. for 14 days, starting from D3 post-stroke, was



(caption on next column)

Fig. 5. Sensorimotor effects of S 44819 after MCAO in a juvenile stroke model. (A) Effects of S 44819 on neuroscore after MCAO in a juvenile stroke model (boxes represent medians and interquartile ranges. Whisker represents the Min to Max with all points shown; * P < 0.05 *vs* vehicle, ** *P* < 0.01 *vs* vehicle, Kruskal-Wallis test; # P < 0.05 *vs* 0, Sign test; final group size on D16: vehicle n = 15; S 44819 (1 mg/kg) n = 15; S 44819 (3 mg/kg) n = 18; S 44819 (10 mg/kg) n = 16). (B) Effects of S 44819 on grip-test *ratio* after MCAO in a juvenile stroke model (boxes represent medians and interquartile ranges. Whiskers represent the Min to Max with all points shown; * P < 0.05 *vs* vehicle, Kruskal-Wallis test; # P < 0.05 *vs* 1, Sign test; final group size on D16: vehicle n = 15; S 44819 (1 mg/kg) n = 15; S 44819 (3 mg/kg) n = 18; S 44819 (10 mg/kg) n = 16). (C) Effects of S 44819 on lesion volume after MCAO in a juvenile stroke model on D17 (boxes represent medians and interquartile ranges. Whisker represents the Min to Max with all points shown, *n* = 14–15 per group; Mann-Whitney test). (D) Effects of S 44819 (3 mg/kg) on spatial distribution of the ischemic lesion on D17. Reduced thionin staining delineates injured regions. Representative brain are showed. (NT: neuroscore; GT: grip-test).

subsequently performed focusing on sensorimotor deficits in juvenile rats.

In the pharmacological study, global death rate was quite higher than during the validation study: 44% *vs* 31%, likely due to its longer duration (16 days *vs* 8 days) and the handling of the animals two times per day for the oral gavage. S 44819 significantly decreased the neuroscore measured on D9 and D16 at the higher doses of 3 and 10 mg/kg. Moreover, forepaw strength deficits were reduced with S 44819 at the dose of 3 mg/kg. Interestingly, the lower mortality rate 16 days after stroke onset was in the group S 44819 treated at the dose of 3 mg/kg while body weight recovery was the greater in this group compared to the others. Taken together, our data indicate that S 44819 is able to alleviate stroke-induced sensorimotor deficits in juvenile rats, without modifying lesion volumes, in agreement with previous results obtained in adult rats (Wang et al., 2018).

Increased and sustained tonic neuronal inhibition in the peri-infarct zone during the first weeks after stroke onset has been hypothesized to disrupt neuroplasticity, possibly impairing sensorimotor and cognitive functions to re-map from damaged areas (Dijkhuizen et al., 2003). This tonic inhibition is mediated by GABA neurotransmitter and extrasynaptic GABAARs mainly consisting in α5-subunit-containing receptors (Glykys and Mody, 2006)·(Semyanov et al., 2004). The present study using the well characterized α5-GABAAR S 44819 antagonist supports the hypothesis that extended GABAergic inhibition after the acute phase of stroke may be detrimental for middle-term functional recovery and give a first evidence that this mechanism could also be of importance in the paediatric population.

In conclusion, we performed a characterization of a MCAO model in juvenile rats, in which mechanical ischemia-reperfusion induces sustained and reproducible functional deficits in 28 day-old rats, allowing pharmacological studies to assess drug candidates expected to be administered in children. Moreover, by reproducing the results obtained in adults with a molecule whose mode of action is perfectly characterized, we demonstrate that GABAergic pathway is relevant for the pathophysiology of paediatric stroke. In this model, the α5-GABAAR antagonist S 44819 improved *post*-stroke middle-term functional in similar way as in adult rodents.

Disclosure

The present work was financially supported by Institut de Recherches Internationales Servier (IRIS, Suresnes, France) and the drug S 44819 developed and provided by IRIS. The co-author Aurore Sors is employee of IRIS. All the experiments and the data analysis of the data were carried out by Etap-lab.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

Alia, C., Spalletti, C., Lai, S., Panarese, A., Micera, S., Caleo, M., 2016. Reducing GABAA-mediated inhibition improves forelimb motor function after focal cortical stroke in mice. Sci. Rep. 6, 37823. https://doi.org/10.1038/srep37823.

Aspey, B.S., Cohen, S., Patel, Y., Terruli, M., Harrison, M.J., 1998. Middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 24, 487–497. https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.1998.00146.x.

Atack, J.R., Bayley, P.J., Seabrook, G.R., Wafford, K.A., McKernan, R.M., Dawson, G.R., 2006. L-655,708 enhances cognition in rats but is not proconvulsant at a dose selective for α5-containing GABAA receptors. Neuropharmacology 51, 1023–1029. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.04.018.

Balkaya, M., Kröber, J.M., Rex, A., Endres, M., 2013. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab. 33, 330–338. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.185.

Belayev, L., Alonso, O.F., Busto, R., Zhao, W., Ginsberg, M.D., 1996. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Stroke 27, 1616–1623. https://doi.org/10.1161/01.STR.27.9.1616.

Bour, A., Little, S., Dodart, J.-C., Kelche, C., Mathis, C., 2004. A secreted form of the β-amyloid precursor protein (sAPP695) improves spatial recognition memory in OF1 mice. Neurobiol. Learn. Mem. 81, 27–38. https://doi.org/10.1016/S1074-7427(03)00071-6.

Bu, F., Min, J.-W., Munshi, Y., Lai, Y.-J., Qi, L., Urayama, A., McCullough, L.D., Li, J., 2019. Activation of endothelial ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) improves post-stroke recovery and angiogenesis via activating Pak1 in mice. Exp. Neurol. 322, 113059. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113059.

Carmichael, S.T., 2012. Brain excitability in stroke: the yin and yang of stroke progression. Arch. Neurol. 69, 161–167. https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.1175.

Chabriat, H., Bassetti, C.L., Marx, U., Audoli-Inthavong, M.-L., Sors, A., Lambert, E., Wattez, M., Hermann, D.M., Althaus, K., Amaro, S., Bae, H.-J., Bak, Z., Barbarini, L., Bassi, P., Bazan, R., Bereczki, D., Berkowicz, T., Berrouschot, J., Blacquiere, D., Brola, W., Butcher, K., Cardona, P., Cha, J.-K., Cloud, G., Cohen, D., Cordonnier, C., Csanyi, A., Czlonkowska, A., Davis, S., Dawson, J., Klippel, N.D., Denier, C., Desfontaines, P., Diener, H.-C., Dioszeghy, P., Dippel, D.W., Dorado, L., Folyovich, A., Freitas, G.R., Friedrich, M.A., Fryze, W., Gagliardi, R.J., Gottschal, M., Grimley, R., Grond, M., Gröschel, K., Hosseini, H., Hwang, Y., Kallmuenzer, B., Khan, U., Kim, J.S., Kleinig, T., Koves, A., Martin, A.L., Lasek-Bal, A., Lembo, G., Lemmens, R., Lindert, R., Marrone, L.C.P., Zabaleta, M.M., Mas, J.-L., Vallejo, J.M., Mazighi, M., Minelli, C., Mistri, A., Molina, C., Alvarez, F.M., Moro, C.H.C., Mulleners, W., Nabavi, D., Neau, J.-P., O'brien, B., Ovary, C., Panczel, G., Park, M.S., Phan, T., Ragab, S., Rejdak, K., Freitas, G.R.D., Roffe, C., Gonzalez, J.R., Rover, L., Silva, G.S., Schellinger, P., Martin, T.S., Shaw, L., Sibon, I., Skoda, O., Smadja, D., Sobolewski, P., Soda, H., Sprigg, N., Swiat, M., Szapary, L., Szegedi, N., Toni, D., Valikovics, A., Vanhooren, G., Vecsei, L., Wein, T., Wong, A., Carrillo, A.X., 2020a. Safety and efficacy of GABAA α5 antagonist S44819 in patients with ischaemic stroke: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. Lancet Neurology 19, 226–233. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30004-1.

Chabriat, H., Bassetti, C.L., Marx, U., Picarel-Blanchot, F., Sors, A., Gruget, C., Saba, B., Wattez, M., Audoli, M.-L., Hermann, D.M., 2020b. Randomized efficacy and safety trial with Oral S 44819 after recent ischemic cerebral event (RESTORE BRAIN study): a placebo controlled phase II study. Trials 21. https://doi.org/10.1186/s13063-020-4072-2.

Clarkson, A.N., Huang, B.S., MacIsaac, S.E., Mody, I., Carmichael, S.T., 2010. Reducing excessive GABAergic tonic inhibition promotes post-stroke functional recovery. Nature 468, 305–309. https://doi.org/10.1038/nature09511.

de la Torre, J.C., Fortin, T., Park, G.A.S., Saunders, J.K., Kozlowski, P., Butler, K., de Socarraz, H., Pappas, B., Richard, M., 1992. Aged but not young rats develop metabolic, memory deficits after chronic brain ischaemia. Neurol. Res. 14, 177–180. https://doi.org/10.1080/01616412.1992.11740045.

Dijkhuizen, R.M., Singhal, A.B., Mandeville, J.B., Wu, O., Halpern, E.F., Finklestein, S.P., Rosen, B.R., Lo, E.H., 2003. Correlation between brain reorganization, ischemic damage, and neurologic status after transient focal cerebral ischemia in rats: a functional magnetic resonance imaging study. J. Neurosci. 23, 510–517. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-02-00510.2003.

Donnan, G.A., Fisher, M., Macleod, M., Davis, S.M., 2008. Stroke. Lancet 371, 1612–1623. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60694-7.

Etherington, L.-A., Mihalik, B., Pálvölgyi, A., Ling, I., Pallagi, K., Kertész, S., Varga, P., Gunn, B.G., Brown, A.R., Livesey, M.R., Monteiro, O., Belelli, D., Barkóczy, J., Spedding, M., Gacsályi, I., Antoni, F.A., Lambert, J.J., 2017. Selective inhibition of extra-synaptic α5-GABAA receptors by S44819, a new therapeutic agent. Neuropharmacology 125, 353–364. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.08.012.

Ferreira, E.D.F., Romanini, C.V., Mori, M.A., de Oliveira, R.M.W., Milani, H., 2011. Middle-aged, but not young, rats develop cognitive impairment and cortical neurodegeneration following the four-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion. Eur. J. Neurosci. 34, 1131–1140. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07824.x.

Fullerton, H.J., Chetkovich, D.M., Wu, Y.W., Smith, W.S., Johnston, S.C., 2002. Deaths from stroke in US children, 1979 to 1998. Neurology 59, 34–39. https://doi.org/10.1212/WNL.59.1.34.

Gacsályi, I., Móricz, K., Gigler, G., Megyeri, K., Machado, P., Antoni, F.A., 2018. Persistent therapeutic effect of a novel α5-GABAA receptor antagonist in rodent preclinical models of vascular cognitive impairment. Eur. J. Pharmacol. 834, 118–125. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.015.

Glykys, J., Mody, I., 2006. Hippocampal network hyperactivity after selective reduction of tonic inhibition in GABAA receptor α5 subunit–deficient mice. J. Neurophysiol. 95, 2796–2807. https://doi.org/10.1152/jn.01122.2005.

Goulart, B.K., de Lima, M.N.M., de Farias, C.B., Reolon, G.K., Almeida, V.R., Quevedo, J., Kapczinski, F., Schröder, N., Roesler, R., 2010. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. Neuroscience 167, 969–973. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.032.

Hafez, S., Hoda, M.N., Guo, X., Johnson, M.H., Fagan, S.C., Ergul, A., 2015. Comparative analysis of different methods of ischemia/reperfusion in hyperglycemic stroke outcomes: interaction with tPA. Transl. Stroke Res. 6, 171–180. https://doi.org/10.1007/s12975-015-0391-0.

Kilic, E., Kilic, Ü., Bacigaluppi, M., Guo, Z., Abdallah, N.B., Wolfer, D.P., Reiter, R.J., Hermann, D.M., Bassetti, C.L., 2008. Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. J. Pineal Res. 45, 142–148. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00568.x.

Koizumi, J., Yoshida, Y., Nakazawa, T., Ooneda, G., 1986. Experimental studies of ischemic brain edema. Nosotchu 8, 1–8. https://doi.org/10.3995/jstroke.8.1.

Lake, E.M.R., Chaudhuri, J., Thomason, L., Janik, R., Ganguly, M., Brown, M., McLaurin, J., Corbett, D., Stanisz, G.J., Stefanovic, B., 2015. The effects of delayed reduction of tonic inhibition on ischemic lesion and sensorimotor function. J. Cereb. Blood Flow Metab. 35, 1601–1609. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.86.

Le Magueresse, C., Monyer, H., 2013. GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex. Neuron 77, 388–405. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.011.

Lehman, L.L., Khoury, J.C., Taylor, J.M., Yeramaneni, S., Sucharew, H., Alwell, K., Moomaw, C.J., Pearlso, K., Flaherty, M., Khatri, P., Broderick, J.P., Kissela, B.M., Kleindorfer, D.O., 2018. Pediatric stroke rates over 17 years: report from a population-based study. J. Child Neurol. 33, 463–467. https://doi.org/10.1177/0883073818767039.

Li, W., Huang, R., Shetty, R.A., Thangthaeng, N., Liu, R., Chen, Z., Sumien, N., Rutledge, M., Dillon, G.H., Yuan, F., Forster, M.J., Simpkins, J.W., Yang, S.-H., 2013. Transient focal cerebral ischemia induces long-term cognitive function deficit in an experimental ischemic stroke model. Neurobiol. Dis. 59, 18–25. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.06.014.

Lourbopoulos, A., Mamrak, U., Roth, S., Balbi, M., Shrouder, J., Liesz, A., Hellal, F., Plesnila, N., 2017. Inadequate food and water intake determine mortality following stroke in mice. J. Cereb. Blood Flow Metab. 37, 2084–2097. https://doi.org/10.1177/0271678X16660986.

Lucon-Xiccato, T., Dadda, M., 2016. Guppies show Behavioural but not cognitive sex differences in a novel object recognition test. PLoS One 11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156589.

Luhmann, H.J., Prince, D.A., 1991. Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. J. Neurophysiol. 65, 247–263. https://doi.org/10.1152/jn.1991.65.2.247.

Neumann-Haefelin, T., Kastrup, A., de Crespigny, A., Yenari, M.A., Ringer, T., Sun, G.H., Moseley, M.E., 2000. Serial MRI after transient focal cerebral ischemia in rats. Stroke 31, 1965–1973. https://doi.org/10.1161/01.STR.31.8.1965.

Pan, G., Jin, L., Shen, W., Zhang, J., Pan, J., Cheng, J., Xie, Q., Hu, Q., Wu, S., Zhang, H., Chen, X., 2020. Treadmill exercise improves neurological function by inhibiting autophagy and the binding of HMGB1 to Beclin1 in MCAO juvenile rats. Life Sci. 243, 117279. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117279.

Parent, M., Boudier, A., Perrin, J., Vigneron, C., Maincent, P., Violle, N., Bisson, J.-F., Lartaud, I., Dupuis, F., 2015. In situ microparticles loaded with S-Nitrosoglutathione protect from stroke. PLoS One 10, e0144659. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144659.

Pressler, R., Auvin, S., 2013. Comparison of brain maturation among species: an example in translational research suggesting the possible use of Bumetanide in newborn. Front. Neurol. 4 https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00036.

Rewell, S.S.J., Churilov, L., Sidon, T.K., Aleksoska, E., Cox, S.F., Macleod, M.R., Howells, D.W., 2017. Evolution of ischemic damage and behavioural deficit over 6 months after MCAo in the rat: selecting the optimal outcomes and statistical power for multi-Centre preclinical trials. PLoS One 12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171688.

Rio, J.A.D., Soriano, E., Ferrer, I., 1992. Development of GABA-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. J. Comp. Neurol. 326, 501–526. https://doi.org/10.1002/cne.903260403.

Samson, A.L., Ju, L., Ah Kim, H., Zhang, S.R., Lee, J.A.A., Sturgeon, S.A., Sobey, C.G., Jackson, S.P., Schoenwaelder, S.M., 2015. MouseMove: an open source program for semi-automated analysis of movement and cognitive testing in rodents. Sci. Rep. 5. https://doi.org/10.1038/srep16171.

Semple, B.D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D.M., Noble-Haeusslein, L.J., 2013. Brain development in rodents and humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. Prog. Neurobiol. 0, 1–16. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001.

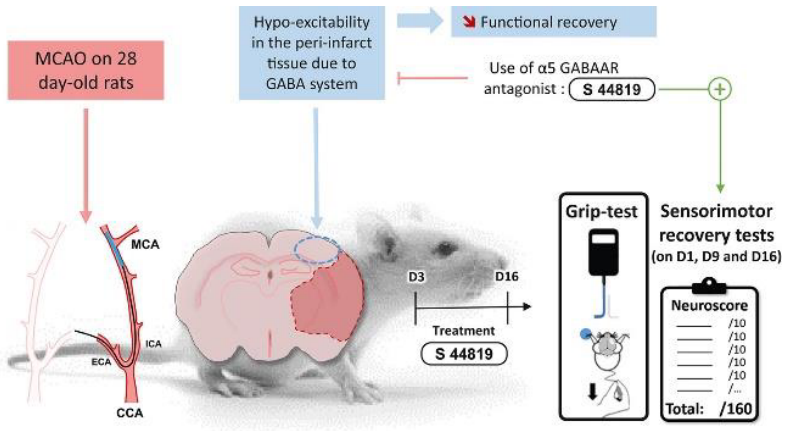
Semyanov, A., Walker, M.C., Kullmann, D.M., Silver, R.A., 2004. Tonically active GABAA receptors: modulating gain and maintaining the tone. Trends Neurosci. 27, 262–269. https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.03.005.

Szabadics, J., Varga, C., Molnár, G., Oláh, S., Barzó, P., Tamás, G., 2006. Excitatory effect of GABAergic Axo-Axonic cells in cortical microcircuits. Science 311, 233–235. https://doi.org/10.1126/science.1121325.

Wang, Y., Dzyubenko, E., Sanchez-Mendoza, E.H., Sardari, M., Silva de Carvalho, T., Doeppner, T.R., Kaltwasser, B., Machado, P., Kleinschnitz, C., Bassetti, C.L., Hermann, D.M., 2018. Postacute delivery of GABAA α5 antagonist promotes Postischemic neurological recovery and Peri-infarct brain remodeling. Stroke 49, 2495–2503. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.021378.

Zhao, W., Belayev, L., Ginsberg, M.D., 1997. Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture: II. Neurological deficits, and pixel-based correlation of histopathology with local blood flow and glucose utilization. J. Cereb. Blood Flow Metab. 17, 1281–1290. https://doi.org/10.1097/00004647-199712000-00003.

Graphical abstract



Theranostics 2020, Vol. 10, Issue 17 7480

IVYSPRING INTERNATIONAL PUBLISHER

Theranostics

2020; 10(17): 7480-7491. doi: 10.7150/thno.44233

Research Paper

Early Ultrafast Ultrasound Imaging of Cerebral Perfusion correlates with Ischemic Stroke outcomes and responses to treatment in Mice

Vincent Hingot[1†], Camille Brodin[2†], Florent Lebrun[2,5], Baptiste Heiles[1], Audrey Chagnot[2], Mervé Yetim[2], Maxime Gauberti[3], Cyrille Orset[2], Mickael Tanter[1], Olivier Couture[1], Thomas Deffieux[1‡], Denis Vivien[2,4‡]✉

1. Institute Physics for Medicine Paris, Inserm U1273, ESPCI Paris, CNRS FRE 2031, PSL University.
2. Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @Caen-Normandie (BB@C), UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Caen, France.
3. CHU Caen, Department of radiology, Caen University Hospital, Avenue de la Côte de Nacre, Caen, France.
4. CHU Caen, Department of Clinical Research, Caen University Hospital, Avenue de la Côte de Nacre, Caen, France.
5. STROK@LLIANCE, ETAP-Lab, 2 rue des Rochambelles, Caen, France

† These co-first authors equally contributed to this work.

‡ These co-last authors equally contributed to this work.

✉ Corresponding author: Denis VIVIEN, PhD, INSERM UMR-S U1237 "Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders", University Caen Normandie, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), Bd Becquerel, BP5229, 14074 Caen, France. Phone: +33 2 31 47 01 66; Fax: +33 2 31 47 02 22; E-mail: vivien@cyceron.fr.

© The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). See http://ivyspring.com/terms for full terms and conditions.

Received: 2020.01.23; Accepted: 2020.04.28; Published: 2020.06.12

Abstract

In the field of ischemic cerebral injury, precise characterization of neurovascular hemodynamic is required to select candidates for reperfusion treatments. It is thus admitted that advanced imaging-based approaches would be able to better diagnose and prognose those patients and would contribute to better clinical care. Current imaging modalities like MRI allow a precise diagnostic of cerebral injury but suffer from limited availability and transportability. The recently developed ultrafast ultrasound could be a powerful tool to perform emergency imaging and long term follow-up of cerebral perfusion, which could, in combination with MRI, improve imaging solutions for neuroradiologists.

Methods: In this study, in a model of *in situ* thromboembolic stroke in mice, we compared a control group of non-treated mice (N=10) with a group receiving the gold standard pharmacological stroke therapy (N=9). We combined the established tool of magnetic resonance imaging (7T MRI) with two innovative ultrafast ultrasound methods, ultrafast Doppler and Ultrasound Localization Microscopy, to image the cerebral blood volumes at early and late times after stroke onset and compare with the formation of ischemic lesions.

Results: Our study shows that ultrafast ultrasound can be used through the mouse skull to monitor cerebral perfusion during ischemic stroke. In our data, the monitoring of the reperfusion following thrombolytic within the first 2 h post stroke onset matches ischemic lesions measured 24 h. Moreover, similar results can be made with Ultrasound Localization Microscopy which could make it applicable to human patients in the future.

Conclusion: We thus provide the proof of concept that in a mouse model of thromboembolic stroke with an intact skull, early ultrafast ultrasound can be indicative of responses to treatment and cerebral tissue fates following stroke. It brings new tools to study ischemic stroke in preclinical models and is the first step prior translation to the clinical settings.

Key words: Ischemic stroke; Thrombolysis; Ultrasound Imaging; Ultrasound Localization Microscopy; Outcome

Introduction

Cerebral arterial recanalization and tissue reperfusion are the major prognostic factors of good functional outcomes following ischemic stroke. The only FDA approved pharmacological treatment of

stroke remains thrombolytic therapy, using recombinant tissue plasminogen activator (rtPA), with a therapeutic window of 4.5 h after stroke onset [1]. The Extend clinical trial suggests the safe use of rtPA alone, even 9 h after stroke onset [2]. The overall acute recanalization rate after rtPA treatment is below 35 %, with its efficacy affected by the time to treatment, poor collaterals, clot localization and the size of thrombi [3, 4]. This efficacy is dramatically improved when combined with endovascular thrombectomy (EVT) when treated within 6-24 h of the onset of symptoms [5, 6].

The main imaging techniques dedicated to brain hemodynamics are positron emission tomography (PET), single photon emission computed tomography (SPECT), Xenon-enhanced computed tomography (XeCT), dynamic perfusion computed tomography (PCT), MRI dynamic susceptibility contrast (DSC), arterial spin labeling (ASL) and transcranial Doppler ultrasonography (TCD). Finer estimation of cerebral perfusion can be obtained in Perfusion Weighted Imaging (PWI) but requires the injection of MR contrast agents and only provide one reading [7]. Currently, there are no tools that could be performed at bedside (as TCD), repeatable (as ASL), provides quantitative measurement (as PET and XeCT) and measures multiple perfusion parameters (as PCT) [8,9]. The recent development of ultrafast ultrasound and progresses in probe technologies combined all these criteria in a unique system [10]. Unlike optical methods that are used for cerebral perfusion imaging, ultrasound allows the imaging in depth in living tissues. Specifically, ultrafast Doppler allows the monitoring of subtle Cerebral Blood Volume (CBV) changes without contrast agents and led to the development of the ultrasound analog of functional MRI (fMRI): functional Ultrasound (fUS) [11-16]. Ultrafast ultrasound also allows the detection of injected intravascular microbubbles, a clinical ultrasound contrast agent, and led to the development of Ultrasound Localization Microscopy (ULM) [17-20] which, unlike ultrafast Doppler, may allow transcranial imaging in adults patients [21,22]. In this study, we demonstrate that both modalities are adapted to the study of stroke in a mouse model, with ultrafast Doppler producing longitudinal monitoring and ULM proving an increased sensitivity and definition, two criteria which are mandatory for clinical applicability.

In preclinical studies where the skull was removed, ultrafast Doppler have been showed to detect vessels with flow as slow as 1 $mm.s^{-1}$ with a 100 µm precision whereas ULM detected vessels under 1 $mm.s^{-1}$ with a 10 µm resolution. In this study, the skull was kept intact and image quality was degraded but still enabled quality imaging of cerebral perfusion. Our present work demonstrates in an intact skull setup with a clinically relevant model of Middle Cerebral Artery (MCA) occlusion [23-25] that ultrafast Doppler and ULM can provide characterization of cerebral perfusion during an ischemic episode and follow-up in mice. The potential of ULM for transcranial imaging in human patients might allow the imaging of cerebral perfusion very early after stroke onset and possible improvement in medical care.

Materials and Methods

Animals

Experiments were performed on swiss male mice (35-40 g; Janvier Labs, France, 8-10 weeks old) in accordance with French ethical laws (Decree 2013-118) and European Communities Council guidelines (2010/63/EU).

Middle Cerebral Artery occlusion in the thromboembolic model

Micropipettes were filled with 1 µL of purified murine alpha thrombin (1 UI = 0.05 mg; Stago BNL). The pipettes were introduced in the lumen of the MCA and murine thrombin was slowly injected to form a fibrin clot. Micropipettes were left in place for 10 min to stabilize the clot.

Tissue-Type Plasminogen Activator induced thrombolysis

To induce thrombolysis, 10 mice received intravenous injection of 200 µL of rtPA (10 mg/kg, Actilyse), 10% as a bolus and 90% as an infusion for 40 min at a steady rate of 4.5 µL/min. A control group of 10 mice was injected with saline under similar conditions. One animal was excluded from the rtPA group due to poor sterotactic fixing.

Ultrafast ultrasound

Acquisitions were performed on an ultrafast scanner (Verasonics, 128 channels, 62.5 MHz sampling rate) with Neuroscan live acquisition software (ART Inserm U1273 & Iconeus; Paris, France) with a custom ultrasound probe (15 MHz, 0.11 mm pitch, 128 elements, 14 mm width, Vermon, France) which enables a 110 µm x 100 µm in plane resolution at a depth of 10 mm. The probe was mounted on 4 motors (3 translation + 1 rotation, Pi, Germany). A schematic of the setup can be found in Figure 1A. As both stereotactic frame and motorization system were fixed to the table, a common coordinate system was set so each animal could be imaged later in similar configuration. In this study, the coordinate system is (z, x, y) with z the axial axis, x the lateral axis and y the

elevation axis as shown in Figure 1A. The coordinate system was adapted to match stereotactic coordinates by taking a reference on the antero-posterior axis at the vertical plane under the Bregma suture β=0.

Ultrafast Doppler

200 compounded frames (11 angles between -10°: 10°) were acquired at 500 Hz. Singular Value Decomposition filters were used (removal of the 60 first singular values) to separate blood signal from tissues and summed to produce a power Doppler image [26-30]. Between two images, a 1.2 s pause was added to let the motor move to the next slice. 24 coronal planes were imaged every 0.3 mm to reconstruct a 10 mm × 14 mm × 8 mm volume between β+2 mm and β-6 mm with an in plane resolution of 110 µm × 100 µm and a step of 300 µm every 40 s (Figure 1B).

Temporal profiles

Two regions of interest were defined on the body of the MCA and on the hypoperfused part of the cortex. The mean Doppler intensity in the ROI was calculated at each time to produce temporal profiles proportional to cerebral blood volumes in the ROI. The profiles were normalized on the basis of pre-occlusion levels.

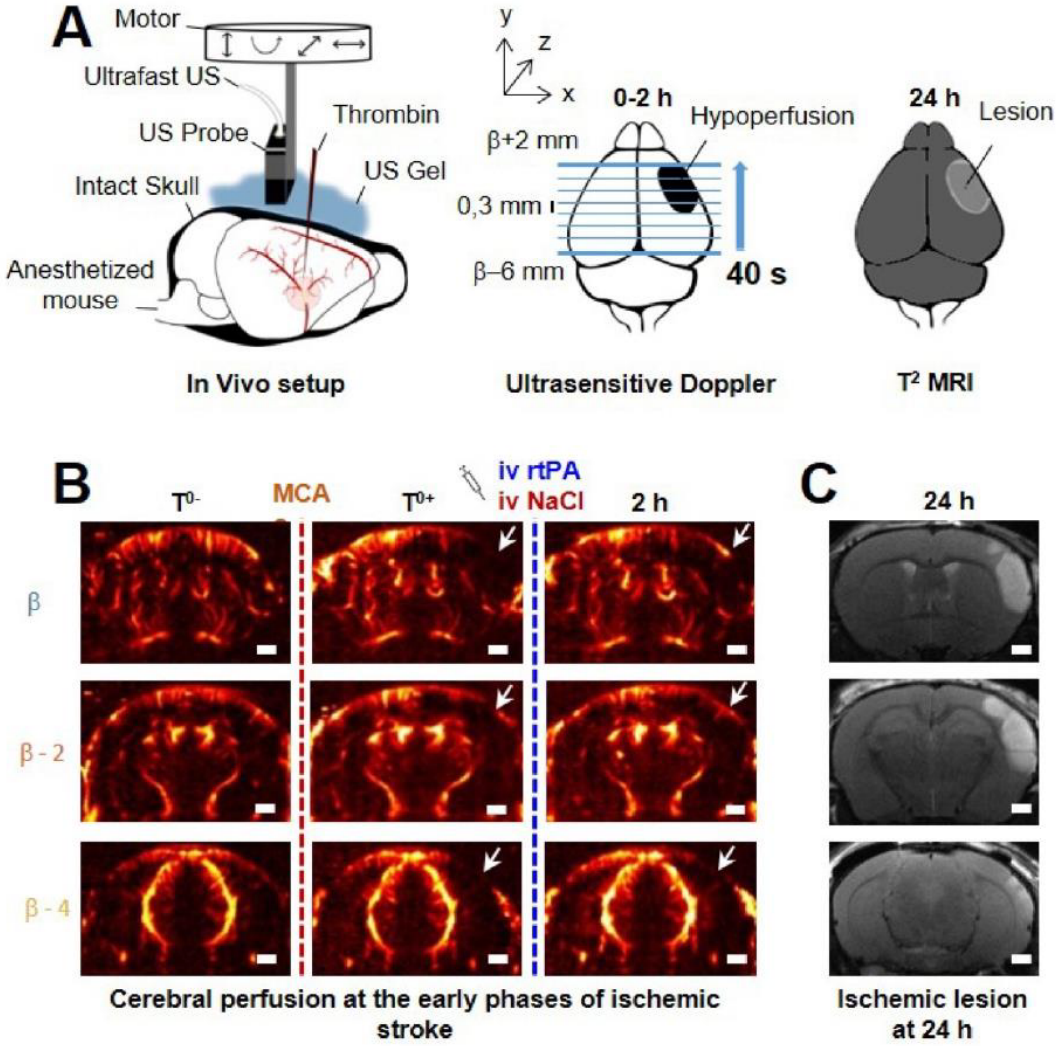


Figure 1. Transcranial ultrafast ultrasound imaging to monitor cerebral perfusion before, during and after stroke A. Experimental setup with an ultrasound probe connected to an ultrafast ultrasound acquisition system (Inserm Accelerator of Technological Research) and mounted on a 4 axis-motor for 3D scanning over the whole mice brain by steps of 0.3 mm. A volume over the whole brain is reconstructed every 40 s. Ultrafast Ultrasound monitors cerebral perfusion during the early phase of the ischemic episode, before, during and after onset, including treatment with the gold standard recombinant-tPA (rtPA). At 24 h MRI reveals the final ischemic lesion. **B.** Ultrafast Doppler reveals hypoperfusion in the ipsilateral cortices subjected to thrombin injection (clot formation) in the middle cerebral artery (MCA) and reperfusion of the corresponding territory after injection of the thrombolytic, rtPA. **C.** Registration and comparison with MRI reveal tight relationships between cerebral perfusions at the early phase of stroke and the final lesion volumes. Scale bar 1 mm.

