



**HAL**  
open science

# Étude de l'activation endothéliale post-hémorragie sous-arachnoïdienne : apport à la compréhension de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale retardée

Suzanne Goursaud

► **To cite this version:**

Suzanne Goursaud. Étude de l'activation endothéliale post-hémorragie sous-arachnoïdienne : apport à la compréhension de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale retardée. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2024. Français. NNT : 2024NORMC403 . tel-04573647

**HAL Id: tel-04573647**

**<https://theses.hal.science/tel-04573647>**

Submitted on 13 May 2024

**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.

# THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Préparée au sein de l'**Université de Caen Normandie**

**Etude de l'activation endothéliale post-hémorragie sous-arachnoïdienne : apport à la compréhension de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale retardée**

Présentée et soutenue par  
**SUZANNE GOURSAUD**

**Thèse soutenue le 29/03/2024**  
devant le jury composé de :

MME CARINE ALI	Professeur des universités - Université de Caen Normandie	Directeur de thèse
M. OLIVIER COUTURE	Directeur de recherche - Sorbonne Université	Membre du jury
M. DAMIEN DU CHEYRON	Professeur des universités PraticienHosp - CHU de Caen	Membre du jury
M. PETER LENTING	Directeur de recherche à l'INSERM - UNIVERSITE PARIS 11 PARIS-SUD	Membre du jury
MME SARA MARTINEZ DE LIZARRONDO	Chargée de recherche - Université de Caen Normandie	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp - Université de Caen Normandie	Membre du jury
M. AYMERIC ROUCHAUD	Professeur des universités PraticienHosp - CHU de Limoges	Rapporteur du jury
MME ANNE-CLÉMENCE VION	Chargé de recherche au CNRS - Université Nantes	Rapporteur du jury

Thèse dirigée par **CARINE ALI** (Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques)



## Remerciements

*Un grand merci à Mme Anne-clémence Vion et Mr Aymeric Rouchaud qui me font l'honneur d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci à Mr Olivier Couture, Mr Peter Lenting qui me font l'honneur de faire partie de mon jury. Merci à vous pour l'attention et le temps que vous avez consacré à ce travail.*

*Denis, un grand merci à toi de m'avoir accueillie au laboratoire. Merci pour ta confiance et surtout ton grand intérêt pour la clinique.*

*Sara, un grand merci à toi, la meilleure cheffe dont on puisse rêver. Tout d'abord merci d'avoir accepté de m'accompagner, me guider durant ces années de thèse. Tu as accepté de me guider au laboratoire dans ce projet, bien que mon travail au CHU impose beaucoup de contraintes, d'absences. Merci pour ta compréhension et ton adaptation aux circonstances pandémiques ou personnelles qui ont pu retarder l'avancement de notre travail. Merci pour cette aventure humaine, teintée de bienveillance. Enfin, la rigueur de ton travail est et restera un exemple pour moi, que je m'efforcerai de conserver et de transmettre.*

*Carine, merci de t'être engagée à diriger ma thèse. Tu as toujours été très compréhensive face aux contraintes professionnelles que j'ai pu avoir. Durant mon année de master 2 déjà, ta gentillesse et ta bienveillance envers moi m'avaient marquée. Je suis consciente de la chance que j'ai eu de vous avoir, Sara et toi dans notre équipe « des belettes ». Merci pour tout...*

*Damien, sans toi je n'aurais jamais eu l'audace de me lancer dans ce projet de thèse. Tu m'as poussée puis soutenue dans ce projet. Ton intérêt pour la recherche fondamentale, associé à ton investissement « au lit du malade », m'ont inspirée. Ainsi, pour toi, pour le service, j'espère être à la hauteur pour transmettre aux plus jeunes l'envie de découvrir le travail au laboratoire, l'humilité et la curiosité que cela impose.*

*Maxime, un grand merci à toi bien sûr qui est, avec Sara, l'autre « cerveau » de cette affaire. Comment regrouper autant de pertinence, de savoir, de rigueur scientifique, de modestie et de gentillesse en un seul homme. C'est une grande chance pour moi d'avoir pu côtoyer toutes ces qualités auprès de Sara et toi depuis quelques années.*

*Merci à toutes les personnes du laboratoire qui m'ont formée à différentes techniques et aidée au quotidien, en particulier Isa, Ben et Eric. Merci également à Marina pour sa bienveillance à*

*mon égard, sa gentillesse et son soutien. Merci à Fanny, Manu et Georges pour les travaux que nous avons fait ensemble, avec toujours beaucoup d'enthousiasme, et qui vont se poursuivre. Merci à Eloïse, Damien, Cyrille, Sandrine, Palma, Yannick, Véro et bien d'autres pour leur aide. Merci également aux personnels du CURB.*

*Merci à toi Clément pour m'avoir fait découvrir le laboratoire en m'accompagnant durant mon master 2, le premier chapitre d'une belle aventure pour moi.*

*Au service de Médecine Intensive et Réanimation. Merci en particulier Xavier, pour son soutien et pour avoir aménagé mon planning de service pour cette fin de thèse. Merci à mes collègues soignant(e)s et ami(e)s du 16.10, du 16.30 qui me soutiennent, dont certaines se reconnaîtront. Mes amis, merci d'être là, de rendre cette vie si colorée et merci pour votre soutien.*

*Ma famille, en particulier mes parents sans qui ce projet n'aurait jamais pu aboutir, grâce à leur aide et leur soutien au quotidien. Un immense merci à vous.*

*Aristide, Georges, Céleste et Joseph avec qui le quotidien est un peu fou mais tellement heureux et merveilleux, merci.*

*Et enfin pour toi, ma grand-mère adorée, qui vient de nous quitter...*

## AVANT-PROPOS

L'hémorragie sous-arachnoïdienne est une pathologie neurovasculaire aiguë responsable encore aujourd'hui d'une morbi-mortalité élevée. Il s'agit d'un accident vasculaire cérébral hémorragique dont la principale cause est la rupture d'un anévrisme intracrânien. C'est un motif d'admission fréquent en unité de soins intensifs et réanimation compte tenu de la gravité inhérente à cette pathologie, avec souvent la nécessité de supports d'organes. La physiopathologie de l'hémorragie sous-arachnoïdienne, ainsi que les complications qui peuvent survenir dans les suites, lui sont spécifiques. Ainsi, lorsque les patients survivent à la phase aiguë de l'hémorragie cérébrale initiale, leurs pronostics vital et fonctionnel vont ensuite dépendre de la survenue de complications secondaires avec en particulier l'occurrence possible d'une ischémie cérébrale retardée, complication la plus redoutée par les praticiens. En effet, la survenue d'ischémie cérébrale retardée dans les suites d'une hémorragie sous-arachnoïdienne est fréquente, et est la principale cause de handicap fonctionnel ou cognitif à long terme, avec bien sûr un impact médico-économique majeur. Bien que la prise en charge de l'hémorragie sous-arachnoïdienne ait évolué sur les dernières décennies notamment concernant le traitement causal de l'anévrisme, mais également la prise en charge symptomatique en soins intensifs (suppléances d'organes par exemple), la prise en charge de l'ischémie cérébrale retardée reste quant à elle un enjeu encore aujourd'hui. En effet, lorsque celle-ci survient, le constat pour les praticiens en charge des patients est celui de l'impossibilité d'engager des thérapeutiques curatives ayant fait réellement la preuve de leur efficacité. Seul un traitement préventif par administration de Nimodipine est recommandé en pratique clinique depuis plusieurs dizaines d'années, alors même que le nombre de patients qui vont développer une ischémie cérébrale secondaire reste malheureusement élevé autour de 30%. C'est pourquoi nous avons décidé de nous intéresser particulièrement à cette complication dans ce travail de thèse.

Malgré une littérature clinique mais également préclinique riche sur ce sujet *pourquoi ne trouve-t-on pas de traitement efficace pour, d'une part, mieux prévenir la survenue d'ischémie cérébrale retardée et d'autre part pouvoir envisager un traitement efficace lorsqu'elle survient ?* Une des réponses à cette question réside dans le fait qu'aujourd'hui, la physiopathologie de l'ischémie cérébrale retardée demeure mal élucidée. L'apparition d'une

ischémie, dans les suites d'un phénomène hémorragique initial, qui survient dans un territoire vasculaire qui peut être controlatéral à la lésion causale, rend cette complication tout à fait singulière. Malgré plusieurs mécanismes physiopathologiques qui se démarquent, il est encore difficile aujourd'hui d'en faire les liens. Ceci peut expliquer pourquoi, malgré le fait que de nombreuses classes thérapeutiques ciblées sur chacun des mécanismes impliqués aient été testées en recherche fondamentale, aucune d'entre elles n'a pu faire la preuve de son efficacité dans le domaine de l'ischémie retardée dans le cadre d'études cliniques de grande ampleur. C'est en ce sens que la première partie de notre introduction fait un état des connaissances sur ce qu'est l'ischémie cérébrale retardée, mais surtout ce que l'on sait aujourd'hui sur ses mécanismes physiopathologiques. Ainsi, cet état des connaissances va nous conduire à nous intéresser plus particulièrement à un mécanisme impliqué dans la survenue d'ischémie cérébrale secondaire qui est la thromboinflammation, par le biais de l'activation endothéliale. *Pourquoi s'intéresser à ce mécanisme plutôt qu'à un autre comme les dépolarisations corticales propagées par exemple ?* L'activation endothéliale est un mécanisme physiopathologique qui peut être caractérisé *in vivo* au niveau systémique mais également au niveau cérébral par plusieurs techniques que nous allons développer dans nos résultats. De ce fait, si nous émettons l'hypothèse que l'activation endothéliale et la thromboinflammation vont jouer un rôle clé, et ceci de façon précoce et/ou retardée, dans la survenue d'ischémie cérébrale, sa détection pourrait donc devenir un marqueur diagnostique mais également pronostic pertinent. En effet, alors même qu'en pratique clinique quotidienne, le diagnostic d'ischémie retardée est établi lorsque le patient présente un déficit neurologique brutal corrélé à la preuve d'une ischémie cérébrale déjà constituée à l'imagerie, le diagnostic s'avère être déjà tardif et souvent déjà au-delà de toute ressource thérapeutique. L'intérêt d'un diagnostic plus précoce paraît donc être un enjeu intéressant, ce d'autant que des perspectives thérapeutiques ayant pour cible la thromboinflammation pourraient également être envisagées. De plus, la disponibilité des techniques de détection *in vivo* de l'activation endothéliale, que ce soit dans le domaine de la recherche expérimentale ou clinique, rend plus aisée et pertinente la recherche translationnelle.

Dans un premier temps, le cœur de ce manuscrit va être la caractérisation d'un modèle murin d'hémorragie sous-arachnoïdienne. A la lumière des difficultés rencontrées à l'issue de cette première partie, nous avons décidé de réaliser une revue de la littérature faisant un état des

lieux sur les modèles expérimentaux d'hémorragie sous-arachnoïdienne, et plus particulièrement sur leur pertinence dans l'étude de l'ischémie cérébrale retardée. Enfin, nous avons fait le choix de nous focaliser sur le mécanisme d'activation endothéliale jouant un rôle clé dans la neuroinflammation à l'origine de l'ischémie cérébrale retardée. Ainsi, grâce à des nouveaux outils d'imagerie moléculaire dont nous disposons, nous avons tenté pour la première fois de caractériser de façon spécifique dans un modèle murin d'hémorragie sous-arachnoïdienne, cette neuroinflammation par détection de l'activation endothéliale.

Enfin, la dernière partie du manuscrit est une discussion reprenant les différentes étapes de notre travail, mais également sur les perspectives qu'elles ouvrent notamment en recherche fondamentale sur cette pathologie. En effet, de nouveaux outils de détection de l'ischémie cérébrale retardée pourraient permettre *in fine* d'améliorer la translation vers la recherche clinique en termes de stratégie diagnostique et thérapeutique.



## LISTE DES ABREVIATIONS

ACSOS	Agressions cérébrales secondaires d'origine systémique
ADAMTS-13	<i>A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13</i>
AIT	Accident ischémique transitoire
AQP4	Aquaporine 4
AVC	Accident vasculaire cérébral
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
CAM	<i>Cell Adhesion Molecule</i>
DNID	Déficit neurologique ischémique différé
DTC	Doppler transcrânien
DVE	Dérivation ventriculaire externe
ECG	Électrocardiogramme
EEG	Électroencéphalogramme
FT	Facteur tissulaire
HSA	Hémorragie sous-arachnoïdienne
HTIC	Hypertension intracrânienne
ICR	Ischémie cérébrale retardée
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LCS	Liquide cérebrospinal
IPM	Imagerie à particules magnétiques
MPIO	<i>Microsized particles of iron oxide</i>
MTT	Temps de transit moyen
NAC	N-Acetylcystéine
OMS	Organisation mondiale de la santé
PaCO <sub>2</sub>	Pression partielle artérielle en dioxyde de carbone
PaO <sub>2</sub>	Pression partielle artérielle en oxygène
PIC	Pression intracrânienne
PPC	Pression de perfusion cérébrale
SIADH	Syndrome de sécrétion inapproprié d'hormone antidiurétique
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
ULM	Microscopie par localisation ultrasonore

VWF

Facteur von Willebrand



## Table des matières

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>5</b>
<b>A. L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL.....</b>	<b>6</b>
a) Définition et épidémiologie.....	6
b) L'accident vasculaire cérébral hémorragique .....	6
a. Définition et physiopathologie.....	7
b. Étiologies et topographies .....	8
c) L'hémorragie sous-arachnoïdienne.....	9
a. Épidémiologie .....	9
b. Facteurs de risque.....	10
c. Étiologies de l'hémorragie sous-arachnoïdienne.....	12
d) Physiopathologie de l'hémorragie sous-arachnoïdienne .....	13
e) Manifestations cliniques de l'hémorragie sous-arachnoïdienne.....	14
f) Complications après hémorragie sous-arachnoïdienne .....	16
a. Complications précoces .....	16
b. Complications retardées .....	20
g) Prise en charge diagnostique.....	21
a. Diagnostic par imagerie .....	21
b. Examens biologiques .....	23
c. Examens électrophysiologiques.....	24
h) Prise en charge thérapeutique.....	24
a. Gestion préhospitalière .....	24
b. Prise en charge en unité de soins critiques et réanimation .....	25
c. Prise en charge du saignement / de l'anévrisme .....	27
i) Pronostic.....	30
a. Mortalité.....	30
b. Pronostic neurologique.....	31
.....	33
<b>B. ISCHEMIE CEREBRALE RETARDEE.....</b>	<b>34</b>
a) Définition, diagnostic et facteurs de risques .....	34
b) Physiopathologie .....	36
a. Dysfonction vasculaire .....	37
b. Inflammation .....	48
c. Dépolarisations corticales propagées .....	51
d. Rôle clé de la phase d'"early brain injury" .....	54
c) Prise en charge et traitement .....	56
<b>C. ACTIVATION ENDOTHELIALE.....</b>	<b>61</b>
a) L'endothélium vasculaire .....	61
b) Hétérogénéité des cellules endothéliales .....	64
c) Le rôle de l'endothélium dans la coagulation.....	66

<b>d) Perturbation des cellules endothéliales et lésion vasculaire .....</b>	<b>68</b>
a. Le stress oxydatif.....	69
b. Les contraintes de cisaillement.....	69
<b>e) Interactions entre les cellules endothéliales et les cellules sanguines .....</b>	<b>70</b>
a. Interactions des plaquettes et des leucocytes avec la paroi vasculaire .....	70
b. Adhésion des leucocytes et des plaquettes durant l'inflammation .....	71
c. Outils d'imagerie utilisant des particules ciblant les cellules endothéliales activées au niveau cérébral .....	73
d. Applications de l'IRM moléculaire sur la neuroinflammation.....	74
e. Nouvel outil d'imagerie : l'imagerie à particules magnétiques.....	78
<b><i>D. MODELES EXPERIMENTAUX D'HEMORRAGIES SOUS-ARACHNOIDIENNES ET ISCHEMIE CEREBRALE RETARDEE .....</i></b>	<b><i>81</i></b>
a) Modèles par injection directe de sang .....	81
b) Modèles par perforation endovasculaire .....	82
c) Autres modèles .....	83
d) Étude de l'ischémie cérébrale retardée dans les modèles expérimentaux d'hémorragie sous-arachnoïdienne. ....	85
<b><i>HYPOTHESE ET OBJECTIFS.....</i></b>	<b><i>88</i></b>
<b><i>RESULTATS.....</i></b>	<b><i>91</i></b>
<b>ARTICLE I: Challenges in simulating human delayed cerebral ischemia: A comprehensive study of     the subarachnoid hemorrhage mouse model .....</b>	<b>92</b>
<b>ARTICLE II: Delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: is there a relevant     experimental model? A systematic review of preclinical literature.....</b>	<b>112</b>
<b>ARTICLE III: Molecular imaging of early brain injury in subarachnoid hemorrhage. ....</b>	<b>128</b>
<b><i>DISCUSSION .....</i></b>	<b><i>151</i></b>
<b><i>CONCLUSION.....</i></b>	<b><i>173</i></b>
<b><i>AUTRES TRAVAUX.....</i></b>	<b><i>175</i></b>
<b><i>BIBLIOGRAPHIE .....</i></b>	<b><i>195</i></b>

## INDEX DES FIGURES

[Figure 1](#) : Courbe de compliance cérébrale dans le cadre du traumatisme crânien d'après *Langfitt*.

[Figure 2](#) : Coupe coronale du cerveau montrant les différents types d'hémorragies intracérébrales.

[Figure 3](#) : Estimation de l'incidence brute mondiale de l'hémorragie sous-arachnoïdienne anévrismale par région de l'OMS

[Figure 4](#) : Angiographie de soustraction d'un patient présentant un anévrisme multilobé de la bifurcation de l'artère cérébrale moyenne droite.

[Figure 5](#) : Base du cerveau, avec les sites les plus courants d'anévrismes

[Figure 6](#) : Hydrocéphalie aiguë après hémorragie sous-arachnoïdienne anévrismale.

[Figure 7](#) : Imageries cérébrales de patients admis pour une hémorragie sous-arachnoïdienne anévrismale.

[Figure 8](#) : Traitement de la lésion anévrismale en cause.

[Figure 9](#) : Physiopathologie de l'ICR

[Figure 9](#) : Dissociation entre vasospasme cérébral et déficit de perfusion.

[Figure 10](#) : Dysfonction vasculaire après hémorragie sous-arachnoïdienne.

[Figure 11](#) : Représentation schématique de l'hémostase.

[Figure 12](#) : Représentation schématique de l'hémostase lors d'une lésion vasculaire et ses trois étapes interdépendantes.

[Figure 13](#) : Représentation de l'hémostase primaire.

[Figure 14](#) : Dysfonction vasculaire après HSA.

[Figure 15](#) : Mécanismes de la réponse inflammatoire après hémorragie sous-arachnoïdienne.

[Figure 16](#) : Dépolarisations corticales propagées après hémorragie sous-arachnoïdienne et potentielles cibles thérapeutiques.

[Figure 17](#) : Perturbations secondaires médiées par des mécanismes qui se produisent au début de la période d'*early brain injury* et qui conduisent à une perte de l'intégrité neuronale

[Figure 18](#) : Production endothéliale d'oxyde nitrique et ses actions dans la cellule musculaire lisse vasculaire.

[Figure 19](#) : Étapes séquentielles qui régulent la circulation des leucocytes dans le système vasculaire par le biais de l'endothélium et ses molécules d'adhésions

[Figure 20](#) : Physiopathologie des cellules endothéliales.

[Figure 21](#) : Initiation, amplification et propagation de la coagulation

[Figure 212](#) : Différentes étapes de la transmigration des leucocytes : implication des molécules d'adhésion endothéliales.

[Figure 23](#) : Représentation schématique de la relation établie entre la sévérité de l'activation endothéliale et les modifications de signal induites par les MPIOs.

[Figure 24](#) L'utilisation de l'IPM avec des MPIO ciblées sur les molécules d'adhésion endothéliales révèle l'interaction leucocyte-endothélium durant le sepsis et la neuroinflammation.

[Figure 25](#) : Représentation schématique du modèle murin d'injection de sang au niveau de la citerne *magna*.

[Figure 26](#) : Représentation schématique du modèle de perforation endovasculaire chez la souris.

[Figure 27](#) : Représentations d'anévrismes intracrâniens décrits dans le modèle élastase.

[Figure 28](#) : Différentes étapes de l'ULM.

[Figure 29](#) : Modèle d'AVC ischémique par occlusion de l'ACM chez la souris, étudié en ULM à la phase aiguë.

[Figure 30](#) : Suivi longitudinal en ULM 3D d'une souris HSA.

[Figure 31](#) : Rôles de P-selectine et VWF au niveau de l'endothélium périphérique et cérébral.

[Figure 32](#) : Principaux résultats issus de l'étude de Martinez de Lizzarondo *et al*

[Figure 33](#) : Dosages plasmatiques de VWF entre les groupes HSA ayant ou non reçu de la NAC.

[Figure 34](#) : Réduction des multimères de VWF après adjonction de NAC *in vivo* puis *in vitro*.

# INTRODUCTION



## A. L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL

### a) Définition et épidémiologie

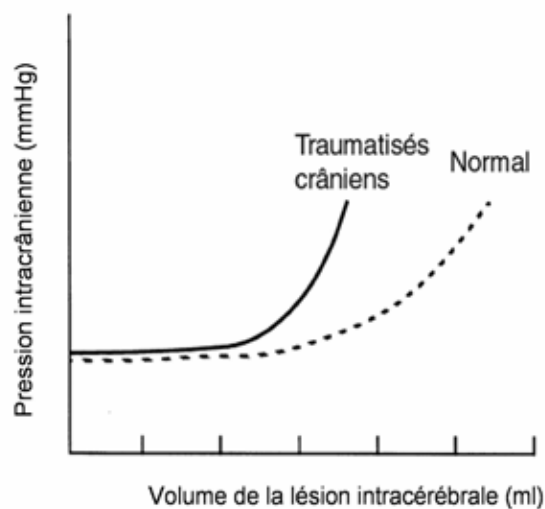
L'accident vasculaire cérébral (AVC) est caractérisé par la survenue brutale d'un déficit neurologique focal. L'AVC est une pathologie fréquente qui touche environ 12 millions de personnes par an dans le monde (Feigin et al. 2021), incidence qui tend à augmenter chaque année compte tenu du vieillissement de la population. Il s'agit d'une pathologie grave qui constitue une urgence médico-chirurgicale, puisque qu'elle est responsable d'une morbi-mortalité importante, avec de 6,55 millions de décès chaque année dans le monde. Il s'agit de la première cause de handicap acquis chez l'adulte, ainsi que la deuxième cause de troubles cognitifs majeurs après la maladie d'Alzheimer. Les AVC peuvent survenir à tout âge, y compris dans l'enfance mais dans 75% des cas, ils affectent des patients âgés de plus de 65 ans. En effet, l'âge moyen est de 73 ans (70 ans pour les hommes et 76 ans pour les femmes).

Le terme d'AVC regroupe l'ensemble des pathologies vasculaires cérébrales d'origine artérielle ou veineuse. Parmi elles, nous retrouvons en premier lieu les AVC ischémiques d'origine artérielle dans 80% des cas. Ces AVC regroupent les accidents ischémiques transitoires (AIT) et les accidents ischémiques constitués à l'origine d'un infarctus cérébral. Dans 20% des cas, les AVC sont de types hémorragiques, dominés par les hémorragies cérébrales ou intra parenchymateuses. Dans de plus rares cas d'AVC, il s'agit de thromboses veineuses cérébrales. Concernant les AVC hémorragiques, un quart d'entre eux est représenté par l'hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA) ou hémorragie méningée, dont la physiopathologie et la prise en charge diffèrent totalement des autres types d'AVC hémorragiques.

### b) L'accident vasculaire cérébral hémorragique

a. Définition et physiopathologie

L'AVC hémorragique résulte de la rupture d'un vaisseau cérébral, ce qui entraîne un saignement intracrânien. En fonction du volume de saignement, l'AVC hémorragique peut avoir pour conséquence un effet de masse sur les structures intra-cérébrales adjacentes, le parenchyme et/ou le liquide cébrospinal (LCS). Cet effet de masse va être à l'origine d'une hypertension intracrânienne (HTIC). En effet, la boîte crânienne est une structure osseuse non extensible. Il en résulte que toute augmentation du volume de l'un de ses constituants (parenchyme, LCS ou volume sanguin) va être responsable d'une augmentation de la pression intracrânienne lorsque les mécanismes physiologiques de compensation sont dépassés (Langfitt et al. 1965) (Figure 1). Par ailleurs, l'issue de sang va être responsable d'une toxicité directe sur les structures adjacentes. Par conséquent, l'AVC hémorragique est une pathologie grave, dont l'issue est fatale dans plus de 30% des cas (Feigin et al. 2021). L'incidence varie selon l'âge, les régions géographiques et le type d'AVC hémorragique.



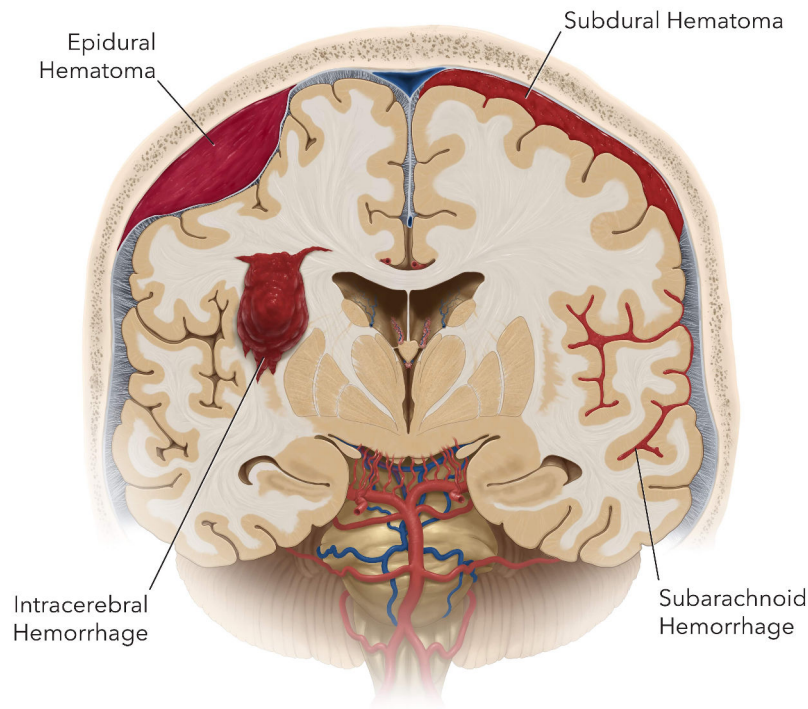
**Figure 1** : Courbe de compliance intracrânienne de *Langfitt* chez le traumatisé crânien (Langfitt et al. 1965).

En situation physiologique, la pression intracrânienne (PIC) est maintenue constante autour de 5 à 15 mmHg. Une augmentation continue du contenu de la boîte crânienne se caractérise par deux phases successives : une première appelée **phase de compensation**, pendant laquelle la PIC est maintenue à peu près constante grâce à des mécanismes compensateurs (essentiellement grâce à la mobilisation du LCS) ; puis, à partir d'un point pour lequel les mécanismes de compensation se trouvent dépassés, une phase d'augmentation exponentielle de la PIC, appelée **phase de décompensation**.

## b. Étiologies et topographies

Nous pouvons distinguer plusieurs types d'AVC hémorragiques selon leur topographie (Figure 2) (Salman et al. 2009) :

- Les **hémorragies sous-durales** et **extra-durales**, qui sont le plus souvent d'origine traumatique. Elles se définissent par la présence de sang entre les méninges et la dure-mère pour les hémorragies sous-durales, et entre la dure-mère et la boîte crânienne pour les hémorragies extra-durales. Elles représentent 2% des hémorragies. Le traitement, lorsqu'il est indiqué, est chirurgical.
- Les **hémorragies intraventriculaires**, qui correspondent à la présence de sang dans le système ventriculaire. Elles sont le plus souvent secondaires à une hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA) ou une hémorragie intra-parenchymateuse sévère.
- Les **hémorragies intra-parenchymateuses**, qui correspondent à la présence de sang au sein du parenchyme cérébral. Elles sont secondaires à la rupture d'une artériole distale. La cause est, dans la grande majorité des cas, la présence d'une pathologie hypertensive sous-jacente et/ou une angiopathie amyloïde. Elles représentent 15-20% des AVC.
- Les **HSA** sont caractérisées par l'issue brutale de sang dans les espaces sous-arachnoïdiens, qui résulte de la rupture d'une artère située entre la pie-mère et l'arachnoïde. La principale étiologie est la rupture d'un anévrisme artériel, il convient alors d'utiliser le terme d'HSA anévrismale. C'est spécifiquement ce type d'AVC hémorragique auquel nous allons nous intéresser dans cette thèse.