Ultrasound Localization Microscopy

To perform ULM, acquisition and post processing steps were adapted from the reference methods [17-20]. For each image, 100 µL of Sonovue microbubbles were injected in the tail vein. Blocks of 800 compounded frames (-5° 0° 5°) at 1 kHz were acquired for 800 ms and saved for 200 ms and this scheme repeated for 180 s. A combination of Butterworth high pass filter (second order, 20 Hz) and SVD filters (removal of the 10 first singular values) were used to separate microbubbles echoes from tissues. Microbubbles centroid positions were localized using a weighted average algorithm. Microbubbles were tracked through consecutive frames using *simpletracker* (Mathworks). Tracks were interpolated and smoothed using a sliding window of 5 points and cleaned from redundant positions. A density image was reconstructed on an 11 µm × 10 µm grid.

Magnetic Resonance Imaging

Acquisitions were performed on a 7T Brucker system. T2-weighted images were acquired using a multislice multiecho sequence: TE/TR 33 ms/2500 ms and reconstructed with a 0.7 mm × 0.7 mm × 0.5 mm resolution. Lesions were manually segmented on T2 acquisitions. MRI and ultrafast Doppler volumes were registered on anatomical similarities using *imregister* (Mathworks), an intensity-based function for multimodal registration. As the coordinate system was the same for ultrafast Doppler and ULM, the volumetric registration used for ultrafast Doppler was applied to ULM to ensure registration with MRI. Segmentation of ischemic lesion was performed manually and blind to ultrasound images.

Quantifications and statistical analyses

To account for tissue swelling due to the edema, a first correction factor had to be calculated for every mouse. On T_2 MRI images, the distance between the skull and the corpus callosum was measured on both hemisphere of the mouse brain. Because skull thickness increases at the front of the head, ultrasound imaging in the most anterior parts of the head suffered from stronger wave attenuation. Consequentially, the contrast and sensitivity to the vasculature was strongly impaired and meaningful analysis could not be performed reliably after β+1.5 mm. As lesions spread up to β+3 mm, the parts between β+1.5 mm and β+3 mm were not included in lesion quantifications in the analysis in Figure 5 under the mention adjusted volume of lesion.

Quantifications are expressed as mean ± std (Figure 5A and 5B). Statistical analysis was performed using GraphPad®. We first assessed normal distribution of all samples by Shapiro-Wilk tests. In the panels A, B and E unpaired two-tailed t tests were performed. Pearson correlation tests were used for panels C and D. Sidak's multiple comparisons tests were used to assess multiple comparisons in panel F. Differences were considered statistically significant for a probability value $p < 0.05$.

Ultrafast ultrasound TICI score

In human, the TICI score is used to describe the perfusion following stroke [34,35]. We adapted a TICI-like score for ultrafast Doppler. The scoring was estimated by an operator from a combination of markers: recanalisation and reperfusion profiles reaching 50% or pre-occlusion levels, and the presence of significant remaining hypoperfused volumes at 2 h. Grade 0: No Recanalisation. Grade 1: Recanalisation but no Reperfusion Grade 2: Recanalisation and partial reperfusion. Grade 3: Complete recanalisation and reperfusion.

Results

Transcranial ultrafast ultrasound monitors hypoperfusion following thromboembolic stroke

On ultrafast Doppler, the body of the MCA can be observed on a coronal slice over 1 mm. Directly after thromboembolic occlusion of the MCA (Figure 1A), blood flow in the artery is completely blocked and the appearance of a large hypoperfused area can be observed in the ipsilateral cortex to the occluded MCA and spreading between β -3 mm and β -4 mm (Figure 1B). In the lateral part of the cortex, fed by the MCA, the blood supply is completely stopped. The most central part of the cortex, fed by the Anterior Cerebral Artery (ACA) is sometimes subjected to small and rapid changes in cerebral blood volumes (CBVs). During the 2 h following MCAo and rtPA treatment, restoration of perfusion can be assessed. At 24 h post-stroke onset and treatment, T_2 weighted MRI reveals areas with high water content corresponding to the ischemic lesion (Figure 1C). The edema as seen on T_2 MRI is known to correlate with tissue damage seen by histopathological staining [23,24]. Moreover, the edema only appears several hours after the stroke onset which makes it ineffective to image tissue damage during the early phase of stroke (Figure S1).

Without rtPA treatment, the ischemic lesion is the hypoperfused volume measured early in ultrafast ultrasound

In the control group, 10 mice were injected with saline 20 min after MCAo, corresponding to the sham of the rtPA-treated group (Figure 2B). Variations in

ultrafast Doppler before and after occlusion exhibit hypoperfusion in the corresponding ipsilateral cortices (Figure 2B). Additionally, differences in ultrafast Doppler between post-occlusion time and 2 h after the stroke onset is displayed in Figure 2C and reveal the absence of any reperfusion. After identification of the MCA on ultrafast Doppler image, recanalization profiles were plotted and exhibited the absence of recanalization for saline treated mice (Figure 2D). Deep in the tissues fed by the MCA, no reperfusion was observed in any of the mice (Figure 2E). Profiles directly after MCAo can be reconstructed and reveal a peak around β-1 mm and spreading between β-4 mm and further than β+3 mm (Figure 2F). Total measured volumes at risk were 16 mm^3 ± 3 mm^3. Similar measurements were performed 2 h post MCAo and show little evolutions and hypoperfused volumes stayed similar within the margin of error (Figure 2G). Infarct areas on T_2 weighted MRI reveal lesion spreading between β-5 mm and β+3 mm with a peak also around β-1 mm and co-localization with the hypoperfused areas (Figure 2H). To account for late edema and ultrasound blindness between β+1 mm and β+3 mm, two corrections were made to the volume of lesions with adjusted volumes of 17 mm^3 ± 3 mm^3 (24 mm^3 ± 5 mm^3 without correction). This represents a 6% difference between ultrasound and MRI. In these conditions, the lesions measured by MRI at 24 h appear to be the totality of the hypoperfused volumes measured by ultrafast Doppler at 2 h post stroke onset. This hypothesis was validated in a supplementary group of 5 mice in which the MCA has been permanently occluded through electrocoagulation thus allowing neither recanalization nor reperfusion of the tissue (Figure S2). As expected, no reperfusion was observed, and similar hypoperfused volumes were observed in ultrafast Doppler imaging together with similar ischemic lesions on T_2 weighted MRI. The volumes at risk were 19 mm^3 ± 3 mm^3 while the volumes of lesion were 18 mm^3 ± 5 mm^3 (24 mm^3 ± 7 mm^3 before adjustments). This represents a 5 % difference between ultrasound and MRI.

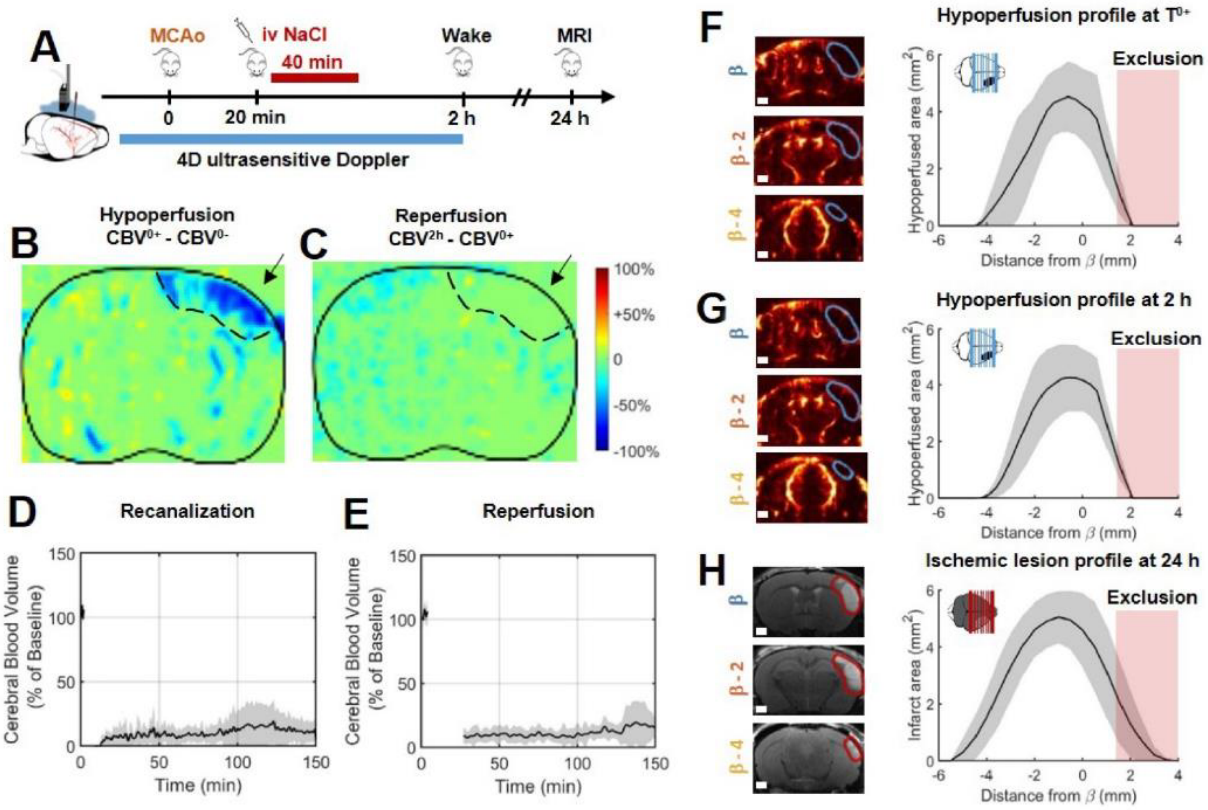


Figure 2. In the absence of treatment, the final volume of lesion corresponds to the early hypoperfused area. A. Experimental timeline for ultrasound monitoring of cerebral blood volumes after MCAo and comparison with MRI. **B**. Differences between ultrafast Doppler imaging performed before and after occlusion of the middle cerebral artery (MCAo) reveal hypoperfusion in the corresponding ipsilateral cortices. **C**. Differences between ultrafast Doppler imaging just after MCAo and 2 h later show no sign of reperfusion in the corresponding ipsilateral cortices. **D**. Monitoring of blood flows in the MCA on ultrafast Ultrasound over β+1 mm shows permanent occlusion with no clear recanalization occurring during the first 2 h. **E**. Monitoring of cerebral perfusion in the hypoperfused volume shows no sign of reperfusion. **F**. Patterns of hypoperfusions directly after MCAo reveal large hypoperfused volumes in the cortex. **G**. Patterns of hypoperfusions 2 h after MCAo reveal similar hypoperfused volumes. **H**. Patterns of the final ischemic lesions measured at 24 h after MCAo revealed by T_2 MRI.

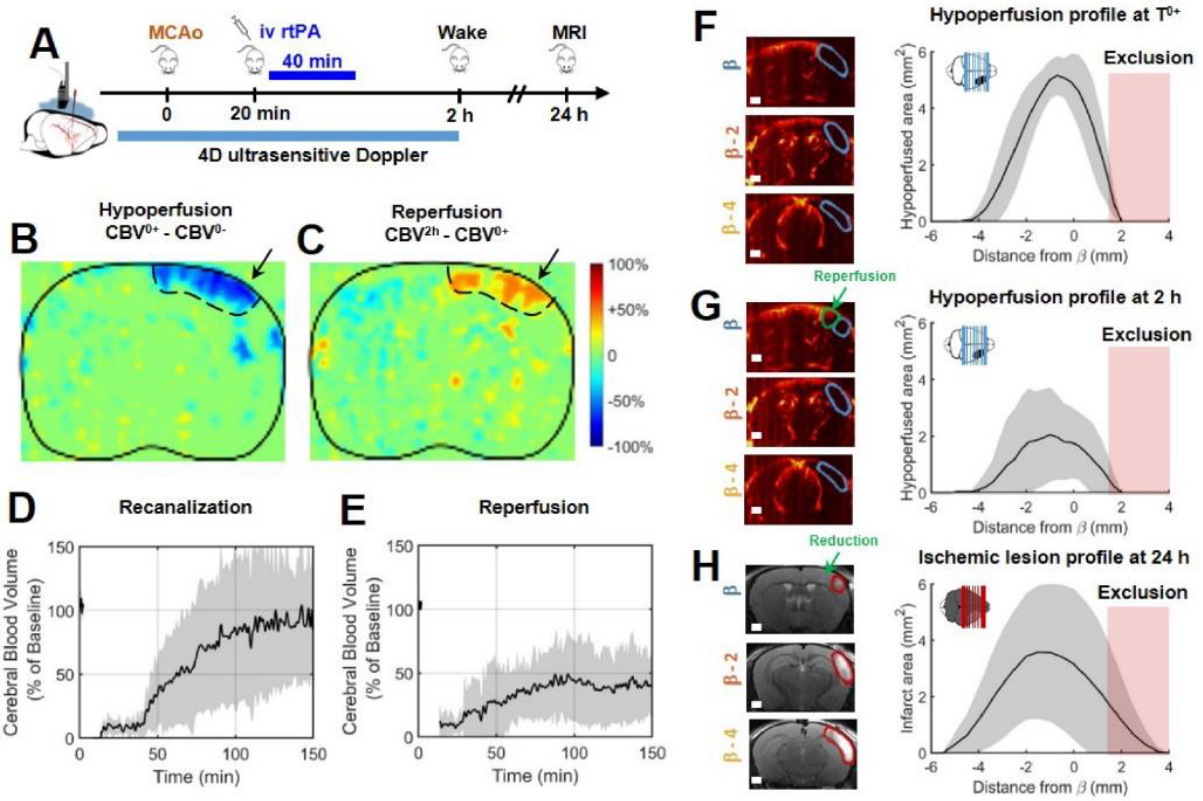


Figure 3. Early injection of rtPA causes arterial recanalization, tissue reperfusion and reduces the volume of lesion. A. Differences between ultrafast Doppler before and after MCAo reveal hypoperfusion in the corresponding ipsilateral cortices. **B**. Differences between ultrafast Doppler just after MCAo and 2 h later show reperfusion in the hypoperfused part of the corresponding cortices. **C**. Corresponding MRIs reveal the formation of smaller lesions. **D**. Monitoring of flows in the MCA on ultrafast ultrasound images over β+1 mm shows rapid and effective recanalization. **E**. Monitoring of cerebral perfusion in the hypoperfused volumes show some tissue reperfusions. **F**. Patterns of hypoperfusions directly after MCAo revealed by ultrafast ultrasound imaging. **G**. Patterns of hypoperfusions 2 h after MCAo revealed by ultrafast ultrasound imaging. **H**. Patterns of the ischemic lesions 24 h after MCAo revealed by MRI in rtPA treated animals.

rtPA induces recanalization and reperfusion can be monitored transcranially with ultrafast ultrasound

In a group of 9 mice, the gold standard fibrinolytic treatment, rtPA was injected intravenously 20 min after occlusion of the MCA, 10 % in bolus and 90 % in infusion as in clinic (Figure 3A). The differences of ultrafast Doppler images from before and after MCAo exhibit the hypoperfusion in the ipsilateral cortices (Figure 3B) whereas the differences between just after occlusion and 2 h after this time display the reperfused areas (Figure 3C). The monitoring of the recanalization of the body of the MCA reveals an overall improvement in arterial recanalization (Figure 3D). Although tissue reperfusion can be observed, it does not appear as effective as arterial recanalization (Figure 3E). The areas at risk in ultrafast Doppler were measured as previously (sham control group, Figure 2) directly after MCAo (before rtPA treatment) and reveal the same behaviors, a peak around β-1 mm and spreading between β-4 mm and further than β+1 mm with total hypoperfused volumes of 17 mm^3 ± 3 mm^3 (Figure 3F). 2 h post MCAo however, the action of rtPA treatment can be quantified as the hypoperfused volumes are reduced to 7 mm^3 ± 7 mm^3 (Figure 3G). In agreement with recanalization-reperfusion of the ischemic brain tissue, revealed by a rescue of the CBV, the final infarct areas on T_2 weighted MRI at 24 h are 11 mm^3 ± 3 mm^3 (14 mm^3 ± 11 mm^3 before adjustment), (Figure 3H) i.e. reduced by 30 % of the lesion volumes compared to the initially identified areas at risk measured before rtPA treatment. There remains a 30 % difference between ultrasound and MRI which highlights the fact that although they are reperfused, some tissues can still be infarcted. The variability in the response to rtPA treatment comes from the thromboembolic model and is rather representative of what happens in human patients. This variability of behaviors can be more finely observed with ultrafast ultrasound.

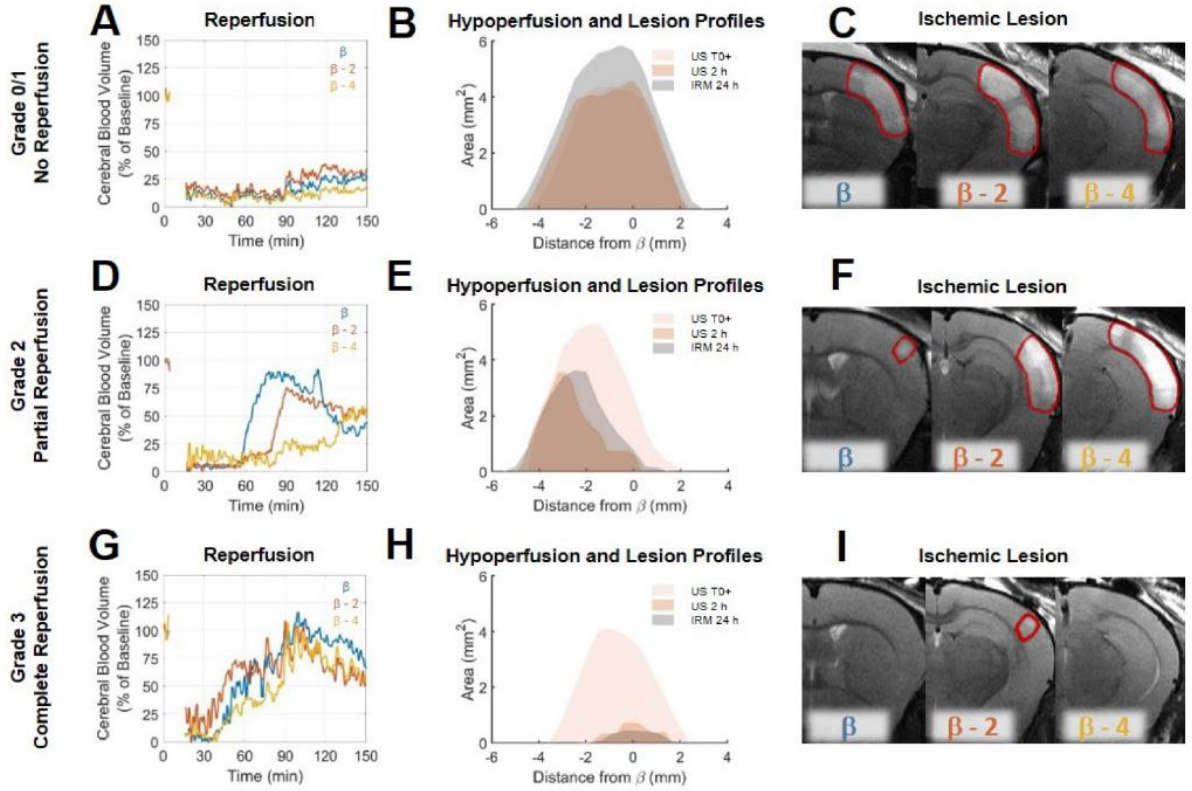


Figure 4. Differences in reperfusion patterns revealed by ultrafast ultrasound imaging correspond to the formation of ischemic lesions. A. For a typical Grade 0/1 mouse, the reperfusion curves in three different parts of the hypoperfused areas show no reperfusion. B. Hypoperfused profiles immediately post MCAo and after 2 h show no significant evolution of the formation of the ischemic lesions co-localized with hypoperfusions. C. Ischemic lesions on the corresponding areas. D. For a typical Grade 2 mouse, the reperfusion curves in three different parts of the hypoperfused areas show inhomogeneous reperfusions. E. Hypoperfused profiles immediately post MCAo and after 2 h show significant evolutions of the formation of the ischemic lesions co-localized with the remaining hypoperfusions at 2h. F. Ischemic lesions on the corresponding areas. G. For a typical Grade 3 mouse, the reperfusion curves in three different parts of the hypoperfused areas show early and effective reperfusions. H. Hypoperfused profiles immediately post MCAo and after 2 h show significant reductions of hypoperfusions associated with the formation of reduced ischemic lesions. I. Ischemic lesions on the corresponding areas.

Transcranial ultrafast ultrasound allows a fine spatiotemporal follow-up of the cerebral blood volumes following stroke and treatment

Analysis of individual animals of the rtPA treated group, unmasks fine correspondence between reperfusion patterns and volumes of lesion. In two animals, some degree of arterial recanalization was observed without any tissue reperfusion. In two other animals, complete tissue reperfusions were achieved. In the other animals, recanalization was followed by some form of incomplete reperfusions. To highlight these differences and how ultrafast ultrasound can be used to understand lesion formation, reperfusion profiles were reconstructed in three different coronal planes to explore spatial temporal differences in reperfusion. To standardize the analysis of reperfusion, a grading system similar to the clinical TICI grading system [31,32] (Thrombolysis In Cerebral Ischemia) from 0 to 3 was used to describe the reperfusion, 0 being no recanalization, 1 being recanalization but no reperfusion, 2 being a partial reperfusion and 3 being a complete reperfusion. This scoring was performed based on the ultrafast Doppler images. On Figure 4 are given three examples of mice with different reperfusion patterns. The first mouse showed little arterial recanalization and no tissue reperfusion corresponding to a TICI grade of 1. The whole hypoperfused volume directly after MCAo remains hypoperfused for the duration of the experiment as shown by reperfusion curves at β (in blue), β-2 (in red) and β-4 (in yellow) (Figure 4A). The hypoperfusion profiles show no significant evolution 2 h after MCAo and the lesion is the entire hypoperfused volume (Figure 4B). MRI reveals a large lesion over the hypoperfused areas (Figure 4C). The second mouse showed good arterial recanalization but inhomogeneous tissue reperfusion corresponding to a TICI grade of 2. Some parts of the hypoperfused volume directly after MCAo are reperfused within the first 2 h as shown by reperfusion curves at β, β-2 mm and β-4 mm (Figure 4D). The hypoperfusion profiles show significant reduction 2 h after MCAo and the lesion matches the remaining hypoperfused volume (Figure 4E). MRI reveals the inhomogeneity of the lesion (Figure 4F). The third mouse showed good

arterial recanalization and good tissue reperfusion corresponding to a TICI grade of 3. All the hypoperfused volume directly after MCAo is reperfused within the first 2 h as shown by reperfusion curves at β, β-2 mm and β-4 mm (Figure 4G). The hypoperfusion profiles show a complete reduction 2 h after MCAo and the absence of lesion (Figure 4H). MRI reveals the absence of lesion (Figure 4I). Eventually, the prediction ability of ultrafast ultrasound can be tested on all the animals.

Transcranial ultrafast ultrasound at 2 h predicts responses to thrombolytic treatment and final outcomes

The effect of rtPA in this model reduces the lesion by more than 30 % (P=0.032) (Figure 5A). The saving of tissue caused by early reperfusion can be observed in rtPA animals (P=0.0206) (Figure 5B). To represent the link between hypoperfusion and the formation of a lesion, the adjusted volumes of lesion can be plotted as a function of the volumes at risk defined as the hypoperfusion directly after the occlusion of the MCA (Figure 5C). For the control group, the outcome of the stroke can be predicted since, after adjustments, all points align along the diagonal (R^2=0.8273, p=0.0003). This means that when no early reperfusion is observed, the final volumes of lesion are the whole volumes at risk measured by using CBV only, just after stroke onset. For animals receiving rtPA, the volumes of lesion are reduced compared to the volumes at risk, meaning that tissue areas were effectively saved (R^2=0.4001, p=0.0675). The size of the lesion depends on two factors: the initial size of the hypoperfused zone and the efficiency of the reperfusion. When plotting the adjusted volumes of lesion as a function of the hypoperfusion at 2 h after stroke onset (control and treated groups) (Figure 5D), all points align around the diagonal (NaCl: R^2=0.8186, p=0.0003) (rtPA: R^2=0.4438, p=0.05) with a strong correlation, even in the rtPA group with a large variability of outcome. This means that in both cases, the volumes of lesion are the hypoperfused volumes measured at 2 h using CBV only.

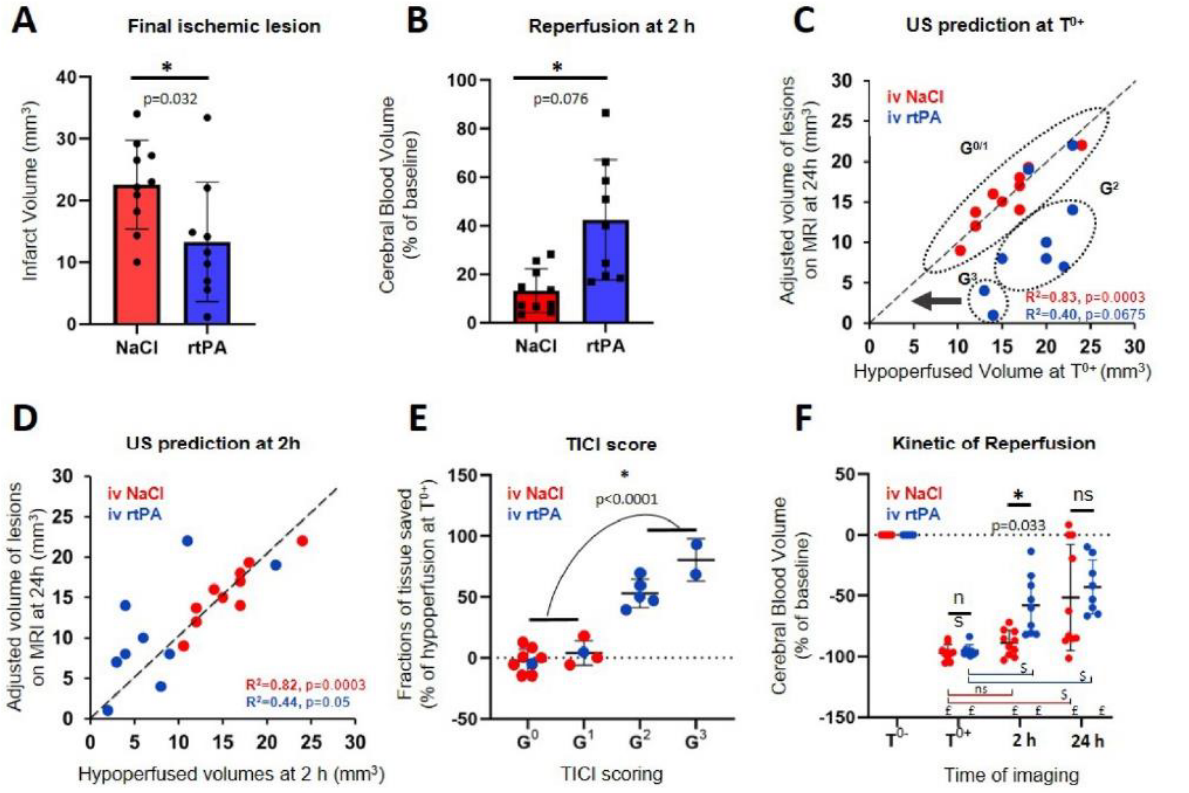


Figure 5. Prediction of lesions and responses to treatment based on early Transcranial ultrafast Doppler imaging. A, B, E = Unpaired t test Two-tailed (n=10; 9); C, D = Pearson correlation (n=10; 9); F = Sidak's multiple comparisons test (n=10; 9), *Intergroup differences; $ Intragroup differences; £ significant compared to T^{0-}. **A.** Final ischemic lesions determined at 24 h indicate reduction of lesions in animals treated with rtPA. **B.** State of reperfusion 2 h after MCAo shows improved reperfusions in the rtPA treated group. **C.** Directly after MCAo, the hypoperfused volume in ultrafast Doppler imaging is a marker of final ischemic lesion volumes for the NaCl treated animals (red) with the lesions that correspond to the complete hypoperfused volumes, aligned around the diagonal. For the rtPA treated group (blue), the lesions are smaller than the volumes at risk defined directly after occlusion because of effective tissue reperfusions. **D.** After rtPA treatment, the remaining hypoperfused volumes are predictive of the final lesion volumes in both groups. **E.** Effectiveness of the prediction of lesions based on reperfusion using the ultrafast ultrasound based TICI score. **F.** Evolutions of perfusions in the volumes at risk at the early time after stroke onset (0 and 2 h) and at 24 h show that after a therapeutic window of 2 h, perfusion is no longer predictive of the lesion.