**Figure 2 :** Coupe coronale du cerveau montrant les différents types d'hémorragies intracérébrales d'après (The Neurosurgical Atlas, by Aaron Cohen-Gadol)

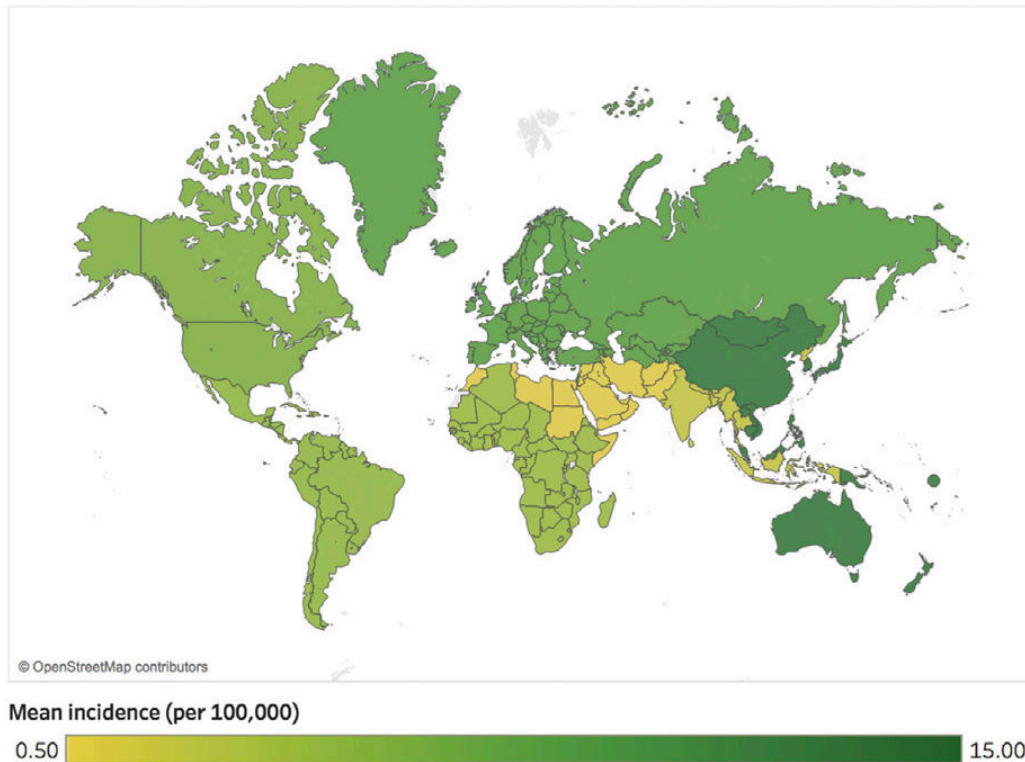
### c) L'hémorragie sous-arachnoïdienne

#### a. Epidémiologie

Dans une méta-analyse récente, l'incidence globale de l'HSA d'origine anévrysmale s'élève à 7,9 pour 100.000 personnes par an (Etminan et al. 2019) . Cette incidence semble diminuer sur les 30 dernières années. L'incidence varie dans le monde selon les zones géographiques (Figure 3).

L'âge moyen de survenue d'une HSA est compris entre 50 et 55 ans (Shea et al. 2007). La majorité des patients touchés ont entre 40 et 60 ans, néanmoins, tous les âges peuvent être atteints. Les femmes sont davantage touchées que les hommes, probablement en rapport avec leur profil hormonal différent. Dans une méta-analyse regroupant un total de 9940 patients porteurs d'anévrisme intracrânien, le taux de rupture était plus élevé chez les femmes que

chez les hommes (1 versus 0,7% de rupture respectivement avec un risque relatif à 1,43 (95%IC 1,1-1,9)(Zuurbier et al. 2022).



**Figure 3** : Estimation de l'incidence brute mondiale des HSA anévrismales par région de l'OMS d'après (Hughes et al. 2018)

b. Facteurs de risque

Parmi les facteurs de risque liés à la survenue d'HSA anévrismales, nous pouvons distinguer des facteurs de risque modifiables et des facteurs de risque non modifiables.

Concernant les facteurs de risque non modifiables, la taille, la forme et la localisation de l'anévrisme influencent le risque de rupture de l'anévrisme. L'étude ISUIA mettait en évidence des taux de rupture des anévrismes intracrâniens compris entre 0 % et 10 % par an, en fonction de la taille de l'anévrisme et de sa localisation (Wiebers 2003).

La majorité des anévrismes intracérébraux n'a pas de déterminisme génétique (Korja et al. 2010). Néanmoins, certaines pathologies héréditaires sont associées à un risque plus élevé de développer des anévrismes intracérébraux, à l'origine potentielle, donc d'un risque accru d'HSA. Parmi ces pathologies génétiques, nous pouvons distinguer la polykystose rénale de

transmission autosomique dominante, l'hyperaldostéronisme familial et le syndrome d'Ehlers-Danlos. En dehors de ces pathologies héréditaires bien connues, l'existence d'antécédents familiaux d'HSA augmenterait le risque individuel de survenue d'HSA (Okamoto et al. 2003; Van Der Jagt et al. 1999). Cette susceptibilité familiale semble être hétérogène. En ce sens, outre la susceptibilité génétique, l'hypothèse d'un facteur de risque environnemental est soulevée (Korja et al. 2010).

Concernant les facteurs de risque modifiables, nous pouvons les regrouper en facteurs de risques cardiovasculaires et distinguer en premier lieu le tabagisme (Vlak et al. 2013). En effet, selon les études, le risque relatif associé au tabagisme varie de 2 à 7. Plus le tabagisme actif est important, plus le risque de survenue d'une HSA anévrismale est important. En ce sens, l'arrêt du tabac va permettre de diminuer ce risque (Anderson et al. 2004; Feigin et al. 2005; Feigin et al. 2005; Sjøfteland et al. 2009; Kim et al. 2012; Lindbohm et al. 2016). L'hypertension artérielle apparaît également comme étant un facteur de risque modifiable lié à la survenue d'HSA. En effet, dans une méta-analyse datant de 2005, le risque relatif était de 2,5 (IC95%, 2,0-3,0) (Feigin et al. 2005).

De même, la consommation de toxiques comme l'alcool se distingue comme étant un facteur de risque modifiable de survenue d'HSA. La consommation d'alcool augmenterait le risque de 2,1 (IC 95% 1,5-2,8) (Feigin et al. 2005). Il existerait même un effet « dose-réponse » de la consommation éthylique sur le risque d'HSA (Yao et al. 2016). La consommation de certaines drogues comme la cocaïne ou la méthamphétamine est associée à un risque accru de survenue d'HSA anévrismales et non anévrismales (Bederson et al. 2009; Levine et al. 1991; Ho et al. 2009).

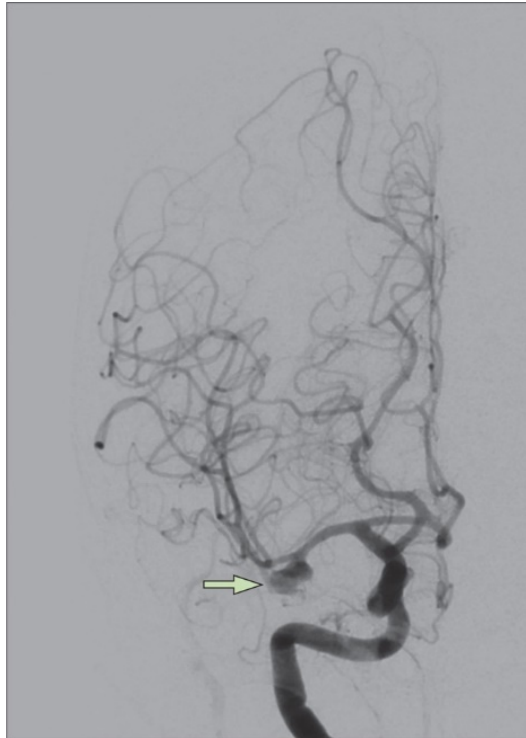
L'hypothèse d'un risque plus élevé de survenue d'HSA chez les femmes ayant un déficit en œstrogène a été soulevée. En effet, l'incidence d'HSA plus élevée chez les femmes est bien connue (Sarti et al. 1991) et l'âge de survenue supérieur à 50 ans chez les femmes en moyenne laisse à penser qu'il y aurait un rôle hormonal. Selon les différentes études, il est néanmoins difficile de conclure sur l'implication certaine d'un déficit oestrogénique sur la survenue de l'HSA anévrismale (Feigin et al. 2005; Algra et al. 2012).

L'impact de la prise d'anticoagulants et/ou d'antiagrégants plaquettaires au long cours sur la survenue d'HSA reste débattue à ce jour. Certaines études montrent qu'une prise d'antiagrégants au long cours tel que l'aspirine aurait un effet protecteur, en revanche d'autres

études ne montrent aucun effet (Phan et al. 2017; García-Rodríguez et al. 2013; Schmidt et al. 2010). Concernant la prise d'anticoagulants au long cours, il semblerait que celle-ci n'augmenterait pas le risque de survenue d'HSA mais aurait un rôle sur la sévérité de celle-ci lorsqu'elle survient. Le rôle protecteur des statines est lui aussi débattu. En effet, la littérature fournit des résultats contradictoires puisque d'une part il a été décrit un risque accru d'HSA chez les patients sous statines au long cours (Vlak et al. 2013), mais d'autre part, il résulte d'une méta-analyse, un risque accru observé chez les hommes ayant un taux de cholestérol plus élevé (Lindbohm et al. 2016).

### c. Étiologies de l'hémorragie sous-arachnoïdienne

Dans la grande majorité des cas, l'HSA est secondaire à la rupture d'un anévrisme cérébral (Figure 4) qui est le plus souvent acquis, rarement congénital. Dans de rares cas, l'HSA peut être secondaire à la rupture d'une malformation artérioveineuse, ou encore survenir dans un contexte post-traumatique. Dans le cas de l'HSA post-traumatique, la physiopathologie est totalement différente de l'HSA anévrismale. La présentation clinique ainsi que la prise en charge diffèrent donc totalement de l'HSA anévrismale. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons uniquement à l'HSA anévrismale, qui représente une entité spécifique à l'origine de complications que nous développerons.



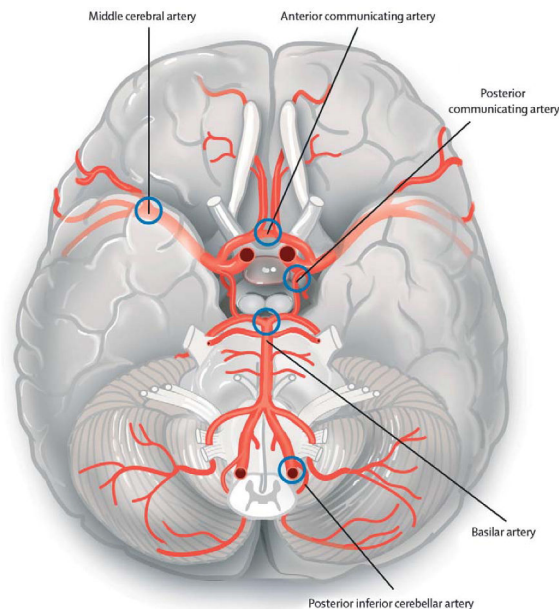
**Figure 4** : Angiographie de soustraction d'un patient présentant un anévrisme multilobé de la bifurcation de l'artère cérébrale moyenne droite, d'après (Claassen and Park 2022)

#### d) Physiopathologie de l'hémorragie sous-arachnoïdienne

L'HSA anévrismale résulte dans la majorité des cas de la rupture d'un anévrisme sacculaire qui correspond à un renflement anormal ou un ballonnement dans la paroi d'une artère, situé sur le réseau vasculaire artériel cérébral antérieur ou postérieur (figure 5). L'anévrisme sacculaire est acquis le plus souvent, plus rarement congénital. La grande majorité des anévrismes reste asymptomatique. La prévalence des anévrismes sacculaires dans la population générale est estimée entre 3 et 5% (Vlak et al. 2011). En parallèle, la prévalence de leur rupture est estimée entre 3 et 25 pour 100.000 personnes. Le contexte de rupture anévrismale peut varier. En effet, la rupture peut survenir sans aucun facteur déclenchant, et notamment pendant le sommeil (Bederson et al. 2009). Néanmoins, l'HSA anévrismale peut aussi survenir dans les suites d'un exercice physique. Le mécanisme est expliqué par l'augmentation de la pression artérielle durant l'effort physique, favorisant la rupture d'anévrisme sacculaire. La rupture d'un anévrisme intracrânien provoque l'issue brutale de sang dans les espaces sous-arachnoïdiens, au sein du LCS. L'issue de sang dans le LCS est responsable d'une augmentation de la pression



intracrânienne selon le principe de *Langfitt* cité plus haut. Selon la sévérité du saignement et sa localisation, le sang peut s'étendre à d'autres structures intracrâniennes : les ventricules, les espaces sous-duraux ou encore le parenchyme cérébral.



**Figure 5** : Base du cerveau, avec les sites les plus courants d'anévrismes (cercles) d'après (Gijn et al. 2007)

#### e) Manifestations cliniques de l'hémorragie sous-arachnoïdienne

La présentation clinique typique de l'HSA anévrismale est une céphalée intense d'apparition brutale, qualifiée « en coup de tonnerre » (Onathan et al. 2000). La topographie de cette céphalée est peu discriminante car elle peut être localisée ou généralisée. Les symptômes associés aux céphalées sont inconstants mais peuvent être : une brève perte de connaissance, des nausées/vomissements, une raideur de nuque. Selon la sévérité de l'HSA, les troubles de conscience peuvent aller jusqu'au coma. De même, la survenue de crises convulsives est inconstante (moins de 10% des patients), mais est un signe de mauvais pronostic (Butzkueven et al. 2000). Chez certains patients, le décès est brutal avant même la prise en charge médicale (Lindbohm et al. 2017).

L'examen clinique initial retrouve fréquemment une hypertension artérielle, en réponse physiologique adaptée à la survenue d'une hypertension intracrânienne brutale. Un syndrome méningé associant une raideur de nuque, une photophobie ainsi que des céphalées est

souvent retrouvé. Le syndrome de Terson associant une hémorragie intravitréenne à une HSA, est caractérisé par l'apparition d'un flou visuel. Ce signe est inconstant mais demeure un signe de mauvais pronostic.

D'autres signes cliniques peuvent être décrits en fonction de la localisation de l'HSA. Pour exemple, une atteinte de la III<sup>ème</sup> paire crânienne se traduit dans la majorité des cas par l'apparition d'une mydriase, voire d'une paralysie oculomotrice. Dans ce cas, l'atteinte du nerf III est en rapport avec une rupture d'anévrisme de l'artère communicante postérieure. En revanche, l'atteinte du nerf VI résulte de la survenue d'HTIC mais n'a aucune valeur localisatrice. Plusieurs échelles de classification selon la gravité clinique de l'HSA ont été proposées afin de standardiser leur prise en charge initiale. L'échelle proposée initialement par *Hunt et Hess* ([table 1](#)) ("Report of World Federation of Neurological Surgeons Committee on a Universal Subarachnoid Hemorrhage Grading Scale" 1988), ayant une reproductibilité inter-observateur médiocre, tend à être remplacée actuellement par l'échelle WFNS (*World Federation of Neurological Surgeons*) ([table 2](#)) (Teasdale et al. 1988). En effet, l'échelle WFNS combine l'association du score *Glasgow Coma Scale* avec la présence ou non d'un déficit moteur. Une forme grave d'HSA est définie par un stade 3 à 5 de la classification WFNS. Enfin, l'échelle de Glasgow (*Glasgow Coma Scale*) ([table 3](#)) (Teasdale et al. 1974) est l'élément d'évaluation clinique le plus reproductible et le mieux relié au pronostic. Il est présent dans l'échelle combinée WFNS, rendant ce score pronostic le plus utilisé en pratique clinique car recommandé par les sociétés savantes (Oshiro et al. 1997). Les patients ayant un score de Glasgow inférieur à 12 (correspondant à un score WFNS grade 4-5) auraient un pronostic plus sombre (Takagi et al. 1999).

**Table 1** : Classification de *Hunt et Hess*

Grade	Description clinique
0	Anévrisme non rompu
1	Asymptomatique ou céphalée minime
2	Céphalée modérée à sévère, raideur de nuque
3	Somnolence, confusion, déficit focal minime
4	Coma léger, déficit focal, troubles végétatifs
5	Coma profond, moribond

**Table 2:** Classification de la *World Federation of Neurological Surgeons (WFNS)* selon (Hunt and Hess 1968)

Grade	Score de Glasgow	Déficit moteur	GOS grade 1–3 à 6 mois (%) <sup>a</sup>
I	15	Absent	13
II	13–14	Absent	20
III	13–14	Présent	42
IV	7–12	Présent ou absent	51
V	3–6	Présent ou absent	68

**Table 3 :** Échelle de Glasgow (Glasgow Coma Scale) d’après (Teasdale et al. 1974)

Réponse oculaire		Réponse verbale		Réponse motrice	
Grade	Score	Grade	Score	Grade	Score
Nulle	1	Nulle	1	Nulle	1
À la douleur	2	Incompréhensible	2	Extension stéréotypée	2
À la demande	3	Inappropriée	3	Flexion stéréotypée	3
Spontanée	4	Confuse	4	Évitement	4
-	-	Normale	5	Orientée	5
-	-	-	-	Aux ordres	6

#### f) Complications après hémorragie sous-arachnoïdienne

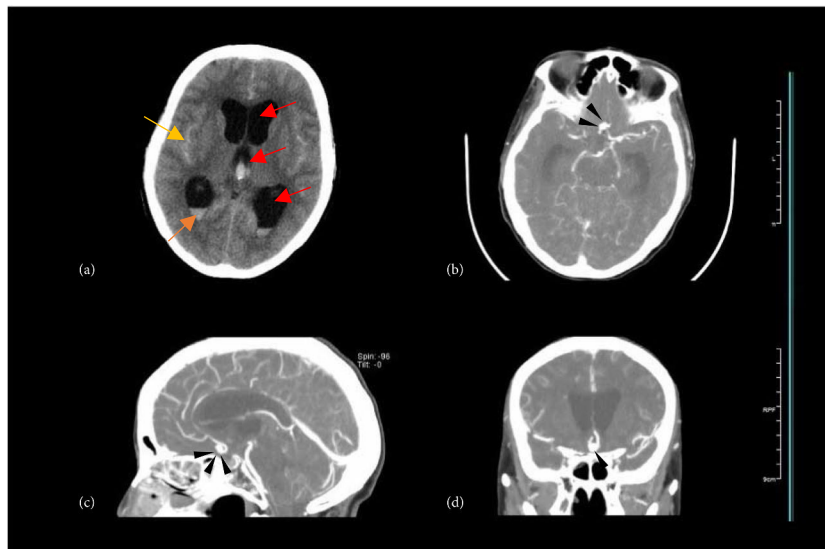
Les complications après HSA anévrismale sont fréquentes et sont à l’origine de sa morbi-mortalité. Elles peuvent être neurologiques mais également systémiques. Nous pouvons les dichotomiser en complications précoces et retardées.

##### a. Complications précoces

#### **Hydrocéphalie aiguë**

L’hydrocéphalie aiguë représente une complication fréquente des HSA graves ([figure 6](#)), touchant entre 20 et 30% des patients admis pour HSA (Muehlschlegel et al. 2018). Elle est provoquée par l’obstruction à l’écoulement du LCS par le sang présent dans les espaces sous-arachnoïdiens, mais peut également être due à un défaut de résorption du LCS au niveau des plexus choroïdes. Les facteurs de risque d’hydrocéphalie aiguë sont l’âge, l’importance de

l'HSA, sa localisation (plus fréquente dans les ruptures d'anévrismes de la circulation postérieure), et la présence d'une hémorragie intra-ventriculaire. Le diagnostic d'hydrocéphalie est établi en imagerie, par la réalisation d'un scanner à la phase initiale qui va objectiver une dilatation du système cisterno-ventriculaire. La présence d'une hydrocéphalie implique une prise en charge spécifique que nous détaillerons ensuite.



**Figure 6** : Hydrocéphalie aiguë après hémorragie sous-arachnoïdienne anévrismale (Chen et al. 2017). (a) Scanner qui montre une hémorragie dans les sillons des vallées sylviennes (flèche jaune) associée à une hémorragie de la corne postérieure des ventricules latéraux (flèche orange), responsable d'une hydrocéphalie du 3<sup>ème</sup> ventricule et des ventricules latéraux (flèches rouges). (b), (c) et (d) angioscanner permettant de localiser l'anévrisme en cause situé au niveau de l'artère communicante antérieure (flèches noires).

### Hypertension intracrânienne

Les patients présentant une HSA anévrismale développent fréquemment dans les minutes ou heures qui suivent la rupture, un tableau d'HTIC en rapport avec le volume de sang dont l'issue est brutale dans la boîte crânienne. L'HTIC peut également être secondaire à la survenue d'une hydrocéphalie aiguë. L'HTIC va également être favorisée par l'hyperémie et/ou l'ischémie secondaire à l'hémorragie initiale, mais aussi secondaire à la vasodilatation artériolaire distale en réponse à l'agression cérébrale aiguë (Claassen et al. 2022). L'HTIC va être à l'origine d'un taux de mortalité important à la phase initiale de l'HSA, qui s'explique par l'évolution possible

vers un engagement cérébral qui lui-même va conduire vers le décès. Sa prise en charge va donc être primordiale et pluridisciplinaire.

### Resaignement

Après une HSA, le risque de resaignement est présent durant les premières 72 heures en l'absence de traitement de l'anévrisme en cause. Dans le cas d'un resaignement, le taux de mortalité augmente. Les facteurs de risque identifiés de resaignement sont le délai de prise en charge de l'anévrisme, la sévérité du statut neurologique à l'admission, la taille de l'anévrisme, la présence d'une hypertension artérielle non contrôlée, la présence d'une hémorragie intra-ventriculaire ou intra-parenchymateuse ou encore d'une hydrocéphalie aiguë. Le diagnostic de resaignement est suspecté en cas de détérioration neurologique secondaire et sera confirmé grâce à la réalisation d'une imagerie cérébrale. La prise en charge de l'anévrisme, qu'elle soit chirurgicale ou endovasculaire, est le seul traitement préventif de resaignement.

### Épilepsie

Des convulsions peuvent survenir à la phase aiguë de l'HSA chez 6 à 18% des patients (Connolly et al. 2012), mais également de façon plus retardée. Les facteurs de risque de survenue d'épilepsie sont la présence de caillots de sang, d'une hémorragie intra-parenchymateuse, d'un infarctus cérébral et la localisation de l'anévrisme sur l'artère cérébrale moyenne. La survenue d'épilepsie avant la prise en charge de l'anévrisme est identifiée comme un signe de resaignement précoce. La survenue de convulsions est une urgence thérapeutique car elle peut aggraver le pronostic neurologique par la majoration de l'hypoxie tissulaire qui survient durant la phase per-critique. A l'extrême, la survenue d'épilepsie peut mettre en jeu le pronostic vital immédiat. Néanmoins, le traitement antiépileptique préventif n'est actuellement pas recommandé de façon systématique.

### Complications métaboliques : hyponatrémie, anémie, hyperglycémie

Trente pour cent des patients développent une hyponatrémie après HSA (Connolly et al. 2012; Suarez 2015). Le mécanisme mis en avant est lié à une atteinte hypothalamique. Plus spécifiquement, deux mécanismes peuvent être à l'origine d'une hyponatrémie associée à une rétention hydrosodée, et doivent être distingués. D'une part le syndrome de sécrétion

inapproprié d'hormone antidiurétique (SIADH) et d'autre part le syndrome de perte de sel (ou *cerebral salt wasting*). Il est parfois difficile d'en faire la distinction en pratique clinique, alors même que leurs traitements respectifs diffèrent.

L'anémie après HSA est retrouvée chez 18% des patients (Giller et al. 1998). Plusieurs études retiennent l'anémie comme facteur de mauvais pronostic, alors même qu'un hématicrite élevé serait un facteur protecteur concernant la survenue des infarctus cérébraux retardés (Naidech et al. 2007). Néanmoins, aucune recommandation n'est actuellement établie quant au seuil transfusionnel à adopter (Connolly et al. 2012).

L'hyperglycémie est fréquente après une agression aiguë de l'organisme, qu'elle soit d'origine neurologique ou non. Il s'agit d'une réponse au stress lié à l'agression systémique. Cette hyperglycémie secondaire impose une prise en charge adaptée. En ce sens, les sociétés savantes préconisent la gestion de l'équilibre glycémique avec, si besoin, la mise en place protocolisée d'une insulinothérapie. En revanche, aucun seuil précis de glycémie n'est strictement recommandé. Les recommandations insistent néanmoins sur la nécessité d'éviter la survenue d'hypoglycémies, aggravant les lésions neurologiques (Connolly et al. 2012).

### Complications cardiopulmonaires

La survenue d'œdème pulmonaire et d'arythmie cardiaque est présente respectivement dans 23 et 35% des patients après HSA (Solenski et al. 1995). La survenue d'évènements cardiovasculaires est corrélée à la gravité initiale de l'HSA et peut menacer le pronostic vital. Il y a une hyperactivation du système sympathique avec une « toxicité » des catécholamines endogènes, davantage observée dans les formes graves d'HSA. De nombreux troubles électrocardiographiques sont décrits. En chef de file, nous retrouvons surtout des anomalies de la repolarisation (sous-décalage du segment ST, allongement de l'intervalle QT, inversion des ondes T). Ces anomalies sont le reflet d'une souffrance myocardique contemporaine de l'HSA. En ce sens, la troponinémie qui est un marqueur de souffrance myocardique, si elle est dosée, peut être augmentée. De façon concomitante, une dysfonction cardiaque à type d'insuffisance ventriculaire gauche peut être diagnostiquée chez 21% des patients environ (Messina et al. 2023). Le rôle diagnostique de l'échocardiographie est alors indispensable à la

prise en charge initiale. Il en résulte parfois des tableaux d'insuffisance cardiaque gauche compliqués d'œdème aigu du poumon. Un tableau de cardiopathie de stress ou encore appelé takotsubo, avec aspect échographique typique d'une dysfonction apicale avec « ballonnisation » caractéristique, est également décrit mais non spécifique de l'HSA, davantage lié au stress engendré par cette agression neurologique aiguë et sévère.

#### b. Complications retardées

##### Vasospasme et ischémie cérébrale retardée

L'ischémie cérébrale retardée (ICR) est une complication fréquente après HSA puisqu'elle survient chez environ 30% des patients qui survivent à la phase aiguë. L'ICR survient dans les 3 semaines qui suivent le saignement et est caractérisée par la survenue d'une ischémie cérébrale en rapport avec une inadéquation entre les besoins et les apports en oxygène et en glucose (à l'origine d'une « dette » énergétique), se traduisant par la survenue d'un déficit neurologique secondaire, mis en évidence par un infarctus cérébral en imagerie. L'ICR est la complication qui va être principalement à l'origine de la morbi-mortalité des patients (Claassen and Park 2022; Rosengart et al. 2007; MacDonald et al. 2012). Cette complication est donc un enjeu majeur en terme socio-économique puisque, parmi les patients survivants, certains vont être porteurs de handicaps lourds. L'ICR a longtemps été rattachée à la survenue d'un vasospasme artériel. Nous verrons plus loin qu'il est désormais admis que les mécanismes conduisant à l'ICR sont bien plus complexes et encore mal élucidés. L'ICR va être le sujet central de ce manuscrit, il va donc être développé plus loin dans l'introduction (chapitre **B. ISCHEMIE CEREBRALE RETARDEE**).

##### Hydrocéphalie chronique à pression normale

Une hydrocéphalie chronique complique seulement une partie des hydrocéphalies aiguës, justifiant alors le recours à une valve de dérivation permanente. L'hydrocéphalie à pression normale se caractérise par une triade de symptômes associant des troubles de la marche, une incontinence urinaire et un syndrome démentiel, associée à la persistance d'une dilatation ventriculaire à l'imagerie, sans augmentation de la PIC.

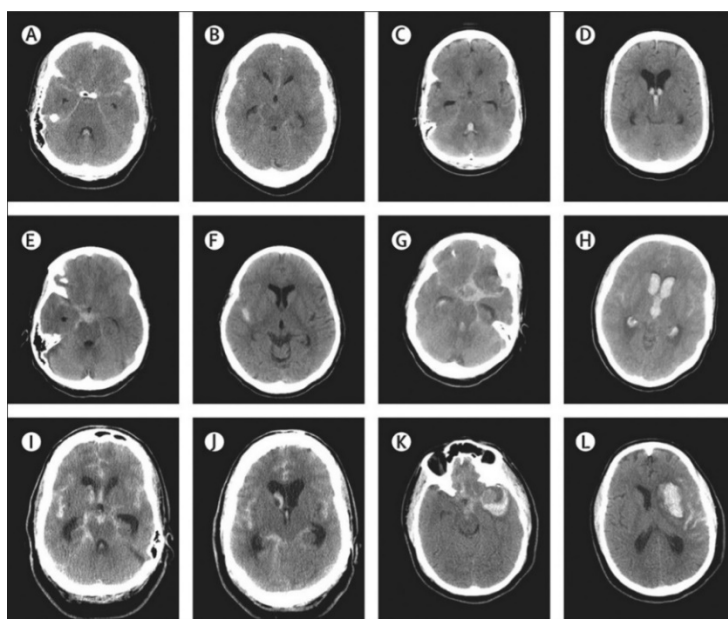
## g) Prise en charge diagnostique

Les manifestations cliniques ayant été abordées dans la section « *A.V Manifestations cliniques de l'hémorragie sous-arachnoïdienne* », nous ne revenons pas sur le diagnostic clinique mais allons aborder les méthodes de diagnostic paraclinique.

### a. Diagnostic par imagerie

En cas de suspicion clinique d'HSA, le scanner cérébral sans injection de produit de contraste est l'examen de référence pour établir le diagnostic et doit être réalisé en urgence quel que soit le degré de gravité initial, dès lors que l'HSA est évoquée par les signes cliniques. La sensibilité du scanner cérébral pour poser le diagnostic d'HSA est plus performante dans les 6 premières heures suivant l'hémorragie. Le sang va en effet être visible dans les espaces sous-arachnoïdiens comme une image hyperdense (*figure 7*). Le sang est situé le plus souvent dans les citernes de la base, mais également parfois dans les sillons des vallées sylviennes ou scissures interhémisphériques. Selon la gravité, du sang peut être visualisé en intra-ventriculaire, en sous-dural mais également en intra parenchymateux. La localisation du saignement n'est pas forcément prédictive de la localisation de l'anévrisme, sauf lorsqu'il s'agit d'un anévrisme de l'artère cérébrale antérieure ou communicante antérieure. Il existe des faux négatifs dans le diagnostic scanographique d'HSA. En effet, lorsque la quantité de sang présente dans les méninges est faible, le scanner peut ne pas être contributif. Par conséquent, un scanner négatif n'élimine pas formellement le diagnostic d'HSA. Dans ce cas de figure, si la suspicion clinique est robuste, il sera discuté la réalisation d'une ponction lombaire (en l'absence de contre-indication) qui elle, permettra, en cas d'HSA de mettre en évidence la présence dans le LCS de pigments xanthochromiques surnageants après centrifugation. En ce sens, il est préférable, pour espérer visualiser ces pigments issus de la lyse des globules rouges, d'attendre un délai de 6 à 12 heures après HSA. Il est néanmoins totalement inutile, non recommandé, voire contre-indiqué en cas de troubles de conscience profonds, de réaliser une ponction lombaire lorsque le scanner cérébral permet de faire le diagnostic d'HSA.





**Figure 7 :** Imageries cérébrales de patients admis pour une hémorragie sous-arachnoïdienne anévrismale d'après (Claassen and Park 2022). Scanners cérébraux montrant : score de Fisher 1 modifié (A, B), 2 (C, D), 3 (E, F), 4 (G, H), la présence d'une hydrocéphalie (I, J), et d'une hémorragie cérébrale intra-parenchymateuse (K, L).

La réalisation du scanner cérébral permet d'une part de confirmer le diagnostic, mais également d'évaluer l'importance de l'HSA. En effet, la sévérité scanographique va être un facteur de risque de survenue de vasospasme et d'ICR. La classification la plus utilisée est celle de Fisher (table 4) (Fisher et al. 1980).

**Table 4 :** Grade de Fisher d'après (Fisher et al. 1980)

Grade de Fisher	Aspect scanner
1	Absence de sang
2	Dépôts de moins de 1 mm d'épaisseur
3	Dépôts de plus de 1 mm d'épaisseur
4	Hématome parenchymateux ou hémorragie ventriculaire

Il existe des limites à cette échelle largement utilisée. En effet, elle ne permet pas de distinguer les hémorragies intra-parenchymateuses ou intraventriculaires isolées, de celles avec une hémorragie associée des citernes. Une modification de l'échelle de Fisher (table 5) a donc été

proposée dans le but d'améliorer la prédiction de survenue d'ICR (Claassen et al. 2001). Cette échelle a été validée rétrospectivement sur une cohorte de 276 patients.

**Table 5** : Échelle de Fisher modifiée et risque d'infarctus cérébral d'après (Claassen et al. 2001)

Grade	Critères	Infarctus cérébral (%)
0	Pas d'HSA ou d'HV	0
1	HSA minime, pas d'HV dans les 2 ventricules latéraux	6
2	HSA minime, HV dans les 2 ventricules latéraux	14
3	HSA importante*, pas d'HV dans les 2 ventricules latéraux	12
4	HSA importante*, HV dans les 2 ventricules latéraux	28

HV : hémorragie ventriculaire ; \*HSA remplissant complètement au moins une citerne ou une scissure.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) cérébrale peut être envisagée pour poser le diagnostic d'HSA. Néanmoins, son accessibilité moins aisée et les difficultés de surveillance des patients durant l'examen font que le scanner cérébral reste à l'heure actuelle l'examen de référence dans le diagnostic d'HSA. La réalisation d'une IRM peut être discutée notamment dans le cas des femmes enceintes afin de limiter l'exposition aux rayonnements.

Une fois le diagnostic d'HSA posé, il est nécessaire d'identifier l'origine du saignement. Pour cela, la réalisation d'un angioscanner cérébral est recommandée dans un but de diagnostic étiologique et pré-thérapeutique, qui sera interprété par un neuroradiologue.

#### b. Examens biologiques

Les examens biologiques à la prise en charge initiale ont pour but d'évaluer le retentissement systémique de l'HSA et ainsi d'optimiser sa prise en charge, en limitant les agressions cérébrales secondaires d'origines systémiques (ACSOS). Comme expliqué au chapitre précédent, l'HSA peut, selon son degré de sévérité, avoir un retentissement « extra-cérébral ». En effet, la survenue d'hyponatrémie, d'hyperglycémie, d'anémie, impose la réalisation fréquente et répétée de dosages plasmatiques comme un ionogramme sanguin ainsi qu'une

numération sanguine. De même, la fréquence importante d'une atteinte cardiaque impose le dosage des marqueurs de souffrance myocardique tels que la troponine ou encore le *brain natriuretic peptide (BNP)*. Un bilan biologique exhaustif permet donc de faire un « état des lieux » du degré d'atteinte systémique, par conséquent d'engager des mesures thérapeutiques adaptées et ainsi optimiser la prise en charge des patients.

### c. Examens électrophysiologiques

La réalisation systématique d'un électrocardiogramme (ECG) dans le cadre du bilan de prise en charge d'une HSA a pour objectif de dépister des anomalies électrocardiographiques éventuelles qui peuvent être associées à une atteinte myocardique. Comme notifié plus haut, ces anomalies à l'ECG vont menacer le pronostic vital des patients à court terme.

La réalisation d'un électroencéphalogramme (EEG) n'est pas recommandée à titre systématique au cours de la prise en charge. Elle pourra avoir un intérêt diagnostique pour dépister une épilepsie, notamment lorsque celle-ci est infraclinique, de surcroît chez les patients qui vont nécessiter une sédation continue. Le dépistage de l'épilepsie aura alors, si celle-ci est confirmée, un intérêt thérapeutique majeur.

## h) Prise en charge thérapeutique

### a. Gestion préhospitalière

Le diagnostic d'HSA impose le transfert en urgence vers le centre de recours le plus proche équipé d'un plateau technique adapté, c'est-à-dire doté d'un service de soins critiques, de neurochirurgie, ainsi que de radiologie interventionnelle. Le transfert doit s'effectuer dans des conditions de sécurité pour le patient, et doit donc être impérativement médicalisé. En ce sens, il est essentiel d'entreprendre les premières mesures symptomatiques afin d'optimiser la prise en charge des dommages aigus, et de sécuriser le transport. Le patient doit alors bénéficier d'un monitoring de la saturation périphérique en oxygène, la pression artérielle et la fréquence cardiaque durant le transport. L'oxygénation, voire la sécurisation des voies aériennes avec mise en place d'une ventilation mécanique invasive en cas de coma avec GSC

inférieur ou égal à 8, est indispensable. De même, une optimisation hémodynamique est recommandée, bien que le niveau de pression artérielle cible reste débattu. En effet, l'HTA aiguë est un facteur de risque de resaignement, mais elle expose au risque d'hypoperfusion cérébrale et donc *in fine* au risque d'ischémie cérébrale. En parallèle, si le patient présente des signes cliniques d'HTIC voire d'engagement cérébral, ces derniers imposent d'entreprendre des mesures thérapeutiques symptomatiques à visée de neuroprotection. Les traitements à disposition en secteur préhospitalier sont alors, la sédation-analgésie profonde et/ou l'osmothérapie.

#### b. Prise en charge en unité de soins critiques et réanimation

La prise en charge en unité de soins critiques et réanimation consiste, à la phase initiale, en une stabilisation du patient avec prise en charge des différentes défaillances d'organes.

La prise en charge initiale est celle de la défaillance neurologique avec gestion de l'HTIC selon les recommandations. Selon la réponse aux différents traitements, il est possible d'incrémenter le niveau de prise en charge allant de la sédation analgésique thérapeutique, la curarisation, l'osmothérapie, l'hypothermie thérapeutique jusqu'à la craniectomie chirurgicale de décompression. Selon la gravité initiale de l'HSA, il est parfois recommandé de recourir à un monitoring invasif et continu de la PIC dans le but d'optimiser la prise en charge.

En parallèle, la prise en charge en réanimation a pour objectif la stabilisation hémodynamique par le biais de monitorages dédiés, et donc la mise en place de thérapeutiques adaptées. La prise en charge thérapeutique optimale de l'HTA demeure peu claire. Pour la majorité des patients à la phase aiguë de l'HSA, il paraît opportun de maintenir une pression artérielle systolique inférieure à 160 mmHg selon les recommandations (Connolly et al. 2012). Le maître mot est l'éviction de l'hypotension artérielle.

Il est parfois nécessaire de recourir à des techniques spécialisées en cas de défaillance respiratoire associée, le plus fréquemment en rapport avec la survenue d'un œdème pulmonaire. De même, la survenue d'une défaillance rénale peut parfois imposer la mise en place de techniques de suppléances spécifiques.

La prise en charge initiale en réanimation requiert également la mise en place d'un monitoring spécifique. Ainsi, le patient devra être monitoré en continu de sa fréquence cardiaque, ECG

continu, saturation périphérique, mais également équipé d'un cathéter de pression artérielle invasive pour monitoring de la pression artérielle en continu, d'un EEG continu. Par ailleurs, des Dopplers transcrâniens (DTC) devront être réalisés quotidiennement en l'absence d'évaluation clinique neurologique possible. Les DTC vont permettre de détecter et de monitorer la survenue du vasospasme. Pour les patients dont la sévérité de l'HSA impose un transfert en réanimation, il est indispensable d'effectuer une surveillance continue avec des examens neurologiques répétés pluriquotidiens à la phase aiguë. Le risque d'évolution vers un tableau d'HTIC est à redouter à la phase initiale. Par la suite, la fréquence de survenue de vasospasme et d'ICR rend indispensable une surveillance rapprochée.

Le monitoring de la PIC pourra s'effectuer par l'intermédiaire de la mise en place d'une dérivation ventriculaire externe (DVE) qui va permettre le drainage continu du LCS. La mise en place d'un tel dispositif est recommandée dans le cas de la présence d'une hémorragie ventriculaire ou lorsque le score WFNS est supérieur ou égal à 3. Il permet donc d'une part le drainage du LCS afin d'éviter la survenue d'une hydrocéphalie et ainsi permettre le contrôle de la PIC, mais également le monitoring continu de la PIC et de la pression de perfusion cérébrale (PPC). La PPC, qui est le meilleur reflet du débit sanguin cérébral (DSC), est obtenue en calculant la différence entre pression artérielle moyenne (PAM) et la pression veineuse corticale qui est approximée par la PIC car les veines corticales ne se collabent jamais, ce qui aboutit à  $PPC = PAM - PIC$ .

A l'issue de la prise en charge des différentes défaillances d'organes, la prise en charge en réanimation consiste en une optimisation des paramètres tels que la température, la glycémie, la natrémie, l'hémoglobémie, la pression artérielle, la pression partielle en  $CO_2$  ( $PaCO_2$ ) ainsi que la pression partielle en  $O_2$  ( $PaO_2$ ). L'optimisation de ces différents paramètres va permettre de lutter contre les ACSOS. En effet, ces ACSOS vont être à l'origine de dommages cérébraux secondaires s'ils sont négligés. Parmi ces paramètres, certains jouent également un rôle clé dans la physiologie de la perfusion cérébrale. Pour exemple, le maintien d'une normocapnie ( $PaCO_2$  normale) va être un point clé de la prise en charge. En effet, la  $PaCO_2$  étant le plus puissant vasoconstricteur cérébral, de faibles variations (baisse) de  $PaCO_2$  peuvent conduire à un risque d'ischémie cérébrale majeure. De la même façon, l'autorégulation cérébrale en pression permet le maintien d'une perfusion cérébrale adaptée à la valeur de PIC. C'est en ce sens, que le maintien d'une valeur de pression artérielle minimale est indispensable.

Malheureusement, en cas d'HSA sévère, cette autorégulation en pression peut être abolie. Ce phénomène doit donc être dépisté par un monitoring de la PPC et de la PIC en continu, et ainsi entreprendre le cas échéant des mesures thérapeutiques appropriées.

Parmi les mesures symptomatiques immédiates avant la prise en charge du saignement, l'arrêt des traitements antithrombotiques ainsi que l'antagonisation des traitements anticoagulants utilisés au long cours sont recommandés (Frontera et al. 2015).

En parallèle, l'utilisation d'une prophylaxie antithrombotique médicamenteuse est recommandée dès la sécurisation de l'anévrisme effectuée.

La mise en place d'un traitement prophylactique antiépileptique n'est pas recommandée.

Le maintien d'une euvolémie est recommandée, bien que les modalités n'en soient pas précisées (Suarez 2015).

Le traitement par Nimodipine orale dans le cadre de la prévention du vasospasme est actuellement recommandée à la dose de 60 mg toutes les 4 heures pour une durée de 21 jours. Cependant, en dépit de ses effets vasodilatateurs à l'étage vasculaire cérébral, il n'existe pas aujourd'hui d'évidence quant à la diminution du vasospasme angiographique ou symptomatique sous Nimodipine (Allen et al. 1983; Pickard et al. 1989; Feigin et al. 1998). En revanche, la Nimodipine aurait un effet sur le devenir neurologique des patients après HSA dans plusieurs études randomisées et méta-analyses (Feigin et al. 1998; Dayyani et al. 2022; Mees et al. 2008). Le mécanisme lié au bénéfice retrouvé de la Nimodipine reste mal expliqué.

#### c. Prise en charge du saignement / de l'anévrisme

Afin d'éviter le resaignement, il est indispensable d'envisager le traitement de l'anévrisme en cause dans les 24 premières heures suivant l'HSA. Actuellement, les deux options thérapeutiques pour exclure un anévrisme rompu sont le clippage microchirurgical et l'embolisation par voie endovasculaire. Le choix de la technique utilisée doit être le résultat d'une discussion pluridisciplinaire, notamment entre neurochirurgiens et neuroradiologues interventionnels en fonction des caractéristiques du patient et de l'anévrisme.

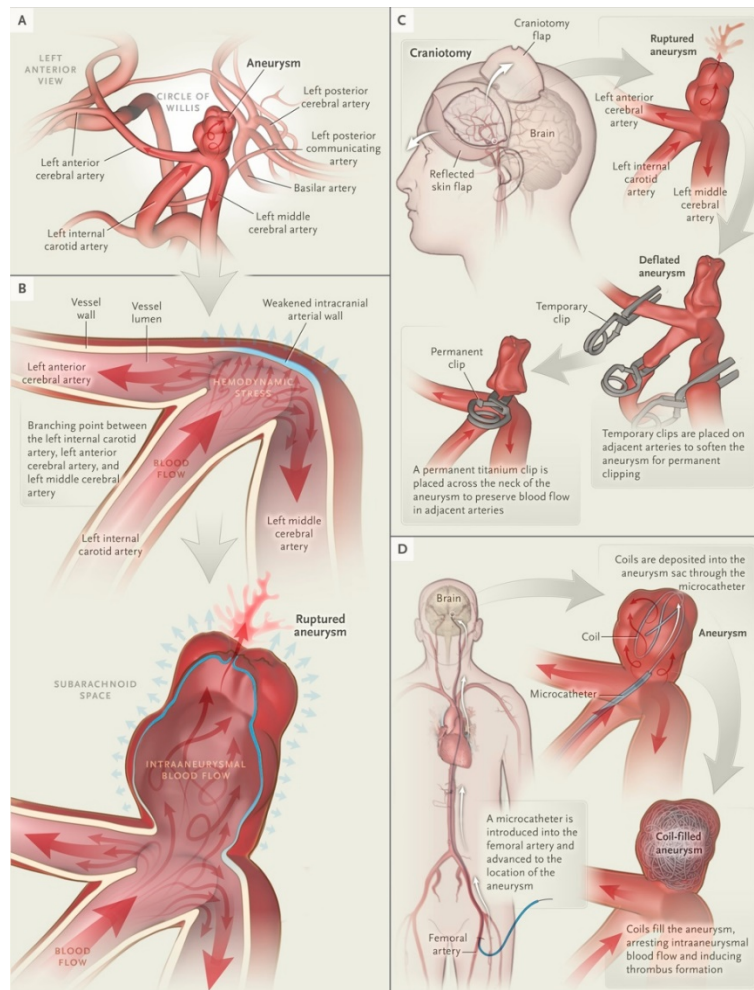
### *i. Technique endovasculaire*

La technique endovasculaire est réalisée par les neuroradiologues interventionnels. En pratique, la mise en place de fines spirales métalliques (*coils*) au niveau de l'anévrisme permet son exclusion. L'abord est peu invasif puisqu'il se fait par voie endovasculaire. Les complications les plus fréquentes sont les complications thromboemboliques, les perforations du sac anévrisimal, les dissections artérielles, et les problèmes techniques liés au matériel utilisé (par exemple l'embolisation accidentelle de *coils*) (Figure 8).

Le traitement endovasculaire doit être privilégié dans certains cas, que sont les patients âgés de plus de 70 ans, avec un score WFNS 4-5, et ceux présentant un anévrisme du tronc basilaire. Lorsque les deux techniques sont possibles (embolisation et chirurgie), il est recommandé de préférer la technique endovasculaire (Connolly et al. 2012).

### *ii. Technique chirurgicale*

Le *clipping* chirurgical doit être considéré chez les patients présentant un large hématome intra-parenchymateux (>50 ml) associé à un anévrisme de l'artère cérébrale moyenne (Connolly et al. 2012). Il consiste en un abord direct de la zone d'intérêt par une craniotomie. Le risque des complications inhérentes à une chirurgie intracrânienne doit être considéré dans le choix de la technique (Figure 8).



**Figure 8** : traitement de la lésion anévrismale en cause d'après (Lawton and Vates 2017).

**(A)** Anatomie du polygone de Willis. L'artère carotide interne pénètre dans le crâne par le bas puis suit un parcours à travers l'espace sous-arachnoïdien, dégageant des branches perforantes qui alimentent le parenchyme. Une pression pulsatile élevée aux points de ramification de l'artère proximale (flèche, **B**) peut favoriser la formation d'anévrismes sacculaires. Dans de tels cas, un anévrisme se forme au point d'implantation d'une artère, là où la contrainte pulsatile artérielle est maximale. La plupart des lésions restent silencieuses jusqu'à la rupture, moment auquel le sang est rapidement libéré dans l'espace sous-arachnoïdien, entraînant des effets précoces tels qu'une élévation de la pression intracrânienne, une irritation parenchymateuse, un œdème et une hydrocéphalie et des effets retardés, tels qu'un vasospasme et une ischémie cérébrale retardée. La réparation chirurgicale d'un anévrisme (**C**) implique d'exposer l'anévrisme et les artères adjacentes afin que le chirurgien puisse appliquer une pince en titane sur le col de l'anévrisme, ce qui l'exclut effectivement de la circulation artérielle. L'anévrisme est ensuite exclu et le réseau vasculaire est inspecté pour s'assurer qu'aucune branche n'est compromise par le placement du clip. Les parois internes de la base de l'anévrisme sont rapprochées par le clip, ce qui permet généralement une guérison à vie de la lésion. La réparation endovasculaire d'un anévrisme (**D**) implique l'insertion d'un cathéter intra-artériel dans la circulation sous guidage radiologique jusqu'à ce que la pointe du cathéter se trouve dans la lumière de l'anévrisme. Avec l'utilisation du cathéter, des *coils* sont introduits et relargués dans la lumière de l'anévrisme, ce qui ralentit ou empêche le flux sanguin dans l'anévrisme et conduit à la



formation de thrombus, bloquant ainsi efficacement l'entrée du sang artériel dans l'anévrisme. L'examen angiographique du résultat confirme l'écoulement dans les branches artérielles saines.

#### i) Pronostic

Le devenir après traitement initial de l'HSA anévrismale est impacté par les lésions cérébrales en rapport direct avec le saignement initial, mais également par les lésions neurologiques secondaires.

#### a. Mortalité

##### Mortalité à court terme

Le taux de mortalité à la phase initiale de l'HSA est élevé (Gijn, et al. 2007). Entre 18 et 24% des patients vont décéder avant même leur prise en charge hospitalière (Asikainen et al. 2023; Lindbohm et al. 2017). Parmi les patients arrivant vivants à l'hôpital, la mortalité va être liée au saignement initial, à l'hydrocéphalie, l'HTIC, la comitialité associée, au resaignement, à l'ICR mais également liée aux complications extra-neurologiques (notamment cardiaques). Alors même que la mortalité initiale reste élevée, celle-ci a diminué avec les années avec l'amélioration et la standardisation des prises en charge diagnostiques et thérapeutiques. En effet, pour exemple, une étude finlandaise a montré une baisse du taux de mortalité à 30 jours de 2% par an entre 1998 et 2017 des patients hospitalisés pour une HSA (Asikainen et al. 2023).

##### Mortalité à long terme

Les patients survivants après HSA ont un risque de mortalité plus élevé que la population générale. Le taux de mortalité à un an s'élève à 22% selon un registre suisse de près de 2000 patients (Schatlo et al. 2020). De façon plus précise, il semblerait que le taux de mortalité à 5 ans soit plus bas chez les patients ayant bénéficié d'un traitement par voie endovasculaire comparé aux patients ayant eu un traitement chirurgical (Molyneux et al. 2009).

## b. Pronostic neurologique

Les complications neurologiques à l'origine des séquelles à long terme après HSA, sont représentées par des troubles neurocognitifs, de l'épilepsie mais également un large panel de déficits neurologiques focaux. Ce sont ces séquelles à long terme qui vont être source de handicap pour les patients qui survivent dans les suites d'une HSA. Plus de 10% des patients seraient considérés comme ayant un handicap modéré à sévère persistant après HSA (Schatlo et al. 2020).

Des études suggèrent l'importance des déficits neurocognitifs avec notamment la persistance de troubles mnésiques et des troubles neuropsychologiques chez 20% des patients survivants à 3 mois après HSA (Anderson et al. 2006). Les séquelles neuropsychologiques peuvent comprendre également de la dépression, du stress, de l'anxiété mais aussi des troubles de sommeil. La localisation de l'anévrisme, le type de traitement n'apparaissent pas comme étant des facteurs de risque de séquelles neurocognitives, en revanche, la survenue d'ICR ou de vasospasme impacte le risque de séquelles (MacDonald et al. 2012; Wong et al. 2013).

L'évaluation des séquelles neurologiques à distance de l'HSA peut être effectuée par le biais de plusieurs échelles d'évaluation. Les deux échelles les plus usitées et recommandées sont l'échelle de Rankin modifiée (mRS) (table 6) (Banks and Marotta 2007) et le *Glasgow Outcome Scale (GOS)* ou GOS extended (GOSE) (table 7) (Fayol et al. 2004). Cette échelle évalue davantage le degré de dépendance engendré par les séquelles neurocognitives présentées.

**Table 6** : Echelle de Rankin modifiée (mRS)

0	Aucun symptôme
1	Pas d'incapacité significative en dehors des symptômes ; activités et autonomie conservés
2	Légère incapacité ; incapable de mener à bien toutes ses activités antérieures, mais capable de mener ses propres affaires sans assistance
3	Incapacité modérée ; requiert certaines aides, mais capable de marcher sans assistance
4	Incapacité modérément sévère ; incapable de marcher sans assistance et incapable de s'occuper de ses propres besoins sans assistance
5	Incapacité sévère ; confiné au lit, incontinent et nécessitant une attention et des soins constants de nursing
6	Décès

**Table 7** : Echelle *Glasgow Outcome Scale Extended*

GOS-E category	Abbreviation	Description
Death	Death	Dead
Vegetative state	VS	Unable to obey commands
Lower severe disability	LSD	Dependent on others for care
Upper severe disability	USD	Independent at home
Lower moderate disability	LMD	Independent at home and outside the home but with some physical or mental disability
Upper moderate disability	UMD	Independent at home and outside the home but with some physical or mental disability, with less disruption than LMD
Lower good recovery	LGR	Able to resume normal activities with some injury-related problems
Upper good recovery	UGR	No injury-related problems

## HEMORRAGIE SOUS-ARACHNOÏDIENNE

- L'HSA correspond à une issue brutale de sang dans les espaces sous-arachnoïdiens.

L'étiologie la plus fréquente, acquise, est la rupture d'un anévrisme sacculaire des artères intracrâniennes.

- Les manifestations cliniques sont classiquement la survenue de céphalées brutales et intenses. L'échelle WFNS va permettre d'évaluer la sévérité clinique initiale qui va être corrélée à la morbi-mortalité de l'HSA.
- Les complications après HSA peuvent être :
  - Précoces comme l'hydrocéphalie, l'HTIC, le resaignement, l'épilepsie, les complications métaboliques et cardiopulmonaires.
  - Retardées comprenant l'ischémie cérébrale retardée (ICR) et l'hydrocéphalie chronique à pression normale
- La prise en charge diagnostique consiste en la réalisation d'un scanner cérébral sans injection de produit de contraste qui va permettre de confirmer le diagnostic d'HSA et d'en évaluer la sévérité. La réalisation dans le même temps d'un angioscanner cérébral va permettre de poser le diagnostic étiologique en permettant de mettre en évidence la présence de l'anévrisme en cause.
- La prise en charge thérapeutique s'effectue en deux temps :
  - La prise en charge initiale comprend un traitement dit symptomatique des complications aiguës, avec la mise en place de supports d'organes si nécessaire, ainsi que le drainage du LCS si celui-ci est indiqué.
  - Le traitement de l'anévrisme est réalisé dans les premières 24 heures et consiste dans la majorité des cas en un traitement endovasculaire ou chirurgical.
- Le pronostic des HSA est lié aux lésions initiales mais aussi aux lésions cérébrales secondaires.
  - Le taux de mortalité à la phase initiale reste élevé autour de 20%.
  - Le pronostic neurologique va ensuite dépendre également de la survenue d'I'ICR.
  - Les séquelles à long terme vont être source de handicap fonctionnel et/ou neurocognitif, à l'origine d'une morbi-mortalité plus élevée que dans la population générale.