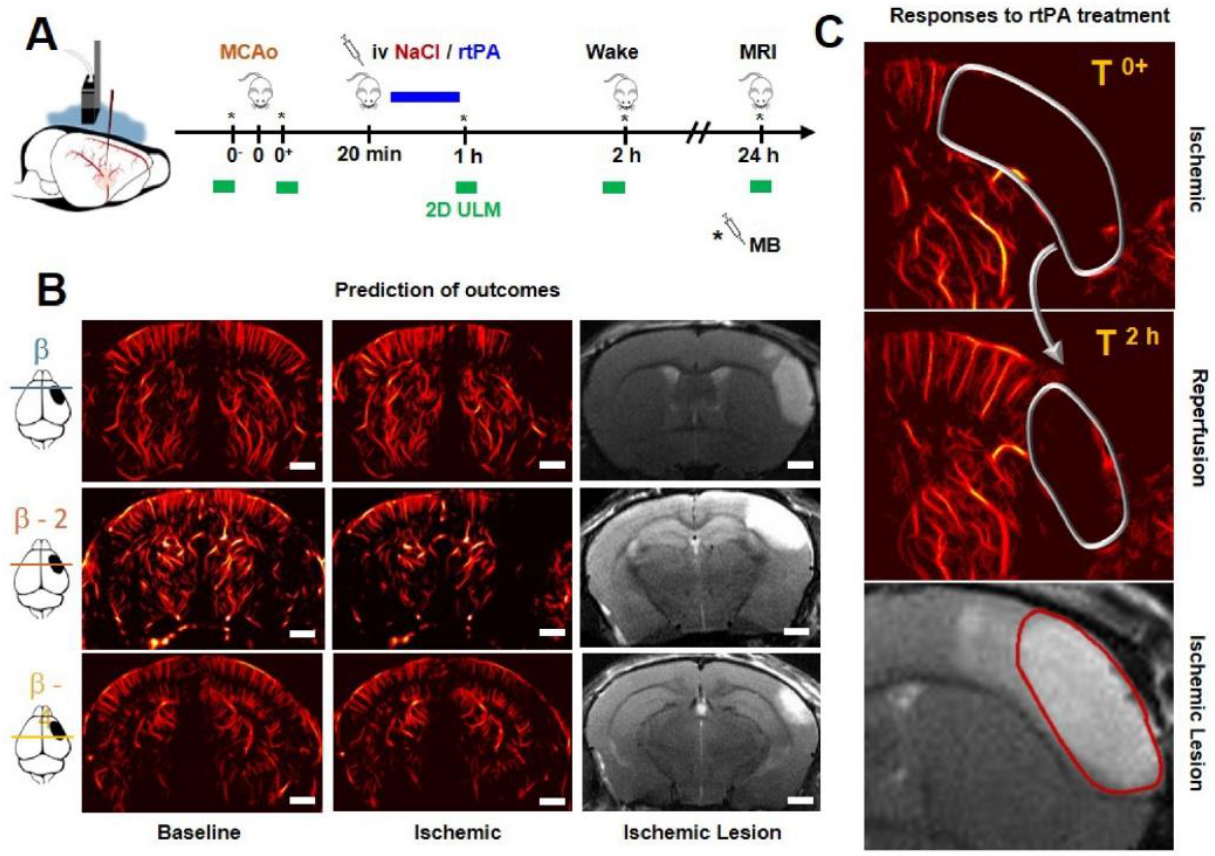


Figure 6. Predicting the outcomes and evaluating responses to treatment with transcranial ULM. A. Timeline for ULM acquisitions. **B.** For mice treated with NaCl, a large lesion can be seen in ULM just after ischemia and very little reperfusion can be observed 2 h after the onset. In ultrafast Doppler, the hypoperfused area is the infarcted lesion seen in MRI. **C.** On rtPA treated mice, the reperfusion can be evaluated with ULM and predicts the formation of the lesion. Scale bar 1 mm.

However, this representation does not consider the quality of the reperfusion in saving tissues. All mice in the control group are attributed a TICI score of 0 or 1, meaning that no reperfusion was ever observed. Four mice in the rtPA treated group were attributed TICI scores of 0 or 1 meaning that thrombolysis was not effective enough to reperfuse the tissues. In these conditions, the prognostic of lesions is similar to the control saline group. Six mice in the rtPA group were attributed TICI scores of 2 or 3, meaning that reperfusions were achieved. In these conditions, the lesions were reduced compared to the volumes at risk and compared to the control group, implying that the better the reperfusion is, the more tissues are saved. Using the ultrafast Doppler based TICI grading system, we can represent how much tissue was effectively saved by an early and effective reperfusion compared to the initial areas at risk measured by CBV (Figure 5E). It is no surprise that for grades 0 and 1, no tissue is saved. On the contrary, major improvements can be observed for mice with grade 2 and 3 with preservation of more than half of the tissue ($P<0.0001$). All animals were imaged again at 24 h. Some reperfusion 24 h after the onset of the stroke is observed in both the saline and rtPA groups, with an improved reperfusion for the rtPA treated animals when measured at 2 h ($p=0.033$) (Figure 5F).

Transcranial Ultrasound Localization Microscopy to image hypoperfusion

In four mice in each group, ULM was performed in a single coronal plane at particular times, just before and after occlusion of the MCA, 1 and 2 h later and again after 24 h (Figure 6A). On the given examples in Figure 6B, although there is still shadowing by the skull, ULM can be performed and reveals the vasculature with enhanced spatial resolution and sensitivity. ULM reveals the localization and extent of the hypoperfusion. 24 h after the onset of the stroke, we can compare the lesions seen in T_2 weighted MRI with the hypoperfused areas. The given examples in Figure 6B, shows the formation of a large lesion. The hypoperfused area is large to begin with, and the injection of NaCl does not induce efficient reperfusion. 2 h after the onset of the ischemia, only a

small area is reperfused, which we can easily identify as saved on the corresponding T_2 image. The given example in Figure 6C shows the formation of a reduced lesion after rtPA treatment and reperfusion. These examples give an idea of how ULM could be used to image the hypoperfused areas and monitor the response to treatment.

Discussion

An important goal to improve stroke therapy is to identify how the lesion will extend with time, whether the patient will respond to treatment and ultimately to predict the functional outcome. To address these important questions, neurologists and neuroradiologists use a combination of prediction tools with the severity of stroke, its location, age, previous risk factors and comorbid disease (such as high blood pressure, diabetes, etc.) as key factors. Despite all these criteria, their answer remains most often very evasive and is usually postponed until the evolution of permanent neurological deficits. An early biomarker to accurately identify salvageable tissues and to predict functional outcome after stroke is, therefore, mandatory [33] and could be met with the assistance of neuroimaging techniques [34].

In our study, we demonstrate that ultrafast Doppler and Ultrasound Localization Microscopy can be relevant neuroimaging modalities for stroke. We show here that early assessment of the cerebral perfusion using *in vivo* ultrafast Doppler brain imaging, when performed early after stroke onset (here 2 h in rodents) is indicative of final lesion volumes measured by MRI at 24 h. We also demonstrate, that when performed just after thrombolytic treatment (rtPA-induced fibrinolysis), the methodology can be used to monitor the treatment efficacy.

Ultrafast Doppler for functional imaging was demonstrated in different animal models [11–14] and in clinical settings: in newborns [15] or intraoperatively [16]. In the context of stroke, it was first investigated in 2012 [35] and recent works confirmed its relevance [36,37], but not in a model of thromboembolic stroke as it occurs in clinic and without considering prognostic and/or responses to the gold standard treatment. However, the translation of results to human should always be done carefully, especially in the context of stroke. Indeed, all strategies identified so far to save the brain excepted rtPA treatment have failed in the clinic, mainly because of poor animal modeling. The model of stroke we have used here [23,24] is relevant with the actual clinical setting [25,38]. Moreover, ultrasound imaging of the early phases following stroke was also performed with optical contrast using photoacoustic imaging but in a simpler mouse model of photo thrombose and filament induced MCA occlusion [39]. Unlike ultrafast Doppler and ULM, photoacoustic imaging is sensitive to oxygen saturation in tissue and not blood volumes but can nonetheless provide similar results in terms of temporal dynamics and formation of lesion [40]. Although its translation to human patients might be severely limited by the strong absorption of light through the skull, photoacoustic can be complementary with ultrafast Doppler and ULM for preclinical studies to provide both cerebral blood volume and tissue oxygenation in tissues with different sets of sensitivity and resolutions.

Similarly, the translation of ultrasound imaging methods to human has always been a challenge because of a strong attenuation by the skull bone. As demonstrated previously, ultrafast Doppler can be performed through the fontanel [15] and could thus contribute to the diagnosis of stroke in babies. However, there are clear limitations about the possibility to use ultrafast ultrasound in adult due to strong aberrations and absorptions by the skull bone. The more recent improvements of both contrast and resolution of ULM may allow transcranial imaging [21,22], all the more so than microbubbles are commonly used in human as contrast agent for ultrasound imaging (Sonovue, Bracco), and in particular in MCA infarction to improve the signal to noise ratio [41]. This is a major point considering the recent report made by the Food and Drug Administration (FDA) about a Safety Announcement related to gadolinium-based contrast agents (GBCAs) administered for MRIs [42]. Nonetheless, the quality of the imaging through the skull will be critical to determine the quality of the readings, as there is a priori no way to distinguish ischemic from shadowed areas.

A proper clinical trial has yet to demonstrate the ability of ULM to provide quality reading through the human skull. The clinical use of ULM in this context could be performed through the temporal window, and would benefit from the extension of the field of view from 2D to 3D to access large areas of the brain which may reduce the dependency of the imaging procedure to the operator and allow the detection of scattered lesion. It may also enable the estimation of quantitative biomarkers of vascular suffering over large areas of the brain. Such extension is envisioned to become possible in the next years with the advent of piezocomposite 2D Matrix Arrays or Capacitive Micromachined Ultrasonic Transducers (CMUT) technologies and development of 3D ultrafast ultrasound modalities [43-45].

The possibility to have access to an easy to use,

cheap, operator independent and transportable machine to image cerebral perfusion would undoubtedly increase the number of patients eligible for treatment, with the possibility to use this imaging method in the ambulance. Although recanalization is associated with rapid clinical improvement in some patients, for others despite recanalization, they show delayed or impaired reperfusion. Ideal patient selection for thrombolysis alone or combined to thrombectomy should therefore not be based on therapeutic windows but rather on perfusion imaging to determine "a signature" of response to treatments. In addition, such type of monitoring could be very useful for long term recording of recovery and to prevent and treat recurrent stroke.

In conclusion, we provide here, in a relevant model of thromboembolic stroke model in mice with rtPA treatment, the demonstration that ultrafast ultrasound *in vivo* imaging can be used in the context of stroke to diagnose ischemic injury, to prognose outcomes and responses to treatment, in an early time frame after stroke onset.

Supplementary Material

Supplementary figures and tables.
http://www.thno.org/v10p7480s1.pdf

Acknowledgments

This work was supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR), within the project ANR Predic, the European Research Council under the European Union Horizon H2020 programme/ERC Consolidator grant agreement No 772786-ResolveStroke, the RHU project Marvelous (16-RHUS-0009), the LABEX WIFI (Laboratory of Excellence ANR -10 -LABX -24) within the French Program "Investments for the Future" under reference ANR -10 - IDEX -0001 -02 PSL* and performed with the technical and scientific support of the INSERM Accelerator of Technological Research in Biomedical Ultrasound and the institute Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C).

Author contributions

All authors designed the research, V.H., C.B. and C.O. did the experiments, V.H., C.B., T.D., M.T. and D.V. analyzed the data, T.D. developed parts of the sequence, acquisition and processing software, VH, B.H. and O.C. developed the algorithms for ULM, all the authors discussed the results and wrote the paper.

Disclosure

O.C. and M.T. are depositor of the patent /FR2011/052810. T.D. and M.T. are cofounder of Iconeus.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

References

1. Zivin J, Fisher M, DeGirolami U, Hemenway C, Stashak J. Tissue plasminogen activator reduces neurological damage after cerebral embolism. Science. 1985; 230: 1289–92.
2. Campbell BCV, Ma H, Ringleb PA, Parsons MW, Churilov L, Bendszus M, et al. Extending thrombolysis to 4·5–9 h and wake-up stroke using perfusion imaging: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. Lancet. 2019; 394: 139-147.
3. Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, van der Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, et al. A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke. N Engl J Med. 2015; 372: 11–20.
4. Coutinho JM, Liebeskind DS, Slater LA, Nogueira RG, Clark W, Davalos A, et al. Combined Intravenous Thrombolysis and Thrombectomy vs Thrombectomy Alone for Acute Ischemic Stroke: A Pooled Analysis of the SWIFT and STAR Studies. JAMA Neurol. 2017; 74: 268-274.
5. Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, Bonafe A, Budzik RF, Bhuva P, et al. Thrombectomy 6 to 24 h after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. N Engl J Med. 2018; 378: 11–21.
6. Thiebaut AM, Gauberti M, Martinez De Lizarrondo S, Vivien D, Yepes M, Roussel BD. The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond. Lancet Neurol. 2018; 17: 1121–1132.
7. Shen Q, Duong T. Magnetic resonance imaging of cerebral blood flow in animal stroke models. Brain Circ. 2016; 2:20-27.
8. Wintermark M, Sesay M, Barbier M, Borbely K, Dillon WP, Eastwood JD, et al. Comparative Overview of Brain Perfusion Imaging Techniques. Stroke. 2005; 36:e83-99
9. Essig M, Shiroishi MS, Nguyen TB, Saake M, Provenzale JM, Enterline D, et al. Perfusion MRI: The Five Most Frequently Asked Technical Questions. AJR Am J Roentgenol. 2013; 200:24–34.
10. Tanter M, Fink M. Ultrafast imaging in biomedical ultrasound. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control. 2014; 61: 102–119.
11. Deffieux T, Demene C, Pernot M, Tanter M. Functional ultrasound neuroimaging: a review of the preclinical and clinical state of the art. Curr Opin Neurobiol. 2018; 50:128–135.
12. Mace E, Montaldo G, Cohen I, Baulac M, Fink M, Tanter M. Functional ultrasound imaging of the brain. Nat Methods. 2011; 8: 662–4.
13. Demene C, Tiran E, Sieu LA, Bergel A, Gennisson JL, Pernot M, et al. 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography. NeuroImage. 2016; 127: 472–483.
14. Tiran E, Ferrier J, Deffieux T, Gennisson JL, Pezet S, Lenkei Z, et al. Transcranial Functional Ultrasound Imaging in Freely Moving Awake Mice and Anesthetized Young Rats without Contrast Agent. Ultrasound Med Biol. 2017; 43: 1679–1689.
15. Demene C, Baranger J, Bernal M, Delanoe C, Auvin S, Biran V, et al. Functional ultrasound imaging of brain activity in human newborns. Sci Transl Med. 2017; 9(411).
16. Imbault M, Chauvet D, Gennisson JL, Capelle L, Tanter M. Intraoperative Functional Ultrasound Imaging of Human Brain Activity. Sci Rep. 2017; 7: 7304.
17. Errico C, Pierre J, Pezet S, Dessailly Y, Lekei Z, Couture O, et al. Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. Nature. 2015; 527(7579): 499–502.
18. Couture O, Hingot V, Heiles B, Muleki-Seya P, Tanter M. Ultrasound Localization Microscopy and Super-Resolution: A State of the Art. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control. 2018; 65: 1304–1320.
19. Hingot V, Errico C, Heiles B, Rahal L, Tanter M, Couture O. Microvascular flow dictates the compromise between spatial resolution and acquisition time in Ultrasound Localization Microscopy. Sci Rep. 2019; 9: 2456.
20. Heiles B, Correia M, Hingot V, Pernot M, Provost J Tanter M, et al. Ultrafast 3D Ultrasound Localization Microscopy using a 32×32 Matrix Array. IEEE Trans Med Imaging. 2019; 38: 2005-2015.
21. O'Reilly MA, Hynynen K. A super-resolution ultrasound method for brain vascular mapping. Med Phys. 2013; 40: 110701.
22. Soulioti De, Espindola D, Dayton PA, Pinton GF. Super-Resolution Imaging Through the Human Skull. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control. 2020; 67: 25-36.
23. Orset C, Haelenwyn B, Allan SM, Ansar S, Sampos F, Cho TH, et al. Efficacy of Alteplase in a Mouse Model of Acute Ischemic Stroke: A Retrospective Pooled Analysis. Stroke. 2016; 47: 1312–1318.
24. Orset C, Macrez R, Young AR, Panthou D, Angles-Cano E, Maubert E, et al. Mouse Model of In Situ Thromboembolic Stroke and Reperfusion. Stroke. 2007; 38: 2771–2778.
25. Llovera G, Hofmann K, Roth S, Salas-Perdomo A, Ferrer-Ferrer M, Perego C, et al. Results of a preclinical randomized controlled multicenter trial (pRCT): Anti-CD49d treatment for acute brain ischemia. Sci Transl Med. 2015; 7(299): 299ra121.

26. Demene C, Deffieux T, Pernot M, Osmanski BF, Gennisson JL, Sieu LA, et al. Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity. IEEE Trans Med Imaging. 2015; 34: 2271-85.
27. Baranger J, Arnal B, Perren F, Baud O, Tanter M, Demene C. Adaptive Spatiotemporal SVD Clutter Filtering for Ultrafast Doppler Imaging Using Similarity of Spatial Singular Vectors. IEEE Trans Med Imaging. 2018; 37: 1574–1586.
28. Shung KK, Sigelmann R, Reid JM. Scattering of ultrasound by blood. IEEE Trans Biomed Eng. 1976; 23: 460–467.
29. Cloutier G, Qin Z. Ultrasound backscattering from non-aggregating and aggregating erythrocytes--a review. Biorheology. 1997; 34: 443–470.
30. Bercoff J, Montaldo G, Loupas T, Savery D, Meziere F, Find M, et al. Ultrafast compound Doppler imaging: providing full blood flow characterization. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control. 2011; 58: 134–147.
31. Zaidat OO, Lazzaro MA, Liebeskind DS, Janjua N, Wechsler L, Nogueira RG, et al. Revascularization grading in endovascular acute ischemic stroke therapy. Neurology. 2012; 79: S110–S116.
32. Zerna C, Thomalla G, Campbell BCV, Rha JH, Hill MD. Current practice and future directions in the diagnosis and acute treatment of ischaemic stroke. Lancet. 2018; 392: 1247–1256.
33. Stinear CM. Prediction of motor recovery after stroke: advances in biomarkers. Lancet Neurol. 2017; 16: 826–836.
34. Thomalla G, Gerloff C. Acute imaging for evidence-based treatment of ischemic stroke. Curr Opin Neurol. 2019; 32: 521-529.
35. Martin A, Mace E, Boisgard R, Montaldo G, Theze B, Tanter M, et al. Imaging of perfusion, angiogenesis, and tissue elasticity after stroke. J Cereb Blood Flow Metab. 2012; 32: 1496–1507.
36. Brunner C, Isabel C, Martin A, Dussaux C, Savoye A, Emmrich J, et al. Mapping the dynamics of brain perfusion using functional ultrasound in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion. J Cereb Blood Flow Metab. 2017; 37: 263–276.
37. Brunner C, Korostelev M, Raja S, Montaldo G, Urban A, Baron JC. Evidence from functional ultrasound imaging of enhanced contralesional microvascular response to somatosensory stimulation in acute middle cerebral artery occlusion/reperfusion in rats: A marker of ultra-early network reorganization? J Cereb Blood Flow Metab. 2018; 38: 1690–1700.
38. Martinez de Lizarrondo S, Gakuba C, Herbig BA, Repesse Y, Ali C, Denis CV, et al. Potent Thrombolytic Effect of N -Acetylcysteine on Arterial Thrombi. Circulation. 2017; 136: 646–660.
39. Lv J, Shi L, Jingde Z, Fei D, Zhiyou W, Ronghe C, et al. In vivo photoacoustic imaging dynamically monitors the structural and functional changes of ischemic stroke at a very early stage. Theranostics. 2020; 10:816-828.
40. Cao R, Li J, Kharel Y, Zhang C, Morris E, Santos WL, et al. Photoacoustic microscopy reveals the hemodynamic basis of sphingosine 1-phosphate-induced neuroprotection against ischemic stroke. Theranostics. 2018; 8:6111-6120.
41. Seidel G, Meyer-Wiethe K, Berdien G, Hollstein D, Toth D, Aach T. Ultrasound Perfusion Imaging in Acute Middle Cerebral Artery Infarction Predicts Outcome. Stroke. 2004; 35:1107-1111.
42. Levine D, McDonald RJ, Kressel HY. Gadolinium Retention After Contrast-Enhanced MRI. JAMA. 2018; 320:1853.
43. Provost J, Papadacci C, Arango JE, Imbault M, Fink M, Gennisson JL, et al. 3D ultrafast ultrasound imaging in vivo. Phys Med Biol. 2014; 59: L1–L13.
44. Provost J, Papadacci C, Demene C, Gennisson JL, Tanter M, Pernot M. 3-D ultrafast Doppler imaging applied to the noninvasive mapping of blood vessels in vivo. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control. 2015; 62: 1467–1472.
45. Rabut C, Correia M, Finel V, Pezet S, Pernot M, Deffieux T, et al. 4D functional ultrasound imaging of whole brain activity in rodents. Nat Methods. 2019; 16: 994–997.

Impact of decompressive craniectomy on hemorrhagic transformation in malignant ischemic stroke in mice

Alin BORHA, MD, MSc[1,2]; Florent LEBRUN MSc[1], Emmanuel Touzé, MD, PhD[1,3]; Evelyne EMERY, MD, PhD[1,2]; Denis VIVIEN, PhD[1,4]; Thomas GABEREL, MD, PhD[1,2].

1. Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, U1237, PhIND "Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders", Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, Cyceron, 14074 Caen, FRANCE

2. Department of Neurosurgery, Caen University Hospital, Avenue de la Côte de Nacre, 14000 Caen, FRANCE.

3. Department of Neurology, Caen University Hospital, Avenue de la Côte de Nacre Caen, FRANCE

4. Department of Clinical Research, Caen University Hospital, Avenue de la Côte de Nacre Caen, FRANCE

Short title: Decompressive craniectomy in malignant stroke.

Corresponding Author Information:

Alin Borha, Normandie Univ, INSERM, U1237, PhIND "Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders", Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, GIP Cyceron, Bd Becquerel, BP5229, 14074 Caen, France.

Phone and email: +33 2 31 06 57 18, alin_borha@hotmail.com

Key Words: ischemic stroke, decompressive craniectomy, mechanical thrombectomy, hemorrhagic transformation.

Word count: 2582

Abstract

Background

Endovascular thrombectomy (EVT) has changed the management of ischemic stroke. The reperfusion can however lead to a hemorrhagic transformation (HT). Decompressive craniectomy (DC) is a surgical procedure used for malignant ischemic stroke. However, its efficacy was demonstrated before the era of EVT trials. Here, we hypothesized that DC for ischemic stroke after thrombectomy could lead to a higher risk of HT. We thus evaluated this hypothesis in a mouse model of stroke induced by occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) with or without mechanical reperfusion.

Methods

90 mice subjected to MCAO were divided into 6 groups: permanent MCAO with or without DC; MCAO followed by a mechanical reperfusion with or without DC and MCAO with a mechanical reperfusion followed by rtPA-induced reperfusion with or without DC. Mice were evaluated by magnetic resonance imaging (MRI) 24 hours after the MCAO to assess ischemic lesion volumes, and the rate, type and volume of HTs.

Results

The ischemic volume was higher in the 2 groups without reperfusion than in the 4 groups with reperfusion independently of rtPA treatment and DC. The distribution of HT types was different between the 6 groups. The HT volumes and HT scores was smaller in the two groups without reperfusion and in the reperfusion group without rtPA and without DC. In mice having reperfusion, the mean HT score was higher in mice who had DC without rtPA (HT score 5, p 0.048) or with rtPA (HT score 8, p 0.02), than in mice without DC (HT score 1).

Conclusion

DC for a malignant stroke, after reperfusion, corresponding to an EVT failure, increases the risk of severe hemorrhagic transformations in a model of ischemic stroke in mice. This result support the need of clinical studies to evaluate the added value of DC at the era of EVT.

Introduction

Endovascular thrombectomy (EVT) has dramatically changed the management of stroke (1,2,3), but can be complicated by hemorrhagic transformations (HTs). Decompressive craniectomy (DC) is a surgical procedure used for malignant ischemic stroke (5). However, its efficacy was demonstrated before the era of EVT. EVT can fail and only achieves partial tissue reperfusion requiring DC (6). As DC modify the cortical circulation, and as it leads to parenchymal stretching related to the correction of the mass effect, it may play a role in the occurrence of HTs (4). Here we hypothesized that DC performed in the context of severe ischemic stroke after EVT failure could lead to a higher risk of HTs. We thus evaluated this hypothesis in a corresponding stroke model in mice.

Methods

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. Our study was approved by the national animal care and local ethical committee CENOMEXA (# 24003). Detailed Materials and Methods are available in the online-only Data Supplement (10-17). The design of the study is described in Figure 1A. Briefly a total of 90 male Swiss mice, 3 months old (35-45 g) were randomly divided into 6 groups. Treatment groups are intravenous rtPA-induced reperfusion performed 1.5 hours after MCAO occlusion (rtPA+/-), mechanical tissue reperfusion initiated 2 hours after the MCAO (Reperfusion +/-), and DC performed 4 hours after previous treatments (DC+/-), either alone or in combination. All animals were imaged by MRI at 24 hours after MCAO, to evaluate

ischemic lesion volumes, brain oedema and the occurrence of HT. Functional recovery was also evaluated. Statistical significance was set at $p<0.05$.

Results

Ischemic lesion volumes and neurological outcomes

The mortality rate before 24h was of 33% in reperfusion-/rtPA-/DC- group, 33% in reperfusion+/rtPA+/DC+ group and of 20% in the others groups. Mice dead before the 24h MRI were replaced to reach n=15 per group. MR angiography revealed no reperfusion in the reperfusion- groups, and partial to complete reperfusion in the reperfusion+ groups (Fig 1B). This model of stroke leads to a major mass effect, as revealed by the measurement of the midline shift, which is corrected by DC (Fig 1C). Every animal harbored a severe ischemic stroke (Fig 2A). Mechanical reperfusion with or without rtPA and combined with or without DC produce smaller ischemic volumes compared with the groups without reperfusion (Fig 2B). A severe neurological impairment was found in all animals. The distribution of the neuroscores was better in the reperfusion+/rtPA-/DC- group than in the other groups (Fig 2C). Similarly, all groups presented an important weight loss compared to baseline, but this weight loss was significantly lower in the reperfusion+/rtPA-/DC- and reperfusion+/rtPA+/DC- groups than in the reperfusion-/rtPA-/DC+ group (Fig 2D).

Risk of hemorrhagic transformations

The occurrence of HTs was infrequent in the groups without reperfusion, and in the reperfusion+/DC-/rtPA- group, whereas HTs occur more frequently in the groups with reperfusion, associated with DC and/or rtPA (Fig 3A). Distribution of HT subtypes was significantly different among the 6 groups, with more severe HT types in the groups with reperfusion associated with DC and/or rtPA (Fig 3B). The same

observations were made for the HT volumes (Fig 3C) and the mean HT score (Fig 3D): in case of mechanical reperfusion, severe HTs occurred if it was associated to DC and/or to i.v. rtPA.

Discussion

We showed that in a MCAO model of severe ischemic stroke in mice, performing a DC after reperfusion increases the risk of severe HTs. This suggest that DC for large ischemic stroke despite reperfusion may worsened final outcomes with an increased risk of HT.

Guidelines recommend EVT when the size of the ischemic infarct area is not too large (3). Patients with large infarctions were not selected for EVT because of a high risk of symptomatic bleeding in the area of infarction after tissue reperfusion (2). However, despite this higher risk of HT, EVT seems to be beneficial according to functional outcomes even in patients with large infarct core, as recently confirmed in a large randomized clinical trial (7). Incomplete recanalization (less than TICI grade 2b) is frequent in these patients: it is comprised between 14% and 60%, and can lead to a large ischemic stroke which are classic indication of DC (6,7). The place of DC after partial recanalization in large ischemic stroke has never been extensively studied: one study reported the same neurological outcomes of patients after DC whether or not they had EVT before (6). However, the sample size was small and the occurrence of HTs was not reported. The DC in our model allows to correct the midline shift induced by the malignant stroke, as in clinical medicine. Our results clearly call for a new clinical trial.

From a mechanism's point of view, we hypothesized that the increased risk of HTs related to the association of EVT and DC is related to mechanical mechanisms: the

vessels, which have a damaged blood-brain barrier (8) are stretched by the parenchymal shift related to the DC. Then, these injured vessels are more exposed to rupture, as blood flow is still present after partial reperfusion provided by the EVT. This hypothesis remains however to be confirmed.

Our study has some limitations. To obtain severe ischemic strokes, which represent an indication for a DC, we choose a 2 hours MCAO, and this prolonged ischemia is known to be associated to an increase risk of HTs (9). We have not monitored the intracranial pressure (ICP) in our study, which could have provided interesting data. Although, a previous study using a similar model of DC, has reported a decrease of the ICP following DC (10). An additional limitation could be the DC technic used in this study, which is slightly different in term of location as compared to the one performed in clinical practice.

Conclusion

Decompressive craniectomy increases the risk of severe HTs in mice after reperfusion, justifying a randomized trial to further evaluate the clinical relevance to perform DC after EVT failure after severe ischemic stroke.

Disclosures

This work was supported by the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale. The authors have no personal, financial, or institutional interest in any of the drugs, materials, or devices described in this article.

Supplemental Material

Supplemental Methods

Figure S1-S4

Checklist

REFERENCES

1. Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, Dippel DW, Mitchell PJ, Demchuk AM, Dávalos A, Majoie CB, van der Lugt A, de Miquel MA et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. Lancet. 2016; 387:1723-1731.

2. Román LS, Menon BK, Blasco J, Hernández-Pérez M, Dávalos A, Majoie CBLM, Campbell BCV, Guillemin F, Lingsma H, Anxionnat R et al. Imaging features and safety and efficacy of endovascular stroke treatment: a metaanalysis of individual patient-level data. Lancet Neurol. 2018;17: 895-904.

3. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, Biller J, Brown M, Demaerschalk BM, Hoh B et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: 2019 update to the 2018 guidelines for the early management of acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke. 2019;50:e344-e418.

4. Doerfler A, Engelhorn T, Heiland S, Benner T, Forsting M. Perfusion- and diffusion-weighted magnetic resonance imaging for monitoring decompressive craniectomy in animals with experimental hemispheric stroke. J Neurosurg. 2002; 96: 933-940.

5. Vahedi K, Hofmeijer J, Juettler E, Vicaut E, George B, Algra A, Amelink GJ, Schmiedeck P, Schwab S, Rothwell PM, et al. DECIMAL, DESTINY, and HAMLET investigators. Early decompressive surgery in malignant infarction of the middle cerebral artery: a pooled analysis of three randomised controlled trials. Lancet Neurol. 2007; 6: 215-222.

6. Göttsche J, Flottmann F, Jank L, Thomalla G, Rimmele DL, Czorlich P, Westphal M, Regelsberger J. Decompressive craniectomy in malignant MCA infarction in times of mechanical thrombectomy. Acta Neurochir (Wien). 2020; 162:3147-3152.

7. Yoshimura S, Sakai N, Yamagami H, Uchida K, Beppu M, Toyoda K, Matsumaru Y, Matsumoto Y, Kimura K, Takeuchi M et al. Endovascular Therapy for Acute Stroke with a Large Ischemic Region. N Engl J Med. 2022; 386:1303-1313.

8. Hoffmann A, Dege T, Kunze R, Ernst AS, Lorenz H, Böhler LI, Korff T, Marti HH, Heiland S, Bendszus M, et al. Early Blood-Brain Barrier Disruption in Ischemic Stroke Initiates Multifocally Around Capillaries/Venules. Stroke. 2018; 49: 1479-1487.

9. Fagan SC, Nagaraja TN, Fenstermacher JD, Zheng J, Johnson M, Knight RA. Hemorrhagic transformation is related to the duration of occlusion and treatment with tissue plasminogen activator in a nonembolic stroke model. Neurol Res. 2003; 25:377-382.

10. Bühler D, Azghandi S, Schüller K, Plesnila N. Effect of decompressive craniectomy on outcome following subarachnoid hemorrhage in mice. Stroke. 2015; 46:819-26.

11. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989; 20 :84-91.

12. Rousselet E, Kriz J, Seidah NG. Mouse Model of Intraluminal MCAO: Cerebral Infarct Evaluation by Cresyl Violet Staining J Vis Exp. 2012; 6:4038.