## B. ISCHEMIE CEREBRALE RETARDEE

### a) Définition, diagnostic et facteurs de risques

L'ischémie cérébrale retardée (ICR) est une complication fréquente après une HSA puisqu'elle survient dans près de 30% des cas et contribue à une morbi-mortalité élevée (Suarez 2015; Vergouwen et al. 2010). L'ICR est définie par la survenue d'un déficit neurologique focal persistant (comme une aphasie, une hémiparésie, une hémianopsie, une hémignégligence) ou la modification du GCS avec une baisse d'au moins deux points de celui-ci, associée à la preuve d'ischémie faite à l'imagerie (ou histologie / autopsie). C'est en 2010 qu'un comité d'experts a établi une définition claire de l'ICR. En effet, auparavant, l'absence de définition claire ne permettait pas d'établir un diagnostic précis et standardisé des patients présentant une telle complication neurologique après HSA. En effet, le terme d'ischémie retardée était souvent attribué à la survenue du vasospasme qui, on le verra plus loin, n'est qu'un des mécanismes pouvant conduire à l'ICR. Cette définition a donc permis d'en faire le diagnostic et ainsi pouvoir envisager de façon plus rigoureuse la réalisation d'études scientifiques cliniques et pré-cliniques sur le sujet. Le diagnostic peut être posé après avoir écarté d'autres causes attribuables à la survenue de ce déficit, et notamment une complication immédiate après occlusion anévrysmale. En effet, comme nous l'avons vu plus haut, les deux techniques permettant d'exclure l'anévrysme causal ne sont pas sans risque. Par exemple, des complications emboliques artérielles per-procédure endovasculaire peuvent survenir.

Cette définition rend le diagnostic difficile chez les patients qui ne peuvent être évalués cliniquement comme ceux requérant une sédation profonde continue ou encore ceux ayant une altération profonde de la vigilance à la prise en charge initiale (Schmidt et al. 2008). Dans ces 2 cas de figure, la surveillance clinique neurologique et la cinétique d'évolution sont rendus difficiles.

La survenue de l'ICR est décrite de façon typique entre le 4<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour après HSA. Dès la suspicion clinique, il est nécessaire de réaliser une imagerie cérébrale (IRM ou scanner cérébral) afin d'objectiver une zone d'ischémie constituée pour confirmer le diagnostic d'ICR, conformément à la définition. Sur une cohorte de 56 patients avec ICR, il a été mis en évidence

que les deux principaux types de lésions retrouvés à l'imagerie étaient des infarctus corticaux uniques à proximité de la zone de rupture anévrysmale dans 40% des cas, mais également de multiples zones ischémiques constituées, disséminées de façon bilatérale hémisphérique dans les régions sous-corticales dans 50% des cas, et parfois à distance de la zone anévrysmale (Rabinstein et al. 2005). La mise en évidence d'une ischémie par un scanner de perfusion réalisé dans les 3 premiers jours après HSA pourrait permettre de prédire la survenue d'une ischémie cérébrale retardée (Van Der Schaaf et al. 2006). Ces résultats sont encore préliminaires mais prometteurs. L'IRM peut elle aussi permettre d'évaluer les régions à risque d'ischémie en faisant appel à des séquences en diffusion. Comme lors des AVC ischémiques, l'existence d'une inadéquation (ou encore appelée communément « mismatch ») diffusion-perfusion peut être utilisée pour décider d'une intervention neuroradiologique (Vatter et al. 2011).

Dans le cadre d'une démarche diagnostique précoce, le dosage plasmatique de la protéine S100bêta pourrait être un outil intéressant dans la prédiction de survenue de l'ICR. S100bêta est synthétisée principalement par les cellules gliales du système nerveux central et par les cellules de Schwann. Sa concentration dans le LCS et le sang augmente lors d'une atteinte lésionnelle neurologique aiguë d'origine traumatique ou vasculaire. Le dosage de la concentration plasmatique de la protéine S100B apporte une aide au diagnostic des atteintes cérébrales aiguës et peut s'inscrire parmi les biomarqueurs permettant un suivi de l'évolution et les séquelles engendrées par la lésion initiale. La moyenne de la valeur des 15 premiers jours après HSA (et non la valeur initiale) serait en effet corrélée au devenir des patients à 12 mois dans une série prospective de 109 patients avec HSA (Sanchez-Peña et al. 2008).

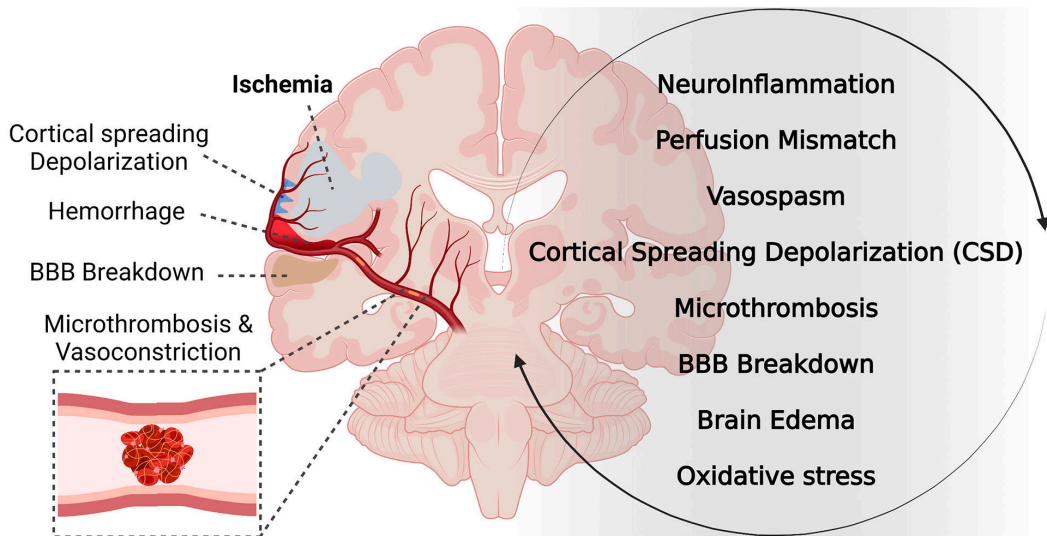
Concernant les facteurs de risque de survenue d'ICR, il apparaît établi aujourd'hui que les patients ayant une HSA sévère auraient plus de risque de développer une ICR. La sévérité de l'HSA va être caractérisée radiologiquement par le stade Fisher au scanner, mais aussi par l'évaluation clinique initiale. De même, les patients de moins de 55 ans ainsi que les patients fumeurs seraient plus exposés à la survenue d'ICR (Juvola et al. 2005; Crobeddu et al. 2012; De Rooij N 2013).

## b) Physiopathologie

La physiopathologie de l'ICR demeure à l'heure actuelle mal élucidée. La définition de l'ICR établie en 2010 a néanmoins permis de faciliter les investigations à ce sujet. Le référentiel international d'essais sur l'HSA (*Subarachnoid Hemorrhage International Trialist*) a permis d'harmoniser les études cliniques en fixant les critères de jugement nécessaires (Jaja et al. 2014). Depuis, plusieurs études ont avancé sur la physiopathologie de l'ICR et notamment mis en avant l'implication de l'inflammation et de la microcirculation dans la genèse de l'ICR (figure 9). Le vasospasme ayant longtemps été mis en avant comme seule origine de la survenue d'infarctus cérébraux secondaires, il est établi aujourd'hui qu'il ne suffit pas à lui seul à expliquer l'ICR. En effet, il a été observé chez certains patients le développement d'une authentique ICR en l'absence de vasospasme à l'angiographie. A l'inverse, certains patients chez qui il a été objectivé un vasospasme, ne vont pas développer d'ICR. Il est donc convenu à l'heure actuelle du caractère multifactoriel des mécanismes conduisant à l'ICR.

Les premières 24-48 heures après le saignement initial représentent la phase aiguë à l'origine de **lésions cérébrales précoces** (autrement appelée « *early brain injury* »), caractérisée par les dommages liés à l'HTIC et l'ischémie globale transitoire. L'œdème cérébral, la perméabilisation de la barrière hématoencéphalique, l'activation du système nerveux sympathique, la perte de l'autorégulation cérébrale, la microthrombose, les dépolarisations corticales propagées et l'inflammation ont été observés durant cette phase précoce (Hospital et al. 2015). Dans les suites, la présence de sang dans les espaces sous-arachnoïdiens vient aggraver ces phénomènes, conduisant *in fine*, dans certains cas à la survenue d'ICR autour du 4<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jour après HSA.

## Pathophysiology of Delayed Cerebral Ischemia after SAH



**Figure 9** : physiopathologie de l'ICR d'après (Goursaud et al. 2021)

Nous allons donc développer ci-dessous les différentes composantes décrites dans la littérature, en catégorisant en trois champs interconnectés : la dysfonction vasculaire, l'inflammation et les dépolarisations corticales propagées.

### a. Dysfonction vasculaire

La survenue d'ICR est le résultat d'une inadéquation entre la perfusion cérébrale et le métabolisme cérébral, quelle qu'en soit la cause. Dans cette partie, nous allons donc développer les différents mécanismes à l'origine d'une dysfonction vasculaire pouvant conduire à l'ICR ([figure 14](#)).

A la phase aiguë initiale, l'**ischémie globale transitoire** pourrait être le facteur déclenchant de cette dysfonction vasculaire. En effet, cette première phase serait initiée par une activation du système sympathique causant la libération excessive de catécholamines endogènes, à l'origine d'une lésion ischémique de l'hypothalamus, ainsi qu'une compression du tronc cérébral. En parallèle, l'ischémie globale transitoire provoque des lésions endothéliales ainsi qu'une altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les dommages de l'endothélium et la mort cellulaire qui résultent de cette ischémie transitoire surviennent dans les premières 24



heures suivant l'HSA. Ils seraient à l'origine de la perturbation de la BHE mais favoriseraient également la coagulation en exposant le collagène sous-endothélial. Ces phénomènes conduisent tous deux à la formation d'un œdème vasogénique cérébral. Une autre conséquence de cette ischémie transitoire serait l'augmentation de l'expression de l'endothéline-1, aux effets vasoconstricteurs.

L'**hémoglobine** et les autres produits du sang séquestrés dans les membranes érythrocytaires relarguent l'oxyhémoglobine et d'autres substances vasoactives. Il a été rapporté chez le primate une augmentation notable de la concentration en oxyhémoglobine et désoxyhémoglobine dans le LCS, avec un pic 7 jours après HSA, ce qui correspond à la phase d'agression secondaire après HSA, qui fait suite au premier pic de lésions cérébrales précoces des 24 premières heures (Pluta et al. 1998). Bien que les mécanismes exacts soient mal connus, il semblerait que la présence d'hémoglobine serait le premier facteur « spasmogène ».

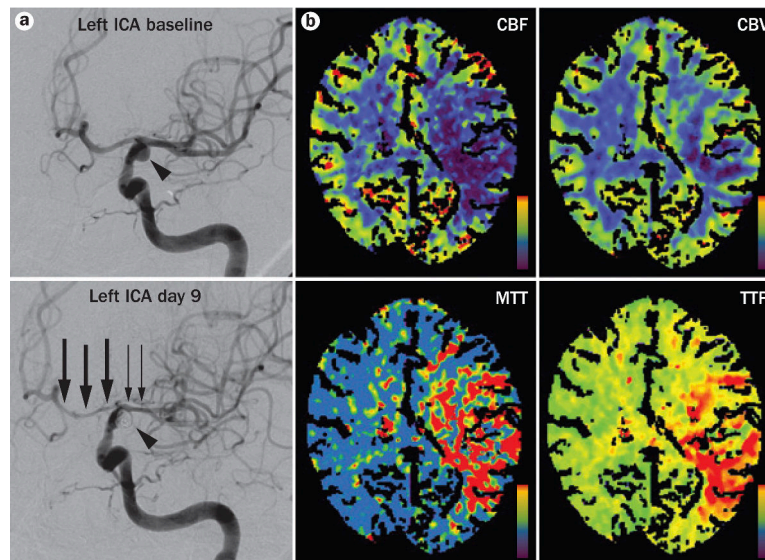
### Le vasospasme

Le mécanisme conduisant à l'ICR le plus communément admis est le vasospasme (Rabinstein et al. 2004). Le vasospasme est caractérisé en angiographie par la réduction de calibre d'une artère intracérébrale. Cette réduction est associée à des modifications structurelles histologiques de la paroi vasculaire. Les signes cliniques varient de la simple fièvre, à la confusion ou à l'apparition d'un déficit moteur ou d'une aphasie. Le mécanisme déclenchant du vasospasme est la présence de sang dans les espaces sous-arachnoïdiens. Des produits du métabolisme de l'hémoglobine semblent activer certaines voies : augmentation de l'endothéline, réduction de la production de monoxyde d'azote (NO), stress oxydant exercé sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux, formation d'acide hydroxy-eicosatétraénoïque (20-HETE) à partir de l'acide arachidonique (Zhang et al. 2009).

L'examen de référence pour le diagnostic de vasospasme reste l'artériographie cérébrale, qui a néanmoins l'inconvénient d'être trop sensible (le taux de vasospasme angiographique est supérieur à celui de vasospasme symptomatique), mais l'avantage de permettre le traitement endovasculaire s'il est indiqué. Le scanner cérébral peut contribuer au diagnostic de vasospasme selon ses deux modalités récentes d'injection. L'angioscanner permet une

évaluation anatomique du vasospasme avec une excellente spécificité, particulièrement pour le vasospasme sévère. Le scanner de perfusion permet d'estimer la perfusion du parenchyme par la mesure du temps de transit moyen (MTT), qui entre dans le calcul du débit sanguin cérébral. L'allongement du MTT et la baisse du débit sont reliés au risque de développer une ischémie cérébrale.

La sévérité du vasospasme dépend de la localisation du vaisseau concerné et de l'existence ou non d'un réseau collatéral de suppléance. Le vasospasme survient à partir du 3<sup>ème</sup> jour après HSA avec un pic de survenue entre le 7<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> jour. La survenue de vasospasme résulterait de la sécrétion endogène de substances vasoconstrictrices produites à l'issue de la dégradation du sang dans les espaces sous-arachnoïdiens. La localisation de la rupture anévrysmale, ainsi que la sévérité du saignement caractérisé par la classification Fisher au scanner, sont des facteurs prédictifs de survenue de l'ICR (Kistler et al. 1983; Ko et al. 2011). Il est important de distinguer le vasospasme angiographique qui, au 7<sup>ème</sup> jour, survient chez 30 à 70% des patients après HSA, du vasospasme symptomatique c'est-à-dire associé à la survenue d'un déficit neurologique, qui, lui, survient chez 20 à 30% des patients (Kassell et al. 1985; Frontera et al. 2009; Vergouwen et al. 2011). Le diagnostic de vasospasme est parfois suspecté lors des surveillances par doppler trans-crânien (DTC). Dans ce cas, ils vont objectiver une augmentation anormale des vitesses des flux des artères intracrâniennes en cause. Le diagnostic nécessitera d'être alors confirmé par la réalisation d'un angioscanner ou d'une angiographie. Dans une étude menée chez 381 patients hospitalisés pour une HSA, une angiographie était réalisée à titre systématique à  $9 \pm 2$  jours. Chez ces patients, la présence et la sévérité du vasospasme étaient corrélées à la présence d'un infarctus cérébral au scanner (Crowley et al. 2011). Dans environ 30 à 40 % des cas, le vasospasme entraîne un déficit neurologique ischémique différé (DNID), évoluant vers un infarctus cérébral séquellaire définitif dans la moitié des cas. Si le vasospasme peut être responsable d'ischémie cérébrale retardée (ICR), on reconnaît maintenant à celle-ci d'autres causes. En effet, si le vasospasme entraîne souvent une hypoperfusion, il est bien démontré qu'une ICR est susceptible de survenir chez des patients sans vasospasme (Dhar et al. 2012) (figure 10). De plus, de nombreuses thérapeutiques ayant pour objectif d'entraîner une vasodilatation ont été testées, et n'ont pas permis de réduire l'incidence de l'ICR.



**Figure 10** : Dissociation entre vasospasme cérébral et déficit de perfusion.

**(a)** Angiographie réalisée à t0 chez un patient avec une HAS qui montre un anévrisme de l'ACP gauche. L'angiographie réalisée au 9<sup>ème</sup> jour objective l'anévrisme embolisé (pointe de flèche) avec un vasospasme sévère de l'ACA gauche (flèches larges) ainsi qu'un vasospasme modéré de l'ACM homolatérale (petites flèches).

**(b)** Scanners de perfusion, réalisés pour évaluer les conséquences hémodynamiques de l'HSA, qui objective une réduction du DSC et du VSC avec une augmentation du MTT. Ces observations sont en accord avec une ischémie réversible dans le territoire de l'ACM gauche mais pas au niveau de l'ACA, où le vasospasme le plus sévère est observé.

ACA : artère cérébrale antérieure ; ACM : artère cérébrale moyenne ; ACP : artère communicante postérieure ; DSC : débit sanguin cérébral ; VSC : volume sanguin cérébral ; ICA : artère carotide interne; MTT: temps de transit moyen. D'après (Budohoski et al. 2013)

### La microthrombose et la thromboinflammation

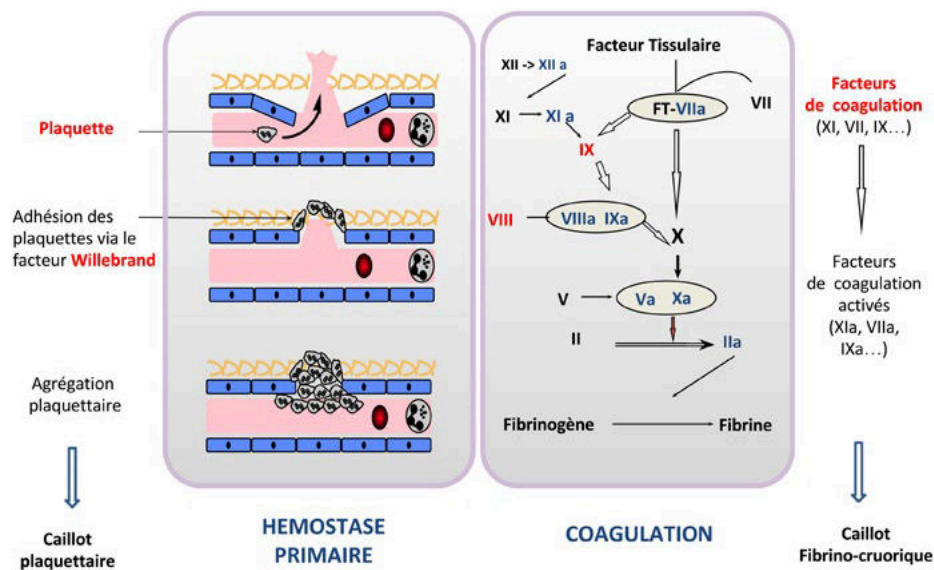
La microthrombose correspond à la formation de caillots de sang au niveau de la microcirculation artérielle ou veineuse. L'ICR peut être la conséquence de la formation de micro-thrombi en rapport avec l'activation de cascades de la coagulation dans les jours suivant l'HSA. En effet, ces micro-thrombi ont été mis en évidence en autopsie (Vergouwen et al. 2008).

#### ○ Physiopathologie des thromboses

Afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de de la microthrombose, et d'appréhender plus facilement les cibles thérapeutiques éventuelles, il est important d'en

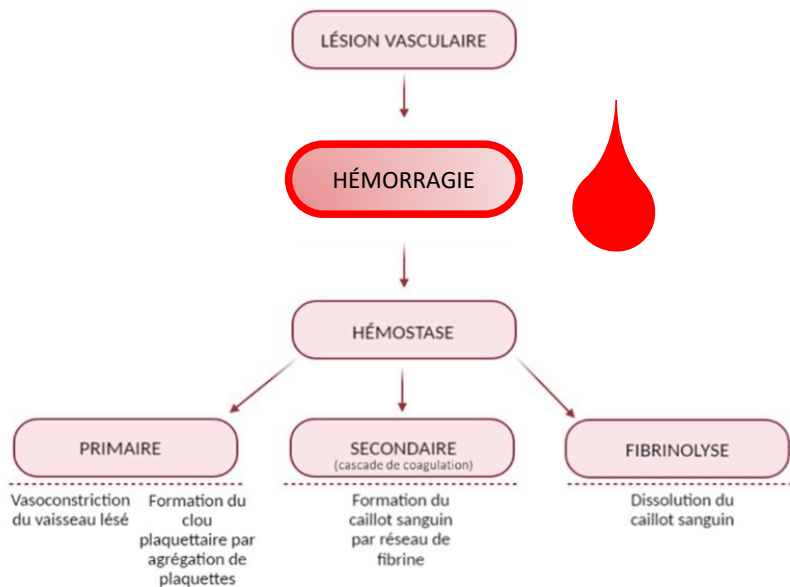
rappeler brièvement les mécanismes physiopathologiques. La physiopathologie des thromboses peut être abordée à partir de trois composantes : les perturbations rhéologiques, l'activation du système d'hémostase et les atteintes de la paroi vasculaire. En ce qui concerne le rôle de la rhéologie dans la thrombose, deux phénomènes peuvent conduire à la formation de thromboses : la stase sanguine et la rupture du flux laminaire présent à l'état physiologique. Cette diminution du flux peut être due à un état d'hyperviscosité sanguine.

L'activation du système d'hémostase va également conduire à la formation de thromboses (figure 11). Nous allons nous intéresser plus particulièrement à ce mécanisme. En effet, ses différentes étapes, notamment l'hémostase primaire, vont être intéressantes à connaître dans le but de mieux appréhender les mécanismes conduisant à la thrombose mais surtout le rôle des différents composants, leur implication dans la survenue des microthrombose conduisant à l'ICR, et donc leur potentiel intérêt thérapeutique.



**Figure 11 :** Représentation schématique de l'hémostase d'après (Scheved 2015)

A l'état physiologique, l'hémostase est donc classiquement décomposée en 3 étapes : l'hémostase primaire, la coagulation (ou hémostase secondaire) et enfin la fibrinolyse (figure 12). Les interactions entre la coagulation et la voie fibrinolytique sont extrêmement critiques pour maintenir un équilibre thrombo-hémorragique.



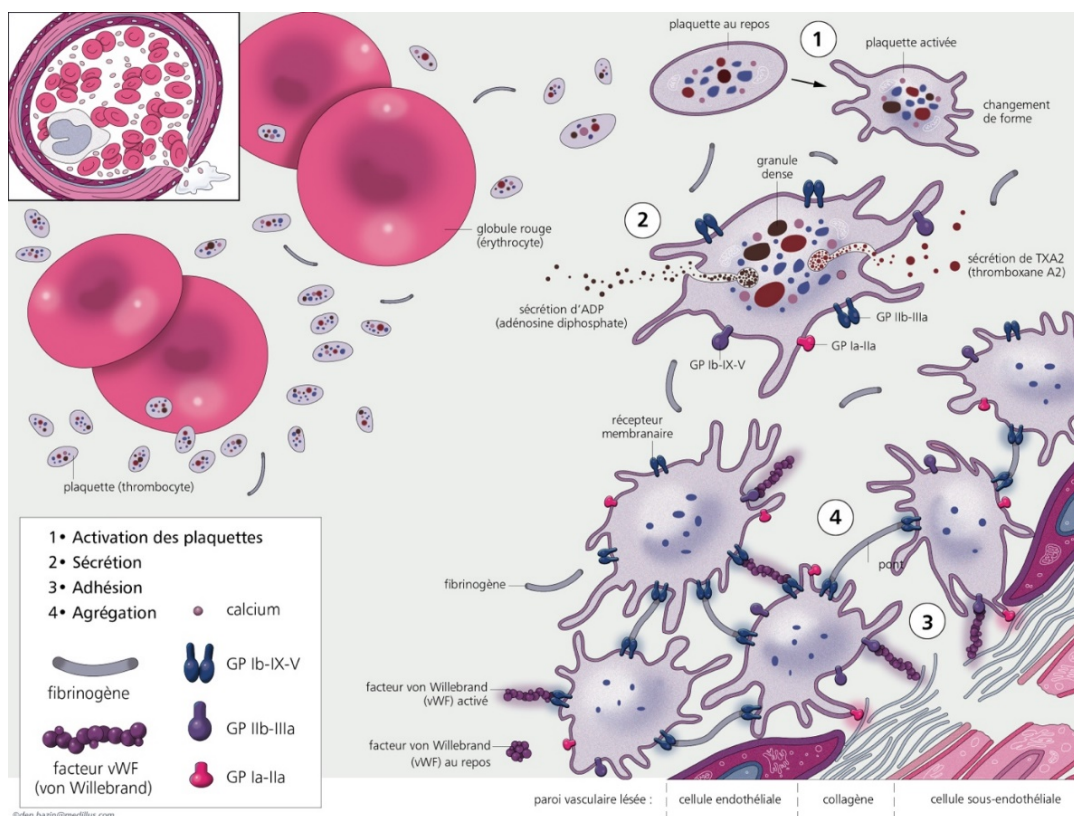
[Figure 12](#) : Représentation schématique de l’hémostasie lors d’une lésion vasculaire et ses trois étapes interdépendantes.

### - L’hémostasie primaire

L’hémostasie primaire fait référence à l’activation et à l’agrégation des plaquettes, entraînant la formation temporaire d’un clou plaquettaire ([figure 13](#)). A cette étape, les interactions entre le système vasculaire endommagé et les plaquettes vont être primordiales. Quatre acteurs principaux interviennent dans l’hémostasie primaire : **les plaquettes, la paroi vasculaire, le fibrinogène** et le **facteur Willebrand (VWF)**. Les plaquettes jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de la thrombose. Il est donc nécessaire que le nombre et la fonction plaquettaire soit optimale pour que l’hémostasie primaire soit efficace.

Cette première phase comprend principalement les contractions des muscles lisses conduisant à une vasoconstriction du vaisseau lésé, l’exposition de la matrice sous-endothéliale aux composants de sang et les réponses des cellules endothéliales à la formation du « bouchon » issu de l’hémostasie primaire. Lors de la formation de ce bouchon hémostatique primaire, les plaquettes sont activées. Elles vont ensuite répondre à une série d’évènements tels que l’adhésion, la sécrétion, l’agrégation et la contraction ([figure 13](#)) (Shattil and Bennett, 1981).

Dans ces circonstances normales, de la prostacycline et de l'oxyde nitrique (NO) antithrombotique sont produits, ce qui ne permet pas l'adhérence des plaquettes aux parois des vaisseaux. Une plaie traumatique expose les composants vasculaires du sous-endothélium tels que le facteur VWF, le collagène et les protéines pro-coagulantes.



**Figure 13** : représentation de l'hémostase primaire

Ce sont des composants hautement thrombogènes qui activent la cascade de coagulation. Les plaquettes se lient à l'endothélium via le VWF et le collagène, devenant ainsi activées par le collagène, l'adrénaline, l'adénosine diphosphate et la thrombine. Les plaquettes activées libèrent des médiateurs, tels que le thromboxane A2, qui attirent davantage de plaquettes vers la zone lésée, contribuant ainsi à la formation d'un « bouchon » hémostatique primaire. Lorsque les plaquettes sont activées, elles modifient également leurs formes dans le but d'augmenter encore leurs propriétés adhésives (Broos, 2011). Le niveau d'activation basal des plaquettes est un élément clé. Ce phénomène peut être induit par les altérations de l'endothélium. L'adhésion des plaquettes sur l'endothélium altéré est alors un élément lui aussi essentiel.