13. Choudhri TF, Hoh BL, Solomon RA, Connolly ES Jr, Pinsky DJ. Use of a spectrophotometric hemoglobin assay to objectively quantify intracerebral hemorrhage in mice. Stroke. 1997; 28:2296-2302.

14. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke: the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). JAMA. 1995; 274:1017-1025.

15. Smith WS, Sung G, Starkman S, Saver JL, Kidwell CS, Gobin YP, Lutsen HL, Nesbit GM, Grobelny T, Rymer MM et al., Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: results of the MERCI trial/ Merci Trial investigators. Stroke 2005; 36:1432-1438.

16. 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.

17. Lu A, Clark JF, Broderick JP, Pyne-Geithman GJ, Wagner KR, Khatri P, Tomsick T, Sharp FR. Mechanical reperfusion is associated with post-ischemic hemorrhage in rat. brain. Exp Neurol. 2009; 216: 407-412.

Figures Legends

Figure 1: Flow chart of the study and characteristics of the models used.

(A) Flow chart describing the study design and the 6 experimental groups. **(B)** Distribution of TICI scores in all 6 groups (n=10). MRA revealed no reperfusion in the reperfusion- groups, and partial to complete reperfusion in the reperfusion+ groups. Red dotted cercle = left middle cerebral artery (MCA), green = right MCA. **(C)** Distribution of midline shift in the 6 groups. 0 no deviation, 0.5 partial deviation, 1 mm deviation on T 2-weighted images. The DC significantly improved midline shift (Cochrane-Armitage test for trend p=0.019).

Figure 2: Ischemic volume and functional outcomes in the 6 groups.

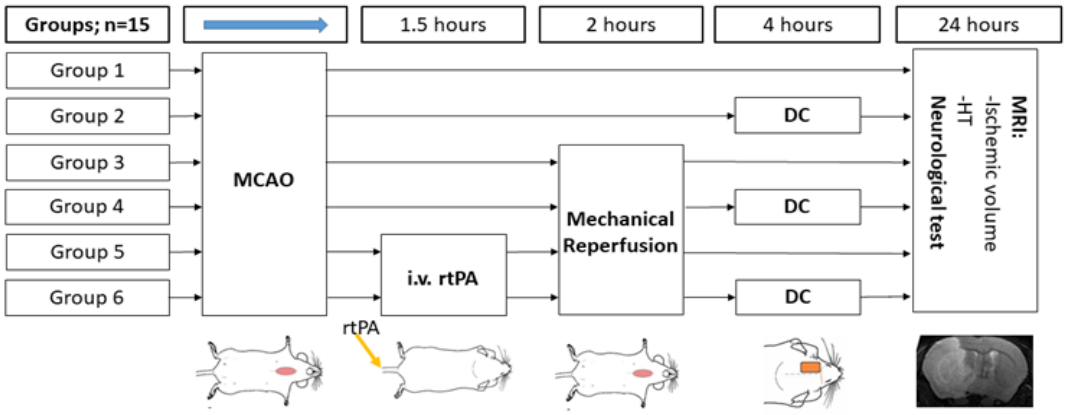
(A) Representative T2-weighted MRI pictures of the ischemic lesions in the 6 groups. **(B)** Ischemic volumes measured 24 hours after the initial surgery (n=15 per groups). There was a smaller ischemia volume in the 4 groups with mechanical reperfusion compared to the 2 groups without reperfusion (*: $p<0.05$ versus Reperfusion-/rtPA-/DC). **(C)** Using a 6 points neuroscore (NS) we found an important neurological impairment in all groups. The distribution of the NS was significantly different between all groups, being better in the reperfusion+/rtPA-/DC- group (Kruskall-Wallis test, p=0.03). **(D)** All groups presented an important weight loss compared to baseline. Weight loss was significantly decreased in reperfusion+/rtPA-/DC- and reperfusion+/rtPA+/DC- groups as compared to reperfusion-/rtPA-/DC+ groups (*: p<0.05 vs reperfusion-/rtPA-/DC+).

Figure 3: Risk of hemorrhagic transformation increased after DC in mice with reperfusion.

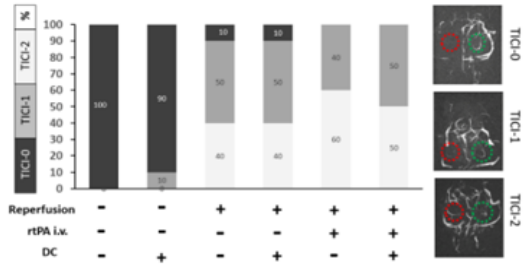
(A) Representative T2*- weighted MRI pictures representing the occurrence of HT in the 6 groups. HT were more important in mice with reperfusion and/or DC and/or rtPA. **(B)** The distribution of HT types in all 6 groups were significantly different (Cochrane-Armitage test for

trend p=0.0297). **(C)** HT volumes measured 24 hours after the stroke. Higher volumes were observed in reperfusion+ groups with rtPA+ and/or DC+ (*: p<0.05 vs reperfusion-/rtPA-/DC- group). In the reperfusion- groups, the association of DC did not increase the volume of HT (ns: p=0.35 versus reperfusion-/rtPA-/DC-). When a reperfusion was performed, HT volume was higher in reperfusion+/rtPA+/DC- and in reperfusion+/rtPA+/DC+ groups as compared to reperfusion+/rtPA-/DC- group (§: p<0.05 vs reperfusion+/rtPA-/DC- group). **(D)** HT scores measured 24 hours after the stroke. Higher HT scores were observed in reperfusion+ groups with rtPA+ and/or DC+ (*: p<0.05 vs reperfusion-/rtPA-/DC- group). Without reperfusion, DC did not increase the HT score (ns: p=0.17 versus reperfusion-/rtPA-/DC-). When a reperfusion was performed, HT score was higher in groups with DC and/or rtPA (§: p<0.05 vs reperfusion+/rtPA-/DC- group).

A



B



C

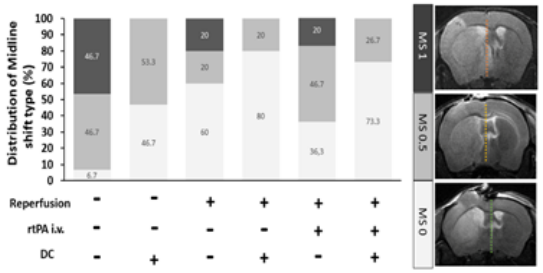


Figure 1: Flow chart of the study and characteristics of the models used. (A) Flow chart describing the study design and the 6 experimental groups. **(B)** Distribution of TICI scores in all 6 groups (n=10). MRA revealed no reperfusion in the reperfusion- groups, and partial to complete reperfusion in the reperfusion+ groups. Red dotted cercle = left middle cerebral artery (MCA), green = right MCA. **(C)** Distribution of midline shift in the 6 groups. 0 no deviation, 0,5 partial deviation, 1 mm deviation on T 2-weighted images. The DC significantly improved midline shift (Cochrane-Armitage test for trend p=0.019).

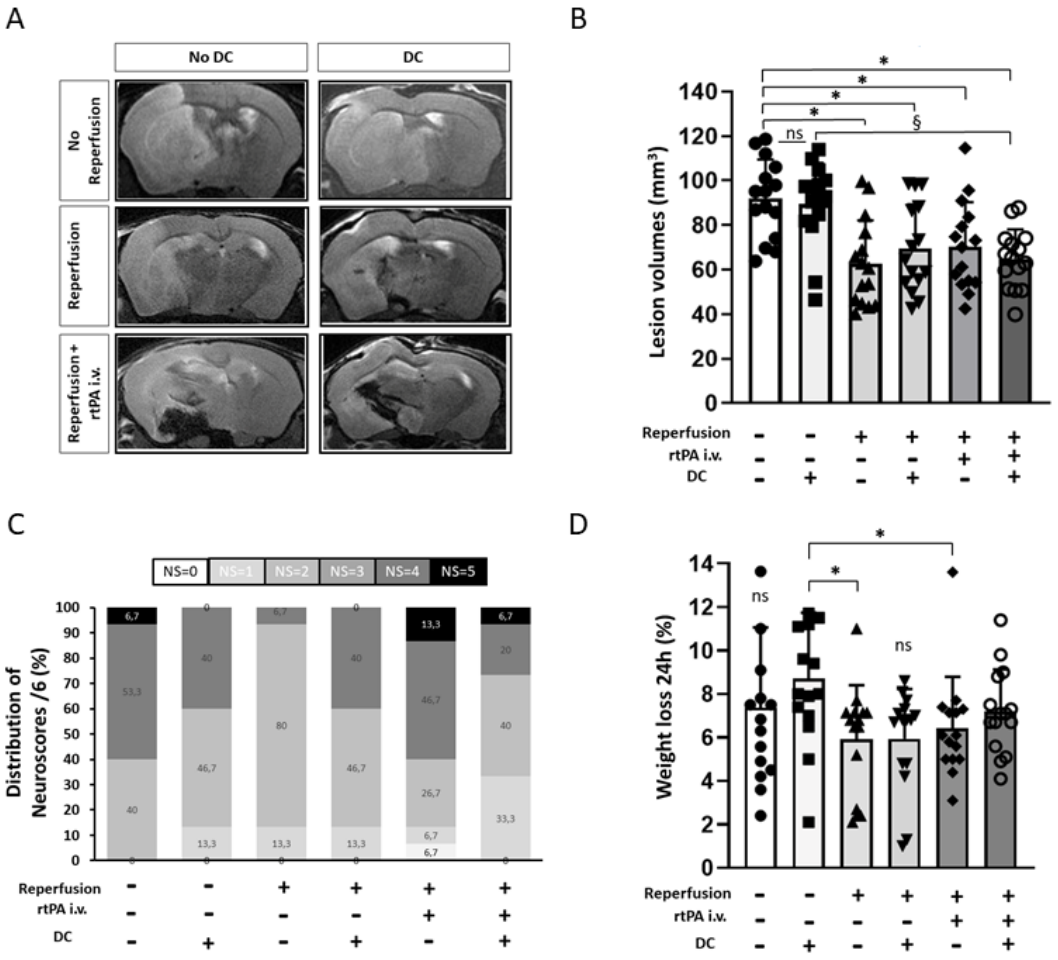


Figure 2: Ischemic volume and functional outcomes in the 6 groups. (A) Representative T2-weighted MRI pictures of the ischemic lesions in the 6 groups. **(B)** Ischemic volumes measured 24 hours after the initial surgery (n=15 per groups). There was a smaller ischemia volume in the 4 groups with mechanical reperfusion compared to the 2 groups without reperfusion (*:*p*<0,05 versus Reperfusion-/rtPA-/DC). **(C)** Using a 6 points neuroscore (NS) we found an important neurological impairment in all groups. The distribution of the NS was significantly different between all groups, being better in the reperfusion+/rtPA-/DC- group (Kruskall-Wallis test, p=0.03). **(D)** All groups presented an important weight loss compared to baseline. Weight loss was significantly decreased in reperfusion+/rtPA-/DC- and reperfusion+/rtPA+/DC- groups as compared to reperfusion-/rtPA-/DC+ groups (*: p<0,05 vs reperfusion-/rtPA-/DC+).

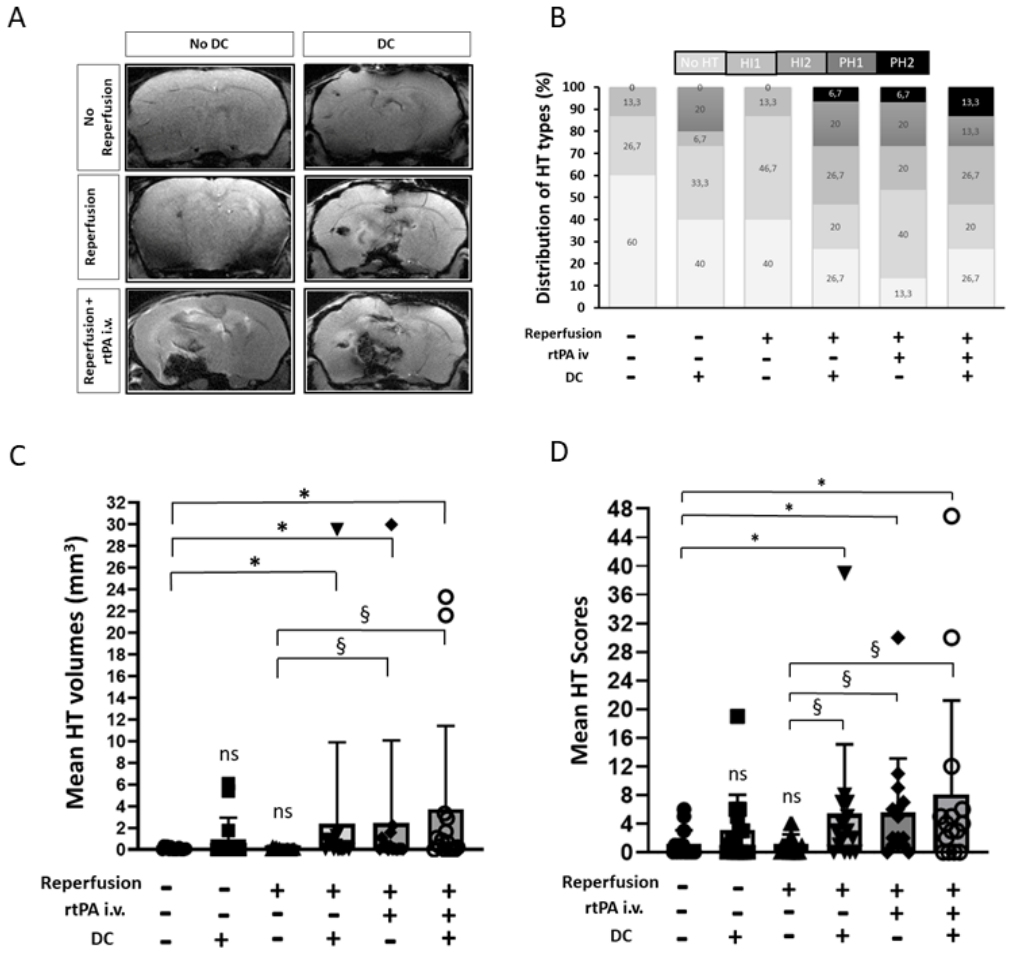


Figure 3: Risk of hemorrhagic transformation increased after DC in mice with reperfusion. (A) Representative T2*- weighted MRI pictures representing the occurrence of HT in the 6 groups. HT were more important in mice with reperfusion and/or DC and/or rtPA. **(B)** The distribution of HT types in all 6 groups were significantly different (Cochrane-Armitage test for trend p=0.0297). **(C)** HT volumes measured 24 hours after the stroke. Higher volumes were observed in reperfusion+ groups with rtPA+ and/or DC+ (*: p<0,05 vs reperfusion-/rtPA-/DC- group). In the reperfusion- groups, the association of DC did not increased the volume of HT (ns: p=0,35 versus reperfusion-/rtPA-/DC-). When a reperfusion was performed, HT volume was higher in reperfusion+/rtPA+/DC- and in reperfusion+/rtPA+/DC+ groups as compared to reperfusion+/rtPA-/DC- group (§: p<0,05 vs reperfusion+/rtPA-/DC- group). **(D)** HT scores measured 24 hours after the stroke. Higher HT scores were observed in reperfusion+ groups with rtPA+ and/or DC+ (*: p<0,05 vs reperfusion-/rtPA-/DC- group). Without reperfusion, DC did not increase the HT score (ns: p=0,17 versus reperfusion-/rtPA-/DC-). When a reperfusion was performed, HT score was higher in groups with DC and/or rtPA (§: p<0.05 vs reperfusion+/rtPA-/DC- group).

Supplemental Material

Impact of decompressive craniectomy on hemorrhagic transformation in malignant ischemic stroke in mice

Detailed Methods

Animals

All the experiments were performed in 3 months old male Swiss mice (35-45 g; CURB, Caen, France). All efforts were made to limit animal suffering as previously described. Experiments were carried out following the ARRIVE guidelines (www.nc3rs.org.uk) and in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) regarding the care and use of animals for experimental procedures. Our study was approved by the national animal care and local ethical committee CENOMEXA (# 24003).

All the experiments were performed in mice anesthetized with isoflurane (2%) in 70%/30% NO2/O2. Body temperature was maintained at 37°C with a rectal temperature probe and homoeothermic heating pad. Mice received subcutaneous buprenorphine (0.05 mg/kg) at the time of the anesthesia and during the imaging procedure at when appropriate.

Experimental Design

The design of the study is described in **Figure 1A.** Briefly a total of 90 male Swiss mice, 3 months old (35-45 g) were randomly divided in 6 groups. Treatment groups can be defined by the realization of intravenous rtPA reperfusion 1,5 hours after middle cerebral artery occlusion (MCAO) (rtPA+/-), the realization of a mechanical reperfusion 2 hours after the MCAO (Reperfusion+/-), and the realization of a DC 4 hours later (DC+/-). The mortality rate before 24h was of 33% (5 mice) in the reperfusion-/rtPA-/DC- group, of 33% in the reperfusion+/rtPA+/DC+ group (5 mice) and of 20% (3 mice) in the 4 others groups. The 22 died mice before the 24h MRI analysis were replaced to reach n=15 per group.

In detailed, mice were anesthetized with isoflurane and 70% N02 end 30% O2 mixture gas.

Mice in group 1, mechanical reperfusion-/rtPA-/DC-, had a middle cerebral artery occlusion (MCAO) via a transvascular artery catheterization for 24 hours.

Mice in group 2, mechanical reperfusion-/rtPA-/DC+, had a MCAO and a DC 4 hours after. The MCAO lasted 24 hours.

Mice in group 3, mechanical reperfusion+/rtPA-/DC-, had a MCAO for 120 minutes and a mechanical reperfusion for 24 hours.

Mice in group 4, mechanical reperfusion+/rtPA-/DC+, had a MCAO for 120 minutes, a mechanical reperfusion for 24 hours and a DC 4 hours after the MCAO occlusion.

Mice in group 5, mechanical reperfusion+/rtPA+/DC-, had a MCAO, rtPA iv injection 90 min after, mechanical reperfusion 2 hours after.

Mice in group 6, mechanical reperfusion+/rtPA+/DC+, had a MCAO occlusion, rtPA iv injection 90 min after, mechanical reperfusion 2 hours after, and a DC 4 hours after.

All mice were evaluated by a neurological examination and a Magnetic resonance imaging (MRI) 24 hours after the stroke.

Middle cerebral artery occlusion (MCAO) surgery

Animals were subjected to 120 minutes left MCAO via a suture model under general anesthesia (11,12). A 2-cm longitudinal incision was made at the midline of the neck and the left common carotid artery (CCA), external carotid artery (ECA), and internal carotid artery (ICA) were exposed under an operating microscope. Care was taken to avoid injuring the *vagus* nerve. The ICA was further dissected to identify the pterygopalatine branch and intracranial ICA. A 5-0 silk suture was tightened at the origin of the ECA and the distal end of the ECA was ligated. The ICA was temporarily clamped with microvasculature clips (Codman, Raynham, MA, USA). The CCA was tied with a 5.0 silk suture. A 4-0 1 cm silicate Doccol filament (L1011 PK10, Catalog No.: 60231011PK10), was introduced into the ECA lumen through a small incision, and was gently advanced under high microscope visualization into the ICA about 8-10 mm, after the pterygopalatine artery was visualized. The suture at the origin of the ECA was then tightened around the intraluminal filament to prevent bleeding. The skin incision was temporarily closed with a 5.0 suture. Animals were allowed to recover from anesthesia. In the MCAO without reperfusion groups the filament was left in place 24h, until realization of the MRI.

Reperfusion

In the groups with reperfusion, corresponding to a thrombectomy failure, after 120 minutes of MCAO, mice were anesthetized as previously described. The neck suture was opened, the filament was gently removed. The suture around the ECA was firmly tight or the ECA was gently coagulated. The suture on the CCA was removed. Care

was taken to avoid any postoperative hemorrhage. The incision was sutured with a 4.0 nylon suture. Animals were returned to their cages for 24 h after MCAO. We chose a 120 minutes MCAO occlusion to obtain a large ischemic stroke to be more closed to malignant stroke observed in human.

Thrombolysis

Thrombolysis was initiated via the tail vein using 200µL of human recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) (Boeringher Ingelheim - Alteplase®) (10% in bolus, 90% in perfusion over 30 min (10 mg/kg, i.v.) 90 min after the stroke onset.

Decompressive Craniectomy

DC was performed as previously described at 4 hours after the MCAO occlusion (10). While under general anesthesia, the mice were maintained using a stereotactic frame. The skull was exposed after a longitudinal skin incision. The skull bone over the left hemisphere was removed using a high-speed drill under continuous cooling with saline. Bone flaps with a size of 8 × 6 mm were obtained, with special attention paid to leave the dura mater intact, and not to expose the superior sagittal sinus. The mice were allowed to recover once the wound was closed.

Neurological examination

Neurological examination was performed 24 hours after the MCAO, before the anesthesia for the MRI. The neurological deficits were scored as follows: 0, normal; 1, mild turning behavior with or without inconsistent curling when picked up by tail, inferior to 50% attempts to curl to the contralateral side; 2, mild consistent curling, more than 50% attempts to curl to contralateral side; 3, strong and immediate consistent curling, mouse holds curled position for more than 1–2 s, the nose of the mouse almost reaches tail; 4, severe curling progressing into barreling, loss of walking or righting reflex; 5, comatose or moribund (12). The percentage of weight loss was defined as: (weight before MCAO-weight 24h after MCAO)/ weight before MCAO.

Magnetic Resonance Imaging

All animals were imaged by MRI 24 hours after MCAO. Animals found dead in the cage were excluded from the study, and replace to reach n=15 per group. Mice were deeply anesthetized with 5% isoflurane and maintained with 1.5-2% isoflurane 30%O2/70%N2O during the acquisitions. MRI was performed with a Bruker 7T Pharmascan R -MRI system (Bruker, Germany) on day 1, 24 hours after the MCAO. Gradient-echo imaging (GRE) was performed for evaluation of HT. Gradient echo-planar imaging T2*-weighted sequences were used to detect hemorrhagic events:

TE/TR Echo time 8.706 ms/ repetition time 500ms; Slice Thickness 0,5 mm; ms average 2; Flip angle 40; Scan time 3 min 12 sec. T2-weighted images high resolution were acquired for evaluation of the ischemic stroke: TE/TR 40 ms/ repetition time 2500 ms; Echo spacing 3,33 ms; slice thickness 0,5mm; Image size 256; Field of view 17,92; Scan time 2 min 41s; Average 2.

MRangiography was realized in the first 10 mice in each group, using a Two-dimensional time-of-flight (2D TOF) sequence by a 2D Fast Low Angle Shot sequence (TE/TR 12 ms/7 ms).

Hemorrhagic transformation evaluation

In MRI evaluation we classified Hemorrhagic transformation (HT) as according to the ECASS 1 and 2 definitions as either hemorrhagic infarction (HI) in which blood is interspersed with intact brain elements, or as parenchymal hemorrhage or hematoma (PH) in which a pool of blood destroys brain parenchyma. Four major types of HT were assessed: HI1 (small petechiae), HI2 (more confluent petechiae), PH1 (<30% of the infarcted area with some mild space-occupying effect) and PH2 (>30% of the infarcted area with significant space-occupying effect and potential perihematomal edema) (14,15) The hemorrhage scores were defined as hemorrhage area seen on any section in the cortex or basal ganglia of mice on maximal hemorrhage diameter: neuroscore (NS) 0, no hemorrhage; NS 1, inferior to 1mm; NS 2 for hemorrhage 1-2 mm; NS 3, for hemorrhage between 2-3 mm; and Neuroscore 4 for hemorrhages greater >3 mm in maximal diameter (13,14,15).

Reperfusion evaluation

A 3D vascular reconstruction was realized using Image J 1;48 software (NIH) on MR angiography slices. Evaluation of reperfusion was then realized using a modified TICI scale: TICI 0 = complete occlusion, TICI 1 = partial occlusion, TICI 2 = normal appearance of the artery) (16).

Volume, brain oedema and midline shift measurements

Image reconstruction was performed using Image J software. Lesion volumes were manually drawn. Each slice of ischemic or hemorrhagic lesions was manually marked then volume was calculated according to the slice thickness of 0,5 mm per slice.

Brain edema was calculated as follows: (volume of infarcted hemisphere − volume of contralateral normal hemisphere)/volume of contralateral hemisphere × 100% (17).

The midline shift in the 6 groups was calculated using Image J software on T 2-weighted images . Evaluation was realized using the following scale 0 no deviation, 0,5 partial deviation, 1 mm deviation (Figure 1C).

Physiological parameters

Physiological parameters as arterial blood pressure and blood glucose levels were measures in extreme groups (n=5 mice per group).

The arterial blood pressure was assessed non-invasively using a Visitech Systems BP 2000 before, at 4 hours and 24 hours after stroke onset. Blood glucose levels were measured in 5 animals in the group “no reperfusion” and in the group “reperfusion, venous thrombolysis and DC”. We used blood drops from the punctured tail vein at different stages on D0 (before stroke and at 4 and 24 hours after stroke) using a portable dextrometer.

Statistical analysis

Results are the mean +/- SD. For continuous variables, statistical analyses were performed using the Kruskall-Wallis test followed by post hoc comparison with the Mann-Whitney U test. For discrete variables, the analyses were performed using exact Cochrane–Armitage (CA) test for linear trend in proportion (SAS software V9.4, SAS Institute, NC, Cary). Statistical analysis were performed using the Biostatgv website (https://biostatgv.sentiweb.fr/). A probability value of *P* inferior to 0.05 was considered significant.

Supplementary results

Brain edema measurement

Brain edema differs among the groups, but it seems to be related to the reperfusion status or to the administration of rtPA more than to the realization of DC (Figure S1).

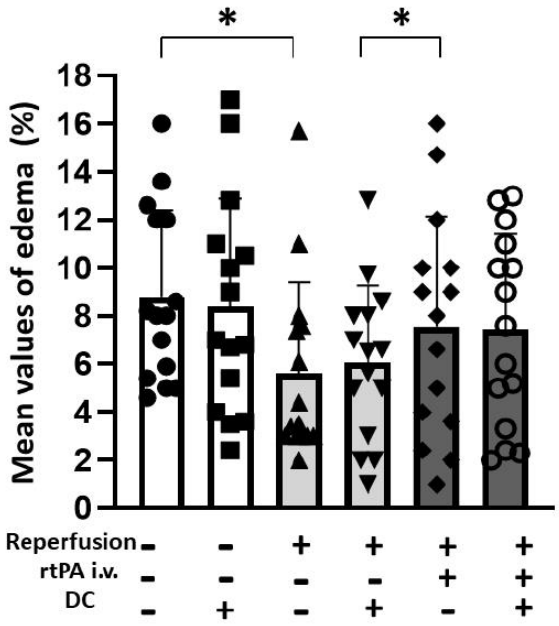
Relation between the neuroscore and the ischemia volume

Supplementary Figure S2 examined the relationship between the NS and the ischemia volume. The mean lesion volumes were of 79.6 mm^3 (+/-22) for mice with a neuroscore of 5 (NS 5) (n=5), of 82 mm^3 (+/-22.3) for mice with a neuroscore of 4 (NS 4) (n=28), of 72.9 mm^3 (20.5) for mice with a neuroscore of 3 (NS 3) (n=45), of 63.3 mm^3 (+/-17) for mice with a neuroscore of 2 (NS 2) (n=11) and of 54 mm^3 for mice with a neuroscore of 1 (NS 1) (n=1). There was a significant difference between the groups NS-2 and NS-4, with the more severe neurological scores correlated with the larger lesion volumes (p 0.01).

Physiological parameters

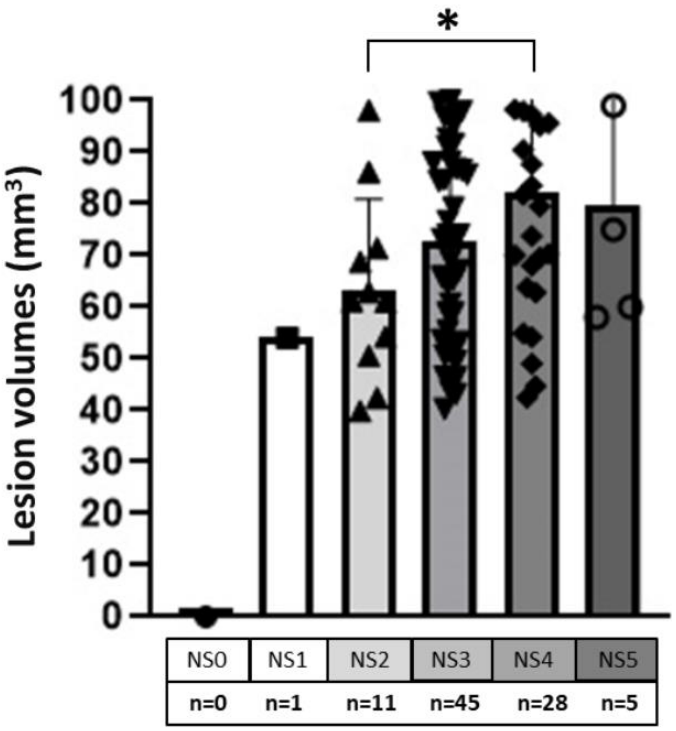
There were no significant differences between the arterial blood pressure and blood glucose levels in the 2 groups (Figure S3 and S4).

Supplementary Figures



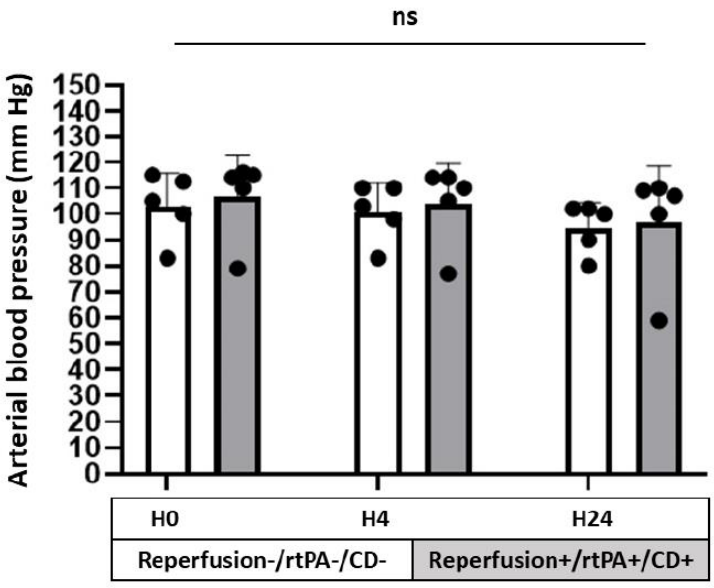
Supplementary Figure S1: Mean values of brain oedema

The mean values of brain oedema were: in the group “reperfusion -/rtPA-/DC-“ of 8.79 (+/-3.6)%; in the group “reperfusion -/rtPA-/DC+” of 8.38 (+/- 4.5)%; in the group “reperfusion +/rtPA-/DC” of 5.6 (+/-3.8)%; in the group “reperfusion +/rtPA-/DC+” of 6.05 (+/-3.2)%, in group “reperfusion+/rtPA+/DC-“ of 7.55 (+/_4.6)% and in the group “reperfusion+/rtPA+/DC+” of 7.44 (+/-4)%. The “reperfusion -/rtPA-/ CD-“ group has a significant more important oedema comparative to the “reperfusion +/rtPA-/DC- group (p=0.007) and the reperfusion+/rtPA+/CD6 had more oedema then the group reperfusion+/rtPA-/CD+ (p=0.019).