Les rôles respectifs du fibrinogène et du VWF dans la thrombose sont illustrés en pathologie. En effet, les thromboses de certaines dysfibrinogénémies sont décrites, ainsi que les thromboses multiples survenant dans les anomalies du métabolisme du facteur VWF, telles qu'elles sont réalisées lors du purpura thrombotique thrombocytopénique avec déficit en ADAMTS13 (*α disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13*).

#### - **La coagulation plasmatique ou hémostase secondaire**

La coagulation plasmatique ou hémostase secondaire se réfère à l'activation de la cascade de coagulation qui se termine par la conversion du fibrinogène en fibrine par la thrombine, entraînant un dépôt de fibrine sur la lésion vasculaire. Cela forme *in fine* un caillot qui va obstruer la lumière vasculaire et ainsi amortir voire stopper le flux sanguin.

L'hémostase secondaire implique la cascade de coagulation principalement activée par deux voies initiales, dont la voie du facteur tissulaire (**voie extrinsèque**) et la voie d'activation par contact (**voie intrinsèque**).

La physiologie de la coagulation fait appel, pour l'activation initiale, à l'interaction entre un composant cellulaire, le facteur tissulaire, et un composant plasmatique, le facteur VII. La liaison [facteur tissulaire-facteur VII] induit une activation du facteur VII. Ces deux facteurs forment un complexe qui active davantage le facteur IX et le facteur X, une voie de la coagulation connue sous le nom de voie extrinsèque. Il s'en suit la cascade de la coagulation aboutissant à la formation du facteur X activé, qui va permettre la transformation de prothrombine en thrombine. La thrombine va participer à la formation du caillot mais va également catalyser sa propre génération. Ce système d'activation en chaîne est régulé par la présence d'inhibiteurs : l'antithrombine, le système protéine C-protéine S et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire. L'activation de la coagulation est un événement critique dans la thrombose. Elle peut être liée à une expression exagérée de facteur tissulaire à la surface des cellules, telles qu'elle est réalisée dans les états septicémiques et les inflammations ou au contact des tumeurs.

## - **La fibrinolyse**

La fibrinolyse est le troisième temps physiologique de l'hémostase. Elle permet de dissoudre les thrombus suite à la restauration de l'intégrité vasculaire.

### o **Thrombose et ICR : ce que l'on sait.**

Il a tout d'abord été mis en évidence dès 1983 sur des séries de cas autopsiques s'intéressant au vasospasme, la présence de microthrombi décrits comme étant à l'origine d'un infarctus cérébral (Suzuki et al. 1990; 1983). Plus tard, en 2006, une série autopsique de 29 patients décédés après HSA a permis de mettre en évidence une corrélation entre la présence de microthrombi et l'ICR (Stein et al. 2006).

La voie du NO a un rôle clé dans l'équilibre homéostasique vasculaire et le maintien du tonus vasculaire par le biais de l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, l'adhésion leucocytaire et la prolifération des cellules musculaires lisses. Les phénomènes de microthromboses, associant l'effet pro-coagulant de l'agrégation plaquettaire et le spasme des artérioles intra-parenchymateuses, est actuellement un champ de recherche émergent. En effet l'incidence de micro-thrombi serait corrélée à la survenue d'ICR et au devenir neurologique (Romano et al. 2008; McBride et al. 2017; Stein et al. 2006; Ohkuma et al. 1997).

La protéase endothéliale ADAMTS13 réprime normalement l'adhésion plaquettaire et la modulation inflammatoire induite par la thrombose, par régulation négative du VWF et de P-sélectine. Les lésions endothéliales microvasculaires et la dérégulation d'ADAMTS13 font donc le lien potentiel entre la survenue de microthromboses et l'inflammation pathologique. En effet, il semblerait que la diminution de l'activité d'ADAMTS13, associée à l'augmentation de VWF et P-selectine, seraient prédictifs de la survenue d'ICR après HSA (Chauhan et al. 2008; Vergouwen et al. 2009), ceci indiquant que la thromboinflammation pourrait être une cible thérapeutique intéressante. Des travaux sur des modèles pré-cliniques laissent penser que la dysfonction microvasculaire jouerait un rôle clé dans la physiopathologie de l'ICR (Dodd et al. 2021).



- [Thrombose et ICR : pistes thérapeutiques](#)

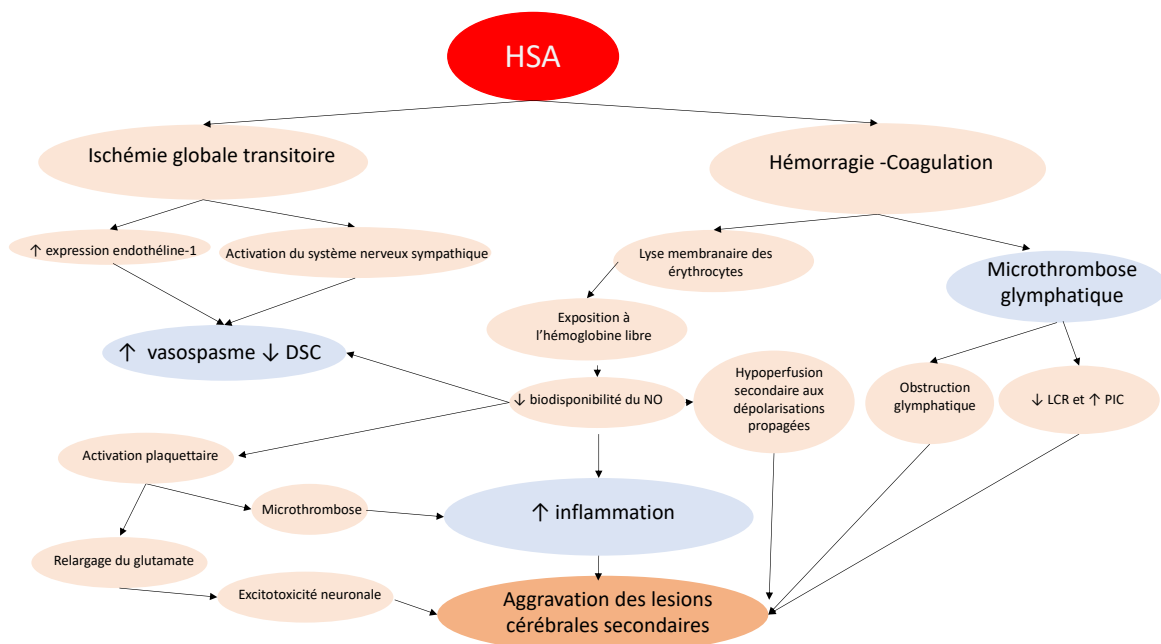
Chez l'homme, plusieurs études ont eu pour objectif de réduire la survenue d'ICR en inhibant les voies de la coagulation ou de l'agrégation plaquettaire. La difficulté d'interprétation de ces études est liée au fait qu'il est compliqué de dissocier l'effet anticoagulant à la phase initiale sur la résorption de l'hématome, de l'effet préventif secondaire sur la formation de microthrombose. Le caractère pro-hémorragique du traitement anticoagulant doit donc être considéré en fonction de la sévérité du saignement initial, de surcroît quand l'anévrisme causal n'est pas sécurisé. Une méta-analyse datant de 2007 regroupant un total de 1385 patients montre un effet modeste de la prise d'anticoagulants sur le devenir neurologique, au prix d'une possible augmentation des complications hémorragiques (Mees et al. 2010).

### [Glymphatique et système lymphatique méningé](#)

En 2015, *Louveau* et collaborateurs ont découvert des vaisseaux lymphatiques dans la paroi des sinus duraux, qui ont pour rôle de faire l'interface avec les ganglions lymphatiques cervicaux profonds (Louveau et al. 2015). Cette découverte a conduit à l'hypothèse que l'altération de ce nouveau système lymphatique méningé pourrait contribuer au développement de l'ICR. Récemment, il a été mis en évidence que ce système lymphatique méningé jouerait un rôle important dans la clairance du sang issu de l'HSA et plus particulièrement des érythrocytes. La perturbation de ces vaisseaux lymphatiques serait à l'origine d'une réponse inflammatoire disproportionnée, et plus spécifiquement d'une activation microgliale importante (Chen et al., 2020.). En amont de ces vaisseaux lymphatiques méningés, les voies glymphatiques paravasculaires se trouvent à proximité des artères pénétrantes et constituent l'interface directe entre le LCS et le liquide interstitiel parenchymateux. Cette voie permet aux produits sanguins issus de l'HSA de pénétrer rapidement dans le parenchyme cérébral et de stimuler la neuroinflammation. L'exposition du parenchyme cérébral aux effets toxiques de l'hémoglobine, des métabolites de l'hémoglobine et d'autres produits figurés du sang est donc régulée par ce système paravasculaire. Plusieurs études fondamentales s'intéressent donc à cette voie depuis quelques années, avec comme objectif commun d'améliorer la fonctionnalité de ce système paravasculaire, mais aussi la clairance du système lymphatique méningé.

## Altération de l'autorégulation cérébrale

L'autorégulation cérébrale est le phénomène physiologique permettant de maintenir un débit sanguin cérébral constant, pour des variations de pression artérielle et de pressions partielles en O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>. Plusieurs éléments interviennent dans l'autorégulation cérébrale, avec entre autres les facteurs myogéniques, neurogéniques, métaboliques et endothéliaux. Dans le cas de l'HSA, la somme de ces facteurs contribue donc à la perte de l'autorégulation. Yundt et collaborateurs ont ainsi pu observer sur une étude clinique que, chez les patients ayant une HSA avec le diagnostic de vasospasme, les capacités d'autorégulation étaient altérées (Yundt et al. 1998). Une seconde étude clinique a, quant à elle, pu observer que la diminution de cette capacité d'autorégulation après HSA était un facteur prédictif de survenue d'ICR (Lam et al. 2000). Plusieurs études ultérieures ont pu confirmer ces résultats, réaffirmant donc l'association entre la perte d'autorégulation cérébrale et la survenue d'ICR après HSA.



**Figure 14 : Dysfonction vasculaire après HSA d'après (Dodd et al. 2021)**

L'ischémie globale transitoire et la toxicité de l'hémoglobine libre sont à l'origine de la dysfonction vasculaire conduisant à la microthrombose et au vasospasme. La perturbation de la voie du NO est un mécanisme qui joue un rôle charnière entre la dysfonction vasculaire, l'inflammation et l'ischémie corticale propagée. Le système glymphatique et les vaisseaux lymphatiques situés dans les méninges pourraient également être des médiateurs de l'ICR. DSC : débit sanguin cérébral ; NO : monoxyde d'azote ; LCR liquide céphalo-rachidien ; PIC pression intracrânienne.

## b. Inflammation

### Inflammation systémique après HSA

L'inflammation regroupe une catégorie extrêmement large de réponses physiologiques et pathologiques de l'hôte à une infection et à une lésion tissulaire (Medzhitov et al. 2008). La sévérité de cette réponse inflammatoire après HSA apparaît comme étant un facteur prédictif de survenue d'ICR, mais également d'évolution neurologique défavorable (Badjatia et al. 2015; Tam et al. 2010; Dhar et al. 2008). C'est ainsi que plusieurs études rétrospectives ont pu mettre en évidence que la concentration de lactate, la CRP (C-reative protéine), le taux de leucocytes, le ratio neutrophiles/lymphocytes, la vitesse de sédimentation et la présence d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique, qui sont tous des marqueurs non spécifiques de l'inflammation, étaient prédictifs du devenir des patients après HSA (Dhar, 2008 ; Tam 2010 ; Al-mufti 2019 ; MacMahon 2013 ; McGirt 2003).

Jusqu'ici, aucune molécule à visée anti-inflammatoire, y compris la corticothérapie, n'a pu établir la preuve de son efficacité sur la survenue d'ICR ou sur le devenir neurologique chez l'homme. Pour ce qui est de l'utilisation des anti-inflammatoires non-stéroïdiens, les données issues des études cliniques sont décevantes et la robustesse de ces études insuffisante. Une première étude prospective réalisée sur 138 patients a pu mettre en évidence un effet bénéfique de l'utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens sur l'évolution neurologique (évaluée par l'échelle du *glasgow outcome scale*), et sur la survenue d'infarctus cérébraux secondaires (Muroi, 2014). Une autre étude sur 178 patients a pu observer que l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens conduisait à une durée de séjour en réanimation plus courte et une baisse de la mortalité. Néanmoins, aucun effet n'était observé sur la survenue d'ICR ou le devenir neurologique (Nassiri, 2016). En conclusion, l'utilisation de traitements anti-inflammatoires non spécifiques se sont avérés être décevants pour la prévention de l'ICR et sur le devenir neurologique.

Plusieurs études précliniques se sont également intéressées à l'inflammation comme cible thérapeutique. Néanmoins, il faut souligner que, jusqu'ici, ces études animales se sont focalisées sur la survenue de vasospasme comme critère de jugement principal, contrairement à ce qui est préconisé actuellement, conformément à la définition de l'ICR. Depuis 2010, ce paradigme a donc évolué et des avancées ont été faites, permettant de mettre en avant

l'implication des **cellules inflammatoires**, de la **microglie** et des **leucocytes périphériques** dans la réponse inflammatoire après HSA au niveau du système nerveux central (figure 15).

### Médiateurs cellulaires : microglie et neuroinflammation

L'implication de la microglie dans l'HSA a été suspectée depuis la mise en évidence du rôle de l'hème en tant qu'activateur du récepteur *toll-like receptor 4* (TLR4) (Figueiredo et al. 2007) . Le récepteur TLR4 est essentiel à la fonction immunitaire innée. Il est exprimé par toutes les cellules myéloïdes. Cependant, la fonction microgliale en tant que résidente des cellules exprimants TLR4 les met en position intéressante pour répondre aux interactions TLR4-hème dans le système nerveux central. Néanmoins, le rôle de la microglie dans la physiopathologie de l'HSA demeurait mal établi jusqu'en 2013, où Hanafy et collaborateurs ont démontré que la déplétion en microglie chez la souris réduisait le vasospasme et la mort neuronale par apoptose (Hanafy et al. 2013). Le rôle de la microglie dans la mort neuronale après HSA a été réaffirmé par la suite par l'équipe de Shneider (Schneider et al. 2015). Ce travail avait pour objectif de différencier l'atteinte des cellules myéloïdes périphériques et résidentes en laissant intact les macrophages périphériques. Ils ont ainsi constaté que les souris appauvries en microglie avaient moins de mort neuronale jusqu'à 9 jours après HSA. Ces études ont donc permis d'établir le rôle de la microglie comme médiateur de la neuroinflammation et de la mort neuronale après HSA.

Les mécanismes moléculaires précis concernant l'action de la microglie dans la genèse de l'ICR restent mal élucidés. L'étude Hanafy *et al* a pu démontrer que la mort neuronale n'est dépendante de TLR4 qu'à la phase initiale de l'agression cérébrale. Il existe plusieurs autres voies proposées qui pourraient contribuer aux mécanismes de neuroinflammation médiée par la microglie après un AVC hémorragique. Pour exemple, HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*) qui est une protéine qui régule le remodelage de la chromatine et la transcription génique, est également sécrétée en tant que cytokine pro-inflammatoire par des cellules de la lignée myéloïde, y compris la microglie (Yang, 2020). La neutralisation de HMGB1 avec un anticorps monoclonal diminuerait la réactivité microgliale et améliorerait le devenir neurologique après HSA (Wang, 2019). Chez l'homme, une concentration élevée en HMGB1 dans le LCS serait corrélée avec un devenir neurologique défavorable (Nakahara, 2009). Malheureusement, ces études ne sont pas en mesure de faire la différence entre HMGB1 dérivé de la microglie et

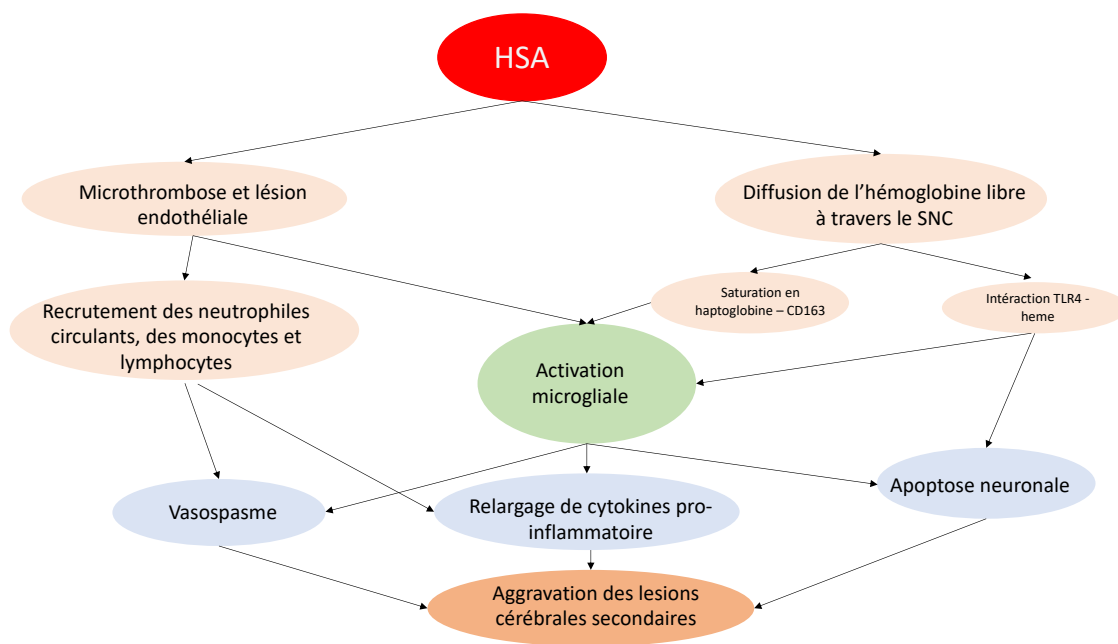
HMGB1 dérivé des macrophages/monocytes. Cette limite rend leur interprétation difficile. Les recherches futures devraient donc évaluer les mécanismes de l'atteinte microgliale cette fois dans la phase retardée après HSA.

### Médiateurs cellulaires : les leucocytes périphériques

L'association entre la réponse immunitaire périphérique et le devenir neurologique après HSA a été établie depuis de nombreuses années (Neil-dwyer et al. 1974). Cette association a été confirmée plus récemment en respectant les critères d'évaluation en adéquation avec la définition de l'ICR (Al-Mufti et al. 2019). Des marqueurs des lignées myéloïdes et lymphoïdes ont pu être observés dans le LCS et les tissus adjacents aux espaces sous-arachnoïdiens des patients après HSA. De plus, le niveau d'expression de ces cellules serait corrélé au devenir neurologique (McMahon et al. 2013). Une hypothèse pour expliquer ce phénomène est que les cellules immunitaires périphériques réagissent lorsque les macrophages qui résident dans le système nerveux central (microglie) sont dépassés par une hémolyse massive dans les suites d'une HSA.

Après altération de la surface de l'endothélium vasculaire, les cellules immunes circulantes serviraient de lien entre la dysfonction vasculaire, l'inflammation vasculaire et la réponse immunitaire systémique. Les molécules d'adhésion cellulaire appelées *cell adhesion molecules (CAMs)* ont pour rôle de permettre la liaison entre les cellules immunitaires et l'endothélium après une agression de l'endothélium vasculaire (Lawson and Wolf 2009). Une augmentation de l'expression de ces molécules d'adhésion a pu être observée après HSA, dont le dosage était effectué dans le sang et dans le LCS humain (Kaynar et al. 2004), mais également sur du tissu cérébral et vasculaire chez l'animal, sur des études déjà anciennes (Sills et al. 1997). Une étude de Polin *et al* a montré que plusieurs molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1 et E-selectine) étaient augmentées dans le LCS après HSA, mais également que le taux de E-selectine était corrélé à un devenir neurologique défavorable (Polin, 1998). Une autre étude a montré de façon similaire que P-selectine (et non ICAM-1, VCAM-1) était augmenté chez les patients qui développaient une ICR (Nissen, 2001). Ces études suggèrent donc que les CAM de type selectine joueraient un rôle important dans le développement des l'ICR. Les études précliniques visant à neutraliser les molécules d'adhésions ont souvent utilisé le vasospasme comme critère d'évaluation. Ainsi, le choix du vasospasme comme critère de jugement, et non

un critère d'évaluation neurologique comportemental, représente une limite majeure. Néanmoins, l'ensemble de la littérature actuelle soutient l'hypothèse selon laquelle les cellules immunitaires périphériques répondent aux changements inflammatoires de l'endothélium après HSA. Les recherches futures sur ces voies doivent donc maintenant se focaliser sur des critères d'évaluation fonctionnels qui sont désormais nécessaires pour déterminer leur utilité en pratique clinique.



**Figure 15 : Mécanismes de la réponse inflammatoire après hémorragie sous-arachnoïdienne d'après (Dodd et al. 2021)**

L'HSA provoque une réponse inflammatoire à partir de la microglie à travers la signalisation des récepteurs TLR4 et CD163. La réaction microgliale provoque la production de cytokines pro-inflammatoires, un vasospasme ainsi qu'une apoptose des neurones. L'endothélium vasculaire cérébral contribue lui aussi à cette inflammation en recrutant des leucocytes circulants. Les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes pénètrent dans le SNC après HSA et provoquent un vasospasme et un relargage des cytokines pro-inflammatoires. CD163 : cluster de différenciation 163 ; SNC : système nerveux central ; TLR4 : toll-like 4 receptor

### c. Dépolarisations corticales propagées

#### Physiopathologie des dépolarisations corticales propagées

Un troisième mécanisme pourrait être la survenue de dépolarisations corticales propagées, encore appelé « *cortical spreading depolarization* ». Il s'agit d'ondes de dépolarisation corticales qui, par le biais d'une action astrocytaire et microgliale, pourraient être responsables

de vasoconstriction des artères de petit calibre, entraînant la survenue d'infarctus corticaux (Dreier et al. 2009). Dans le cerveau des sujets sains, ces dépolarisations peuvent être provoquées par une augmentation du potassium extracellulaire provoquant une ouverture passive des canaux ioniques, ce qui est à l'origine d'une surcharge de la capacité des pompes Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup> dépendantes de l'ATP pour maintenir l'homéostasie ionique. Dans le contexte d'une agression cérébrale aiguë, ces ondes de dépolarisations corticales sont provoquées par les mêmes mécanismes, mais peuvent être plus sévères et plus longues. En raison de leur caractère unique et de leurs conséquences en termes de suppression de l'activité électrique cérébrale, les dépolarisations corticales propagées ont été étudiées de manière approfondie dans le contexte de nombreux troubles neurologiques, y compris l'AVC (Cozzolino et al. 2018).

### Dépolarisations corticales propagées après HSA

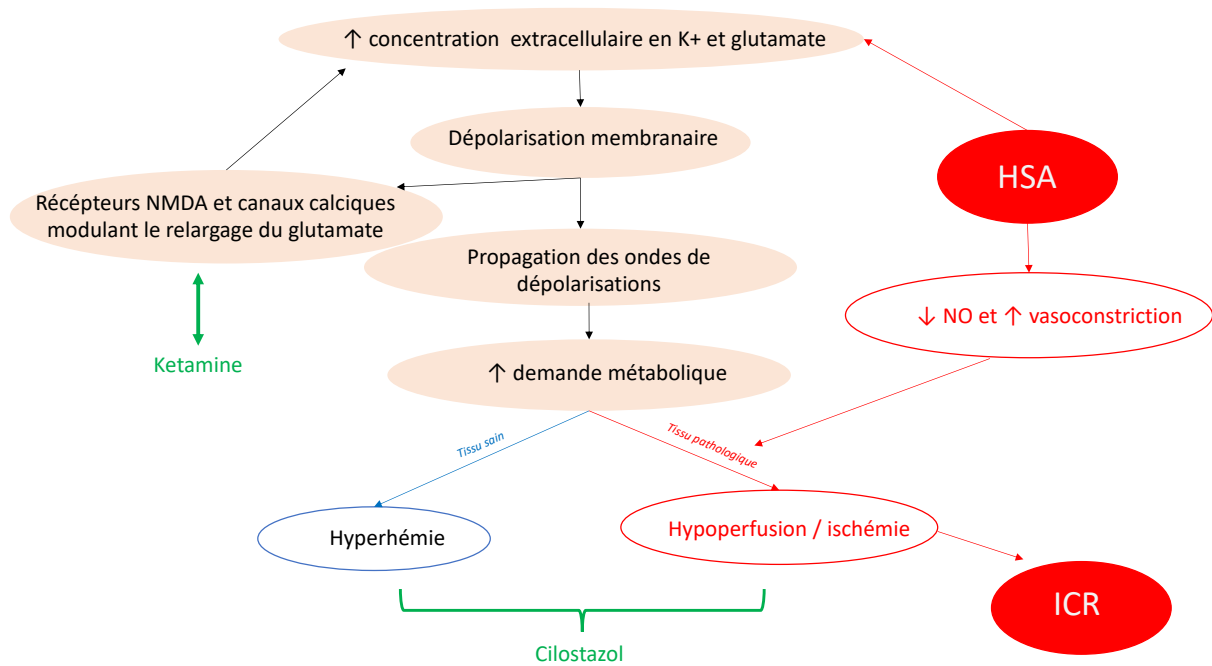
Les dépolarisations corticales propagées provoquent une hyperhémie au niveau des tissus sains, en réponse à une demande métabolique accrue pendant la dérégulation de l'homéostasie ionique (Ayata et al. 2015). Les tissus cérébraux lésés, siège de dépolarisations corticales, sont plus sujets au découplage neurovasculaire, ce qui est parfois à l'origine d'une zone d'hypoperfusion. Ces types de dépolarisations sont d'ailleurs nommés à ce titre « dépolarisation péri-ischémique » ou encore « ischémie corticale propagée ». Des travaux précliniques ont donc pu voir le jour en se basant sur l'hypothèse du rôle clé de ces dépolarisations corticales après HSA, dans la survenue de l'ischémie secondaire. A ce titre, une étude chez le rat a montré que les produits issus d'une hémolyse (potassium et hémoglobine) ajoutés dans du LCS artificiel, avaient pour conséquence la survenue de dépolarisations corticales propagées, d'ischémie corticale en parallèle d'une importante mort neuronale et activation microgliale (Dreier et al. 2000). Ces mêmes auteurs ont observé que la survenue de dépolarisations corticales propagées après HSA était un facteur prédictif de développer une ICR (Dreier et al. 2006). Il a été montré que les ondes de dépolarisation pouvaient survenir en l'absence de vasospasme, et qu'elles seules étaient corrélées à la survenue d'ICR (Woitzik et al. 2012). De plus, la corrélation entre dépolarisation corticale et ICR persiste après le traitement du vasospasme angiographique (Woitzik et al. 2012). Toutes ces études menées en grande partie par un groupe d'experts sur le sujet, *COSBID Study Group (Co-Operative Studies on Brain Injury Depolarizations)*, ont révolutionné le concept physiopathologique de l'ICR. En

effet, les dépolarisations corticales propagées et leurs facteurs associés sont désormais au premier plan des recherches pour améliorer le pronostic neurologique des patients après HSA.

### Une cible thérapeutique prometteuse ?

L'hypothèse du rôle clé des dépolarisations corticales propagées dans la survenue de l'ICR ouvre des pistes thérapeutiques en suggérant l'emploi d'agents inhibant la dépolarisation, tels que la kétamine (figure 16) (Alan et al, 2010.). De même, des travaux ont pu montrer l'effet de la Nimodipine dans la réduction de l'ischémie secondaire aux dépolarisations corticales (Dreier et al. 2002). Le rôle de la Nimodipine est d'inhiber les canaux calciques présents au niveau des muscles lisses du système vasculaire cérébral. Cependant, La Nimodipine peut agir de manière indépendante des vaisseaux pour modifier directement la réponse ionique et électrique au stress dans les neurones (Pisani et al. 1998). Ceci pourrait donc expliquer pourquoi l'effet de la Nimodipine est constaté sur la survenue d'ischémie secondaire après HSA, sans réduction de l'incidence du vasospasme de façon significative (Dorhout et al. 2007). L'administration de Cilostazol, inhibiteur de la phosphodiesterase, a également pu montrer, dans une étude expérimentale, une réduction de l'ischémie en rapport avec les dépolarisations propagées chez les rats, résultat qui n'est pas retrouvé de façon significative chez l'homme (Sugimoto et al. 2018).





**Figure 16 : Dépolarisations corticales propagées après hémorragie sous-arachnoïdienne et potentielles cibles thérapeutiques.**

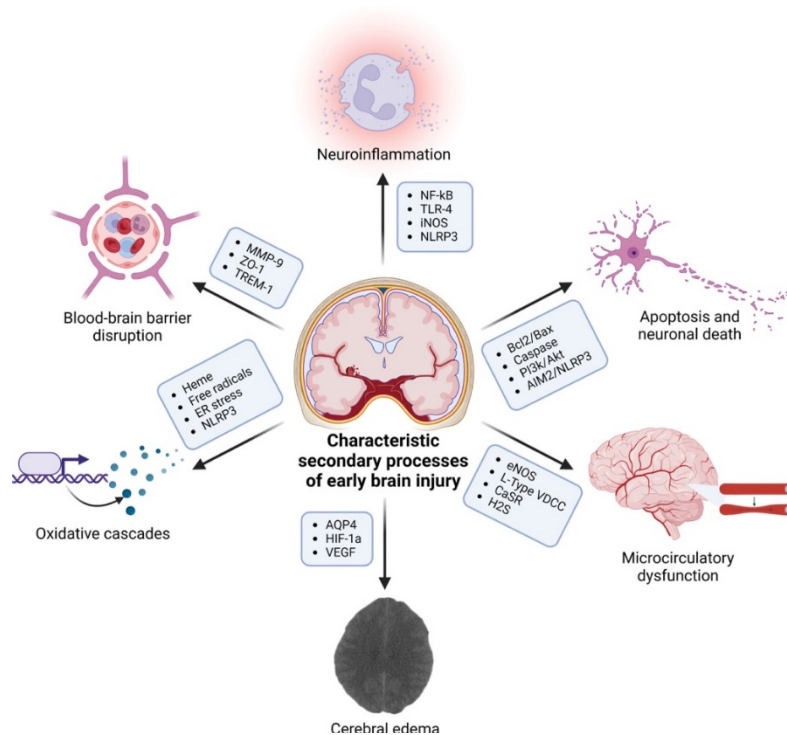
Les dépolarisations corticales propagées sont à l'origine d'une ischémie cérébrale par augmentation de la demande métabolique au sein des tissus agressés, afin de compenser une augmentation de la perfusion cérébrale. L'hémorragie elle-même est à l'origine de dépolarisations corticales par relargage de K<sup>+</sup> et de glutamate provenant des érythrocytes et des plaquettes. Les drogues prometteuses étudiées dans la prévention de survenue des dépolarisations corticales sont la kétamine et le Cilostazol. La kétamine joue un rôle en inhibant les récepteurs NMDA et la propagation des ondes de dépolarisations. Le Cilostazol diminue l'ischémie en améliorant le couplage neurovasculaire.

HSA : hémorragie sous-arachnoïdienne ; ICR : ischémie cérébrale retardée ; NO : monoxyde d'azote ; NMDA : N-méthyl-D-aspartate.

#### d. Rôle clé de la phase d'"early brain injury"

Depuis quelques années, une attention particulière est portée sur les mécanismes qui surviennent immédiatement après l'HSA (Fujii et al. 2013; Xu et al. 2021). En effet c'est lors de cette phase précoce, immédiatement après la rupture anévrysmale, que beaucoup de patients vont développer des lésions cérébrales secondaires. Cette phase précoce, qui survient au décours immédiat de la rupture anévrysmale, inclut l'extravasation de sang dans les espaces sous-arachnoïdiens, l'augmentation rapide de la PIC, une vasoconstriction artérielle réactionnelle responsable d'une ischémie aiguë transitoire associée à une diminution du DSC, une perte de l'autorégulation et un œdème cérébral. Ce sont ces mécanismes qui vont générer l'atteinte cérébrale précoce, qui va être un facteur prédictif de mauvaise évolution des patients

à long terme (Ostrowski et al. 2006). En effet, il est désormais avancé que cette phase précoce, autrement nommée *early brain injury*, va faire le lit de mécanismes tels que la dysfonction microvasculaire, l'altération de la BHE, la neuroinflammation, un emballement des cascades oxydatives, l'œdème cérébral et *in fine* la mort neuronale (figure 17). Ces mécanismes, que nous avons détaillés plus haut, vont être eux-mêmes impliqués dans la survenue de l'ICR. Cette phase de lésions cérébrales précoces représente donc un élément central de la physiopathologie après HSA, puisqu'il est désormais admis qu'elle est indépendamment liée au devenir des patients, mais aussi à la survenue d'ICR et leurs interdépendances en termes de mécanismes physiopathologiques (Cahill et al. 2006) . Bien qu'il soit désormais admis que cette phase précoce d'*early brain injury* joue un rôle clé dans le devenir des patients, il est difficile d'en faire une approche diagnostique. En effet, une des approches possibles est celle de l'évaluation de l'œdème cérébral au scanner ou à l'IRM. Il a été montré que l'importance de l'œdème était un facteur de mauvais pronostic après HSA (Choi et al. 2016; Claassen et al. 2002). Néanmoins, il s'agit d'une approche peu spécifique et limitée puisqu'elle caractérise exclusivement un des mécanismes intervenant dans cette phase lésionnelle précoce. L'approche diagnostique plus sensible est spécifique de cette phase d'*early brain injury*, et reste donc un enjeu actuel.



**Figure 17 :** Perturbations secondaires médiées par des mécanismes qui se produisent au début de la période d'*early brain injury* et qui conduisent à une perte de l'intégrité neuronale d'après (Lauzier et al. 2023).

### c) Prise en charge et traitement

Les recommandations internationales de 2012 concernant l'HSA mettent en avant plusieurs points quant à la prise en charge du vasospasme et de l'ICR que nous allons développer ci-dessous :

- **Pour réduire le risque d'ICR, il est recommandé d'administrer à tous les patients de la Nimodipine *per os* dès la prise en charge de l'HSA.**

En effet, comme développé dans le chapitre « VIII.2 [Prise en charge en unité de soins critiques et réanimations](#) », l'administration de Nimodipine *per os* durant les 3 semaines suivant l'HSA aurait un effet bénéfique sur le pronostic neurologique des patients, bien qu'elle ne réduise pas l'incidence du vasospasme (Pickard et al. 1989; Allen et al. 1983; Liu et al. 2011). Le rationnel physiopathologique de l'utilisation de cette molécule étant son effet vasodilatateur cérébral, l'absence de réduction du taux de vasospasme reste mal expliquée et pose question aujourd'hui. Néanmoins, à l'heure actuelle, à défaut d'autres études robustes positives, la

imodipine reste la seule thérapeutique prophylactique recommandée dans la prévention de l'ICR (Connolly et al. 2012).

- **Il est recommandé de maintenir un état d'euvolémie.**

En pratique, il s'agit d'effectuer une optimisation volémique en évitant l'hypovolémie pouvant augmenter le risque d'ischémie. Pour ce faire, le monitoring hémodynamique, et l'utilisation de solutés balancés seront à privilégier.

- **L'hypervolémie induite comme traitement prophylactique du vasospasme ou l'angioplastie au ballon prophylactique ne sont pas recommandés.**

Pour le traitement du vasospasme asymptomatique, il n'est pas recommandé de prise en charge thérapeutique mais une surveillance clinique et paraclinique. Pour les vasospasmes sévères constatés en angiographie, les prises en charge diffèrent du manque de recommandations claires, et donc certains praticiens suggèrent une prise en charge thérapeutique, bien que ceux-ci soient asymptomatiques.

- **Le monitoring par DTC** pour la détection précoce du vasospasme est recommandé au lit du patient.

Sa sensibilité et sa spécificité sont controversées et ne semblent satisfaisantes que pour l'artère cérébrale moyenne. En pratique clinique, l'utilisation du monitoring par DTC prend tout son sens lorsque l'examen clinique est peu contributif (notamment les patients sédatisés). En revanche, chez les patients dont l'évaluation clinique est possible, l'examen clinique pluriquotidien doit être à privilégier.

- **Le diagnostic d'ICR en imagerie peut être effectué à l'aide d'un scanner de perfusion ou d'une IRM.**
- **L'hypertension induite** est recommandée chez les patients présentant une ICR afin d'améliorer la perfusion cérébrale, en dehors de contre-indications.

- Chez les patients ne répondant pas à l'hypertension induite, qui présentent un vasospasme symptomatique à l'angiographie, il est recommandé d'effectuer un **geste d'angioplastie et/ou une infusion sélective intra-artérielle d'agents vasodilatateurs**.

Concernant les autres thérapeutiques proposées, aucune n'est actuellement recommandée. En effet, l'utilisation d'agents intra-thécaux fibrinolytiques a été proposée. Une méta-analyse a d'ailleurs suggéré un bénéfice sur le devenir neurologique (Kramer et al. 2010), ceci étant basé sur une littérature préclinique et un rationnel physiopathologique robuste (Gaberel et al. 2014). Bien que les 5 études incluses soient randomisées, leurs méthodologies apparaissent néanmoins critiquables. En ce sens, cette thérapeutique n'a pas été retenue. Des études plus robustes et de plus grande ampleur sont actuellement en cours (Gaberel et al. 2019) . Le drainage lombaire prophylactique dans les 72 heures suivant l'HSA a également été proposé. Une étude randomisée multicentrique récente a mis en évidence une différence significative sur la survenue d'infarctus cérébraux et le devenir neurologique dans le groupe de patients ayant bénéficié d'un drainage lombaire de LCS prophylactique (Wolf et al. 2023) A noter que les patients bénéficiaient en parallèle d'une prise en charge standard de l'HSA laissée à la discrétion du praticien, y compris le recours à la pose de DVE.

D'autres thérapeutiques ont fait l'objet de larges études cliniques et précliniques basées sur une nouvelle approche de l'ICR et fondées sur des données expérimentales, mettant en avant le rôle d'une dysfonction endothéliale associée à une dysfonction microcirculatoire (Macdonald et al. 2007). L'utilisation de statines, d'antagonistes des récepteurs à l'endothéline-1, le sulfate de magnésium a été proposée (Kirkpatrick et al. 2014; Kwok et al. 2010; Zhao et al. 2009; Rabinstein et al. 2010)(MacDonald et al. 2008). A l'heure actuelle, les données de la littérature ne permettent pas de recommander l'utilisation de ces molécules dans la prévention ou le traitement du vasospasme associé à l'ICR.

Concernant les thérapeutiques recommandées, notamment la Nimodipine, il est important de noter que les recommandations se basent sur des études anciennes. La prise en charge des HSA, que ce soit en termes diagnostic ou thérapeutique (traitement de l'HSA en elle-même

mais également des mesures associées en soins critiques) a considérablement évolué sur les 2 dernières décennies, permettant d'améliorer la prise en charge et ainsi diminuer la mortalité.

## ISCHEMIE CEREBRALE RETARDEE

- L'ICR est définie par la survenue d'un déficit neurologique focal persistant et/ou une altération de la vigilance, associée à la preuve d'une ischémie en imagerie.
- Il s'agit d'une complication fréquente survenant chez environ 30% des patients survivant à la phase aiguë.
- L'ICR survient dans les 3 semaines qui suivent l'HSA et va être à l'origine d'une morbi-mortalité élevée.
- La physiopathologie de l'ICR est complexe, multifactorielle et encore mal élucidée. Elle va comprendre plusieurs composantes :
  - La présence d'une dysfonction vasculaire dont les mécanismes sont décrits (le vasospasme, la microthrombose et la thromboinflammation, la dysfonction lymphatique méningée et l'altération de l'autorégulation cérébrale).
  - L'augmentation de la réponse inflammatoire après HSA avec entre autres le rôle clé de l'activation endothéliale via le recrutement des leucocytes circulants.
  - La survenue de dépolarisations corticales propagées.
- La phase précoce dite d'*early brain injury* joue un rôle central
  - A l'origine de mécanismes physiopathologiques multiples qui vont conduire à l'ICR.
  - Il s'agit d'un facteur pronostic après HSA
  - Son investigation est actuellement limitée
- L'administration de Nimodipine est actuellement la seule thérapeutique recommandée qui permettrait d'améliorer le pronostic neurologique des patients après HSA.

## C. ACTIVATION ENDOTHELIALE

Comme nous l'avons développé dans le chapitre « B. II. Physiopathologie de l'ICR », des études récentes ont montré que l'activation endothéliale pouvait jouer un rôle clé dans la genèse de l'ICR. En effet, pour rappel, il a pu être observé une augmentation de la concentration des marqueurs d'activation endothéliale dans le sang et le LCS des patients ayant développé une ICR après HSA anévrismale. Ce constat ouvre des perspectives nouvelles à explorer afin de mieux comprendre la physiopathologie liée à l'ICR et donc d'envisager de nouvelles pistes diagnostiques et thérapeutiques. C'est l'axe que nous avons donc choisi de développer dans ce projet de thèse, puisqu'il ouvre la possibilité de nouvelles méthodes de détection peu invasives et accessibles en laboratoire.

### a) L'endothélium vasculaire

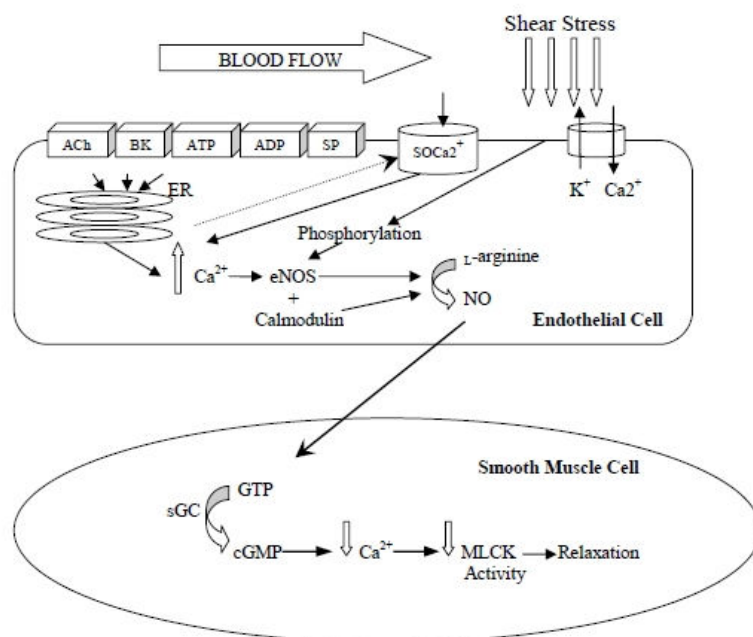
L'endothélium peut être considéré comme un organe à lui seul. Il est le garant de la qualité de la macrocirculation et de la microcirculation. C'est un acteur essentiel dans la régulation du tonus vasculaire, il participe au maintien de la viscosité sanguine, il assure une fonction anticoagulante et participe à l'angiogenèse. Il correspond à la monocouche de cellules tapissant la surface interne des vaisseaux (encore appelée intima) de chaque organe : les **cellules endothéliales**. Nous attribuons aux cellules endothéliales un rôle de « gardien » de l'endothélium. Ce rôle de « gardien » que possèdent les cellules endothéliales peut être affecté par la présence de récepteurs liés à la membrane pour de nombreuses molécules, notamment des protéines (facteurs de croissance, protéines coagulantes et anticoagulantes), des particules de lipides et des hormones.

L'endothélium est un organe qui possède des fonctions sécrétoires, synthétiques, métaboliques et immunologiques (Fishman 1982).

L'endothélium vasculaire a également un rôle clé dans la régulation du flux sanguin. Il résulte de la capacité des cellules endothéliales au repos à générer une surface anti-thrombotique active qui va faciliter le transit du plasma et des constituants cellulaires dans tout le système vasculaire. Dès lors qu'une perturbation des contraintes hémodynamiques locales survient



(inflammation et/ou contraintes de cisaillement hydrodynamiques élevées), les cellules endothéliales sont activées et sont à l'origine d'un environnement local pro-thrombotique et anti-fibrinolytique. Par ailleurs, le flux sanguin est régulé par la sécrétion et l'absorption de substances vasoactives par l'endothélium, qui modifient le tonus vasomoteur en provoquant une vasoconstriction ou une vasodilatation des parois spécifiques en réponse à différents stimuli (figure 18). Pour exemple, le NO est un messenger radicalaire généré en permanence par l'endothélium. Il remplit localement de nombreuses fonctions dont la relaxation des cellules musculaires lisses sous-jacentes, impliquées dans la régulation de la vasodilatation, et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Furchgott et al. 1980; Ignarro 1990; Moncada et al. 1991). La production de NO provoque donc une vasodilatation, et, dans le même temps, une augmentation du cisaillement de l'endothélium par augmentation du débit sanguin, qui provoque elle aussi une augmentation de la production de NO.

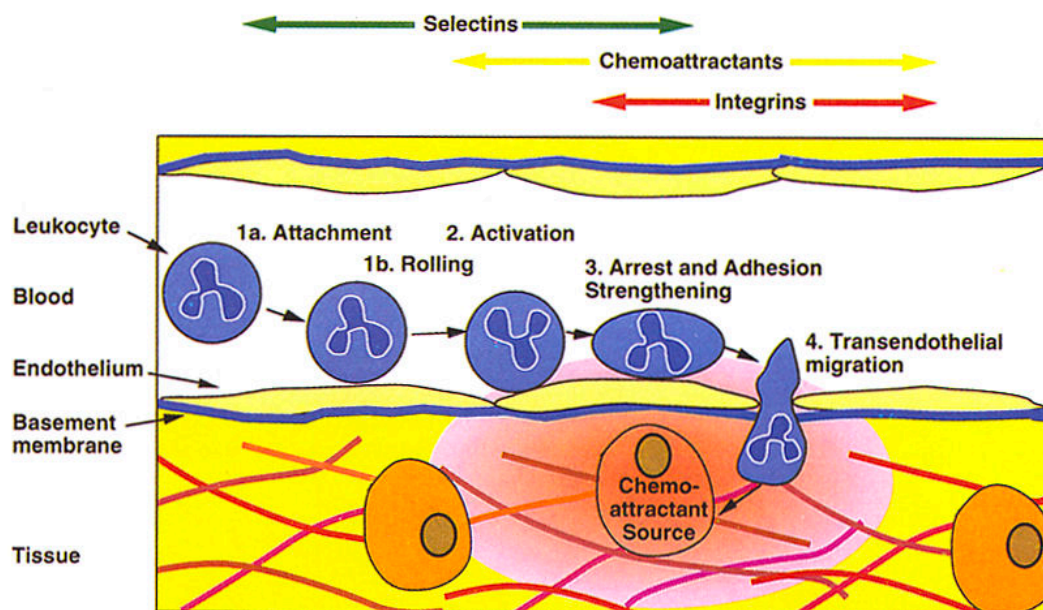


**Figure 18** : Production endothéliale d'oxyde nitrique et ses actions dans la cellule musculaire lisse vasculaire.

Lorsque les réserves de  $Ca^{2+}$  du réticulum endoplasmique sont épuisées, un signal est envoyé au canal  $SOCa^{2+}$  qui permet au  $Ca^{2+}$  extracellulaire d'entrer dans la cellule endothéliale. (ACh= acetylcholine; BK= bradykinine ; ATP= adenosine triphosphate; ADP= adenosine diphosphate; SP= substance P;  $SOCa^{2+}$ = store-operated  $Ca^{2+}$  channel; ER= endoplasmic reticulum; NO= nitric oxide; sGC= soluble

guanylyl cyclase; cGMP= cyclic guanosine-3', 5-monophosphate; MLCK= myosin light chain kinase.)  
d'après (Sandoo et al. 2010)

L'endothélium exprime également des molécules dites d'adhésion qui, comme leur nom l'indique, ont pour rôle de conditionner le recrutement et le passage des leucocytes circulant dans l'intima (figure 19) (Springer 1994). Il joue donc un rôle clé au cours des processus inflammatoires et contrôle le passage inter et transcellulaire de nombreux nutriments et hormones circulantes.



**Figure 19** : Étapes séquentielles qui régulent la circulation des leucocytes dans le système vasculaire par le biais de l'endothélium et ses molécules d'adhésion d'après (Springer 1994).

Enfin, l'endothélium joue un rôle clé dans la coagulation en empêchant l'exposition du sous-endothélium qui est thrombogène, aux facteurs circulants de la coagulation, ainsi qu'en synthétisant un certain nombre de facteurs pro et anti-coagulants.

L'étude détaillée de l'endothélium vasculaire et plus particulièrement de sa fonction endothéliale est devenue possible avec le développement des techniques de culture cellulaire *in vitro* dans les années 1970 (Jaffe et al. 1973; Lewis et al. 1973; Gimbrone et al. 1974). Malheureusement, ces techniques de cultures cellulaires ont trouvé leurs limites. Aujourd'hui,

les études de recombinaisons génétiques chez la souris permettent de mieux comprendre la fonctionnalité des cellules endothéliales dans le cadre physiologique, mais également en situation pathologique.

Bien que les fonctions des cellules endothéliales soient impliquées dans de multiples processus biologiques, nous nous centrerons dans cette partie d'introduction sur leurs **mécanismes d'adhésion** en cas de lésion vasculaire aiguë.

#### b) Hétérogénéité des cellules endothéliales

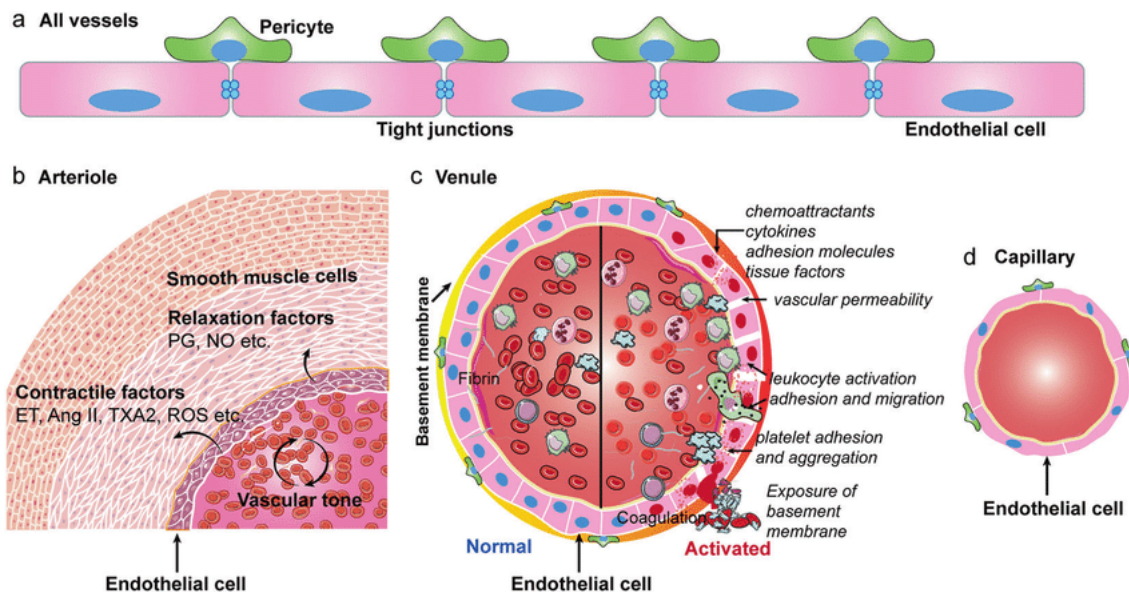
Certaines pathologies vasculaires sont limitées à certains types de vaisseaux. Pour exemple, les mécanismes à l'origine de thromboses veineuses diffèrent des mécanismes connus pour être à l'origine des thromboses artérielles. Les mécanismes diffèrent alors même que les structures diffèrent entre veines et artères. Il semble donc que la spécificité du siège de la lésion soit en rapport avec une hétérogénéité des cellules endothéliales elles-mêmes (figure 20). Cette variabilité semble être une fonction adaptative pour chaque organe. En fonction du siège, il est décrit différents types de cellules endothéliales avec par exemple les cellules endothéliales tapissant les villosités intestinales, ou encore le parenchyme rénal, qui présentent un aspect fenêtré qui facilite la perméabilité sélective et permet les mécanismes d'absorption, de sécrétion ou encore de filtration. En parallèle, les cellules endothéliales localisées au niveau cérébral ou de la rétine sont reliées par des jonctions permettant de maintenir une perméabilité nécessaire à la fonction de la BHE.

Les cellules endothéliales diffèrent également selon les tissus en ce qui concerne leur **phénotype de surface** et leur **expression protéique**. En effet, le VWF qui est utilisé couramment comme marqueur des cellules endothéliales ne va pas être exprimé de façon uniforme selon les types de vaisseaux (Dumas et al. 2021). De même, l'induction du facteur tissulaire (FT) après perfusion de cytokines pro-inflammatoires ou endotoxines est aussi limitée à des vaisseaux spécifiques (Soult et al. 2014). Enfin, pour exemple caractéristique, l'expression des récepteurs des molécules d'adhésion impliquées dans le trafic cellulaire de type Lu-ECAM-1 (molécules d'adhésion de cellules endothéliales spécifiques aux poumons) est exclusivement exprimée par les cellules endothéliales postcapillaires au niveau pulmonaire (Duong et al. 2020).

## Le phénotype des cellules endothéliales va être sensible à une régulation environnementale

et génétique. En effet, l'hétérogénéité des cellules endothéliales se développe en raison de l'exposition de la cellule à des stimuli environnementaux. L'endothélium reçoit un certain nombre de signaux physiques, mécaniques, puis va adapter son comportement et ses différentes fonctions. C'est ce qui explique l'hétérogénéité spécifique des cellules endothéliales en fonction de leurs sièges. De nombreux facteurs exogènes vont influencer le phénotype des cellules endothéliales. Parmi eux, nous pouvons citer des promoteurs ou inhibiteurs de facteurs solubles (facteurs de croissance, cytokines, chimiokines), des lipides et protéines plasmatiques (thrombine, plasmine et anticorps), les forces mécaniques, des radicaux oxygénés et le contact avec les cellules circulantes et tissulaires. Pour illustrer cette régulation du phénotype endothélial par son environnement local, nous pouvons citer le phénomène de transdifférenciation (Augustin et al, 1994).

Par ailleurs, les cellules endothéliales micro- et macro-vasculaires diffèrent par leur croissance, leur capacité à former des structures de type capillaire, la synthèse de prostaglandines et l'expression de récepteurs d'adhésion pour les lymphocytes (Ahmed et al, 2011).



**Figure 20** : physiopathologie des cellules endothéliales illustrée d'après (Jin et al. 2020).

Les cellules endothéliales sont présentes sur tous les vaisseaux (a) comme les artères (b), les veines (c), et les capillaires (d), et sont normalement protégées par les péricytes qui viennent supporter la structure du vaisseau. Des jonctions serrées relient les cellules voisines, aident à maintenir l'intégrité des tissus et agissent comme des barrières à la perméabilité, la régulation du tonus vasculaire et la perméabilité lors de l'activation.

### c) Le rôle de l'endothélium dans la coagulation

Comme nous l'avons rappelé plus haut, une fonction physiologique de l'endothélium est de faciliter le flux sanguin en évitant tout phénomène thrombotique et donc en inhibant l'adhésion plaquettaire et la coagulation. Néanmoins, lorsque survient une lésion de l'endothélium, l'activation des cellules endothéliales peut aboutir à des mécanismes pro-thrombotiques (figure 21). Il existe un **équilibre permanent entre l'état pro et anticoagulant** qui va être modulé au niveau de la transcription des gènes, et par la cellule elle-même, et qui va permettre le plus souvent à l'endothélium lésé de revenir à son état basal lorsque le stimulus pro-coagulant est terminé (Jamwal et al. 2018). En effet, lorsque les mécanismes ne sont pas dépassés, l'endothélium tente de garder un rôle « conservateur » en limitant les dommages vasculaires et l'inflammation. Néanmoins, lorsque la lésion engendre une dérégulation de ces mécanismes, on peut alors observer une perte de cette activité anticoagulante, qui peut engendrer des complications thrombotiques qui vont être développées par la suite.