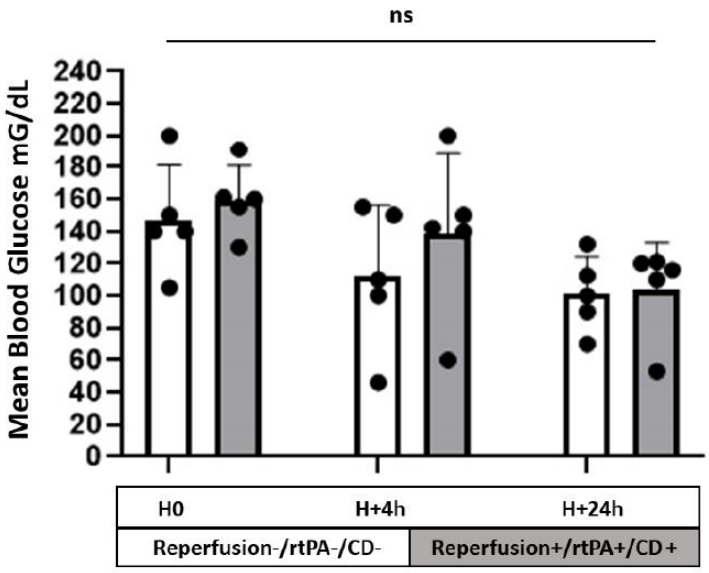
Supplementary Figure S2: Relation of the neuroscore (NS) to the mean lesion volumes.

The mean lesion volumes were of 79.6 mm^3 (+/-22) for mice with a neuroscore of 5 (NS 5) (n=5), of 82 mm^3 (+/-22.3) for mice with a neuroscore of 4 (NS 4) (n=28), of 72.9 mm^3 (20.5) for mice with a neuroscore of 3 (NS 3) (n=45), of 63.3 mm^3 (+/-17) for mice with a neuroscore of 2 (NS 2) (n=11) and of 54 mm^3 for mice with a neuroscore of 1 (NS 1) (n=1). There was a significant difference between the groups NS-2 and NS-4, with the more severe neurological scores correlated with the larger lesion volumes (p 0.01).



Supplementary Figure S3: Mean arterial blood pressure values.

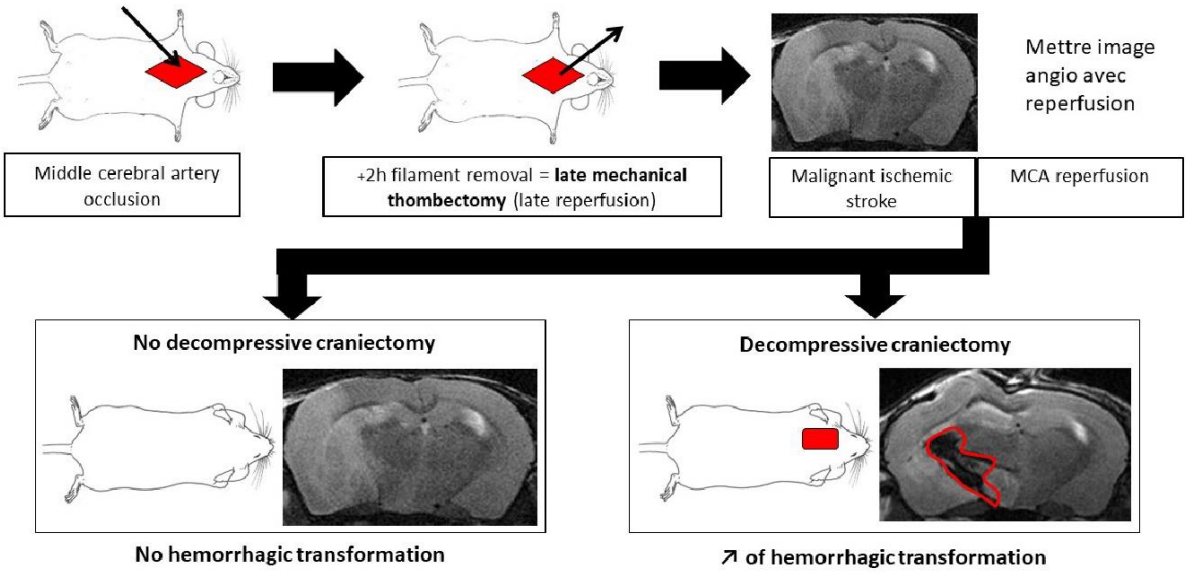
The mean values in the "reperfusion -/ rtPA-/ DC-"group were 108 (+/-13) mmHg before stroke, 100.8 (+/- 15) mmHg at 4h and 94.8 (+/- 9) mmHg at 24 h after stroke. In the "reperfusion +/rtPA+/ DC+" group the arterial blood pressure were 106.8 (+/-15.7) mmHg before stroke, 104 (+/- 15) mmHg at 4 hours and 97(+/- 4.5) mm Hg at 24 hours after the stroke. There were no significant differences between the groups.



Supplementary Figure S4: Mean values of Blood Glucose (BG)

Levels of BG in the group "reperfusion -/ rtPA-/ DC-" were 147 (+/-34) mg/dl before the stroke, 112 (+/- 44) mg/dL at 4 hours and 100.9 (+/-23) mg/dL at 24 hours after the stroke. In the group "reperfusion +/rtPA+/ DC+" levels of BG were 159.4 (+/- 22) mg/dl before the stroke, 138.4 (+/- 50) mg/dL at 4 hours and 104 (+/-29) mg/dL at 24 hours after the stroke. There were not significant differences between the groups.

Graphical abstract



Decompressive craniectomy for a malignant stroke, after reperfusion, corresponding to a late mechanical thrombectomy, increases the risk of severe hemorrhagic transformations in a model of ischemic stroke in mice. This result support the need of clinical studies to evaluate the added value of DC at the era of EVT.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abumiya, T. *et al.* (2005) 'Aggravation of hemorrhagic transformation by early intraarterial infusion of low-dose vascular endothelial growth factor after transient focal cerebral ischemia in rats', *Brain Research*, 1049(1), pp. 95–103. Available at: https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.05.011.

Adams, H.P. *et al.* (2008) 'Emergency administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: results of an international phase III trial: Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial (AbESTT-II).', *Stroke*, 39(1), pp. 87–99. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.106.476648.

Ahmad, A.S. *et al.* (2015) 'Considerations for the Optimization of Induced White Matter Injury Preclinical Models', *Frontiers in Neurology*, 6. Available at: https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00172.

Ahmed, N., Näsman, P. and Wahlgren, N.G. (2000) 'Effect of intravenous nimodipine on blood pressure and outcome after acute stroke', *Stroke*, 31(6), pp. 1250–1255. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.31.6.1250.

Akassoglou, K. *et al.* (2000) 'Tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis protects against axonal degeneration and demyelination after sciatic nerve injury', *The Journal of Cell Biology*, 149(5), pp. 1157–1166. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.149.5.1157.

Alexander, W. (2016) 'European Society of Cardiology Congress', *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 41(10), pp. 645–649.

Alloubani, A., Saleh, A. and Abdelhafiz, I. (2018) 'Hypertension and diabetes mellitus as a predictive risk factors for stroke', *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 12(4), pp. 577–584. Available at: https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.03.009.

Altalhi, R., Pechlivani, N. and Ajjan, R.A. (2021) 'PAI-1 in Diabetes: Pathophysiology and Role as a Therapeutic Target', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), p. 3170. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms22063170.

Amarenco, P. *et al.* (2009) 'Classification of Stroke Subtypes', *Cerebrovascular Diseases*, 27(5), pp. 493–501. Available at: https://doi.org/10.1159/000210432.

van den Ameele, J. *et al.* (2014) 'Thinking out of the dish: what to learn about cortical development using pluripotent stem cells', *Trends in Neurosciences*, 37(6), pp. 334–342. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.03.005.

Anderson, C.S. *et al.* (2016) 'Low-Dose versus Standard-Dose Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke', *New England Journal of Medicine*, 374(24), pp. 2313–2323. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMoa1515510.

Anfray, A. *et al.* (2019) 'Circulating tPA contributes to neurovascular coupling by a mechanism involving the endothelial NMDA receptors', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, p. 271678X19883599. Available at: https://doi.org/10.1177/0271678X19883599.

Anfray, A. *et al.* (2021) 'Single- and two- chain tissue type plasminogen activator treatments differentially influence cerebral recovery after stroke', *Experimental Neurology*, 338, p. 113606. Available at: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113606.

Anrather, J. and Iadecola, C. (2016) 'Inflammation and Stroke: An Overview', *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 13(4), pp. 661–670. Available at: https://doi.org/10.1007/s13311-016-0483-x.

Antillon, D. and Towfighi, A. (2011) 'No Time to "Weight": The Link between Obesity and Stroke in Women', *Women's Health*, 7(4), pp. 453–463. Available at: https://doi.org/10.2217/WHE.11.36.

Armstead, W.M. (2003) 'PTK, ERK and p38 MAPK contribute to impaired NMDA-induced vasodilation after brain injury', *European Journal of Pharmacology*, 474(2–3), pp. 249–254. Available at: https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)02012-0.

Armstead, W.M. *et al.* (2011) 'tPA contributes to impaired NMDA cerebrovasodilation after traumatic brain injury through activation of JNK MAPK', *Neurological Research*, 33(7), pp. 726–733. Available at: https://doi.org/10.1179/016164110X12807570509853.

Armstead, W.M. *et al.* (2016) 'tPA-A296-299 Prevents Impairment of Cerebral Autoregulation After Stroke Through LRP Dependent Increase in cAMP and p38', *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 47(8), pp. 2096–2102. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.012678.

Arora, S., Ojha, S.K. and Vohora, D. (no date) 'Characterisation of streptozotocin induced diabetes mellitus in swiss albino mice', *Global J. Pharmacol. 2009*, pp. 81–84.

Arstall, M.A. *et al.* (1995) 'N-Acetylcysteine in Combination With Nitroglycerin and Streptokinase for the Treatment of Evolving Acute Myocardial Infarction', *Circulation*, 92(10), pp. 2855–2862. Available at: https://doi.org/10.1161/01.CIR.92.10.2855.

Asahi, M. *et al.* (2000) 'Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(12), pp. 1681–1689. Available at: https://doi.org/10.1097/00004647-200012000-00007.

Asahi, Minoru *et al.* (2000) 'Role for Matrix Metalloproteinase 9 after Focal Cerebral Ischemia: Effects of Gene Knockout and Enzyme Inhibition with BB-94', *Journal of Cerebral Blood Flow &*

Metabolism, 20(12), pp. 1681–1689. Available at: https://doi.org/10.1097/00004647-200012000-00007.

Astrup, T. and Stage, A. (1952) 'Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue', *Nature*, 170(4335), p. 929. Available at: https://doi.org/10.1038/170929a0.

Audibert, G., Charpentier, C. and Mertes, P.-M. (2007) 'Surveillance du métabolisme cérébral (SjO2, PtiO2, microdialyse)', in N. Bruder, P. Ravussin, and B. Bissonnette (eds) *La réanimation neurochirurgicale*. Paris: Springer (Le point sur …), pp. 121–140. Available at: https://doi.org/10.1007/978-2-287-68199-8_7.

B

Bang, O.Y. *et al.* (2011) 'Collateral Flow Averts Hemorrhagic Transformation After Endovascular Therapy for Acute Ischemic Stroke', *Stroke*, 42(8), pp. 2235–2239. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.604603.

Baranes, D *et al.* (1998) 'Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway.', *Neuron*, 21(4), pp. 813–25.

Baranes, Danny *et al.* (1998) 'Tissue Plasminogen Activator Contributes to the Late Phase of LTP and to Synaptic Growth in the Hippocampal Mossy Fiber Pathway', *Neuron*, 21(4), pp. 813–825. Available at: https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80597-8.

Barker-Carlson, K., Lawrence, D.A. and Schwartz, B.S. (2002) 'Acyl-Enzyme Complexes between Tissue-type Plasminogen Activator and Neuroserpin are Short-lived in Vitro', *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), pp. 46852–46857. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M207740200.

Barnes, P. and Thomas, K.L. (2008) 'Proteolysis of proBDNF is a key regulator in the formation of memory', *PloS One*, 3(9), p. e3248. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003248.

Bas, D.F. *et al.* (2012) 'Plasma 3-nitrotyrosine estimates the reperfusion-induced cerebrovascular stress, whereas matrix metalloproteinases mainly reflect plasma activity: a study in patients treated with thrombolysis or endovascular recanalization', *Journal of Neurochemistry*, 123 Suppl 2, pp. 138–147. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07952.x.

Basham, M.E. and Seeds, N.W. (2001) 'Plasminogen expression in the neonatal and adult mouse brain', *Journal of Neurochemistry*, 77(1), pp. 318–325. Available at: https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.t01-1-00239.x.

Beal, C.C. (2010) 'Gender and stroke symptoms: a review of the current literature', *The Journal of Neuroscience Nursing: Journal of the American Association of Neuroscience Nurses*, 42(2), pp. 80–87.

Becker, K. *et al.* (2001) 'Antibody to the alpha4 integrin decreases infarct size in transient focal cerebral ischemia in rats', *Stroke*, 32(1), pp. 206–211. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.32.1.206.

Belayev, L., Endres, M. and Prinz, V. (2016) 'Focal Cerebral Ischemia in the Mouse and Rat by Intraluminal Suture', in U. Dirnagl (ed.) *Rodent Models of Stroke*. New York, NY: Springer New York (Neuromethods), pp. 31–43. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-5620-3_4.

Belov Kirdajova, D. *et al.* (2020) 'Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, p. 51. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00051.

Benchenane, K. *et al.* (2005) 'Oxygen Glucose Deprivation Switches the Transport of tPA Across the Blood–Brain Barrier From an LRP-Dependent to an Increased LRP-Independent Process', *Stroke*, 36(5), pp. 1059–1064. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000163050.39122.4f.

Benchenane, K. *et al.* (2007) 'Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory', *Journal of Cell Science*, 120(Pt 4), pp. 578–585. Available at: https://doi.org/10.1242/jcs.03354.

Benchoua, A. *et al.* (2001) 'Specific Caspase Pathways Are Activated in the Two Stages of Cerebral Infarction', *The Journal of Neuroscience*, 21(18), pp. 7127–7134. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07127.2001.

Bentes, C. *et al.* (2017) 'Epileptic manifestations in stroke patients treated with intravenous alteplase', *European Journal of Neurology*, 24(6), pp. 755–761. Available at: https://doi.org/10.1111/ene.13292.

Berger, C. *et al.* (2001) 'Hemorrhagic transformation of ischemic brain tissue: asymptomatic or symptomatic?', *Stroke*, 32(6), pp. 1330–1335. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.32.6.1330.

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. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411587.

Bertrand, T *et al.* (2015) 'Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR', *Cell Death & Disease*, 6(10), pp. e1924–e1924. Available at: https://doi.org/10.1038/cddis.2015.296.

Bertrand, T. *et al.* (2015) 'Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR', *Cell Death & Disease*, 6, p. e1924. Available at: https://doi.org/10.1038/cddis.2015.296.

Bevers, M.B. *et al.* (2017) 'Hyperglycemia is associated with more severe cytotoxic injury after stroke', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(7), pp. 2577–2583. Available at: https://doi.org/10.1177/0271678X16671730.

Bhatia, R. *et al.* (2010) 'Low Rates of Acute Recanalization With Intravenous Recombinant Tissue Plasminogen Activator in Ischemic Stroke', *Stroke*, 41(10), pp. 2254–2258. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.592535.

Bieber, M. et al. (2021) 'Targeting platelet glycoprotein VI attenuates progressive ischemic brain damage before recanalization during middle cerebral artery occlusion in mice', Experimental Neurology, 344, p. 113804. Available at: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113804.

Binder, B.R., Spragg, J. and Austen, K.F. (1979) 'Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates', *The Journal of Biological Chemistry*, 254(6), pp. 1998–2003.

Bir, S.C. *et al.* (2012) 'Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(7), pp. 745–757. Available at: https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.05.003.

Birnbaumer, L. *et al.* (1994) 'The naming of voltage-gated calcium channels.', *Neuron*, 13(3), pp. 505–6.

Bivard, A. *et al.* (2022) 'Tenecteplase versus Alteplase for Stroke Thrombolysis Evaluation Trial in the Ambulance (Mobile Stroke Unit—TASTE-A): protocol for a prospective randomised, open-label, blinded endpoint, phase II superiority trial of tenecteplase versus alteplase for ischaemic stroke patients presenting within 4.5 hours of symptom onset to the mobile stroke unit', *BMJ Open*, 12(4), p. e056573. Available at: https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-056573.

Bliss, T. V and Lomo, T. (1973) 'Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path.', *The Journal of physiology*, 232(2), pp. 331–56. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273.

Blouet, C. *et al.* (2007) 'Dietary cysteine alleviates sucrose-induced oxidative stress and insulin resistance', *Free Radical Biology and Medicine*, 42(7), pp. 1089–1097. Available at: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.006.

Boehme, A.K. *et al.* (2013) 'Systemic Inflammatory Response Syndrome in tPA Treated Patients Is Associated with Worse Short-term Functional Outcome', *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 44(8), pp. 2321–2323. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.001371.

Boulaftali, Y. *et al.* (2011) 'Platelet Protease Nexin-1, a Serpin That Strongly Influences Fibrinolysis and Thrombolysis', *Circulation*, 123(12), pp. 1326–1334. Available at: https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.000885.

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. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30177-6.

Bradley, S.A. *et al.* (2022) 'Role of diabetes in stroke: Recent advances in pathophysiology and clinical management', *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 38(2), p. e3495. Available at: https://doi.org/10.1002/dmrr.3495.

Branston, N.M., Strong, A.J. and Symon, L. (1977) 'Extracellular potassium activity, evoked potential and tissue blood flow. Relationships during progressive ischaemia in baboon cerebral cortex', *Journal of the Neurological Sciences*, 32(3), pp. 305–321. Available at: https://doi.org/10.1016/0022-510x(77)90014-4.

Breyer, M.D. *et al.* (2005) 'Mouse models of diabetic nephropathy', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16(1), pp. 27–45. Available at: https://doi.org/10.1681/ASN.2004080648.

Broderick, J.P. *et al.* (1995) 'Hyperglycemia and Hemorrhagic Transformation of Cerebral Infarcts', *Stroke*, 26(3), pp. 484–487. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.26.3.484.

Broderick, J.P. *et al.* (2015) 'Endovascular Therapy is Effective and Safe for Patients with Severe Ischemic Stroke: Pooled Analysis of IMS III and MR CLEAN Data', *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 46(12), pp. 3416–3422. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.011397.

Brott, T. *et al.* (1989) 'Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale', *Stroke*, 20(7), pp. 864–870. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.20.7.864.

Buga, A.-M., Di Napoli, M. and Popa-Wagner, A. (2013) 'Preclinical models of stroke in aged animals with or without comorbidities: role of neuroinflammation', *Biogerontology*, 14(6), pp. 651–662. Available at: https://doi.org/10.1007/s10522-013-9465-0.

Bukhari, N. *et al.* (2011) 'Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(42), pp. 14931–14943. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3339-11.2011.

C

Cabanillas, G. and Popescu-Martinez, A. (2016) 'N-Acetylcysteine for Relapsing Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: More Evidence of a Promising Drug', *American Journal of Therapeutics*, 23(5), pp. e1277-1279. Available at: https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000000386.

Calabresi, P. *et al.* (2000) 'Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory', *The European Journal of Neuroscience*, 12(3), pp. 1002–1012.

Campbell, B.C. V *et al.* (2018) 'Tenecteplase versus Alteplase before Thrombectomy for Ischemic Stroke.', *The New England journal of medicine*, 378(17), pp. 1573–1582. Available at: https://doi.org/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* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31053-0.

Candelario-Jalil, E., Dijkhuizen, R.M. and Magnus, T. (2022) 'Neuroinflammation, Stroke, Blood-Brain Barrier Dysfunction, and Imaging Modalities', *Stroke*, 53(5), pp. 1473–1486. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.122.036946.

Candelario-Jalil, E. and Paul, S. (2021) 'Impact of Aging and Comorbidities on Ischemic Stroke Outcomes in Preclinical Animal Models: A Translational Perspective', *Experimental neurology*, 335, p. 113494. Available at: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113494.

Cassé, F. *et al.* (2012) 'Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(15), pp. 5186–5199. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5296-11.2012.

Castellanos, M. *et al.* (2003) 'Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke', *Stroke*, 34(1), pp. 40–46.

Chamorro, Á. *et al.* (2016) 'Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation', *The Lancet. Neurology*, 15(8), pp. 869–881. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00114-9.

Chauhan, G. and Debette, S. (2016) 'Genetic Risk Factors for Ischemic and Hemorrhagic Stroke', *Current Cardiology Reports*, 18(12), p. 124. Available at: https://doi.org/10.1007/s11886-016-0804-z.

Chen, C. *et al.* (2010) 'Suppression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its downstream genes reduces acute hyperglycemia-enhanced hemorrhagic transformation in a rat model of cerebral ischemia', *Journal of Neuroscience Research*, 88(9), pp. 2046–2055. Available at: https://doi.org/10.1002/jnr.22361.

Chen, D. *et al.* (2020) 'Mouse Models of Autoimmune Diabetes: The Nonobese Diabetic (NOD) Mouse', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2128, pp. 87–92. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0385-7_6.

Chen, J. *et al.* (2011) 'Adverse effects of bone marrow stromal cell treatment of stroke in diabetic rats', *Stroke*, 42(12), pp. 3551–3558. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.627174.

Chen, R. *et al.* (2021) 'New Insight Into Neutrophils: A Potential Therapeutic Target for Cerebral Ischemia', *Frontiers in Immunology*, 12. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.692061 (Accessed: 25 August 2022).

Chen, Y. *et al.* (2003) 'Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(6), pp. 748–755. Available at: https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000071885.63724.20.

Cheng, T. *et al.* (2006) 'Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator–induced brain hemorrhage', *Nature Medicine*, 12(11), pp. 1278–1285. Available at: https://doi.org/10.1038/nm1498.

Chevilley, A. *et al.* (2015) 'Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, p. 415. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00415.

Chiasson, J.L. *et al.* (1998) 'The STOP-NIDDM Trial: an international study on the efficacy of an alpha-glucosidase inhibitor to prevent type 2 diabetes in a population with impaired glucose tolerance: rationale, design, and preliminary screening data. Study to Prevent Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus', *Diabetes Care*, 21(10), pp. 1720–1725. Available at: https://doi.org/10.2337/diacare.21.10.1720.

Chiba, T. and Umegaki, K. (2013) 'Pivotal roles of monocytes/macrophages in stroke', *Mediators of Inflammation*, 2013, p. 759103. Available at: https://doi.org/10.1155/2013/759103.

Christensen, J.O. *et al.* (2004) 'Population-based stepwise screening for unrecognised Type 2 diabetes is ineffective in general practice despite reliable algorithms', *Diabetologia*, 47(9), pp. 1566–1573. Available at: https://doi.org/10.1007/s00125-004-1496-2.

Christensen, L.R. and Macleod, C.M. (1945) 'A PROTEOLYTIC ENZYME OF SERUM: CHARACTERIZATION, ACTIVATION, AND REACTION WITH INHIBITORS', *The Journal of General Physiology*, 28(6), pp. 559–583. Available at: https://doi.org/10.1085/jgp.28.6.559.

Chu, Y.-W., Chen, P.-Y. and Lin, S.-K. (2020) 'Correlation between Immune-Inflammatory Markers and Clinical Features in Patients with Acute Ischemic Stroke', 29(4), p. 11.

Cipolla, M.J. *et al.* (2000) 'Postischemic attenuation of cerebral artery reactivity is increased in the presence of tissue plasminogen activator', *Stroke*, 31(4), pp. 940–945. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.31.4.940.

Clissold, B. *et al.* (2020) 'Current aspects of TIA management', *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 72, pp. 20–25. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.12.032.

Collen, D. and Lijnen, H.R. (1991) 'Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis', *Blood*, 78(12), pp. 3114–3124.

Coller, B.S. (1990) 'Platelets and thrombolytic therapy', *The New England Journal of Medicine*, 322(1), pp. 33–42. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJM199001043220107.

Collingridge, G.L., Kehl, S.J. and McLennan, H. (1983) 'Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus', *The Journal of Physiology*, 334, pp. 33–46. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014478.

Collins, R. *et al.* (2003) 'MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial', *Lancet (London, England)*, 361(9374), pp. 2005–2016. Available at: https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13636-7.

Copin, J.-C. and Gasche, Y. (2008) 'Effect of the duration of middle cerebral artery occlusion on the risk of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator injection in rats', *Brain Research*, 1243, pp. 161–166. Available at: https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.025.

Cordonnier, C. *et al.* (2017) 'Stroke in women — from evidence to inequalities', *Nature Reviews Neurology*, 13(9), pp. 521–532. Available at: https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.95.

Correa, F. *et al.* (2011) 'Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke', *The Journal of Experimental Medicine*, 208(6), pp. 1229–1242. Available at: https://doi.org/10.1084/jem.20101880.

Couret, D. *et al.* (2018) 'A hemorrhagic transformation model of mechanical stroke therapy with acute hyperglycemia in mice', *Journal of Comparative Neurology*, 526(6), pp. 1006–1016. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.24386.

Coutinho, J.M. *et al.* (2017) 'Combined Intravenous Thrombolysis and Thrombectomy vs Thrombectomy Alone for Acute Ischemic Stroke: A Pooled Analysis of the SWIFT and STAR Studies', *JAMA Neurology*, 74(3), p. 268. Available at: https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.5374.

Craige, S.M. *et al.* (2011) 'NADPH oxidase 4 promotes endothelial angiogenesis through endothelial nitric oxide synthase activation', *Circulation*, 124(6), pp. 731–740. Available at: https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.030775.

Cuzzocrea, S. *et al.* (2000) 'Beneficial effects of n-acetylcysteine on ischaemic brain injury', *British Journal of Pharmacology*, 130(6), pp. 1219–1226. Available at: https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703421.

D

Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J. (2004) 'Cell death: critical control points', *Cell*, 116(2), pp. 205–219. Available at: https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00046-7.

Daniels Gatward, L.F. *et al.* (2021) 'The use of mice in diabetes research: The impact of physiological characteristics, choice of model and husbandry practices', *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 38(12), p. e14711. Available at: https://doi.org/10.1111/dme.14711.

De Meyer, S.F. *et al.* (2011) 'Platelet glycoprotein Ibα is an important mediator of ischemic stroke in mice', *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 3(1), p. 9. Available at: https://doi.org/10.1186/2040-7378-3-9.

Deeds, M.C. *et al.* (2011) 'Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models', *Laboratory Animals*, 45(3), pp. 131–140. Available at: https://doi.org/10.1258/la.2010.010090.

Demchuk, A.M. *et al.* (2012) 'Prediction of haematoma growth and outcome in patients with intracerebral haemorrhage using the CT-angiography spot sign (PREDICT): a prospective observational study', *The Lancet Neurology*, 11(4), pp. 307–314. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70038-8.

Dennis, M.S. (2003) 'Outcome after brain haemorrhage', *Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)*, 16 Suppl 1, pp. 9–13. Available at: https://doi.org/10.1159/000069935.

Denorme, F. *et al.* (2016) 'ADAMTS13-mediated thrombolysis of t-PA-resistant occlusions in ischemic stroke in mice', *Blood*, 127(19), pp. 2337–2345. Available at: https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-662650.

Denorme, Frederik *et al.* (2016) 'Inhibition of Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Reduces Ischemic Brain Damage in Mice', *Stroke*, 47(9), pp. 2419–2422. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.014091.

Dietrich, W.D., Alonso, O. and Busto, R. (1993) 'Moderate hyperglycemia worsens acute blood-brain barrier injury after forebrain ischemia in rats', *Stroke*, 24(1), pp. 111–116. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.24.1.111.

Dirnagl, U., Iadecola, C. and Moskowitz, M.A. (1999) 'Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view', *Trends in Neurosciences*, 22(9), pp. 391–397. Available at: https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01401-0.

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

Docagne, F. *et al.* (1999) 'Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(11), pp. 1315–1324. Available at: https://doi.org/10.1096/fasebj.13.11.1315.

Docagne, F. *et al.* (2015) 'Understanding the Functions of Endogenous and Exogenous Tissue-Type Plasminogen Activator During Stroke', *Stroke*, 46(1), pp. 314–320. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.006698.

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

Dorado, L. *et al.* (2013) 'Hemorrhagic risk of emergent endovascular treatment plus stenting in patients with acute ischemic stroke', *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association*, 22(8), pp. 1326–1331. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2012.12.006.

Dreier, J.P. and Reiffurth, C. (2015) 'The stroke-migraine depolarization continuum', *Neuron*, 86(4), pp. 902–922. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.04.004.

Drieu, A. *et al.* (2018a) 'Anti-inflammatory treatments for stroke: from bench to bedside', *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 11, p. 1756286418789854. Available at: https://doi.org/10.1177/1756286418789854.

Drieu, A. *et al.* (2018b) 'Anti-inflammatory treatments for stroke: from bench to bedside', *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 11, p. 1756286418789854. Available at: https://doi.org/10.1177/1756286418789854.

Drieu, A., Lanquetin, A., Levard, D., Glavan, M., Campos, F., Quenault, A., Lemarchand, E., *et al.* (2020) 'Alcohol exposure-induced neurovascular inflammatory priming impacts ischemic stroke and is linked with brain perivascular macrophages', *JCI insight* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1172/jci.insight.129226.

Drieu, A., Lanquetin, A., Levard, D., Glavan, M., Campos, F., Quenault, A., Lemarchand, E., *et al.* (2020) 'Alcohol exposure-induced neurovascular inflammatory priming impacts ischemic stroke and is linked with brain perivascular macrophages', *JCI insight*, 5(4), p. 129226. Available at: https://doi.org/10.1172/jci.insight.129226.

Drieu, A., Buendia, I., Levard, D., Hélie, P., Brodin, C., Vivien, D. and Rubio, M. (2020a) '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. Available at: https://doi.org/10.1007/s12975-019-00733-8.

Drieu, A., Buendia, I., Levard, D., Hélie, P., Brodin, C., Vivien, D. and Rubio, M. (2020b) '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. Available at: https://doi.org/10.1007/s12975-019-00733-8.

D'Souza, A. *et al.* (2021) 'Targeting the blood-brain barrier for the delivery of stroke therapies', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 171, pp. 332–351. Available at: https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.015.

Du, Y. *et al.* (2017) 'Differential subnetwork of chemokines/cytokines in human, mouse, and rat brain cells after oxygen–glucose deprivation', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(4), pp. 1425–1434. Available at: https://doi.org/10.1177/0271678X16656199.

Durukan, A. *et al.* (2009) 'Post-ischemic blood-brain barrier leakage in rats: one-week follow-up by MRI', *Brain Research*, 1280, pp. 158–165. Available at: https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.05.025.

Dzialowski, I. *et al.* (2007) 'Asymptomatic hemorrhage after thrombolysis may not be benign: prognosis by hemorrhage type in the Canadian alteplase for stroke effectiveness study registry', *Stroke*, 38(1), pp. 75–79. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000251644.76546.62.