#### Les mécanismes anticoagulants

Le contrôle de la sécrétion de thrombine est une étape importante entre l'équilibre pro et anticoagulant de l'endothélium. En effet, la thrombine va stimuler les voies pro-coagulantes des cellules endothéliales elles-mêmes. Par conséquent, en réponse à ce mécanisme, plusieurs voies d'activation vont être impliquées dans l'inhibition de la génération de thrombine. Les cellules endothéliales empêchent la formation de thrombine via différents mécanismes :

- La matrice qui entoure l'endothélium contient du sulfate d'héparane et des glycosaminoglycanes apparentés qui favorisent l'activité de l'antithrombine III (Nishinaga *et al*, 1994)
- Le sous-endothélium contient également du dermatane sulfate, qui favorise l'activité antithrombine via le cofacteur de l'héparine II (He *et al*, 2008)
- Les cellules endothéliales empêchent la formation de thrombine par l'expression d'un inhibiteur de la voie du FT, qui se lie au facteur Xa au sein du complexe FT/VIIa/Xa (Catieau *et al* 2018).

L'endothélium régule également l'activité de la thrombine par l'expression de la thrombomoduline. La liaison de la thrombine à la thrombomoduline facilite la capacité de l'enzyme à activer la protéine C anti-coagulante. L'activité de la protéine C est renforcée par son co-facteur protéique S, qui est synthétisé, entre autres, par les cellules endothéliales.

La liaison de la thrombine à la thrombomoduline atténue aussi la capacité de l'enzyme à activer les plaquettes, le facteur V, le facteur XIII et le fibrinogène et favorise ainsi l'activité fibrinolytique des cellules endothéliales.

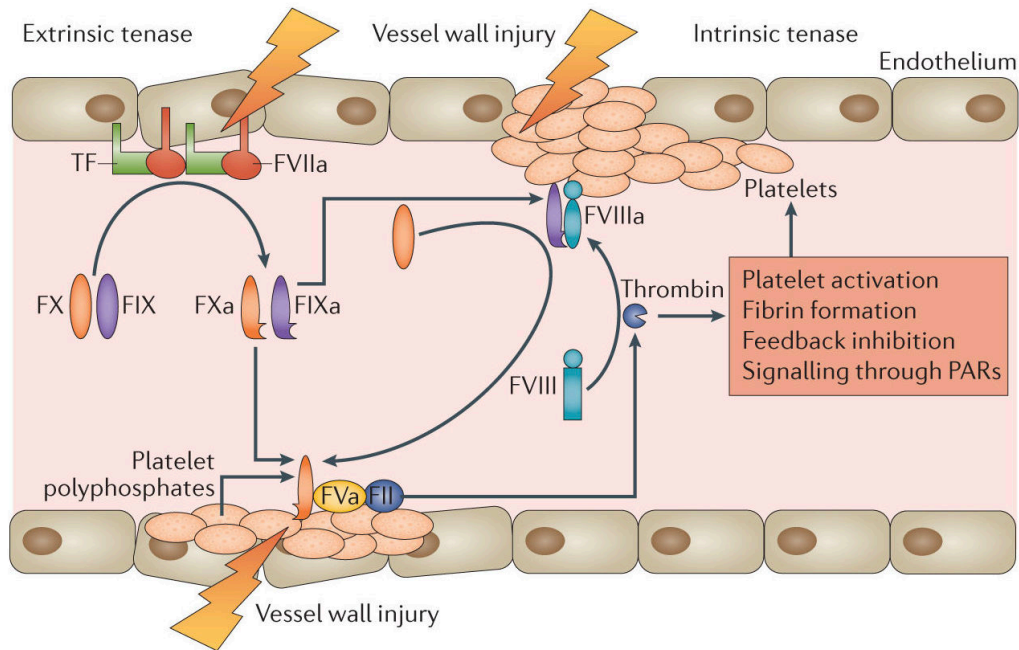
Diverses cytokines proinflammatoires régulent négativement la transcription du gène de la thrombomoduline et accélèrent son internalisation tout en favorisant l'expression du FT. La thrombomoduline soluble est sécrétée dans le plasma et des taux plasmatiques élevés ont été identifiés dans divers troubles associés aux lésions de la cellules (Cucurull et al, 1997).

### Les mécanismes procoagulants

A l'inverse, l'étape centrale de la transformation de la surface membranaire anti-coagulante en pro coagulante va être l'induction du FT. Le FT est l'élément déclencheur de la voie extrinsèque de la cascade de la coagulation. Il va donc accélérer l'activation dépendante du facteur VII activé, des facteurs X et IX. La synthèse du FT est induite *in vitro* par divers agonistes dont la thrombine, plusieurs cytokines, l'hypoxie, le cisaillement etc... Le FT est localisé principalement sous les cellules endothéliales en culture, bien que certaines preuves de son expression à la surface des cellules aient été présentées (Nahara et al 1994).

La liaison de la fibrine favorise l'adhésion à la cellule endothéliale, la propagation, la prolifération et la migration, la rétraction cellulaire, l'adhérence des leucocytes. Les cellules endothéliales mise en culture expriment également le VWF qui se lie à la GPIb sécrétée de façon constitutive par les cellules endothéliales, mais également les multimères ultralarges du VWF libéré des corps de Weibel-Palade en réponse à certains agonistes (Tian et al, 2021). Les altérations génétiques et acquises dans leur structure, l'expression et la fonction des récepteurs aux cellules endothéliales peuvent contribuer à des troubles hémorragiques et thrombotiques inexplicables. Malgré une étude approfondie de la fonction pro-coagulante des cellules endothéliales en culture, il est difficile de connaître de façon exacte l'adhérence plaquettaire ou la formation de fibrine qui en résulte réellement *in vivo*. La preuve la plus probante provient peut-être de modèles animaux de sepsis dans lesquels un tableau de

coagulation intravasculaire dépendante du FT et une lésion ischémique se produisent en l'absence de perturbation de la cellule endothéliale (Taylor 1994). Cependant, la contribution de l'endothélium, des plaquettes, des monocytes et d'autres cellules dans ces modèles nécessite davantage d'études.



**Figure 21** : Initiation, amplification et propagation de la coagulation d'après (Madhusudhan et al. 2016)

Lors d'une lésion de la paroi vasculaire et/ou de l'activation des cellules endothéliales, le facteur tissulaire (TF) est exposé au sang et se lie à FVII ou FVIIa, favorisant l'activation de FVII ou renforçant son activité catalytique. Le complexe TF-FVIIa active de petites quantités de FIX et de FX. Le FXa s'associe à la FVa pour former le complexe prothrombinase, qui clive la FII pour générer une petite quantité de thrombine. Cette phase d'initiation est suivie par la phase d'amplification, au cours de laquelle la thrombine active la surface cellulaire (principalement les plaquettes) liés au FV et au FVIII et au FXI lié aux plaquettes. Le FIXa se lie au FVIIIa sur des surfaces chargées négativement (principalement des phospholipides dérivés des plaquettes), activant le FX et initiant une explosion de génération de thrombine, la phase de propagation. La thrombine a des fonctions pléiotropiques, notamment l'inhibition de la rétroaction, la formation de fibrine, l'activation plaquettaire et la signalisation par des récepteurs activés par la protéase. (a, activé ; F, facteur.)

#### d) Perturbation des cellules endothéliales et lésion vasculaire

Il est maintenant admis que l'endothélium vasculaire est un organe dynamique qui répond à un certain nombre de stimuli qui vont aboutir à un processus d'activation à l'origine d'une

perte des propriétés anti-coagulantes et/ou pro-coagulantes. Bien que le rôle exact de l'endothélium sur la pathogénicité de la thrombose *in vivo* n'est pas prouvé, il semblerait que le dysfonctionnement des cellules endothéliales jouerait un rôle central dans le développement de maladies thrombotiques. Les modifications fonctionnelles provoquent une altération du tonus vasculaire, une augmentation de l'adhésion cellulaire (adhésion leucocytaire et plaquettaire), une augmentation de la perméabilité capillaire et un état pro coagulant de l'endothélium. Les modifications structurelles aboutissent à un œdème cellulaire et à une fuite plasmatique du secteur intravasculaire vers le secteur interstitiel.

#### a. Le stress oxydatif

Au cours d'un stress oxydatif, c'est-à-dire lors d'un déséquilibre de la balance entre la production de pro-oxydants et la défense antioxydante de l'organisme, ces espèces radicalaires de l'oxygène (ERO), peuvent induire des lésions lipidiques, protéiques et de l'ADN. Les espèces radicalaires jouent un rôle central dans la physiologie vasculaire et cellulaire. Ils ont en particulier un rôle majeur dans la survenue de la dysfonction endothéliale. Initialement, les ERO sont apparues comme étant des éléments possédant des propriétés toxiques directes capables de participer à l'apparition de lésions endothéliales lors des processus carcinologiques, de l'athérosclérose, de l'HTA, de la maladie diabétique et des états de choc. Mais, les espèces radicalaires possèdent également des propriétés bénéfiques indispensables à l'homéostasie cellulaire. Actuellement, les travaux portant sur les ERO permettent d'affirmer qu'au-delà de l'effet toxique qu'elles peuvent avoir, elles ont également un rôle de second messenger dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Pour exemple, les cytokines comme le TNF peuvent d'une part induire des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules endothéliales, mais aussi stimuler le facteur de la transcription ubiquitaire NF- $\kappa$ B qui va entraîner une activation de la transcription de molécules d'adhésion leucocytaire telles que VCAM-1 (Tropea et al. 1996).

#### b. Les contraintes de cisaillement

Les contraintes de cisaillement, ou encore appelées *shear stress*, résultent du mouvement permanent des fluides à l'origine d'une interaction dynamique permanente entre une force



tangentielle (le flux sanguin) et une surface (l'endothélium). Les modifications induites par ces contraintes de cisaillement au niveau de l'endothélium peuvent provoquer un réarrangement du cytosquelette, une modification de la morphologie mais également des modifications de l'expression endothéliale (Sapp et al. 2019; Fuh et al. 2021). La réponse adaptative de l'endothélium aux forces de cisaillement est mal caractérisée. Un effet des contraintes de cisaillement sur la biologie vasculaire est suggéré. Pour exemple, la modulation de l'expression de la thrombomoduline serait rapportée (Sapp et al. 2019). Les mécanismes responsables de cette modulation de l'expression du gène de la thrombomoduline par des cellules endothéliales sont à l'étude. Au moins une partie des effets induits par ce mécanisme est médiée par la modulation du gène de transcription.

#### e) Interactions entre les cellules endothéliales et les cellules sanguines

Les cellules endothéliales ont un rôle important dans l'expression des molécules de surface cellulaire qui vont réguler le « trafic » des cellules circulantes. Ces molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules endothéliales aident entre autres à la migration des leucocytes dans les organes « cibles » en cas d'agression, d'inflammation ou de sepsis. Ce phénomène est bien décrit en réponse à l'IL-6, cytokine pro-inflammatoire (Oelze et al. 2021). Nous allons donc décrire ci-dessous les différentes interactions entre cellules endothéliales et cellules sanguines circulantes.

##### a. Interactions des plaquettes et des leucocytes avec la paroi vasculaire

Les leucocytes et les plaquettes sont des cellules sanguines qui peuvent adhérer à la paroi vasculaire en cas de lésion vasculaire ou en réponse à une infection. Ils vont plus spécifiquement adhérer à des régions de l'endothélium, des composants sous-endothéliaux qui vont être exposés en réponse à différents stimuli. Ces interactions entre cellules représentent d'une part des précurseurs indispensables de l'inflammation physiologique et de l'hémostase, mais peuvent également conduire à l'adhésion incontrôlée des leucocytes et des plaquettes à l'origine de phénomènes inflammatoires et thrombotiques pathologiques.

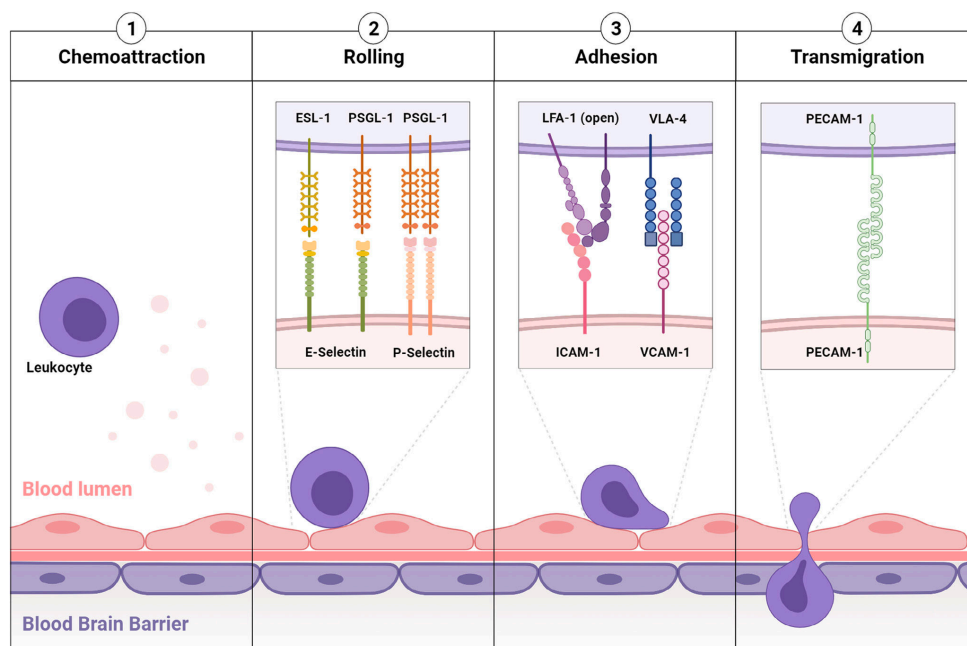
En conséquence des contraintes de cisaillement, les plaquettes et les leucocytes vont interagir avec la surface de l'endothélium par un processus qui se déroule en plusieurs étapes qui comprennent (figure 22) :

1° **L'état de repos** puis **l'activation** des leucocytes déclenchée par la détection des chimiokines ;

2° Le « **roulement** » des leucocytes via leur interaction avec les selectines exprimées à la surface de l'endothélium ;

3° **L'adhésion** des leucocytes à la paroi vasculaire par leur interaction avec les molécules d'adhésion (VCAM-1 et ICAM-1) ;

4° la **transmigration** des leucocytes à travers la couche endothéliale par un mécanisme dépendant de PECAM-1.



**Figure 22** : Différentes étapes de la transmigration des leucocytes : implication des molécules d'adhésion endothéliales d'après (Gauberti et al. 2021).

#### b. Adhésion des leucocytes et des plaquettes durant l'inflammation

Donc, au cours d'un processus inflammatoire, les leucocytes et les plaquettes vont s'attacher et « rouler » à la surface de la cellule endothéliale. Elles migrent finalement entre les cellules pour atteindre le tissu sous-jacent. Les selectines sont des glycoprotéines transmembranaires

qui reconnaissent les glucides de la surface cellulaire des ligands retrouvés sur les leucocytes. Ces interactions selectine – ligands initient et médient l'attache et le roulement des leucocytes à la surface des cellules endothéliales (McEver et al. 1995). Les selectines sont regroupées en une famille de 3 molécules connues, avec chacune un domaine amino-terminal de la lectine dépendant de  $Ca^{2+}$ , un domaine EGF, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique.

Les trois familles de selectines connues sont :

1° **L-sélectine** qui est exprimée sur la plupart des leucocytes et se lie à des ligands exprimés sur les veinules endothéliales des tissus lymphoïdes, sur l'endothélium des sites d'inflammation mais aussi aux ligands exposés aux autres leucocytes.

2° **E-sélectine** qui est exprimée sur les cellules endothéliales activées

3° **P-sélectine** qui est une sélectine stockée au sein des corps de Weibel-Palade et qui est exprimée à la surface de la membrane plasmique des cellules endothéliales lors de l'activation et la migration transmembranaire des leucocytes et des plaquettes activées (Kerfoot et al. 2002). L'activation des plaquettes conduit alors à l'exocytose de cette P-sélectine (Furie et al. 2001). La P-sélectine se lie aux ligands des leucocytes. Les leucocytes adhèrent alors à l'endothélium et peuvent se mettre en contact avec les leucocytes circulants à travers la molécule L-sélectine, entraînant une amplification du recrutement des leucocytes au site d'inflammation (Walcheck et al. 1996).

En cas d'hémorragie, les leucocytes s'attachent et roulent sur les plaquettes adhérentes au site hémorragique (McEver et al. 2015). Les monocytes recrutés peuvent quant à eux augmenter la génération de fibrine, en élaborant du FT après leur activation (Palabrica et al. 1992). De même, les ligands des sélectines exprimées peuvent aussi intervenir dans l'assemblage des plaquettes activées en améliorant l'accumulation des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques (Diacovo et al. 1996).

En conclusion, les sélectines sont à l'origine de réponses inflammatoires, immunitaires et hémostatiques puisqu'elles favorisent les interactions cellulaires dans des situations pathologiques.

c. Outils d'imagerie utilisant des particules ciblant les cellules endothéliales activées au niveau cérébral

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons fait le choix de nous intéresser plus particulièrement à l'activation endothéliale comme élément charnière de la cascade des facteurs conduisant à l'ICR. En effet, l'activation endothéliale et la thromboinflammation présentent un intérêt majeur en terme de cible thérapeutique, et ils présentent également un intérêt diagnostique. Puisque l'augmentation des marqueurs d'activation endothéliale seraient prédictifs de la survenue d'ICR chez les patients après HSA, l'hypothèse que ces derniers auraient un intérêt diagnostique précoce est intéressante. Le diagnostic d'ICR fait par imagerie est malheureusement tardif puisqu'il est confirmé, alors que l'ischémie est constituée en IRM dans la majorité des cas. En ce sens, l'intérêt de cibler cette activation endothéliale au niveau cérébral permettrait d'une part d'améliorer la compréhension des mécanismes mis en jeu dans cette pathologie, mais également d'en faire la détection plus précoce. C'est pourquoi l'utilisation de nouveaux outils d'imagerie déjà décrits tels que l'IRM moléculaire qui permet la détection la neuroinflammation dans d'autres pathologies, paraît intéressante.

Le système nerveux central, et plus particulièrement le cerveau, est capable de détecter des tissus endommagés, il peut donc être apparenté à un organe immunitaire (Louveau et al. 2015). Cette surveillance permanente est permise par l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (Wu et al. 2017). Ces molécules d'adhésion sont en effet capables de contrôler le trafic des leucocytes entre le sang et le parenchyme cérébral, via la BHE. Dans les suites d'une agression à l'origine d'une réponse inflammatoire, les cellules gliales du parenchyme, telle que la microglie et les astrocytes, vont libérer des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines, qui vont activer les cellules endothéliales situées à proximité, qui vont-elles-mêmes attirer les leucocytes circulants (Nourshargh et al. 2014). Cette expression protéique par les cellules endothéliales elles-mêmes peut être détectée par l'IRM moléculaire et *in fine* révéler les processus de la neuroinflammation dans différentes pathologies.

Le concept général de l'IRM moléculaire est d'injecter (par voie intra-veineuse) un agent de contraste sur une protéine d'intérêt et d'effectuer une séquence IRM qui va être capable de détecter l'accumulation de cet agent de contraste *in situ*, permettant ainsi de révéler

l'expression de cette protéine d'intérêt (Weissleder et al. 2015). L'agent de contraste doit, comme son nom l'indique porter un agent de contraste et être capable d'atteindre et de se lier à la protéine d'intérêt. Dans le contexte qui nous intéresse ici, des protéines exprimées par les cellules endothéliales sont sur le versant endoluminal, les particules qui sont donc injectées par voie intra-veineuse vont pouvoir aisément aller se fixer sur les protéines d'intérêt lorsqu'elles sont exprimées.

L'imagerie moléculaire permet la détection de molécules endogènes *in vivo*, de façon non invasive (Terreno et al. 2010). L'IRM moléculaire apparaît particulièrement intéressante pour l'imagerie du système nerveux central puisqu'elle permet une haute résolution des images, en profondeur, sans radiations ionisantes (Weissleder et al. 2015). Cette technique a été largement développée par *Gauberti et al.*, qui a également pu faire la preuve de son concept dans différentes pathologies cérébro-vasculaires et/ou neuroinflammatoires.

#### d. Applications de l'IRM moléculaire sur la neuroinflammation

En 2007, une nouvelle famille de particules de contraste ciblées a été proposée par l'équipe de Ronbin Choudhury : les microparticules d'oxyde ferrique ou MPIO (*microsized particles of iron oxyde*) (McAteer et al. 2007). Ils ont pu démontrer pour la première fois la faisabilité d'une détection cérébrale des cellules endothéliales activées dans un modèle de neuroinflammation chez la souris, en utilisant des MPIOs dirigées vers VCAM-1, une molécule d'adhésion théoriquement surexprimée dans le contexte de neuroinflammation. Ils ont utilisé un modèle murin de neuroinflammation qui consiste en l'injection intrastriatale d'interleukine-1 beta. Cinq heures après cette injection, ils ont injecté les MPIO conjugués à des anticorps monoclonaux anti-VCAM-1, par voie intra-veineuse. A l'issue de cette injection, ils ont réalisé une IRM en séquence T2\* qui a permis de révéler le marquage cérébral des MPIO. Ils ont pu observer un effet de contraste marqué à l'IRM qui se caractérise par un signal faible (voire signal nul) qui correspond à la délimitation des vaisseaux dans la zone inflammatoire du cerveau. *A contrario*, les animaux MPIO contrôles (sans marquage par les anticorps anti-VCAM-1) n'induisaient aucun vide de signal, ceci permettant de conclure sur le caractère spécifique du signal observé.

Plusieurs études ont par la suite confirmé ces résultats et ont pu appliquer cette méthode à différentes pathologies du système nerveux central (Gauberti et al. 2018; Gauberti et al. 2018).

Les quatre principaux champs d'application qui ont été développés dans la littérature sont :

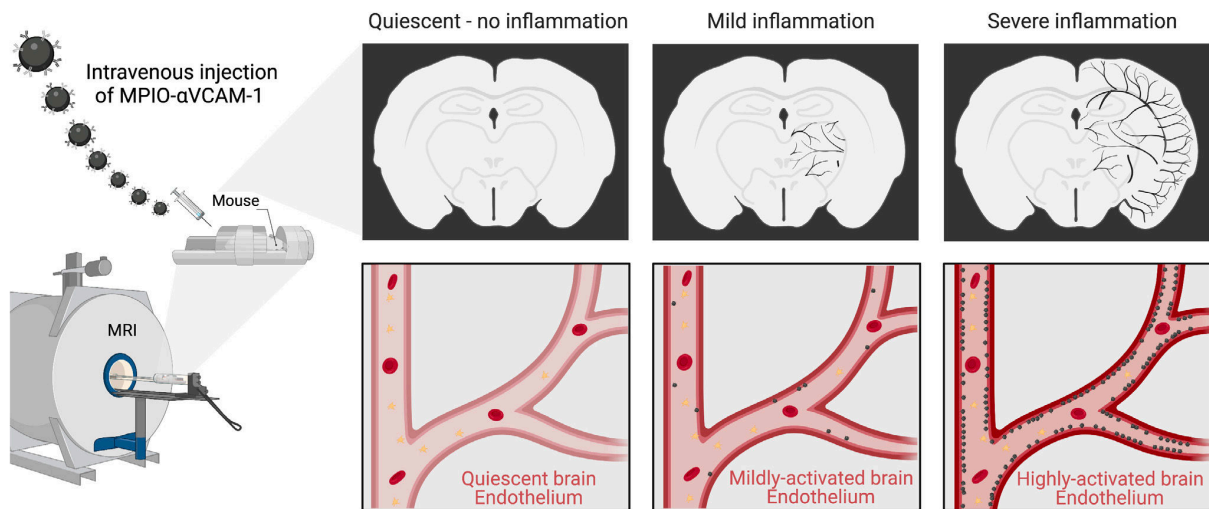
- **Le diagnostic précoce,**
- **La détection des lésions infracliniques,**
- **Le suivi thérapeutique**
- **Et l'évaluation de la sévérité des lésions neurologiques.**

Tout d'abord, Montagne et collaborateurs en 2012 ont développé, grâce à l'IRM moléculaire et l'utilisation des MPIOs, le concept de la détection précoce des atteintes chroniques du SNC (Montagne et al. 2012). Les auteurs ont pu montrer que l'imagerie moléculaire ciblée sur VCAM-1 permettait de révéler la neuroinflammation dans un modèle expérimental de démence vasculaire et d'encéphalomyélite auto-immune, avant même la survenue des symptômes cliniques. Avec l'utilisation des anticorps anti-P-selectine, la réalisation d'IRM médullaire dans un modèle expérimental de sclérose en plaques a permis de détecter de façon précoce les rechutes avant que les lésions ne s'expriment cliniquement (Fournier et al. 2017). Ces travaux ont une relevance clinique majeure puisqu'ils permettraient d'envisager chez l'homme la possibilité d'initier des thérapeutiques plus précocement, dès les premiers stades de la maladie.

L'excellente sensibilité de l'IRM moléculaire dans la détection de l'activation endothéliale permet également de détecter des lésions cérébrales infracliniques. Pour exemple, l'accident ischémique transitoire (AIT) a été étudié par le biais d'un modèle murin consistant en une compression mécanique transitoire de l'artère cérébrale moyenne (Quenault et al. 2017). La réalisation d'IRM moléculaire avec marquage de P-selectine a permis de révéler dans ce modèle la zone d'intérêt correspondant au territoire vasculaire concerné, alors même que la souris ne présentait ni déficit neurologique, ni infarctus à l'IRM cérébrale. L'application clinique de l'imagerie moléculaire dans cette pathologie est fondamentale puisqu'elle permettrait d'établir le diagnostic d'AIT, diagnostic qui reste à l'heure actuelle un diagnostic difficile à établir, voire un diagnostic d'élimination dans certains cas. En parallèle, l'IRM moléculaire permet d'envisager des perspectives en terme de recherche sur les potentielles atteintes d'organes secondaires à des agressions systémiques inflammatoires telles que le sepsis ou l'hyperglycémie (Belliere et al. 2015).

L'IRM moléculaire offre également comme possibilité de monitorer la réponse à un traitement immuno-modulateur. En effet, dans un modèle expérimental d'AVC ischémique par occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne, les MPIOs conjugués à VCAM-1 ont permis de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire des statines ou des inhibiteurs de la Cyclo-oxygénase (COX-2) (Gauberti et al. 2013; Gauberti et al. 2016). De plus, l'étude par imagerie moléculaire permet de caractériser l'intensité de la réponse inflammatoire après recanalisation de l'artère en cause. La phase post-ischémique est caractérisée par une phase retardée qui est le siège d'une neuroinflammation qui varie d'un individu à l'autre, mais qui va être à l'origine d'une mort neuronale. Cette seconde phase va donc pouvoir être une cible accessible, selon l'intensité de la réponse inflammatoire, à des traitements immunomodulateurs. L'IRM moléculaire pourrait alors permettre de cibler les patients « à risque » qui pourraient ainsi bénéficier de telles thérapeutiques. L'IRM avec détection des MPIOs conjugués à ICAM-1 a pu également permettre de caractériser cette phase post-ischémique (Deddens et al. 2013; 2017).

Enfin, l'IRM moléculaire a permis de visualiser et ainsi caractériser la corrélation entre la sévérité de l'atteinte cérébrale et l'intensité de l'activation endothéliale qui en résulte à l'étage cérébral (Figure 23). Une analyse quantitative du signal d'intensité correspondant à l'activation endothéliale permettait de grader la sévérité. Ceci a été évalué sur un modèle expérimental d'encéphalomyélite auto-immune, qui montrait que le volume de signal induit par les MPIOs conjugués à VCAM-1 au niveau cérébral et les MPIOs conjugués à P-selectine au niveau médullaire, étaient corrélés au stade de la maladie (Serres et al. 2011; Montagne et al. 2012; Fournier et al. 2017). Des études récentes ont été publiées montrant la faisabilité d'utiliser d'autres molécules d'adhésion liées aux MPIOs en imagerie moléculaire, comme MadCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) (Fournier et al. 2020) ou encore ALCAM (*Activated leukocyte Cell Adhesion Molecule*) (Zarghami et al. 2021).