E

East, E. *et al.* (2005) 'A role for the plasminogen activator system in inflammation and neurodegeneration in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis', *The American Journal of Pathology*, 167(2), pp. 545–554. Available at: https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62996-3.

East, E. *et al.* (2008) 'Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis (CREAE) in plasminogen activator inhibitor-1 knockout mice: the effect of fibrinolysis during neuroinflammation', *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 34(2), pp. 216–230. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00889.x.

Echeverry, R. *et al.* (2010) 'Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus', *Journal of Clinical Investigation*, 120(6), pp. 2194–2205. Available at: https://doi.org/10.1172/JCI41722.

Ekkert, A. *et al.* (2021) 'Ischemic Stroke Genetics: What Is New and How to Apply It in Clinical Practice?', *Genes*, 13(1), p. 48. Available at: https://doi.org/10.3390/genes13010048.

El Amki, M. and Wegener, S. (2017) 'Improving Cerebral Blood Flow after Arterial Recanalization: A Novel Therapeutic Strategy in Stroke', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), p. E2669. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms18122669.

Elbini Dhouib, I. *et al.* (2016) 'A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches', *Life Sciences*, 151, pp. 359–363. Available at: https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.003.

Elgebaly, M.M., Arreguin, J. and Storke, N. (2019) 'Targets, Treatments, and Outcomes Updates in Diabetic Stroke', *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 28(6), pp. 1413–1420. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.02.005.

Elmaraezy, A. *et al.* (2017) 'Desmoteplase for Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review and Metaanalysis of Randomized Controlled Trials', *CNS & neurological disorders drug targets*, 16(7), pp. 789–799. Available at: https://doi.org/10.2174/1871527315666161213110104.

Emeis, J.J. *et al.* (1997) 'An Endothelial Storage Granule for Tissue-Type Plasminogen Activator', *The Journal of Cell Biology*, 139(1), pp. 245–256. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.139.1.245.

Engelhardt, E. (2017) 'Apoplexy, cerebrovascular disease, and stroke: Historical evolution of terms and definitions', *Dementia & Neuropsychologia*, 11(4), pp. 449–453. Available at: https://doi.org/10.1590/1980-57642016dn11-040016.

Erdmann, E. *et al.* (2007) 'PROactive 07: pioglitazone in the treatment of type 2 diabetes: results of the PROactive study', *Vascular Health and Risk Management*, 3(4), pp. 355–370.

Ergul, A. *et al.* (2012) 'Cerebrovascular Complications of Diabetes: Focus on Stroke', *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 12(2), pp. 148–158.

F

Fan, X. *et al.* (2012) 'A rat model of studying tissue-type plasminogen activator thrombolysis in ischemic stroke with diabetes', *Stroke*, 43(2), pp. 567–570. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.635250.

Fan, X. *et al.* (2013) 'Early Insulin Glycemic Control Combined With tPA Thrombolysis Reduces Acute Brain Tissue Damages In A Focal Embolic Stroke Model Of Diabetic Rats', *Stroke; a journal*

of cerebral circulation, 44(1), pp. 255–259. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.663476.

Fang, B. *et al.* (2007) 'Synergistic interactions between 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and imatinib in patients with chronic myeloid leukemia in blastic phase that is resistant to standard-dose imatinib', *Leukemia Research*, 31(10), pp. 1441–1444. Available at: https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.02.004.

Fang, H. *et al.* (2016) 'Compensatory patterns of collateral flow in stroke patients with unilateral and bilateral carotid stenosis', *BMC neurology*, 16, p. 39. Available at: https://doi.org/10.1186/s12883-016-0560-0.

Fang, M.C., Cutler, D.M. and Rosen, A.B. (2010) 'Trends in Thrombolytic Use for Ischemic Stroke in the United States', *Journal of hospital medicine : an official publication of the Society of Hospital Medicine*, 5(7), pp. 406–409. Available at: https://doi.org/10.1002/jhm.689.

Feigin, V.L. *et al.* (2014) 'Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010', *Lancet (London, England)*, 383(9913), pp. 245–254. Available at: https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)61953-4.

Feigin, V.L. *et al.* (2021) 'Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019', *The Lancet Neurology*, 20(10), pp. 795–820. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00252-0.

Fernández-Monreal, M. *et al.* (2004) 'Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator?', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 25(4), pp. 594–601. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mcn.2003.11.002.

Fiorelli, M. *et al.* (1999) 'Hemorrhagic transformation within 36 hours of a cerebral infarct: relationships with early clinical deterioration and 3-month outcome in the European Cooperative Acute Stroke Study I (ECASS I) cohort', *Stroke*, 30(11), pp. 2280–2284. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.30.11.2280.

Fisher, M. *et al.* (2009) 'Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations', *Stroke*, 40(6), pp. 2244–2250. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.541128.

Flavin, M. P., Zhao, G. and Ho, L.T. (2000) 'Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro', *Glia*, 29(4), pp. 347–354.

Flavin, M P, Zhao, G. and Ho, L.T. (2000) 'Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro.', *Glia*, 29(4), pp. 347–54.

Fonarow, G.C. *et al.* (2014) 'Door-to-Needle Times for Tissue Plasminogen Activator Administration and Clinical Outcomes in Acute Ischemic Stroke Before and After a Quality Improvement Initiative', *JAMA*, 311(16), p. 1632. Available at: https://doi.org/10.1001/jama.2014.3203.

Fox, G. *et al.* (1993) 'Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat', *Stroke*, 24(12), pp. 2087–2092; discussion 2092-2093. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.24.12.2087.

Fraser, P.A. (2011) 'The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability', *Free Radical Biology & Medicine*, 51(5), pp. 967–977. Available at: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.003.

Fredriksson, L. *et al.* (2004) 'Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC.', *The EMBO journal*, 23(19), pp. 3793–802. Available at: https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600397.

Fredriksson, L., Lawrence, D. and Medcalf, R. (2016a) 'tPA Modulation of the Blood–Brain Barrier: A Unifying Explanation for the Pleiotropic Effects of tPA in the CNS', *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 43(02), pp. 154–168. Available at: https://doi.org/10.1055/s-0036-1586229.

Fredriksson, L., Lawrence, D. and Medcalf, R. (2016b) 'tPA Modulation of the Blood–Brain Barrier: A Unifying Explanation for the Pleiotropic Effects of tPA in the CNS', *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 43(02), pp. 154–168. Available at: https://doi.org/10.1055/s-0036-1586229.

Fugate, J.E., Klunder, A.M. and Kallmes, D.F. (2013) 'What Is Meant by "TICI"?', *AJNR: American Journal of Neuroradiology*, 34(9), pp. 1792–1797. Available at: https://doi.org/10.3174/ajnr.A3496.

Furie, B. and Furie, B.C. (2008) 'Mechanisms of Thrombus Formation', *New England Journal of Medicine*, 359(9), pp. 938–949. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMra0801082.

Furlan, A.J. *et al.* (2006) 'Dose Escalation of Desmoteplase for Acute Ischemic Stroke (DEDAS): Evidence of Safety and Efficacy 3 to 9 Hours After Stroke Onset', *Stroke*, 37(5), pp. 1227–1231. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000217403.66996.6d.

Furlan, M. *et al.* (1996) 'Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra', *Annals of Neurology*, 40(2), pp. 216–226. Available at: https://doi.org/10.1002/ana.410400213.

Furman, B.L. (2015) 'Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats', *Current Protocols in Pharmacology*, 70, p. 5.47.1-5.47.20. Available at: https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70.

Furman, B.L. (2021) 'Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats', *Current Protocols*, 1(4), p. e78. Available at: https://doi.org/10.1002/cpz1.78.

G

de Gaetano, G. *et al.* (2016) 'Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document', *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*, 26(6), pp. 443–467. Available at: https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.03.007.

García-Culebras, A. *et al.* (2017) 'Toll-Like Receptor 4 Mediates Hemorrhagic Transformation After Delayed Tissue Plasminogen Activator Administration in In Situ Thromboembolic Stroke', *Stroke*, 48(6), pp. 1695–1699. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.015956.

García-Yébenes, I. *et al.* (2011) 'A Mouse Model of Hemorrhagic Transformation by Delayed Tissue Plasminogen Activator Administration After In Situ Thromboembolic Stroke', *Stroke*, 42(1), pp. 196–203. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.600452.

Garrido-Urbani, S. *et al.* (2011) 'Targeting Vascular NADPH Oxidase 1 Blocks Tumor Angiogenesis through a PPARα Mediated Mechanism', *PLOS ONE*, 6(2), p. e14665. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014665.

Gauberti, M. *et al.* (2013) 'Ultra-Sensitive Molecular MRI of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Reveals a Dynamic Inflammatory Penumbra After Strokes', *Stroke*, 44(7), pp. 1988–1996. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.000544.

Gauberti, M. *et al.* (2014) 'Lack of secondary microthrombosis after thrombin-induced stroke in mice and non-human primates', *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 12(3), pp. 409–414. Available at: https://doi.org/10.1111/jth.12487.

Gerhard, A. *et al.* (2000) 'In vivo imaging of activated microglia using [11C]PK11195 and positron emission tomography in patients after ischemic stroke', *Neuroreport*, 11(13), pp. 2957–2960. Available at: https://doi.org/10.1097/00001756-200009110-00025.

González, R.G. (2012) 'Clinical MRI of Acute Ischemic Stroke', *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 36(2), pp. 259–271. Available at: https://doi.org/10.1002/jmri.23595.

Gouix, E. *et al.* (2009) 'Reverse glial glutamate uptake triggers neuronal cell death through extrasynaptic NMDA receptor activation', *Molecular and Cellular Neurosciences*, 40(4), pp. 463–473. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.01.002.

Gracey, M., Burke, V. and Anderson, C.M. (1969) 'Treatment of abdominal pain in cystic fibrosis by oral administration of n-acetyl cysteine.', *Archives of Disease in Childhood*, 44(235), pp. 404–405.

Grilli, M. *et al.* (2000) 'Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage', *The European Journal of Neuroscience*, 12(7), pp. 2265–2272. Available at: https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00090.x.

Gurney, K.J., Estrada, E.Y. and Rosenberg, G.A. (2006) 'Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation', *Neurobiology of Disease*, 23(1), pp. 87–96. Available at: https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.02.006.

Gürsoy-Ozdemir, Y., Can, A. and Dalkara, T. (2004) 'Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia', *Stroke*, 35(6), pp. 1449–1453. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000126044.83777.f4.

Gveric, D. *et al.* (2001) 'Plasminogen activators in multiple sclerosis lesions: implications for the inflammatory response and axonal damage', *Brain: A Journal of Neurology*, 124(Pt 10), pp. 1978–1988. Available at: https://doi.org/10.1093/brain/124.10.1978.

Gveric, D. *et al.* (2003) 'Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors', *Brain: A Journal of Neurology*, 126(Pt 7), pp. 1590–1598. Available at: https://doi.org/10.1093/brain/awg167.

H

Hacke, W. *et al.* (2005) 'The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial (DIAS): A Phase II MRI-Based 9-Hour Window Acute Stroke Thrombolysis Trial With Intravenous Desmoteplase', *Stroke*, 36(1), pp. 66–73. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000149938.08731.2c.

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. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804656.

Hacke, W. *et al.* (2009) 'Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion-diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2): a prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study', *The Lancet. Neurology*, 8(2), pp. 141–150. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70267-9.

Haelewyn, B., Risso, J.-J. and Abraini, J.H. (2010) 'Human recombinant tissue-plasminogen activator (alteplase): why not use the 'human' dose for stroke studies in rats?', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral*

Blood Flow and Metabolism, 30(5), pp. 900–903. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.33.

Haley, P.J. (2003) 'Species differences in the structure and function of the immune system', *Toxicology*, 188(1), pp. 49–71.

Han, D., Liu, H. and Gao, Y. (2020) 'The role of peripheral monocytes and macrophages in ischemic stroke', *Neurological Sciences*, 41(12), pp. 3589–3607. Available at: https://doi.org/10.1007/s10072-020-04777-9.

Harris, R.J. *et al.* (1991) 'Tissue plasminogen activator has an O-linked fucose attached to threonine-61 in the epidermal growth factor domain.', *Biochemistry*, 30(9), pp. 2311–4. Available at: https://doi.org/10.1021/bi00223a004.

He, F.J., Nowson, C.A. and MacGregor, G.A. (2006) 'Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies', *The Lancet*, 367(9507), pp. 320–326. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68069-0.

Head, B.P. *et al.* (2009) 'Inhibition of p75 neurotrophin receptor attenuates isoflurane-mediated neuronal apoptosis in the neonatal central nervous system.', *Anesthesiology*, 110(4), pp. 813–25. Available at: https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31819b602b.

Hébert, M. *et al.* (2016) 'The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA)', *Revue Neurologique*, 172(3), pp. 186–197. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.10.002.

Hébert, M. *et al.* (2017) 'Distant Space Processing is Controlled by tPA-dependent NMDA Receptor Signaling in the Entorhinal Cortex', *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 27(10), pp. 4783–4796. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhw275.

Hedin, S.G. (1903) 'On the presence of a proteolytic enzyme in the normal serum of the ox', *The Journal of Physiology*, 30(2), pp. 195–201. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.1903.sp000989.

Heo, J.H. *et al.* (1999) 'Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 19(6), pp. 624–633. Available at: https://doi.org/10.1097/00004647-199906000-00005.

Hermann, D.M. and Chopp, M. (2012) 'Promoting brain remodelling and plasticity for stroke recovery: therapeutic promise and potential pitfalls of clinical translation', *The Lancet. Neurology*, 11(4), pp. 369–380. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70039-X.

Herson, P.S. and Hurn, P.D. (2010) 'Gender and the injured brain', *Progress in Brain Research*, 186, pp. 177–187. Available at: https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53630-3.00012-9.

Herson, P.S. and Traystman, R.J. (2014) 'Animal models of stroke: translational potential at present and in 2050', *Future Neurology*, 9(5), pp. 541–551. Available at: https://doi.org/10.2217/fnl.14.44.

Hickey, W.F., Vass, K. and Lassmann, H. (1992) 'Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 51(3), pp. 246–256. Available at: https://doi.org/10.1097/00005072-199205000-00002.

Hino, H. *et al.* (2001) 'Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor-1 in rat and human brain tissues', *Neuroscience Letters*, 297(2), pp. 105–108. Available at: https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01679-7.

Hjort, N. *et al.* (2008) 'MRI detection of early blood-brain barrier disruption: parenchymal enhancement predicts focal hemorrhagic transformation after thrombolysis', *Stroke*, 39(3), pp. 1025–1028. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.497719.

Hong, L. *et al.* (2019) 'The blood pressure paradox in acute ischemic stroke', *Annals of Neurology*, 85(3), pp. 331–339. Available at: https://doi.org/10.1002/ana.25428.

Hossmann, K.-A. (2012) 'The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(7), pp. 1310–1316. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.186.

Howard, G. *et al.* (2016) 'Differences in the role of black race and stroke risk factors for first vs recurrent stroke', *Neurology*, 86(7), pp. 637–642. Available at: https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002376.

Hoylaerts, M. *et al.* (1982) 'Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin', *The Journal of Biological Chemistry*, 257(6), pp. 2912–2919.

Hoylaerts, M *et al.* (1982) 'Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin.', *The Journal of biological chemistry*, 257(6), pp. 2912–9.

Hoyte, L., Kaur, J. and Buchan, A.M. (2004) 'Lost in translation: taking neuroprotection from animal models to clinical trials', *Experimental Neurology*, 188(2), pp. 200–204. Available at: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.05.008.

Hu, K. *et al.* (2006) 'Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression', *The Journal of Biological Chemistry*, 281(4), pp. 2120–2127. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M504988200.

Hu, X. *et al.* (2015) 'Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair', *Nature Reviews. Neurology*, 11(1), pp. 56–64. Available at: https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.207.

Huang, Y.Y. *et al.* (1996) 'Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

States of America, 93(16), pp. 8699–8704. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8699.

Huber, D. (2002) 'Tissue-type plasminogen activator (t-PA) is stored in Weibel-Palade bodies in human endothelial cells both in vitro and in vivo', *Blood*, 99(10), pp. 3637–3645. Available at: https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3637.

Hultman, K. *et al.* (2008) 'Retinoids and activation of PKC induce tissue-type plasminogen activator expression and storage in human astrocytes', *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 6(10), pp. 1796–1803. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03084.x.

Huntington, J.A., Read, R.J. and Carrell, R.W. (2000) 'Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation.', *Nature*, 407(6806), pp. 923–6. Available at: https://doi.org/10.1038/35038119.

Hurtado, M. *et al.* (2007) 'Activation of the epidermal growth factor signalling pathway by tissue plasminogen activator in pancreas cancer cells', *Gut*, 56(9), pp. 1266–1274. Available at: https://doi.org/10.1136/gut.2006.097188.

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

Iglesias-Rey, R. *et al.* (2022) 'Neurological Instability in Ischemic Stroke: Relation with Outcome, Latency Time, and Molecular Markers', *Translational Stroke Research*, 13(2), pp. 228–237. Available at: https://doi.org/10.1007/s12975-021-00924-2.

Ismael, M.A. *et al.* (2008) 'Blockade of sensory abnormalities and kinin B1 receptor expression by N-Acetyl-l-Cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance', *European Journal of Pharmacology*, 589(1), pp. 66–72. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.05.006.

Ito, M. *et al.* (2001) 'Characterization of low dose streptozotocin-induced progressive diabetes in mice', *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 9(3), pp. 71–78. Available at: https://doi.org/10.1016/s1382-6689(00)00064-8.

J

Jackson, S.P., Nesbitt, W.S. and Westein, E. (2009) 'Dynamics of platelet thrombus formation', *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 7 Suppl 1, pp. 17–20. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03401.x.

Jang, I.K. *et al.* (1989) 'Differential sensitivity of erythrocyte-rich and platelet-rich arterial thrombi to lysis with recombinant tissue-type plasminogen activator. A possible explanation for resistance to coronary thrombolysis.', *Circulation*, 79(4), pp. 920–928. Available at: https://doi.org/10.1161/01.CIR.79.4.920.

Jauch, E.C. *et al.* (2013) 'Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association', *Stroke*, 44(3), pp. 870–947. Available at: https://doi.org/10.1161/STR.0b013e318284056a.

Jeanneret, V. *et al.* (2016) 'Tissue-type Plasminogen Activator (tPA) Modulates the Postsynaptic Response of Cerebral Cortical Neurons to the Presynaptic Release of Glutamate', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9, p. 121. Available at: https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00121.

Jeanneret, V. *et al.* (2018) 'Tissue-type plasminogen activator protects the postsynaptic density in the ischemic brain', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 38(11), pp. 1896–1910. Available at: https://doi.org/10.1177/0271678X18764495.

Jian, Z. *et al.* (2019) 'The Involvement and Therapy Target of Immune Cells After Ischemic Stroke', *Frontiers in Immunology*, 10. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02167 (Accessed: 25 August 2022).

Jiang, Y., Han, J., *et al.* (2021) 'Diabetes mellitus: A common comorbidity increasing hemorrhagic transformation after tPA thrombolytic therapy for ischemic stroke', *Brain Hemorrhages*, 2(3), pp. 116–123. Available at: https://doi.org/10.1016/j.hest.2020.11.004.

Jiang, Y., Liu, N., *et al.* (2021) 'Diabetes Mellitus/Poststroke Hyperglycemia: a Detrimental Factor for tPA Thrombolytic Stroke Therapy', *Translational Stroke Research*, 12(3), pp. 416–427. Available at: https://doi.org/10.1007/s12975-020-00872-3.

Jickling, G.C. *et al.* (2014) 'Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 34(2), pp. 185–199. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.203.

Johnson, C.O. *et al.* (2019) 'Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016', *The Lancet Neurology*, 18(5), pp. 439–458. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30034-1.

K

Kaesmacher, J. *et al.* (2018a) 'Rates and Quality of Preinterventional Reperfusion in Patients With Direct Access to Endovascular Treatment', *Stroke*, 49(8), pp. 1924–1932. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.021579.

Kaesmacher, J. *et al.* (2018b) 'Rates and Quality of Preinterventional Reperfusion in Patients With Direct Access to Endovascular Treatment', *Stroke*, 49(8), pp. 1924–1932. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.021579.

Kaesmacher, J. *et al.* (2019) 'Direct mechanical thrombectomy in tPA-ineligible and -eligible patients versus the bridging approach: a meta-analysis', *Journal of NeuroInterventional Surgery*, 11(1), pp. 20–27. Available at: https://doi.org/10.1136/neurintsurg-2018-013834.

Kagitani, H. *et al.* (1985) 'Expression in *E. coli* of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity', *FEBS Letters*, 189(1), pp. 145–149. Available at: https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80860-7.

Kanazawa, M. *et al.* (2011) 'Inhibition of VEGF signaling pathway attenuates hemorrhage after tPA treatment', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(6), pp. 1461–1474. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.9.

Kaneto, H. *et al.* (2001) 'Activation of the Hexosamine Pathway Leads to Deterioration of Pancreatic β-Cell Function through the Induction of Oxidative Stress*', *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), pp. 31099–31104. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M104115200.

Kapral, M.K. *et al.* (2005) 'Sex differences in stroke care and outcomes: results from the Registry of the Canadian Stroke Network', *Stroke*, 36(4), pp. 809–814. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000157662.09551.e5.

Káradóttir, R. *et al.* (2005) 'NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia', *Nature*, 438(7071), pp. 1162–1166. Available at: https://doi.org/10.1038/nature04302.

Karatas, H. *et al.* (2011a) 'Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl3 application: a novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis

studies', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(6), pp. 1452–1460. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.8.

Karatas, H. *et al.* (2011b) 'Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl3 application: a novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis studies', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(6), pp. 1452–1460. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.8.

Karuppagounder, S.S. *et al.* (2018) 'N-acetylcysteine targets 5 lipoxygenase-derived, toxic lipids and can synergize with prostaglandin E2 to inhibit ferroptosis and improve outcomes following hemorrhagic stroke in mice', *Annals of Neurology*, 84(6), pp. 854–872. Available at: https://doi.org/10.1002/ana.25356.

Kasner, S.E. (2006) 'Clinical interpretation and use of stroke scales', *The Lancet Neurology*, 5(7), pp. 603–612. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70495-1.

Katsanos, A.H. *et al.* (2021) 'Intravenous Thrombolysis With Tenecteplase in Patients With Large Vessel Occlusions: Systematic Review and Meta-Analysis', *Stroke*, 52(1), pp. 308–312. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.030220.

Kernan, W.N. *et al.* (2013) 'Obesity', *Stroke*, 44(1), pp. 278–286. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.639922.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) 'Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics', *British Journal of Cancer*, 26(4), pp. 239–257. Available at: https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33.

Khan, M. *et al.* (2004) 'Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke', *Journal of Neuroscience Research*, 76(4), pp. 519–527. Available at: https://doi.org/10.1002/jnr.20087.

Khan, M.A. *et al.* (2016) 'Hyperglycemia in Stroke Impairs Polarization of Monocytes/Macrophages to a Protective Noninflammatory Cell Type', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(36), pp. 9313–9325. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0473-16.2016.

Khoshnam, S.E. *et al.* (2017) 'Pathogenic mechanisms following ischemic stroke', *Neurological sciences*, 38(7), pp. 1167–1186. Available at: https://doi.org/10.1007/s10072-017-2938-1.

Kilkenny, C. *et al.* (2010) 'Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research', *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 1(2), pp. 94–99. Available at: https://doi.org/10.4103/0976-500X.72351.

Kim, H.-K. *et al.* (2003) 'Inhibition of endothelial cell proliferation by the recombinant kringle domain of tissue-type plasminogen activator.', *Biochemical and biophysical research communications*, 304(4), pp. 740–6. Available at: https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00656-9.

Kim, J. *et al.* (2016) 'Direct Thrombus Imaging in Stroke', *Journal of Stroke*, 18(3), pp. 286–296. Available at: https://doi.org/10.5853/jos.2016.00906.

Kim, J.-T. *et al.* (2018) 'Impact of Hyperglycemia According to the Collateral Status on Outcomes in Mechanical Thrombectomy', *Stroke*, 49(11), pp. 2706–2714. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.022167.

King, A.J.F. (2012) 'The use of animal models in diabetes research', *British Journal of Pharmacology*, 166(3), pp. 877–894. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x.

Knipe, L. *et al.* (2010) 'A revised model for the secretion of tPA and cytokines from cultured endothelial cells', *Blood*, 116(12), pp. 2183–2191. Available at: https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-276170.

Koizumi, J. *et al.* (1986) 'Experimental studies of ischemic brain edema', *Nosotchu*, 8(1), pp. 1–8. Available at: https://doi.org/10.3995/jstroke.8.1.

Kolb, H. (1987) 'Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice', *Diabetes/Metabolism Reviews*, 3(3), pp. 751–778. Available at: https://doi.org/10.1002/dmr.5610030308.

Krebs, C. *et al.* (2003) 'Functional NMDA receptor subtype 2B is expressed in astrocytes after ischemia in vivo and anoxia in vitro', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(8), pp. 3364–3372.

Kreutzberg, G.W. (1996) 'Microglia: a sensor for pathological events in the CNS', *Trends in Neurosciences*, 19(8), pp. 312–318.

Krueger, K. and Busch, E. (2002) 'Protocol of a thromboembolic stroke model in the rat: review of the experimental procedure and comparison of models', *Investigative Radiology*, 37(11), pp. 600–608. Available at: https://doi.org/10.1097/00004424-200211000-00003.

Kudo, K., Zhao, L. and Nowak, T.S. (2016) 'Peri-infarct depolarizations during focal ischemia in the awake Spontaneously Hypertensive Rat. Minimizing anesthesia confounds in experimental stroke', *Neuroscience*, 325, pp. 142–152. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.049.

Kuiper, J. *et al.* (1988) 'Characterization of the interaction in vivo of tissue-type plasminogen activator with liver cells.', *The Journal of biological chemistry*, 263(34), pp. 18220–4.

Kuiper, J. *et al.* (1996) 'Interaction of mutants of tissue-type plasminogen activator with liver cells: effect of domain deletions.', *The Biochemical journal*, 313 (Pt 3)(3), pp. 775–80. Available at: https://doi.org/10.1042/bj3130775.

Kumari, R. and Sinha, K. (2021) 'Neutrophil in diabetic stroke: emerging therapeutic strategies', *Neural Regeneration Research*, 16(11), pp. 2206–2208. Available at: https://doi.org/10.4103/1673-5374.310677.

von Kummer, R. *et al.* (2016) 'Desmoteplase 3 to 9 Hours After Major Artery Occlusion Stroke: The DIAS-4 Trial (Efficacy and Safety Study of Desmoteplase to Treat Acute Ischemic Stroke)', *Stroke*, 47(12), pp. 2880–2887. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.013715.

Kuroiwa, T. *et al.* (1985) 'Role of extracellular proteins in the dynamics of vasogenic brain edema', *Acta Neuropathologica*, 66(1), pp. 3–11. Available at: https://doi.org/10.1007/BF00698288.

Kurth, T. *et al.* (2002) 'Body Mass Index and the Risk of Stroke in Men', *Archives of Internal Medicine*, 162(22), p. 2557. Available at: https://doi.org/10.1001/archinte.162.22.2557.

Kvajo, M. *et al.* (2004) 'Regulation of Brain Proteolytic Activity Is Necessary for the In Vivo Function of NMDA Receptors', *Journal of Neuroscience*, 24(43), pp. 9734–9743. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3306-04.2004.

Kvistad, C.E. *et al.* (2022) 'Tenecteplase versus alteplase for the management of acute ischaemic stroke in Norway (NOR-TEST 2, part A): a phase 3, randomised, open-label, blinded endpoint, non-inferiority trial', *The Lancet. Neurology*, 21(6), pp. 511–519. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00124-7.

L

Lapchak, P.A. *et al.* (2002) 'Effects of the Spin Trap Agent Disodium- [tert-butylimino)methyl]benzene-1,3-disulfonate N-Oxide (Generic NXY-059) on Intracerebral Hemorrhage in a Rabbit Large Clot Embolic Stroke Model', *Stroke*, 33(6), pp. 1665–1670. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000017145.22806.AA.

Lapergue, B. *et al.* (2018) 'First-line use of contact aspiration for thrombectomy versus a stent retriever for recanalization in acute cerebral infarction: The randomized ASTER study protocol', *International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society*, 13(1), pp. 87–95. Available at: https://doi.org/10.1177/1747493017711948.

Larsson, S.C. *et al.* (2016) 'Differing association of alcohol consumption with different stroke types: a systematic review and meta-analysis', *BMC medicine*, 14(1), p. 178. Available at: https://doi.org/10.1186/s12916-016-0721-4.

Le Behot, A. *et al.* (2014) 'GpIbα-VWF blockade restores vessel patency by dissolving platelet aggregates formed under very high shear rate in mice', *Blood*, 123(21), pp. 3354–3363. Available at: https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-543074.

Lebrun, F. *et al.* (2022) 'Post-acute delivery of α5-GABAA antagonist, S 44819, improves functional recovery in juvenile rats following stroke', *Experimental Neurology*, 347, p. 113881. Available at: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113881.

Lee, H.-Y. *et al.* (2007a) 'Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons', *Journal of Neurochemistry*, 101(5), pp. 1236–1247. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04417.x.

Lee, H.-Y. *et al.* (2007b) 'Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons.', *Journal of neurochemistry*, 101(5), pp. 1236–47. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04417.x.

Lee, S.H. *et al.* (2014) 'tPA Regulates Neurite Outgrowth by Phosphorylation of LRP5/6 in Neural Progenitor Cells', *Molecular Neurobiology*, 49(1), pp. 199–215. Available at: https://doi.org/10.1007/s12035-013-8511-x.

Lemarchand, E. *et al.* (2016) 'Stressed neurons protect themselves by a tissue-type plasminogen activator-mediated EGFR-dependent mechanism', *Cell Death & Differentiation*, 23(1), pp. 123–131. Available at: https://doi.org/10.1038/cdd.2015.76.

Lemarchant, S. *et al.* (2014) 'tPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury', *Neurobiology of Disease*, 66, pp. 28–42. Available at: https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.02.005.

Lenglet, S. *et al.* (2014) 'Recombinant Tissue Plasminogen Activator Enhances Microglial Cell Recruitment after Stroke in Mice', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34(5), pp. 802–812. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.9.

Lenoir, S. *et al.* (2019) 'Post-synaptic Release of the Neuronal Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA)', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00164.

Leonetti, C. *et al.* (2017) 'Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination', *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), p. 20. Available at: https://doi.org/10.1186/s13024-017-0160-5.

Lesept, F. *et al.* (2016) 'Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors', *Cell Death & Disease*, 7(11), pp. e2466–e2466. Available at: https://doi.org/10.1038/cddis.2016.279.

Lewandowski, S.A. *et al.* (2016) 'Pharmacological targeting of the PDGF-CC signaling pathway for blood-brain barrier restoration in neurological disorders', *Pharmacology & Therapeutics*, 167, pp. 108–119. Available at: https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.07.016.

Li, H. *et al.* (2000) 'Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats', *Stroke*, 31(1), pp. 176–182. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.31.1.176.

Li, W. *et al.* (2013) 'Comparative analysis of the neurovascular injury and functional outcomes in experimental stroke models in diabetic Goto-Kakizaki rats', *Brain Research*, 1541, pp. 106–114. Available at: https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.10.021.

Li, W.A. *et al.* (2013) 'Hyperglycemia in stroke and possible treatments', *Neurological Research*, 35(5), pp. 479–491. Available at: https://doi.org/10.1179/1743132813Y.0000000209.

Li, Y. and Zhang, J. (2021) 'Animal models of stroke', *Animal Models and Experimental Medicine*, 4(3), pp. 204–219. Available at: https://doi.org/10.1002/ame2.12179.

Liebeskind, D.S. *et al.* (2011) 'CT and MRI early vessel signs reflect clot composition in acute stroke', *Stroke*, 42(5), pp. 1237–1243. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.605576.

Lijnen, H.R. (2001) 'Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling', *Thrombosis and Haemostasis*, 86(1), pp. 324–333.

Lillibridge, C.B., Docter, J.M. and Eidelman, S. (1967) 'Oral administration of n-acetyl cysteine in the prophylaxis of "meconium ileus equivalent"', *The Journal of Pediatrics*, 71(6), pp. 887–889. Available at: https://doi.org/10.1016/s0022-3476(67)80019-2.

Lindauer, U. (2016) 'Ethics of Modeling of Cerebral Ischemia in Small Animals', in U. Dirnagl (ed.) *Rodent Models of Stroke*. New York, NY: Springer New York (Neuromethods), pp. 279–290. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-5620-3_17.

Lindenstrøm, E., Boysen, G. and Nyboe, J. (1993) 'Lifestyle factors and risk of cerebrovascular disease in women. The Copenhagen City Heart Study.', *Stroke*, 24(10), pp. 1468–72.

Lindsberg, P.J. and Roine, R.O. (2004a) 'Hyperglycemia in Acute Stroke', *Stroke*, 35(2), pp. 363–364. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000115297.92132.84.

Lindsberg, P.J. and Roine, R.O. (2004b) 'Hyperglycemia in Acute Stroke', *Stroke*, 35(2), pp. 363–364. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000115297.92132.84.

Liot, G. *et al.* (2006) 'Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity', *Journal of Neurochemistry*, 98(5), pp. 1458–1464. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03982.x.

Liu, D. *et al.* (2004) 'Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C', *Nature Medicine*, 10(12), pp. 1379–1383. Available at: https://doi.org/10.1038/nm1122.

Liu, J. *et al.* (2012) 'Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(9), pp. 3044–3057. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6409-11.2012.

L.L.Yeo, L. and Sharma, V.K. (2013) 'The Quest for Arterial Recanalization in Acute Ischemic Stroke-The Past, Present and the Future', *Journal of Clinical Medicine Research*, 5(4), pp. 251–265. Available at: https://doi.org/10.4021/jocmr1342w.

Lo, E.H. (2008) 'A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke', *Nature Medicine*, 14(5), pp. 497–500. Available at: https://doi.org/10.1038/nm1735.

Lo, J.W. *et al.* (2020) 'Association of Prediabetes and Type 2 Diabetes With Cognitive Function After Stroke', *Stroke*, 51(6), pp. 1640–1646. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.028428.

Lochner, Janis E. *et al.* (2006) 'Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging', *Journal of Neurobiology*, 66(6), pp. 564–577. Available at: https://doi.org/10.1002/neu.20250.

Lochner, Janis E *et al.* (2006) 'Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging.', *Journal of neurobiology*, 66(6), pp. 564–77. Available at: https://doi.org/10.1002/neu.20250.

Lockwood, C.J. and Schatz, F. (1996) 'A biological model for the regulation of peri-implantational hemostasis and menstruation', *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 3(4), pp. 159–165.

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. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30253-3.

Lopatkiewicz, A.M. *et al.* (2020) 'Glucocorticoid Resistance is Associated with Poor Functional Outcome After Stroke', *Cellular and Molecular Neurobiology*, 40(8), pp. 1321–1326. Available at: https://doi.org/10.1007/s10571-020-00818-1.

Lopes Pinheiro, M.A. *et al.* (2016) 'Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1862(3), pp. 461–471. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.018.

López, J.A. and Chen, J. (2009) 'Pathophysiology of venous thrombosis', *Thrombosis Research*, 123, pp. S30–S34. Available at: https://doi.org/10.1016/S0049-3848(09)70140-9.

López-Atalaya, J.P. *et al.* (2007) 'Recombinant *Desmodus rotundus* Salivary Plasminogen Activator Crosses the Blood–Brain Barrier Through a Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-Dependent Mechanism Without Exerting Neurotoxic Effects', *Stroke*, 38(3), pp. 1036–1043. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000258100.04923.84.

Lopez-Atalaya, J.P. *et al.* (2008) 'Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(6), pp. 1212–21. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.14.

Louessard, M. *et al.* (2016) 'Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons', *Molecular Neurobiology*, 53(7), pp. 5000–5012. Available at: https://doi.org/10.1007/s12035-015-9432-7.

Louet, E.R. *et al.* (2022) 'tPA-NMDAR Signaling Blockade Reduces the Incidence of Intracerebral Aneurysms', *Translational Stroke Research* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1007/s12975-022-01004-9.

Lu, A. *et al.* (2008) 'Reperfusion activates metalloproteinases that contribute to neurovascular injury', *Experimental Neurology*, 210(2), pp. 549–559. Available at: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.12.003.

Lu, A. *et al.* (2009) 'Mechanical reperfusion is associated with post-ischemic hemorrhage in rat brain', *Experimental neurology*, 216(2), pp. 407–412. Available at: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.12.020.

Lu, P. *et al.* (2011) 'Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), pp. a005058–a005058. Available at: https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058.

Lu, W., Bhasin, M. and Tsirka, S.E. (2002) 'Involvement of tissue plasminogen activator in onset and effector phases of experimental allergic encephalomyelitis', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(24), pp. 10781–10789.

Lueckgen, A. (2021) 'Animal models of T1D', *Nature Research* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1038/d42859-021-00007-0.

M

Ma, G. *et al.* (2021) 'Neuroinflammation in hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator thrombolysis: Potential mechanisms, targets, therapeutic drugs and biomarkers', *International Immunopharmacology*, 90, p. 107216. Available at: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107216.

de Maat, S. *et al.* (2022) 'Microlyse: a thrombolytic agent that targets VWF for clearance of microvascular thrombosis', *Blood*, 139(4), pp. 597–607. Available at: https://doi.org/10.1182/blood.2021011776.

MacDougall, N.J.J. and Muir, K.W. (2011) 'Hyperglycaemia and infarct size in animal models of middle cerebral artery occlusion: systematic review and meta-analysis', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(3), pp. 807–818. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.210.

Macfarlane, R.G. and Biggs, R. (1948) 'Fibrinolysis; its mechanism and significance', *Blood*, 3(10), pp. 1167–1187.

Macrae, I.M. (2016) 'Focal Ischemia Models: Middle Cerebral Artery Occlusion Induced by Electrocoagulation, Occluding Devices, and Endothelin-1', in U. Dirnagl (ed.) *Rodent Models of Stroke*. New York, NY: Springer New York (Neuromethods), pp. 45–58. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-5620-3_5.

Macrez, R. *et al.* (2011) 'Antibodies Preventing the Interaction of Tissue-Type Plasminogen Activator With N-Methyl- D -Aspartate Receptors Reduce Stroke Damages and Extend the Therapeutic Window of Thrombolysis', *Stroke*, 42(8), pp. 2315–2322. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.606293.

Macrez, R. *et al.* (2016) 'Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis', *Brain*, 139(9), pp. 2406–2419. Available at: https://doi.org/10.1093/brain/aww172.

Madani, R. *et al.* (1999) 'Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice', *The EMBO Journal*, 18(11), pp. 3007–3012. Available at: https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.3007.

Maeda, K. *et al.* (2000) 'Quantitative measurement of local cerebral blood flow in the anesthetized mouse using intraperitoneal [14C]iodoantipyrine injection and final arterial heart blood sampling', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(1), pp. 10–14. Available at: https://doi.org/10.1097/00004647-200001000-00003.

Maïer, B., Desilles, J.P. and Mazighi, M. (2020) 'Intracranial Hemorrhage After Reperfusion Therapies in Acute Ischemic Stroke Patients', *Frontiers in Neurology*, 11. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2020.599908 (Accessed: 24 August 2022).

Marchal, G., Young, A.R. and Baron, J.C. (1999) 'Early postischemic hyperperfusion: pathophysiologic insights from positron emission tomography', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 19(5), pp. 467–482. Available at: https://doi.org/10.1097/00004647-199905000-00001.

Marder, V.J. (2011) 'Historical perspective and future direction of thrombolysis research: the re-discovery of plasmin', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(s1), pp. 364–373. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04370.x.

Marenco, J.P. and Frye, R.E. (2019) 'The Clinical Use of N-Acetylcysteine in Cardiology', in R.E. Frye and M. Berk (eds) *The Therapeutic Use of N-Acetylcysteine (NAC) in Medicine*. Singapore: Springer, pp. 277–287. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-10-5311-5_16.

Martin, A.M. *et al.* (2008) 'The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 beta-chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(18), pp. 12004–12013. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M707607200.

Martin, R.L., Lloyd, H.G. and Cowan, A.I. (1994) 'The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?', *Trends in Neurosciences*, 17(6), pp. 251–257. Available at: https://doi.org/10.1016/0166-2236(94)90008-6.

Martinez de Lizarrondo, S. *et al.* (2017) 'Potent Thrombolytic Effect of *N* -Acetylcysteine on Arterial Thrombi', *Circulation*, 136(7), pp. 646–660. Available at: https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027290.

Masrur, S. *et al.* (2015) 'Association of Acute and Chronic Hyperglycemia With Acute Ischemic Stroke Outcomes Post-Thrombolysis: Findings From Get With The Guidelines-Stroke', *Journal of the American Heart Association* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002193.

Masrur, S. *et al.* (no date) 'Association of Acute and Chronic Hyperglycemia With Acute Ischemic Stroke Outcomes Post-Thrombolysis: Findings From Get With The Guidelines-Stroke', *Journal of the American Heart Association*, 4(10), p. e002193. Available at: https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002193.

Matarin, M. *et al.* (2008) 'Whole genome analyses suggest ischemic stroke and heart disease share an association with polymorphisms on chromosome 9p21', *Stroke*, 39(5), pp. 1586–1589. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.502963.

Matsumoto, T. *et al.* (1997) 'Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to interleukin-8', *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 77(2), pp. 119–125.

Matys, T. *et al.* (2004) 'Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(46), pp. 16345–16350. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.0407355101.

McBride, D.W. *et al.* (2016) 'Acute Hyperglycemia Is Associated with Immediate Brain Swelling and Hemorrhagic Transformation After Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats', in R.L. Applegate et al. (eds) *Brain Edema XVI: Translate Basic Science into Clinical Practice*. Cham: Springer International Publishing (Acta Neurochirurgica Supplement), pp. 237–241. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-18497-5_42.

McColl, B.W. *et al.* (2004) 'Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice', *Brain Research*, 997(1), pp. 15–23. Available at: https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.10.028.

McCormick, M.T. *et al.* (2008) 'Management of Hyperglycemia in Acute Stroke', *Stroke*, 39(7), pp. 2177–2185. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.496646.

Medved, L. and Nieuwenhuizen, W. (2003) 'Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin', *Thrombosis and Haemostasis*, 89(03), pp. 409–419. Available at: https://doi.org/10.1055/s-0037-1613368.

Mehra, A. *et al.* (2016) 'The plasminogen activation system in neuroinflammation', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862(3), pp. 395–402. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.011.

Mehra, A. *et al.* (2020) 'Nonionotropic Action of Endothelial NMDA Receptors on Blood–Brain Barrier Permeability via Rho/ROCK-Mediated Phosphorylation of Myosin', *The Journal of Neuroscience*, 40(8), pp. 1778–1787. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0969-19.2019.

Menon, B.K. *et al.* (2022) 'Intravenous tenecteplase compared with alteplase for acute ischaemic stroke in Canada (AcT): a pragmatic, multicentre, open-label, registry-linked, randomised, controlled, non-inferiority trial', *Lancet (London, England)*, 400(10347), pp. 161–169. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01054-6.

Meschia, J.F. and Brott, T. (2018) 'Ischaemic stroke', *European Journal of Neurology*, 25(1), pp. 35–40. Available at: https://doi.org/10.1111/ene.13409.

Messé, S.R. *et al.* (2016) 'Why are acute ischemic stroke patients not receiving IV tPA?: Results from a national registry', *Neurology*, 87(15), pp. 1565–1574. Available at: https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003198.

Mi, D. *et al.* (2018) 'Correlation of hyperglycemia with mortality after acute ischemic stroke', *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 11, p. 1756285617731686. Available at: https://doi.org/10.1177/1756285617731686.

Mican, J. *et al.* (2019) 'Structural Biology and Protein Engineering of Thrombolytics', *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, pp. 917–938. Available at: https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.06.023.

Minor, K., Phillips, J. and Seeds, N.W. (2009) 'Tissue plasminogen activator promotes axonal outgrowth on CNS myelin after conditioned injury', *Journal of Neurochemistry*, 109(3), pp. 706–715. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05977.x.

Miranda, E. and Lomas, D.A. (2006) 'Neuroserpin: a serpin to think about', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 63(6), pp. 709–722. Available at: https://doi.org/10.1007/s00018-005-5077-4.

Mistry, E.A. *et al.* (2017) 'Mechanical Thrombectomy Outcomes With and Without Intravenous Thrombolysis in Stroke Patients: A Meta-Analysis', *Stroke*, 48(9), pp. 2450–2456. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.017320.

Mitsios, J.P. *et al.* (2018) 'Relationship Between Glycated Hemoglobin and Stroke Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Journal of the American Heart Association*, 7(11), p. e007858. Available at: https://doi.org/10.1161/JAHA.117.007858.

Molina, C.A. *et al.* (2001) 'Timing of spontaneous recanalization and risk of hemorrhagic transformation in acute cardioembolic stroke', *Stroke*, 32(5), pp. 1079–1084. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.32.5.1079.

Momi, S. *et al.* (2013) 'Reperfusion of cerebral artery thrombosis by the GPIb-VWF blockade with the Nanobody ALX-0081 reduces brain infarct size in guinea pigs', *Blood*, 121(25), pp. 5088–5097. Available at: https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-464545.

Montagne, A. *et al.* (2012) 'Ultra-sensitive molecular MRI of cerebrovascular cell activation enables early detection of chronic central nervous system disorders', *NeuroImage*, 63(2), pp. 760–770. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.07.018.

van Moorsel, M.V.A. *et al.* (2022) 'VWF-targeted thrombolysis to overcome rh-tPA resistance in experimental thrombotic stroke models', *Blood*, p. blood.2022016342. Available at: https://doi.org/10.1182/blood.2022016342.

Morelli, N. *et al.* (2017) 'Mechanical thrombectomy after intravenous thrombolysis for acute ischaemic stroke', *The Lancet. Neurology*, 16(2), pp. 103–104. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30379-9.

Mori, K. *et al.* (1995) 'The activation of type 1 and type 2 plasminogen by type I and type II tissue plasminogen activator.', *The Journal of biological chemistry*, 270(7), pp. 3261–7. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.270.7.3261.

Morikawa, E. *et al.* (1996) 'Treatment of focal cerebral ischemia with synthetic oligopeptide corresponding to lectin domain of selectin', *Stroke*, 27(5), pp. 951–955; discussion 956. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.27.5.951.

Motto, C. *et al.* (1999) 'Hemorrhage after an acute ischemic stroke.MAST-I Collaborative Group', *Stroke*, 30(4), pp. 761–764. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.30.4.761.

Murray, K.N. *et al.* (2013) 'Systemic immune activation shapes stroke outcome', *Molecular and Cellular Neurosciences*, 53, pp. 14–25. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.09.004.

N

Nabavi, S. *et al.* (2014) 'Engineering a memory with LTD and LTP', *Nature*, 511(7509), pp. 348–352. Available at: https://doi.org/10.1038/nature13294.

Nabika, T. *et al.* (2012) 'The stroke-prone spontaneously hypertensive rat: still a useful model for post-GWAS genetic studies?', *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, 35(5), pp. 477–484. Available at: https://doi.org/10.1038/hr.2012.30.

Nagai, N. *et al.* (1999) 'Role of plasminogen system components in focal cerebral ischemic infarction: a gene targeting and gene transfer study in mice', *Circulation*, 99(18), pp. 2440–2444. Available at: https://doi.org/10.1161/01.cir.99.18.2440.

Nagaoka, M.R. *et al.* (2002) 'Participation of a galectin-dependent mechanism in the hepatic clearance of tissue-type plasminogen activator and plasma kallikrein.', *Thrombosis research*, 108(4), pp. 257–62.

Nakaji, K. *et al.* (2006) 'Matrix metalloproteinase-2 plays a critical role in the pathogenesis of white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rodents', *Stroke*, 37(11), pp. 2816–2823. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000244808.17972.55.

Nassar, T. *et al.* (2004) 'In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone', *Blood*, 103(3), pp. 897–902. Available at: https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1685.

National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995) 'Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke', *The New England Journal of Medicine*, 333(24), pp. 1581–1587. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJM199512143332401.

Navarro-Oviedo, M. *et al.* (2019) 'MMP10 Promotes Efficient Thrombolysis After Ischemic Stroke in Mice with Induced Diabetes', *Translational Stroke Research*, 10(4), pp. 389–401. Available at: https://doi.org/10.1007/s12975-018-0652-9.

Nelson, M.L.A. *et al.* (2017) 'Stroke rehabilitation evidence and comorbidity: a systematic scoping review of randomized controlled trials', *Topics in Stroke Rehabilitation*, 24(5), pp. 374–380. Available at: https://doi.org/10.1080/10749357.2017.1282412.

Neuhaus, A.A. *et al.* (2017) 'Neuroprotection in stroke: the importance of collaboration and reproducibility', *Brain: A Journal of Neurology*, 140(8), pp. 2079–2092. Available at: https://doi.org/10.1093/brain/awx126.

Nicole, O. *et al.* (2001) 'The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling', *Nature Medicine*, 7(1), pp. 59–64. Available at: https://doi.org/10.1038/83358.

Nicole, O *et al.* (2001) 'The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling.', *Nature medicine*, 7(1), pp. 59–64. Available at: https://doi.org/10.1038/83358.

Nicoll, R.A. (2017) 'A Brief History of Long-Term Potentiation', *Neuron*, 93(2), pp. 281–290. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.015.

Nikoletopoulou, V. *et al.* (2013) 'Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1833(12), pp. 3448–3459. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.

Ning, R. *et al.* (2012) 'Tissue plasminogen activator treatment of stroke in type-1 diabetes rats', *Neuroscience*, 222, pp. 326–332. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.018.

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. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706442.

O

Obermeier, B., Verma, A. and Ransohoff, R.M. (2016) 'The blood-brain barrier', *Handbook of Clinical Neurology*, 133, pp. 39–59. Available at: https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63432-0.00003-7.

Obiang, P. *et al.* (2011) 'Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF', *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(2), pp. 121–129. Available at: https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.03.004.

Obiang, P. *et al.* (2012) 'GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(37), pp. 12726–12734. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6202-11.2012.

O'Collins, V.E. *et al.* (2006) '1,026 experimental treatments in acute stroke', *Annals of Neurology*, 59(3), pp. 467–477. Available at: https://doi.org/10.1002/ana.20741.

O'Collins, Victoria E. *et al.* (2013) 'Hypertension and experimental stroke therapies', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(8), pp. 1141–1147. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.88.

O'Collins, Victoria E *et al.* (2013) 'Hypertension and experimental stroke therapies', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(8), pp. 1141–1147. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.88.

O'Donnell, M.J. *et al.* (2010) 'Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study', *The Lancet*, 376(9735), pp. 112–123. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60834-3.

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. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30506-2.

Office of the Surgeon General (US) and Office on Smoking and Health (US) (2004) *The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General*. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US) (Reports of the Surgeon General). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44695/ (Accessed: 14 October 2022).

Office on Smoking and Health (US) (2006) *The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General*. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US) (Publications and Reports of the Surgeon General). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44324/ (Accessed: 14 October 2022).

Orset, C. *et al.* (2007) 'Mouse Model of In Situ Thromboembolic Stroke and Reperfusion', *Stroke*, 38(10), pp. 2771–2778. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.487520.

Orset, C. *et al.* (2016) 'Efficacy of Alteplase in a Mouse Model of Acute Ischemic Stroke: A Retrospective Pooled Analysis', *Stroke*, 47(5), pp. 1312–1318. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.012238.

P

Paciaroni, M. *et al.* (2008) 'Early hemorrhagic transformation of brain infarction: rate, predictive factors, and influence on clinical outcome: results of a prospective multicenter study', *Stroke*, 39(8), pp. 2249–2256. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.510321.

Palaiodimou, L. *et al.* (2019) 'Glycemia management in acute ischemic stroke: current concepts and novel therapeutic targets', *Postgraduate Medicine*, 131(7), pp. 423–437. Available at: https://doi.org/10.1080/00325481.2019.1651206.

Pang, P.T. and Lu, B. (2004) 'Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF', *Ageing Research Reviews*, 3(4), pp. 407–430. Available at: https://doi.org/10.1016/j.arr.2004.07.002.

Paoletti, P. (2011) 'Molecular basis of NMDA receptor functional diversity', *The European Journal of Neuroscience*, 33(8), pp. 1351–1365. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07628.x.

Papadia, S. *et al.* (2005) 'Nuclear Ca2+ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(17), pp. 4279–4287. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5019-04.2005.

Parcq, J. *et al.* (2012) 'Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity', *Cell Death and Differentiation*, 19(12), pp. 1983–1991. Available at: https://doi.org/10.1038/cdd.2012.86.

Park, L. *et al.* (2008) 'Key role of tissue plasminogen activator in neurovascular coupling', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(3), pp. 1073–1078. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.0708823105.

Parron, C. and Save, E. (2004) 'Comparison of the effects of entorhinal and retrosplenial cortical lesions on habituation, reaction to spatial and non-spatial changes during object exploration in the rat', *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(1), pp. 1–11. Available at: https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.03.004.

Parsons, M. *et al.* (2012) 'A randomized trial of tenecteplase versus alteplase for acute ischemic stroke', *The New England Journal of Medicine*, 366(12), pp. 1099–1107. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109842.

Pasquet, N. *et al.* (2019) 'Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells', *Cerebral Cortex*, 29(6), pp. 2482–2498. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhy119.

Pasupathy, S. *et al.* (2017) 'Early Use of N-acetylcysteine With Nitrate Therapy in Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention for ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction Reduces Myocardial Infarct Size (the NACIAM Trial [N-acetylcysteine in Acute Myocardial Infarction])', *Circulation*, 136(10), pp. 894–903. Available at: https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027575.

Pawlak, R. *et al.* (2002) 'Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice', *Neuroscience*, 113(4), pp. 995–1001. Available at: https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00166-5.

Pawlak, R. *et al.* (2003) 'Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior', *Nature Neuroscience*, 6(2), pp. 168–174. Available at: https://doi.org/10.1038/nn998.

Pedragosa, J. *et al.* (2018) 'CNS-border associated macrophages respond to acute ischemic stroke attracting granulocytes and promoting vascular leakage', *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), p. 76. Available at: https://doi.org/10.1186/s40478-018-0581-6.

Pekny, M. and Nilsson, M. (2005) 'Astrocyte activation and reactive gliosis', *Glia*, 50(4), pp. 427–434. Available at: https://doi.org/10.1002/glia.20207.

Peña, I. dela *et al.* (2017) 'Strategies to Extend Thrombolytic Time Window for Ischemic Stroke Treatment: An Unmet Clinical Need', *Journal of Stroke*, 19(1), pp. 50–60. Available at: https://doi.org/10.5853/jos.2016.01515.

Pennica, D. *et al.* (1983) 'Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli', *Nature*, 301(5897), pp. 214–221. Available at: https://doi.org/10.1038/301214a0.

Percie du Sert, N. *et al.* (2017) 'The IMPROVE Guidelines (Ischaemia Models: Procedural Refinements Of in Vivo Experiments)', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(11), pp. 3488–3517. Available at: https://doi.org/10.1177/0271678X17709185.

Pham, M. *et al.* (2010) 'Outcome of experimental stroke in C57Bl/6 and Sv/129 mice assessed by multimodal ultra-high field MRI', *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2, p. 6. Available at: https://doi.org/10.1186/2040-7378-2-6.

Pittman, R.N., Ivins, J.K. and Buettner, H.M. (1989) 'Neuronal plasminogen activators: cell surface binding sites and involvement in neurite outgrowth', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 9(12), pp. 4269–4286.

Pohl, G. *et al.* (1984) 'Tissue plasminogen activator: peptide analyses confirm an indirectly derived amino acid sequence, identify the active site serine residue, establish glycosylation sites, and localize variant differences.', *Biochemistry*, 23(16), pp. 3701–7. Available at: https://doi.org/10.1021/bi00311a020.

Poirier, J. and Derouesné, C. (1993) 'Apoplexy and Stroke', in K.F. Kiple (ed.) *The Cambridge World History of Human Disease*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 584–587. Available at: https://doi.org/10.1017/CHOL9780521332866.071.

Polavarapu, R. *et al.* (2007) 'Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit', *Blood*, 109(8), pp. 3270–3278. Available at: https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-043125.

Potter, J.F. *et al.* (2009) 'Controlling hypertension and hypotension immediately post-stroke (CHHIPS): a randomised, placebo-controlled, double-blind pilot trial', *The Lancet. Neurology*, 8(1), pp. 48–56. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70263-1.

Powers, W.J. *et al.* (2018) '2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association', *Stroke*, 49(3). Available at: https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000158.

PROGRESS Collaborative Group (2001) 'Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic

attack', *Lancet (London, England)*, 358(9287), pp. 1033–1041. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06178-5.

Pun, P.B.L., Lu, J. and Moochhala, S. (2009) 'Involvement of ROS in BBB dysfunction', *Free Radical Research*, 43(4), pp. 348–364. Available at: https://doi.org/10.1080/10715760902751902.

Q

Qian, Zhuo *et al.* (1993a) 'Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate–early gene during seizure, kindling and long-term potentiation', *Nature*, 361(6411), pp. 453–457. Available at: https://doi.org/10.1038/361453a0.

Qian, Z *et al.* (1993) 'Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation.', *Nature*, 361(6411), pp. 453–7. Available at: https://doi.org/10.1038/361453a0.

Qian, Zhuo *et al.* (1993b) 'Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate–early gene during seizure, kindling and long-term potentiation', *Nature*, 361(6411), pp. 453–457. Available at: https://doi.org/10.1038/361453a0.

Qin, C. *et al.* (2019) 'Dual Functions of Microglia in Ischemic Stroke', *Neuroscience Bulletin*, 35(5), pp. 921–933. Available at: https://doi.org/10.1007/s12264-019-00388-3.

Qiu, Y. *et al.* (2021) 'Immune Cells in the BBB Disruption After Acute Ischemic Stroke: Targets for Immune Therapy?', *Frontiers in Immunology*, 12. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.678744 (Accessed: 25 August 2022).

Quinn, T.J. *et al.* (2009) 'Reliability of the modified Rankin Scale: a systematic review', *Stroke*, 40(10), pp. 3393–3395. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.557256.

R

Radak, D. *et al.* (2017) 'Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke', *Current Vascular Pharmacology*, 15(2), pp. 115–122. Available at: https://doi.org/10.2174/1570161115666161104095522.

Rajan, W.D. *et al.* (2020) 'Defining molecular identity and fates of CNS-border associated macrophages after ischemic stroke in rodents and humans', *Neurobiology of Disease*, 137, p. 104722. Available at: https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104722.

Raychev, R. and Saver, J.L. (2012) 'Mechanical thrombectomy devices for treatment of stroke', *Neurology: Clinical Practice*, 2(3), pp. 231–235. Available at: https://doi.org/10.1212/CPJ.0b013e31826af206.

Rehni, A.K. *et al.* (2017) 'Diabetic aggravation of stroke and animal models', *Experimental Neurology*, 292, pp. 63–79. Available at: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.03.004.

Rexrode, K.M. *et al.* (1997) 'A Prospective Study of Body Mass Index, Weight Change, and Risk of Stroke in Women', *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 277(19), p. 1539. Available at: https://doi.org/10.1001/jama.1997.03540430051032.

Rezaeitalab, F. *et al.* (2020) 'Predictive value of inflammatory markers for functional outcomes in patients with ischemic stroke', *Current Journal of Neurology*, 19(2), pp. 47–52. Available at: https://doi.org/10.18502/cjn.v19i2.4940.

Riedel, C.H. *et al.* (2011) 'The importance of size: successful recanalization by intravenous thrombolysis in acute anterior stroke depends on thrombus length', *Stroke*, 42(6), pp. 1775–1777. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.609693.

Rijken, D.C. *et al.* (1979) 'Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 580(1), pp. 140–153. Available at: https://doi.org/10.1016/0005-2795(79)90205-8.

Rijken, D.C. and Collen, D. (1981) 'Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture.', *Journal of Biological Chemistry*, 256(13), pp. 7035–7041.

Rijken, D.C., Hoylaerts, M. and Collen, D. (1982) 'Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator', *The Journal of Biological Chemistry*, 257(6), pp. 2920–2925.

Rijken, D.C. and Lijnen, H.R. (2009) 'New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(1), pp. 4–13. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03220.x.

Roaldsen, M.B., Lindekleiv, H. and Mathiesen, E.B. (2021) 'Intravenous thrombolytic treatment and endovascular thrombectomy for ischaemic wake-up stroke', *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, p. CD010995. Available at: https://doi.org/10.1002/14651858.CD010995.pub3.

Rogove, A.D. *et al.* (1999) 'Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system', *Journal of Cell Science*, 112 (Pt 22), pp. 4007–4016.

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. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.29.10.2189.

Rosso, C. *et al.* (2018) 'The silver effect of admission glucose level on excellent outcome in thrombolysed stroke patients', *Journal of Neurology*, 265(7), pp. 1684–1689. Available at: https://doi.org/10.1007/s00415-018-8896-6.

Rouf, S.A., Moo-Young, M. and Chisti, Y. (1996) 'Tissue-type plasminogen activator: Characteristics, applications and production technology', *Biotechnology Advances*, 14(3), pp. 239–266. Available at: https://doi.org/10.1016/0734-9750(96)00019-5.

Roussel, B.D. *et al.* (2011) 'HMGB-1 promotes fibrinolysis and reduces neurotoxicity mediated by tissue plasminogen activator.', *Journal of cell science*, 124(Pt 12), pp. 2070–6. Available at: https://doi.org/10.1242/jcs.084392.

S

Saand, A.R. *et al.* (2019) 'Systemic inflammation in hemorrhagic strokes - A novel neurological sign and therapeutic target?', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 39(6), pp. 959–988. Available at: https://doi.org/10.1177/0271678X19841443.

Sabetghadam, M. *et al.* (2020) 'Evidence for a Beneficial Effect of Oral N-acetylcysteine on Functional Outcomes and Inflammatory Biomarkers in Patients with Acute Ischemic Stroke',

Neuropsychiatric Disease and Treatment, 16, pp. 1265–1278. Available at: https://doi.org/10.2147/NDT.S241497.

Sallés, F.J. and Strickland, S. (2002) 'Localization and Regulation of the Tissue Plasminogen Activator–Plasmin System in the Hippocampus', *The Journal of Neuroscience*, 22(6), pp. 2125–2134. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-06-02125.2002.

Salman, Mohd. *et al.* (2022) 'Acute Hyperglycemia Exacerbates Hemorrhagic Transformation after Embolic Stroke and Reperfusion with tPA: A Possible Role of TXNIP-NLRP3 Inflammasome', *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 31(2), p. 106226. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.106226.

Samson, A.L. *et al.* (2008) 'Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function', *Journal of Neurochemistry*, 107(4), pp. 1091–1101. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05687.x.

Samson, A.L. *et al.* (2015) 'MouseMove: an open source program for semi-automated analysis of movement and cognitive testing in rodents', *Scientific Reports*, 5. Available at: https://doi.org/10.1038/srep16171.

Sandset, E.C. and Tsivgoulis, G. (2022) 'Tenecteplase for acute ischaemic stroke', *The Lancet*, 400(10347), pp. 138–139. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01107-2.

Sandu, R.E. *et al.* (2015) 'Neuroinflammation and comorbidities are frequently ignored factors in CNS pathology', *Neural Regeneration Research*, 10(9), pp. 1349–1355. Available at: https://doi.org/10.4103/1673-5374.165208.

Saver, J.L. (2006) 'Time Is Brain—Quantified', *Stroke*, 37(1), pp. 263–266. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000196957.55928.ab.

Scheen, A.J. (2019) '[Alcohol, protective or risk factor for cardiovascular disease ?]', *Revue Medicale De Liege*, 74(5–6), pp. 314–320.

Schilling, M. *et al.* (2003) 'Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice', *Experimental Neurology*, 183(1), pp. 25–33. Available at: https://doi.org/10.1016/s0014-4886(03)00082-7.

Schuhmann, M.K. *et al.* (2017) 'Blocking of platelet glycoprotein receptor Ib reduces "thrombo-inflammation" in mice with acute ischemic stroke', *Journal of Neuroinflammation*, 14, p. 18. Available at: https://doi.org/10.1186/s12974-017-0792-y.

Schwalfenberg, G.K. (2021) 'N-Acetylcysteine: A Review of Clinical Usefulness (an Old Drug with New Tricks)', *Journal of Nutrition and Metabolism*. Edited by T. Emanuelli, 2021, pp. 1–13. Available at: https://doi.org/10.1155/2021/9949453.

Seeds, N.W., Basham, M.E. and Haffke, S.P. (1999) 'Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), pp. 14118–14123.

Seeds, N.W., Williams, B.L. and Bickford, P.C. (1995) 'Tissue plasminogen activator induction in Purkinje neurons after cerebellar motor learning', *Science (New York, N.Y.)*, 270(5244), pp. 1992–1994. Available at: https://doi.org/10.1126/science.270.5244.1992.

Seillier, C. *et al.* (2021) 'Roles of the tissue-type plasminogen activator in immune response', *Cellular Immunology*, p. 104451. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104451.

Seillier, C. *et al.* (2022) 'Targeting NMDA Receptors at the Neurovascular Unit: Past and Future Treatments for Central Nervous System Diseases', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), p. 10336. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms231810336.

Selmer, R. and Tverdal, A. (1995) 'Body mass index and cardiovascular mortality at different levels of blood pressure: a prospective study of Norwegian men and women.', *Journal of epidemiology and community health*, 49(3), pp. 265–70. Available at: https://doi.org/10.1136/jech.49.3.265.

Seto, A. *et al.* (2014) 'Induction of ischemic stroke in awake freely moving mice reveals that isoflurane anesthesia can mask the benefits of a neuroprotection therapy', *Frontiers in Neuroenergetics*, 6. Available at: https://doi.org/10.3389/fnene.2014.00001.

Sharp, C.D. *et al.* (2003) 'Human Neuroepithelial Cells Express NMDA Receptors', *BMC Neuroscience*, 4(1), p. 28. Available at: https://doi.org/10.1186/1471-2202-4-28.

Shi, K. *et al.* (2021) 'tPA Mobilizes Immune Cells That Exacerbate Hemorrhagic Transformation in Stroke', *Circulation Research*, 128(1), pp. 62–75. Available at: https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317596.

Shinton, R. and Beevers, G. (1989) 'Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke.', *BMJ (Clinical research ed.)*, 298(6676), pp. 789–94. Available at: https://doi.org/10.1136/bmj.298.6676.789.

Shuaib, A. *et al.* (2007) 'NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke', *The New England Journal of Medicine*, 357(6), pp. 562–571. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMoa070240.

Siao, C.-J., Fernandez, S.R. and Tsirka, S.E. (2003) 'Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(8), pp. 3234–42.

Siao, C.-J. and Tsirka, Stella E. (2002) 'Tissue Plasminogen Activator Mediates Microglial Activation via Its Finger Domain through Annexin II', *Journal of Neuroscience*, 22(9), pp. 3352–3358.

Siao, C.-J. and Tsirka, Stella E (2002) 'Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(9), pp. 3352–8. Available at: https://doi.org/20026281.

Silverman, G.A. *et al.* (2001) 'The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature.', *The Journal of biological chemistry*, 276(36), pp. 33293–6. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.R100016200.

Simats, A. and Liesz, A. (2022) 'Systemic inflammation after stroke: implications for post-stroke comorbidities', *EMBO molecular medicine*, 14(9), p. e16269. Available at: https://doi.org/10.15252/emmm.202216269.

Smedsrød, B., Einarsson, M. and Pertoft, H. (1988) 'Tissue plasminogen activator is endocytosed by mannose and galactose receptors of rat liver cells.', *Thrombosis and haemostasis*, 59(3), pp. 480–4.

Smith, A.G. and Rowland Hill, C. (2017) 'Imaging assessment of acute ischaemic stroke: a review of radiological methods', *The British Journal of Radiology*, p. 20170573. Available at: https://doi.org/10.1259/bjr.20170573.

Smith, A.M. and Dragunow, M. (2014) 'The human side of microglia', *Trends in Neurosciences*, 37(3), pp. 125–135. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.12.001.

Sobrino, T. *et al.* (2010) 'Association of growth factors with arterial recanalization and clinical outcome in patients with ischemic stroke treated with tPA', *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 8(7), pp. 1567–1574. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03897.x.

Sochman, J. (2002) 'N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later: What do we know and what would we like to know?!', *Journal of the American College of Cardiology*, 39(9), pp. 1422–1428. Available at: https://doi.org/10.1016/S0735-1097(02)01797-7.

Sommer, C.J. (2017) 'Ischemic stroke: experimental models and reality', *Acta Neuropathologica*, 133(2), pp. 245–261. Available at: https://doi.org/10.1007/s00401-017-1667-0.

Soreq, H. and Miskin, R. (1981) 'Plasminogen activator in the rodent brain', *Brain Research*, 216(2), pp. 361–374. Available at: https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90138-4.

Spronk, E. *et al.* (2021a) 'Hemorrhagic Transformation in Ischemic Stroke and the Role of Inflammation', *Frontiers in Neurology*, 12. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2021.661955 (Accessed: 1 November 2022).

Spronk, E. *et al.* (2021b) 'Hemorrhagic Transformation in Ischemic Stroke and the Role of Inflammation', *Frontiers in Neurology*, 12, p. 661955. Available at: https://doi.org/10.3389/fneur.2021.661955.

Stankiewicz, T.R. and Linseman, D.A. (2014) 'Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, p. 314. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00314.

Strolinsky, D.C. *et al.* (1972) 'Streptozotocin in the treatment of cancer: phase II study', *Cancer*, 30(1), pp. 61–67. Available at: https://doi.org/10.1002/1097-0142(197207)30:1<61::aid-cncr2820300110>3.0.co;2-o.

Sturgeon, J.D. *et al.* (2008) 'Hemostatic and Inflammatory Risk Factors for Intracerebral Hemorrhage in a Pooled Cohort', *Stroke*, 39(8), pp. 2268–2273. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.505800.

Su, E.J. *et al.* (2008) 'Activation of PDGF-CC by Tissue Plasminogen Activator Impairs Blood Brain Barrier Integrity During Ischemic Stroke', *Nature medicine*, 14(7), pp. 731–737. Available at: https://doi.org/10.1038/nm1787.

Suissa, L. *et al.* (2020) 'Effect of hyperglycemia on stroke outcome is not homogeneous to all patients treated with mechanical thrombectomy', *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 194, p. 105750. Available at: https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.105750.

Suofu, Y. *et al.* (2012) 'Matrix metalloproteinase-2 or -9 deletions protect against hemorrhagic transformation during early stage of cerebral ischemia and reperfusion', *Neuroscience*, 212, pp. 180–189. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.036.

Suzuki, H. *et al.* (1999) 'Anti-P-selectin antibody attenuates rat brain ischemic injury', *Neuroscience Letters*, 265(3), pp. 163–166. Available at: https://doi.org/10.1016/s0304-3940(99)00229-3.

Suzuki, Y. *et al.* (2007) 'Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice', *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 5(8), pp. 1732–1739. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02628.x.

Suzuki, Y., Nagai, N. and Umemura, K. (2016) 'A Review of the Mechanisms of Blood-Brain Barrier Permeability by Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment for Cerebral Ischemia', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00002.

T

Tamura, A. *et al.* (1981) 'Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1(1), pp. 53–60. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.1981.6.

Tanaka, Y. *et al.* (1999) 'Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), pp. 10857–10862. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10857.

Teesalu, T. *et al.* (2004) 'Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system', *Thrombosis and Haemostasis*, 92(2), pp. 358–368. Available at: https://doi.org/10.1160/TH02-12-0310.

Terruso, V. *et al.* (2009) 'Frequency and determinants for hemorrhagic transformation of cerebral infarction', *Neuroepidemiology*, 33(3), pp. 261–265. Available at: https://doi.org/10.1159/000229781.

Thelengana, A. *et al.* (2018) 'Tenecteplase versus alteplase in acute ischemic stroke: systematic review and meta-analysis', *Acta Neurologica Belgica* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1007/s13760-018-0933-9.

Thelwell, C. and Longstaff, C. (2007) 'The regulation by fibrinogen and fibrin of tissue plasminogen activator kinetics and inhibition by plasminogen activator inhibitor 1', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(4), pp. 804–811. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02422.x.

Thewke, D.P. and Seeds, N.W. (1999) 'The expression of mRNAs for hepatocyte growth factor/scatter factor, its receptor c-met, and one of its activators tissue-type plasminogen activator show a systematic relationship in the developing and adult cerebral cortex and hippocampus', *Brain Research*, 821(2), pp. 356–367. Available at: https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01115-4.

Thiebaut, A.M. *et al.* (2018) 'The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond', *The Lancet Neurology*, 17(12), pp. 1121–1132. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30323-5.

Thomalla, G. *et al.* (2007) 'Two Tales: Hemorrhagic Transformation but Not Parenchymal Hemorrhage After Thrombolysis Is Related to Severity and Duration of Ischemia', *Stroke*, 38(2), pp. 313–318. Available at: https://doi.org/10.1161/01.STR.0000254565.51807.22.

Thomalla, G. *et al.* (2018) 'MRI-Guided Thrombolysis for Stroke with Unknown Time of Onset', *The New England Journal of Medicine*, 379(7), pp. 611–622. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMoa1804355.

Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke | NEJM (no date). Available at: https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm199512143332401 (Accessed: 24 August 2022).

Trotter, J.H. *et al.* (2014) 'Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation', *Neuroscience*, 274, pp. 299–307. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.046.

Tschoe, C. *et al.* (2020) 'Neuroinflammation after Intracerebral Hemorrhage and Potential Therapeutic Targets', *Journal of Stroke*, 22(1), pp. 29–46. Available at: https://doi.org/10.5853/jos.2019.02236.

Tsirka, S.E. *et al.* (1995) 'Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator', *Nature*, 377(6547), pp. 340–344. Available at: https://doi.org/10.1038/377340a0.

Tsivgoulis, G. *et al.* (2019) 'Association of Baseline Hyperglycemia With Outcomes of Patients With and Without Diabetes With Acute Ischemic Stroke Treated With Intravenous Thrombolysis: A Propensity Score-Matched Analysis From the SITS-ISTR Registry', *Diabetes*, 68(9), pp. 1861–1869. Available at: https://doi.org/10.2337/db19-0440.

Tuneva, E.O., Bychkova, O.N. and Boldyrev, A.A. (2003) 'Effect of NMDA on production of reactive oxygen species by human lymphocytes', *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 136(2), pp. 159–161. Available at: https://doi.org/10.1023/a:1026366907084.

Turner, R.C. *et al.* (1999) 'Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group', *JAMA*, 281(21), pp. 2005–2012. Available at: https://doi.org/10.1001/jama.281.21.2005.

Tziomalos, K. *et al.* (2017) 'Stress hyperglycemia and acute ischemic stroke in-hospital outcome', *Metabolism*, 67, pp. 99–105. Available at: https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.11.011.

U

Uemura, T. *et al.* (2018) 'Protective Effects of Brain Infarction by N-Acetylcysteine Derivatives', *Stroke*, 49(7), pp. 1727–1733. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.021755.

Unnithan, A.K.A., M Das, J. and Mehta, P. (2022) 'Hemorrhagic Stroke', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559173/ (Accessed: 9 November 2022).

Usuki, S. *et al.* (2007) 'Effect of pre-germinated brown rice intake on diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats', *Nutrition & Metabolism*, 4, p. 25. Available at: https://doi.org/10.1186/1743-7075-4-25.

V

Van de Werf, F., Nobuhara, M. and Collen, D. (1986) 'Coronary thrombolysis with human single-chain, urokinase-type plasminogen activator (pro-urokinase) in patients with acute myocardial infarction', *Annals of Internal Medicine*, 104(3), pp. 345–348. Available at: https://doi.org/10.7326/0003-4819-104-3-345.

Varadharajan, S. *et al.* (2016) 'Computed tomography angiography in acute stroke (revisiting the 4Ps of imaging)', *The American Journal of Emergency Medicine*, 34(2), pp. 282–287. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ajem.2015.10.056.

Vaughan, D.E. (2011) 'PAI-1 antagonists: the promise and the peril.', *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 122, pp. 312–25.

Vavra, J.J. *et al.* (1959) 'Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic', *Antibiotics Annual*, 7, pp. 230–235.

Verstraete, M. *et al.* (1985) 'Pharmacokinetics and systemic fibrinogenolytic effects of recombinant human tissue-type plasminogen activator (rt-PA) in humans', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 235(2), pp. 506–512.

Vivien, D. *et al.* (2011) 'Impact of Tissue Plasminogen Activator on the Neurovascular Unit: From Clinical Data to Experimental Evidence', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(11), pp. 2119–2134. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.127.

Voors-Pette, C. et al. (2019) 'Safety and Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of ACT017, an Antiplatelet GPVI (Glycoprotein VI) Fab', Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 39(5), pp. 956–964. Available at: https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.312314.

W

Wang, D.T. *et al.* (2015) 'Successful recanalization post endovascular therapy is associated with a decreased risk of intracranial haemorrhage: a retrospective study', *BMC Neurology*, 15(1), p. 185. Available at: https://doi.org/10.1186/s12883-015-0442-x.

Wang, X. *et al.* (2003) 'Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator', *Nature Medicine*, 9(10), pp. 1313–1317. Available at: https://doi.org/10.1038/nm926.

Wang, Y.F. *et al.* (1998) 'Tissue plasminogen activator (tPA) increase neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice', *Nature medicine*, 4(2), pp. 228–231.

Wanrooy, B.J., Wen, S.W. and Wong, C.H. (2021) 'Dynamic roles of neutrophils in post-stroke neuroinflammation', *Immunology & Cell Biology*, 99(9), pp. 924–935. Available at: https://doi.org/10.1111/imcb.12463.

Warach, S.J., Dula, A.N. and Milling, T.J. (2020) 'Tenecteplase Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke', *Stroke*, 51(11), pp. 3440–3451. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.029749.

Warach, S.J. and Saver, J.L. (2020) 'Stroke Thrombolysis With Tenecteplase to Reduce Emergency Department Spread of Coronavirus Disease 2019 and Shortages of Alteplase', *JAMA Neurology*, 77(10), pp. 1203–1204. Available at: https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.2396.

Warburton, E. *et al.* (2011) 'Stroke management', *BMJ clinical evidence*, 2011, p. 0201.

Wardlaw, J.M. *et al.* (2012) 'Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis', *The Lancet*, 379(9834), pp. 2364–2372. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60738-7.

Wardlaw, J.M. *et al.* (2014) 'Thrombolysis for acute ischaemic stroke', *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1002/14651858.CD000213.pub3.

Ware, J.H., Dibenedetto, A.J. and Pittman, R.N. (1995) 'Localization of tissue plasminogen activator mRNA in adult rat brain', *Brain Research Bulletin*, 37(3), pp. 275–281. Available at: https://doi.org/10.1016/0361-9230(95)00008-3.

Weide, L.G. and Lacy, P.E. (1991) 'Low-dose streptozocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model', *Diabetes*, 40(9), pp. 1157–1162. Available at: https://doi.org/10.2337/diab.40.9.1157.

Weimar, W. *et al.* (1981) 'Specific lysis of an iliofemoral thrombus by administration of extrinsic (tissue-type) plasminogen activator', *Lancet (London, England)*, 2(8254), pp. 1018–1020. Available at: https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)91217-4.

Weiss, N. *et al.* (2009) 'The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1788(4), pp. 842–857. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.022.

Whiteley, W.N. *et al.* (2016) 'Risk of intracerebral haemorrhage with alteplase after acute ischaemic stroke: a secondary analysis of an individual patient data meta-analysis', *The Lancet. Neurology*, 15(9), pp. 925–933. Available at: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30076-X.

Williams, L.S. *et al.* (2002) 'Effects of admission hyperglycemia on mortality and costs in acute ischemic stroke', *Neurology*, 59(1), pp. 67–71. Available at: https://doi.org/10.1212/wnl.59.1.67.

Won, S.J. *et al.* (2011) 'Hyperglycemia promotes tPA-induced hemorrhage by promoting superoxide production', *Annals of neurology*, 70(4), pp. 583–590. Available at: https://doi.org/10.1002/ana.22538.

Wu, D. *et al.* (2002) 'Inhibition of Platelet Glycoprotein Ib, Glycoprotein IIb/IIIa, or Both by Monoclonal Antibodies Prevents Arterial Thrombosis in Baboons', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(2), pp. 323–328. Available at: https://doi.org/10.1161/hq0202.102321.

Wu, F. *et al.* (2012) 'Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(29), pp. 9848–58. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1241-12.2012.

Wu, F. *et al.* (2013) 'Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway', *Molecular and Cellular Neurosciences*, 52, pp. 9–19. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.10.001.

Wu, F. *et al.* (2015) 'Tissue-Type Plasminogen Activator Triggers the Synaptic Vesicle Cycle in Cerebral Cortical Neurons', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(12), pp. 1966–1976. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.155.

Wu, K.K. and Huan, Y. (2007) 'Diabetic atherosclerosis mouse models', *Atherosclerosis*, 191(2), pp. 241–249. Available at: https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.030.

Wu, K.K. and Huan, Y. (2008) 'Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats', *Current Protocols in Pharmacology*, 40(1), p. 5.47.1-5.47.14. Available at: https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s40.

Wyseure, T. *et al.* (2015) 'Innovative thrombolytic strategy using a heterodimer diabody against TAFI and PAI-1 in mouse models of thrombosis and stroke', *Blood*, 125(8), pp. 1325–1332. Available at: https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-588319.

X

Xie, L., Kang, H. and Nedergaard, M. (2016) 'A Novel Model of Transient Occlusion of the Middle Cerebral Artery in Awake Mice', *Journal of Nature and Science*, 2(2).

Y

Yaghi, S., Willey, J.Z., Cucchiara, B., Goldstein, J.N., Gonzales, N.R., Khatri, P., Kim, L.J., Mayer, S.A., Sheth, K.N., Schwamm, L.H., *et al.* (2017) 'Treatment and Outcome of Hemorrhagic Transformation After Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association', *Stroke*, 48(12), pp. e343–e361. Available at: https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000152.

Yaghi, S., Willey, J.Z., Cucchiara, B., Goldstein, J.N., Gonzales, N.R., Khatri, P., Kim, L.J., Mayer, S.A., Sheth, K.N. and Schwamm, L.H. (2017) 'Treatment and Outcome of Hemorrhagic Transformation After Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association', *Stroke*, 48(12). Available at: https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000152.

Yamamoto, Y. *et al.* (2012) 'Matrix metalloprotein-9 activation under cell-to-cell interaction between endothelial cells and monocytes: possible role of hypoxia and tumor necrosis factor-α', *Heart and Vessels*, 27(6), pp. 624–633. Available at: https://doi.org/10.1007/s00380-011-0214-5.

Yang, Y. *et al.* (2007) 'Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(4), pp. 697–709. Available at: https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600375.

Yang, Y. and Rosenberg, G.A. (2011) 'Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease', *Stroke*, 42(11), pp. 3323–3328. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.608257.

Yang-Feng, T.L. *et al.* (no date) 'Human Tissue-Type Plasminogen Activator Gene Located Near Chromosomal Breakpoint in Myeloproliferative Disorder', p. 9.

Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, Elizabeth G., *et al.* (2003) 'Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein', *The Journal of Clinical Investigation*, 112(10), pp. 1533–1540. Available at: https://doi.org/10.1172/JCI19212.

Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, Elizabeth G, *et al.* (2003) 'Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein.', *The Journal of clinical investigation*, 112(10), pp. 1533–40. Available at: https://doi.org/10.1172/JCI19212.

Yepes, M. (2015) 'Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the central nervous system', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, p. 304. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00304.

Yepes, M. *et al.* (2016) 'Tissue-type plasminogen activator induces synaptic vesicle endocytosis in cerebral cortical neurons', *Neuroscience*, 319, pp. 69–78. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.046.

Yip, H.-K. *et al.* (2016) 'Tissue plasminogen activator deficiency preserves neurological function and protects against murine acute ischemic stroke', *International Journal of Cardiology*, 205, pp. 133–141. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.11.168.

You, R.X. *et al.* (1999) 'Ischemic stroke risk and passive exposure to spouses' cigarette smoking. Melbourne Stroke Risk Factor Study (MERFS) Group.', *American Journal of Public Health*, 89(4), pp. 572–575. Available at: https://doi.org/10.2105/AJPH.89.4.572.

Z

Zabala, A. *et al.* (2020) 'Risk of first stroke in people with type 2 diabetes and its relation to glycaemic control: A nationwide observational study', *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 22(2), pp. 182–190. Available at: https://doi.org/10.1111/dom.13885.

Zaleska, M.M. *et al.* (2009) 'The development of stroke therapeutics: promising mechanisms and translational challenges', *Neuropharmacology*, 56(2), pp. 329–341. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.10.006.

Zalewski, J. and Nessler, J. (2011) '[The endogenous cardioprotection during reperfusion in acute myocardial infarction]', *Kardiologia Polska*, 69 Suppl 3, pp. 67–74.

Zechariah, A., ElAli, A., Hagemann, N., *et al.* (2013) 'Hyperlipidemia attenuates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis, impairs cerebral blood flow, and disturbs stroke recovery via decreased pericyte coverage of brain endothelial cells', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(7), pp. 1561–1567. Available at: https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300749.

Zechariah, A., ElAli, A., Doeppner, T.R., *et al.* (2013) 'Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Pericyte Coverage of Brain Capillaries, Improves Cerebral Blood Flow During Subsequent Focal Cerebral Ischemia, and Preserves the Metabolic Penumbra', *Stroke*, 44(6), pp. 1690–1697. Available at: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.000240.

Zenych, A., Fournier, L. and Chauvierre, C. (2020) 'Nanomedicine progress in thrombolytic therapy', *Biomaterials*, 258, p. 120297. Available at: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120297.

Zhang, C. *et al.* (2009) 'The Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Mediates Tissue-Type Plasminogen Activator-Induced Microglial Activation in the Ischemic Brain', *The American Journal of Pathology*, 174(2), pp. 586–594. Available at: https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080661.

Zhang, C. *et al.* (2018) 'Invasion of Peripheral Immune Cells into Brain Parenchyma after Cardiac Arrest and Resuscitation', *Aging and Disease*, 9(3), pp. 412–425. Available at: https://doi.org/10.14336/AD.2017.0926.

Zhang, D. *et al.* (2021) 'T Cell Response in Ischemic Stroke: From Mechanisms to Translational Insights', *Frontiers in Immunology*, 12. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.707972 (Accessed: 25 August 2022).

Zhang, J. *et al.* (2014) 'Hemorrhagic transformation after cerebral infarction: current concepts and challenges', *Annals of Translational Medicine*, 2(8), p. 81. Available at: https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.08.08.

Zhang, R.L. *et al.* (1994) 'Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat', *Neurology*, 44(9), pp. 1747–1751. Available at: https://doi.org/10.1212/wnl.44.9.1747.

Zhang, Z.G. *et al.* (2000) 'VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain', *The Journal of Clinical Investigation*, 106(7), pp. 829–838. Available at: https://doi.org/10.1172/JCI9369.

Zhang, Z.G. *et al.* (2002) 'Correlation of VEGF and Angiopoietin Expression with Disruption of Blood–Brain Barrier and Angiogenesis after Focal Cerebral Ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 22(4), pp. 379–392. Available at: https://doi.org/10.1097/00004647-200204000-00002.

Zhao, B.-Q. *et al.* (2006) 'Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke', *Nature Medicine*, 12(4), pp. 441–445. Available at: https://doi.org/10.1038/nm1387.

Zhou, H.M. *et al.* (2001) 'Overexpression of plasminogen activator inhibitor type 2 in basal keratinocytes enhances papilloma formation in transgenic mice', *Cancer Research*, 61(3), pp. 970–976.

Zhu, J. *et al.* (2019) 'The role of endogenous tissue-type plasminogen activator in neuronal survival after ischemic stroke: friend or foe?', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(8), pp. 1489–1506. Available at: https://doi.org/10.1007/s00018-019-03005-8.

Zhuo, M. *et al.* (2000) 'Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(2), pp. 542–9.

Zinkstok, S.M. and Roos, Y.B. (2012) 'Early administration of aspirin in patients treated with alteplase for acute ischaemic stroke: a randomised controlled trial', *The Lancet*, 380(9843), pp. 731–737. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60949-0.

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. Available at: https://doi.org/10.1161/01.str.22.10.1276.

del Zoppo, G.J. *et al.* (2012) 'Microglial Cell Activation is a Source of Metalloproteinase Generation during Hemorrhagic Transformation', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(5), pp. 919–932. Available at: https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.11.

Amélioriation de la valeur prédictive des modèles animaux dans la recherche sur l'accident vasculaire cérébral (AVC) avec l'utilisation d'un modèle de diabète murin insulinodépendant pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques

Résumé

Les AVC ischémiques, l'une des principales causes de décès et d'invalidité dans le monde, surviennent principalement chez le sujet âgé atteint de pathologies concomitantes dites comorbidités. Or des années durant, les études précliniques ont testé des molécules thérapeutiques sur des animaux mâles, jeunes et en bonne santé, aboutissant à des prédictions précliniques erronées sur le potentiel chez l'Homme des traitements expérimentaux prometteurs. Ainsi, tous les traitements évalués chez l'animal ont échoué en phase clinique, excepté l'Altéplase (rtPA), seul traitement autorisé pour la phase aigüe de l'AVC ischémique à l'heure actuelle. Cependant, l'administration de rtPA en clinique est à l'origine d'un risque accru de transformation hémorragique (TH), complication majeure menaçant la survie des patients, exacerbé chez le patient diabétique. C'est pourquoi l'élaboration d'un modèle d'AVC ischémique sur des animaux développant un diabète chronique s'avère nécessaire. Dans le but de développer un modèle préclinique pertinent permettant de tester l'efficacité et l'innocuité de nouvelles stratégies thérapeutiques, nous avons induit le diabète de type 1, par injections répétées de streptozotocine, à des souris Swiss mâles avant de leur induire un AVC ischémique proche de la physiopathologie humaine.

Nos résultats montrent que les animaux sans comorbidité présentent une réduction des volumes de lésions cérébrales ainsi qu'une amélioration de la récupération fonctionnelle suite à la recanalisation induite par le rtPA. Les animaux diabétiques présentent quant à eux des lésions plus importantes et des déficits sensorimoteurs plus marqués. De plus, nous avons constaté que le rtPA n'améliore pas la taille des lésions et la récupération neurologique tout en favorisant l'apparition de transformations hémorragiques. Ces résultats, proches de ceux observés en clinique, confirment la valeur translationnelle du modèle puisqu'il permet de modéliser différents effets connus du diabète sur la physiopathologie de l'AVC chez l'Homme.

En l'absence d'effets bénéfiques du rtPA pour la population diabétique, deux stratégies thérapeutiques ont été testées. La n-acétyl-cystéine (NAC), qui avait prouvé ses effets bénéfiques dans le cadre de l'AVC préclinique chez l'animal normo-glycémique, a permis de réduire significativement les tailles de lésions et d'améliorer la récupération fonctionnelle chez les animaux diabétiques. Le Glunomab, un anticorps qui bloque l'interaction délétère du tPA avec les récepteurs NMDA, a permis de limiter drastiquement les dommages ischémiques tout en reversant les effets non-désirés du rtPA comme les TH et la sur-inflammation.

Ainsi, nous disposons désormais d'un modèle expérimental permettant d'une part, d'étudier les mécanismes mal connus qui sous-tendent les effets du diabète sur l'évolution et la prise en charge de l'AVC, et d'autre part qui s'avère utile pour les tests des thérapeutiques de demain.

Improving the predictive value of animal models in stroke research with the use of an insulin-dependent murine diabetes model to test new therapeutic strategies

Abstract

Ischemic strokes, one of the main causes of death and disability worldwide, occur mainly in the elderly with concomitant pathologies called comorbidities. However, for years, preclinical studies have tested therapeutic molecules on young, healthy male animals, leading to erroneous preclinical predictions about the potential of promising experimental treatments in humans. Thus, all the treatments evaluated in animals have failed in the clinical phase, except for alteplase (rtPA), the only treatment authorized for the acute phase of ischemic stroke at present. However, the administration of rtPA in the clinic is at the origin of an increased risk of haemorrhagic transformation (HT), a major complication threatening the survival of patients, exacerbated in diabetic patients. This is why the development of a model of ischemic stroke on animals developing chronic diabetes is necessary. In order to develop a relevant preclinical model to test the efficacy and safety of new therapeutic strategies, we induced type 1 diabetes, by repeated injections of streptozotocin, in male Swiss mice before inducing an ischemic stroke close to human pathophysiology.

Our results show that animals without comorbidity exhibit reduced brain lesion volumes as well as improved functional recovery following rtPA-induced recanalization. Diabetic animals, on the other hand, present more significant lesions and more marked sensorimotor deficits. Furthermore, we found that rtPA does not improve lesion size and neurological recovery while promoting the onset of hemorrhagic transformations. These results, close to those observed in the clinic, confirm the translational value of the model since it makes it possible to model various known effects of diabetes on the pathophysiology of stroke in humans.

In the absence of beneficial effects of rtPA for the diabetic population, two therapeutic strategies have been tested. N-acetyl-cysteine (NAC), which had proven its beneficial effects in the context of preclinical stroke in normoglycemic animals, known to reduce significantly the size of lesions and improve functional recovery in diabetic animals. Glunomab, an antibody that blocks the deleterious interaction of tPA with NMDA receptors, drastically limits ischemic damage while reversing the unwanted effects of rtPA such as HT and over-inflammation.

Thus, we now have an experimental model allowing on the one hand, to study the poorly understood mechanisms underlying the effects of diabetes on the evolution and management of stroke, and on the other hand which proves to be useful for testing the therapies of tomorrow.