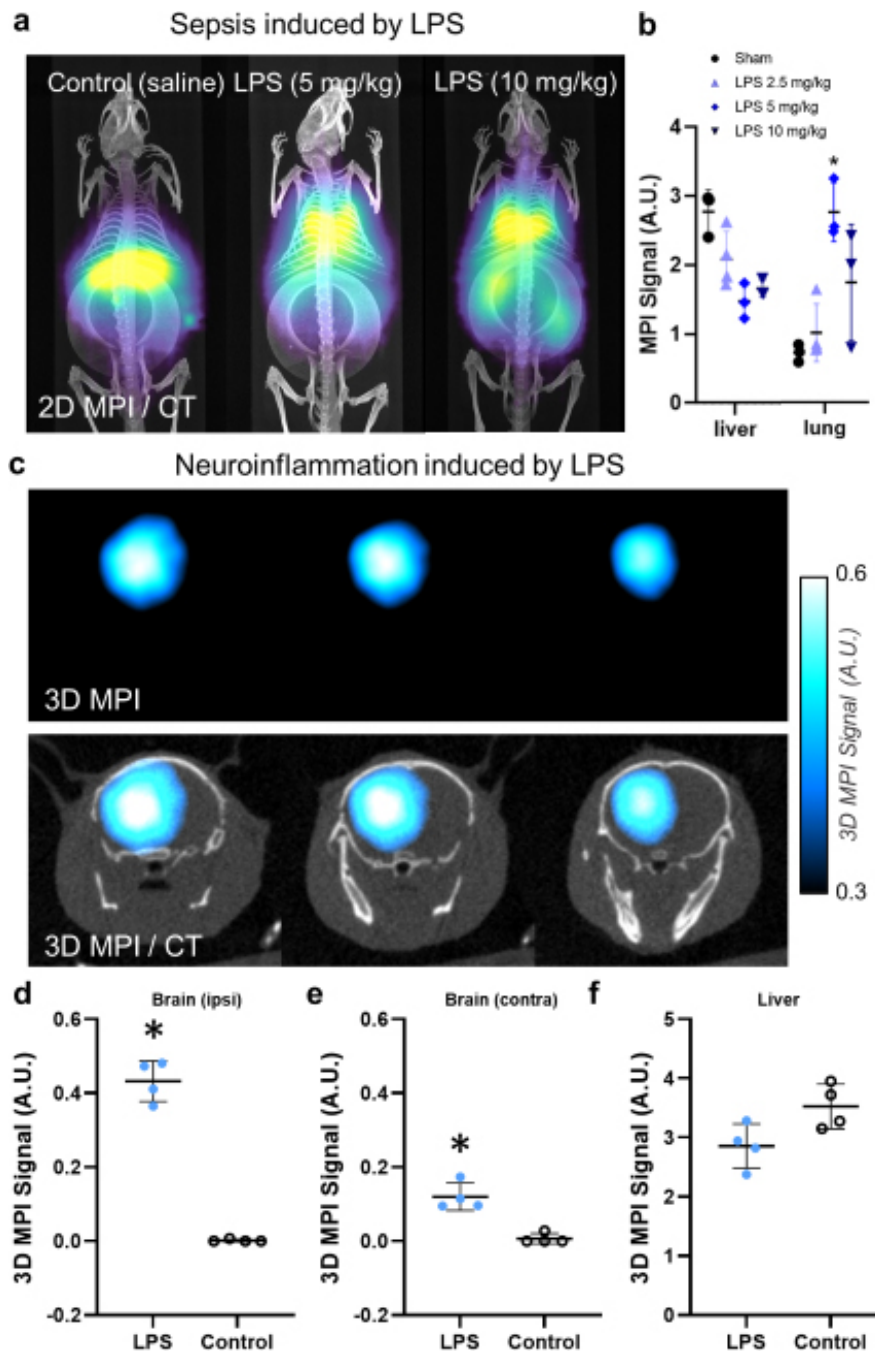
**Figure 23** : Représentation schématique de la relation établie entre la sévérité de l’activation endothéliale et les modifications de signal induites par les MPIOs (signal nul en noir) d’après (Gauberti et al. 2021)

Dans le cadre de l’HSA, comme nous l’avons vu dans le chapitre « [B. II. Physiopathologie de l’ICR](#) », les marqueurs de l’inflammation et plus précisément d’activation endothéliale ont été étudiés chez l’homme et en recherche préclinique. Leur surexpression apparaît comme étant un facteur prédictif de survenue d’ICR. Les méthodes d’étude actuelles de cette activation endothéliale restent des méthodes invasives (prélèvement sanguin ou de LCS) dont la faisabilité en routine semble compromise par plusieurs limites. D’une part, le caractère invasif rend la possibilité d’un suivi longitudinal compliqué. D’autre part, en pratique clinique, le résultat est obtenu souvent de façon retardée, ce qui peut engendrer un retard thérapeutique. Enfin, les dosages plasmatiques ou intra-thécaux vont être le reflet d’une inflammation systémique, et non localisée au cerveau. La pertinence clinique de leurs résultats est donc questionnable si l’on s’interroge sur la mise en place ou non d’une thérapeutique dont l’objectif serait de limiter les dommages cérébraux ischémiques secondaires. En ce sens, l’intérêt du développement de l’imagerie moléculaire dans la pathologie de l’HSA, et plus particulièrement dans la prédiction de survenue de l’ICR par le biais de la détection de l’activation endothéliale, nous paraît être un enjeu intéressant dans la recherche concernant cette pathologie. L’imagerie moléculaire va donc être un outil diagnostique, que nous allons tenter d’utiliser pour caractériser l’activation endothéliale sur un modèle murin d’HSA dans ce projet de thèse.



#### e. Nouvel outil d'imagerie : l'imagerie à particules magnétiques

Actuellement, l'IRM cérébrale dans le cadre de la caractérisation de la neuroinflammation est peu spécifique puisqu'elle permet de distinguer deux types de lésions qui sont l'œdème cérébral et la rupture de BHE. Le diagnostic plus spécifique de cette neuroinflammation reste donc un défi, déjà relevé par l'IRM moléculaire comme décrit précédemment. Nous assistons également à l'émergence d'autres techniques nouvelles d'imagerie qui pourraient compléter l'IRM, dont l'objectif est une quantification plus précise de l'activation vasculaire induite par la neuroinflammation après une pathologie neurovasculaire. L'imagerie à particules magnétiques (IPM) ou *magnetic particle imaging* est une nouvelle modalité d'imagerie qui détecte de manière sensible et spécifique la réponse des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques aux champs magnétiques appliqués, sans image tomographique en arrière-plan (Graeser et al. 2019). Les particules d'oxyde de fer superparamagnétiques sont utilisées depuis des années pour marquer des cellules afin de permettre leur détection en IRM, comme expliqué dans le chapitre précédent. Cependant, cette technique souffre d'une faible spécificité et d'une quantification difficile. L'IPM a donc pour objectif de s'affranchir de ces limitations. L'IPM est basée sur la réponse superparamagnétique des nanoparticules d'oxyde de fer à un champ magnétique appliqué. L'IPM a été utilisée pour détecter des cellules cancéreuses, les cellules lymphocytaires T et des cellules souches marquées par les nanoparticules dans le cerveau de la souris (Melo et al. 2022). Récemment, le laboratoire a pu acquérir cet imageur, permettant ainsi de mettre en application cette technologie de détection de particules super paramagnétiques dans le corps avec une sensibilité élevée. Ainsi, l'utilisation de l'IPM dans le cadre du sepsis, mais également sur un modèle d'inflammation neurovasculaire a été mis au point (figure 24) (Martinez de Lizarrondo et al. 2023). L'hypothèse était donc d'utiliser des MPIO ciblées sur les molécules d'adhésion endothéliales (particules pouvant être utilisées pour révéler les sites d'interactions leucocyte-endothélium), cette fois par IPM. Ces travaux ont permis d'observer en IPM, après injection de MPIO@VCAM-1, les sites de trafic leucocytaires, à l'origine d'une évaluation quantitative des interactions leucocytes-endothélium dans des contextes cliniquement pertinents. A notre connaissance, la technique par IPM n'a pas encore été utilisée pour caractériser la neuroinflammation après HSA, il nous est apparu intéressant d'explorer cet outil dans notre projet, dans le but *in fine* de pouvoir envisager cet imageur en pratique clinique.



**Figure 24** L'utilisation de l'IPM avec des MPIO cibées sur les molécules d'adhésion endothéliales révèle l'interaction leucocyte-endothélium durant le sepsis et la neuroinflammation d'après (Lizarrondo et al. 2023). a-b : Sepsis induit par du LPS, MPIO@VCAM-1 fixe les poumons et les reins de façon dose-dépendante, révélant l'inflammation. c-f: dans les conditions d'inflammation neurovasculaire, accumulation de MPIO@VCAM-1 au niveau des cellules endothéliales des régions cérébrales qui sont le siège d'une inflammation.

## ACTIVATION ENDOTHELIALE

- L'augmentation des marqueurs d'activation endothéliale dans le sang et le LCS serait un facteur prédictif de survenue d'ICR. L'activation endothéliale pourrait donc jouer un rôle clé dans la survenue de l'ICR.
- L'endothélium exprime des **molécules d'adhésion** qui vont permettre le recrutement des leucocytes circulants, qui eux-mêmes vont jouer un rôle clé au cours des processus inflammatoires.
- Après stimulation, l'activation des cellules endothéliales peut aboutir à des **mécanismes prothrombotiques** :
  - Leur modification structurelle va conduire à une augmentation de l'adhésion aux cellules sanguines circulantes (leucocytes et plaquettes)
  - Le stress oxydatif ainsi que les contraintes de cisaillement vont jouer un rôle dans leur activation.
- L'utilisation de particules ciblant les cellules endothéliales rend possible la détection de l'activation endothéliale au niveau cérébral grâce à l'**IRM moléculaire**.
- L'utilisation de l'IRM moléculaire appliquée à la neuroinflammation dans l'ICR aurait comme intérêts :
  - Son **diagnostic plus précoce**
  - La **détection de lésions infracliniques**
  - Le **suivi thérapeutique**
  - **L'évaluation pronostique** de la sévérité des lésions à l'échelle moléculaire.
- **Nouvel outil de détection de la neuroinflammation : l'IPM**
  - Technique plus sensible, permettant une évaluation quantitative
  - Transposition en clinique chez l'homme possible

## D. MODELES EXPERIMENTAUX D'HEMORRAGIES SOUS-ARACHNOIDIENNES ET ISCHEMIE CEREBRALE RETARDEE

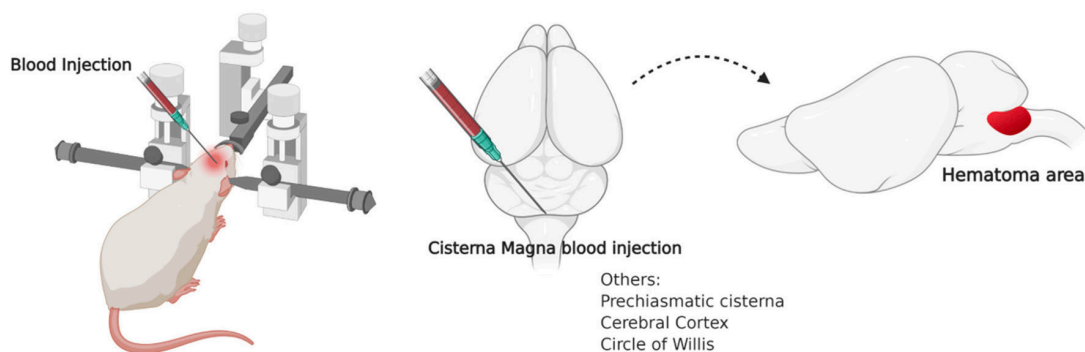
Afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques conduisant à la survenue d'ICR, et d'établir des stratégies préventives et thérapeutiques chez l'homme, il est nécessaire de disposer d'un modèle expérimental d'HSA reproduisant les complications de celle-ci, en particulier l'ICR. En effet, en se basant sur l'évaluation de l'ICR recommandée chez l'homme, et considérant que l'ICR est une complication majeure qui vient déterminer le pronostic des patients qui survivent à la phase aiguë de l'HSA, une approche consensuelle a permis de déterminer que le modèle idéal d'HSA devait associer la survenue d'une ischémie cérébrale par imagerie et/ou histologie, et une altération de la fonction neurologique clinique. Dans le but de faciliter la recherche translationnelle, il paraît raisonnable de privilégier les techniques de diagnostic non invasif, à savoir les techniques d'imagerie, par rapport à l'analyse de l'ischémie en histologie.

Selon Schwartz et *collaborateurs*, le modèle idéal d'HSA aurait pour caractéristiques une bonne fiabilité avec un dépôt de sang dans les espaces sous-arachnoïdiens, une réalisation facile, une physiopathologie proche de celle de l'HSA, un dépôt de sang cohérent avec la présence d'un anévrisme et un faible coût (Schwartz et al. 2000). Plusieurs modèles expérimentaux d'HSA ont été décrits, essentiellement des modèles murins, mais également des modèles chez le primate ou d'autres espèces. Ils peuvent être classés en plusieurs grandes catégories en fonction de la technique utilisée, que nous allons décrire ci-dessous.

### a) Modèles par injection directe de sang

La première catégorie de modèle expérimental est la technique d'induction d'HSA par injection directe de sang dans le LCS voire directement dans le parenchyme cérébral. Cette technique intéresse essentiellement les modèles murins (rats et souris), mais est également réalisée chez le primate. Elle consiste en l'injection de sang (autologue ou hétérologue), d'un volume prédéfini selon la sévérité de l'hémorragie voulue, et la tolérance clinique de l'animal. L'injection est réalisée dans la majorité des cas dans la citerne *magna* qui se situe dans le territoire postérieur (figure 25) ou au niveau de la citerne pré-chiasmatique. Cette technique est réalisée sous anesthésie générale, alors que l'animal est placé dans un cadre stéréotaxique.

Ce modèle présente comme avantage d'être facilement reproductible, de contrôler la quantité de sang injectée donc la sévérité de l'HSA. Certains auteurs ont même décrit des modèles de double injection de sang, c'est-à-dire la réalisation d'injections de sang avec un intervalle de temps qui peut varier selon les modèles, mais qui va permettre d'une part d'augmenter la sévérité de l'HSA, tout en améliorant la tolérance clinique, et d'autre part de « mimer » un resaignement, complication bien décrite dans le cadre de l'HSA dont l'anévrisme n'est pas traité.

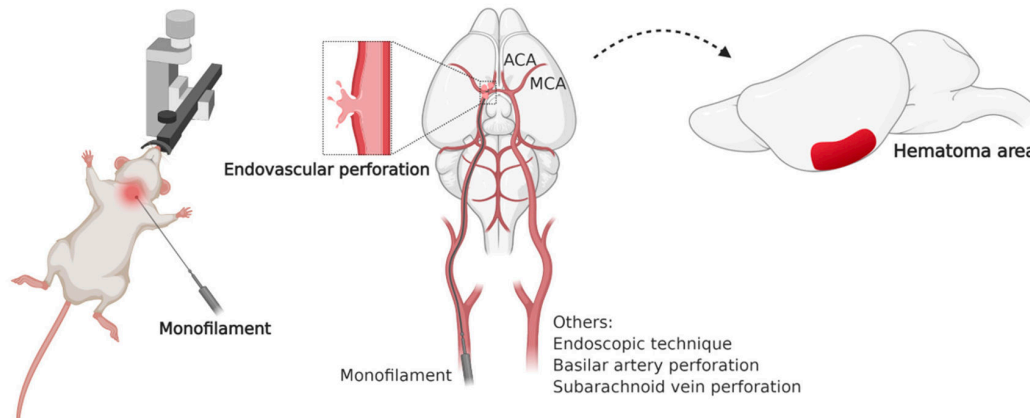


**Figure 25** : représentation schématique du modèle murin d'injection de sang au niveau de la citerne *magna* d'après (Boulaftali et al. 2021)

#### b) Modèles par perforation endovasculaire

Les modèles d'HSA par perforation vasculaire sont des modèles qui consistent à provoquer la rupture d'un vaisseau cérébral, qu'il s'agisse d'une artère ou une veine. Le modèle de perforation endovasculaire a été le premier modèle décrit en 1979. Il consiste dans la majorité des cas en une cathétérisation de l'artère carotide interne, avec perforation de celle-ci à la naissance du polygone de Willis à l'aide d'un mono filament (figure 26). Ce modèle de perforation peut également intéresser la perforation de l'artère basilaire, correspondant alors à une HSA du territoire vasculaire postérieur. Ce modèle présente l'avantage d'être simple à réaliser, peu invasif, peu coûteux, se rapprochant des caractéristiques physiopathologiques de l'HSA chez l'homme. Ce modèle permettrait également de reproduire les complications secondaires à l'HSA chez l'homme. En effet, le vasospasme a été mis en évidence sur des coupes histologiques après HSA dans de nombreux travaux, en étudiant le diamètre des vaisseaux intracérébraux (Sugawara et al. 2008). En revanche, ce modèle reste peu

reproductible puisqu'il ne permet pas de contrôler l'importance du saignement induit par la perforation. Ceci est responsable d'une importante variabilité de sévérité des HSA retrouvée à l'IRM (Egashira et al. 2014). Il en résulte une mortalité relativement élevée autour de 30 % (Bühler et al. 2014). Ce modèle a été décrit largement chez les rongeurs.



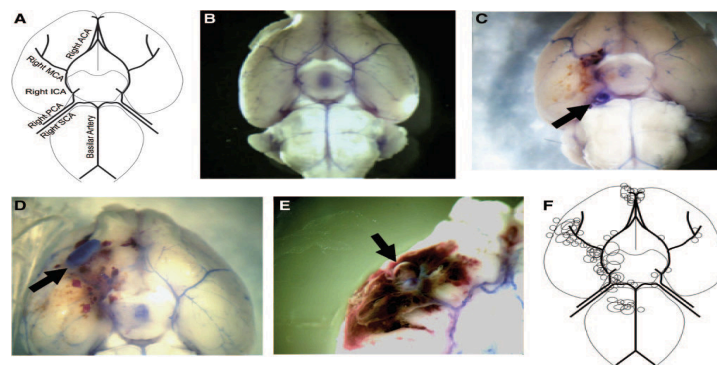
**Figure 26** : représentation schématique du modèle de perforation endovasculaire chez la souris d'après (Boulaftali et al. 2021).

### c) Autres modèles

D'autres modèles ont été décrits dans la littérature.

En chef de file, un modèle associe une exposition des animaux à une hypertension prolongée par infusion de traitement hypertenseur, provoquant la formation d'anévrismes intracrâniens. Dès la détection de ces anévrismes, une injection d'élastase dans le LCS (Makino et al. 2012) permet la rupture de ces derniers, à l'origine d'une HSA (Figure 27). Le principal avantage de ce modèle est qu'il se rapproche au mieux de la physiopathologie de l'HSA anévrismale chez l'homme, puisqu'il s'agit du seul modèle où l'issue de sang dans les espaces sous-arachnoïdiens résulte d'une rupture anévrismale. En revanche, l'inconvénient principal de ce modèle est que la rupture anévrismale est imprévisible. Il est donc difficile d'effectuer un suivi longitudinal ; la sévérité de l'HSA et donc le taux de mortalité qui en résulte sont donc des variables non contrôlées. De même, il est donc difficile de standardiser les protocoles d'évaluations cliniques et paracliniques.

Il est également décrit d'autres modèles qui associent la réalisation d'une HSA soit par injection directe de sang, soit par perforation endovasculaire, avec l'adjonction de différents promoteurs d'ischémie cérébrale. Ainsi, il est décrit un modèle d'HSA réalisé chez des rats diabétiques (Institoris et al. 2011). D'autres protocoles associent l'injection directe de sang dans le LCS avec l'occlusion intermittente d'une carotide interne, réalisant ce que l'on peut appeler un « pré-conditionnement ischémique » (Güresir et al. 2012). De même, l'association du saignement induit avec la réalisation de dépolarisations corticales propagées par le biais d'une injection corticale de potassium est également un modèle qui a été décrit. De façon intéressante, et basée sur un rationnel physiopathologique décrit plus haut, l'adjonction préalable d'agents pro-inflammatoires est une hypothèse qui a été également mise en application sur des modèles d'HSA dans le but de favoriser la survenue d'ICR.



**Figure 27** : Représentations d'anévrismes intracrâniens décrits dans le modèle élastase d'après (Nuki et al. 2009).

(A) Vue schématique ventrale du réseau artériel cérébral normal avec le polygone de Willis. (B) Polygone de Willis visualisé *in vivo* après marquage au bleu (C-E) Formations d'anévrismes intracrâniens (flèches noires). De larges anévrismes intracrâniens en formation sont visualisés en regard de la partie droite du polygone de Willis ainsi que ses grosses branches artérielles. (C) Anévrisme intracrânien au niveau de l'artère communicante postérieure droite. (D) Anévrisme au niveau de l'artère cérébrale moyenne droite. (E) souris décédée à J12 avec un caillot de sang frais d'HSA, au pourtour d'un anévrisme large. (F) localisations des anévrismes chez les souris ayant reçu 35 MUI d'élastase et 1000 ng/kg/min d'angiotensine 2 (n=44). La majorité des anévrismes intracrâniens était localisée du côté homolatéral au site d'injection d'élastase. Un petit nombre d'anévrismes était retrouvé du côté controlatéral au site d'injection, mais également au niveau des branches de l'artère basilaire.

d) Étude de l'ischémie cérébrale retardée dans les modèles expérimentaux d'hémorragie sous-arachnoïdienne.

Dans l'objectif d'une recherche translationnelle efficiente, les modèles expérimentaux d'HSA qui s'intéressent à l'ICR devraient répondre aux critères de la définition établie chez l'homme. Malheureusement, tout comme les études menées chez l'homme, les études précliniques ont longtemps souffert d'un manque de critères d'évaluations cliniques et paracliniques standardisées, ceci étant en partie expliqué par une définition de l'ICR qui a été établie seulement en 2010.

Certains auteurs se sont donc intéressés aux raisons pouvant expliquer la difficulté de transposition des études précliniques vers les études cliniques dans la pathologie de l'HSA anévrismale. Ceci peut expliquer les raisons pour lesquelles la physiopathologie de l'ICR demeure mal élucidée sur le plan mécanistique, et par conséquent pourquoi les stratégies préventives et curatives n'ont jusqu'alors pas fait la preuve de leur efficacité.

Une revue systématique de la littérature s'est intéressée spécifiquement au recensement des modèles *in vivo* de vasospasme (Marbacher et al. 2010). Les auteurs concluent qu'en dépit d'un grand nombre de modèles existants, aucun d'entre eux ne semble être pertinent pour une recherche translationnelle future, et ne peut donc être recommandé. Une autre revue de la littérature menée par Kamp et collaborateurs s'est intéressée à la mortalité dans les modèles chez la souris évaluant l'ICR après HSA (Kamp et al. 2017). Ils ont pu observer à travers cette revue un taux de mortalité moins élevé dans les modèles d'HSA chez la souris comparativement à la mortalité observée chez l'homme. Une des limites mise en avant est que l'évaluation de la mortalité dans les modèles animaux d'anévrisme n'était pas standardisée. En ce sens, les auteurs concluent à la nécessité d'études futures permettant d'établir un lien entre la survenue d'ICR et la mortalité dans les modèles animaux d'HSA. Enfin, une revue récente de la littérature publiée en 2020 fait état des modèles précliniques d'HSA en s'intéressant plus particulièrement à la survenue de déficits neurologiques (Oka et al. 2020). Les auteurs concluent alors que chez le chien, le lapin et les modèles rongeurs, aucun ne permet d'évaluer la survenue d'ICR, alors même que la dysfonction vasculaire, et plus spécifiquement le vasospasme sont souvent étudiés. En revanche, les modèles chez le primate permettent de mieux caractériser la survenue de déficits neurologiques et de lésions



cérébrales ischémiques, bien que la problématique posée par l'utilisation de modèles chez les primates pose davantage de difficultés éthiques, ainsi que des limitations en termes de coût, avec par conséquent une moins bonne reproductibilité.

Des recommandations sont déjà établies sur les bonnes pratiques à mettre en œuvre pour améliorer la qualité méthodologique des modèles précliniques dans le but d'effectuer une recherche translationnelle efficiente et standardisée (Percie du Sert et al. 2020).

La problématique d'une absence de standardisation des critères d'évaluation dans les modèles d'HSA pose en effet le problème de limites en termes de validité interne mais aussi externe, et ne permet pas d'envisager une translation des résultats chez l'homme, notamment dans le domaine des essais thérapeutiques. Cette problématique a en effet déjà été soulevée dans les essais précliniques s'intéressant aux AVC ischémiques et hémorragiques (Van Der Worp et al. 2005; Bart van der Worp et al. 2010; Frantziyas et al. 2011).

Dans le domaine de la recherche sur l'ICR, notamment pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques et ainsi envisager des thérapeutiques efficaces, les difficultés à pouvoir établir un modèle d'HSA permettant de reproduire la survenue d'ICR selon les critères définis en 2010, semble donc être un frein à l'avancée de la recherche chez l'homme. En ce sens, et en l'absence de données exactes sur cette problématique soulevée, il nous est apparu opportun de faire un état des lieux précis de la littérature sur l'existence ou non de modèles d'HSA, pouvant reproduire la survenue d'ICR, selon les critères définis, à savoir la survenue d'ischémie à l'imagerie, associée à la survenue d'un déficit neurologique. Il s'agit donc d'une partie fondamentale de cette thèse, qui sera développée dans la première partie des résultats. Cette première partie de résultats représentera le socle de connaissance sur lequel nous nous baserons pour la réflexion dans la suite de la thèse.

## MODELES EXPERIMENTAUX D'HSA

- Le modèle idéal d'HSA aurait pour caractéristiques une bonne fiabilité (dépôt de sang dans les espaces sous-arachnoïdiens), une réalisation facile, une physiopathologie proche de celle de l'HSA, un dépôt de sang cohérent avec la présence d'un anévrisme et un faible coût.
- Il existe 2 grandes catégories de modèles précliniques d'HSA :
  - Les **modèles par injection directe de sang** dans les espaces sous-arachnoïdiens.
  - Les **modèles par perforation endovasculaire**.
- D'autres modèles existent comme le modèle d'hypertension induite associée à une injection *in situ* d'élastase, permettant la formation puis la rupture d'un anévrisme intracrânien.
- Des recommandations existent sur les « bonnes pratiques » à mettre en œuvre pour améliorer la qualité méthodologique des modèles précliniques dans le but d'effectuer une recherche translationnelle efficace et standardisée.
- Les difficultés à établir un modèle d'HSA qui permettrait de reproduire la survenue d'ICR selon les critères définis par les experts semble être un frein à l'avancée de la recherche chez l'homme. Pourtant, ce modèle aiderait à mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'ICR et pourrait ainsi permettre d'envisager des thérapeutiques efficaces.

## HYPOTHESE ET OBJECTIFS

A la lumière des données actuelles dont nous disposons sur la physiopathologie de l'ICR, il est difficile de choisir une cible thérapeutique qui pourrait permettre d'améliorer le pronostic des patients. En effet, le caractère multifactoriel de sa physiopathologie complexifie la compréhension et donc la prise en charge de l'ICR. Outre les difficultés de la prise en charge thérapeutique, la problématique du diagnostic de l'ICR est peu évoquée mais pourtant une réalité. En effet, le diagnostic d'ICR chez l'homme est souvent posé tardivement (alors que l'infarctus cérébral est déjà constitué). Ce paramètre contribue probablement aux nombreux échecs d'essais thérapeutiques en clinique, mais aussi dans les études précliniques. En ce sens, il nous semble pertinent de tenter de changer de paradigme et ainsi s'intéresser à cette problématique diagnostique, dans le but d'améliorer la détection des mécanismes conduisant à l'ICR, notamment en termes de précocité et de spécificité. Nous disposons dans le laboratoire de la technique d'IRM moléculaire. Cette technique nous semble particulièrement intéressante puisqu'elle est non invasive et spécifique. Elle permet comme nous l'avons vu plus haut de détecter des lésions infracliniques précoces et offre les possibilités d'un suivi longitudinal. De plus, les données sur l'utilisation de l'IRM moléculaire dans l'HSA ne sont, aujourd'hui, pas décrites. En ce sens, guidés par des données récentes publiées chez l'homme et le petit animal, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle de l'activation endothéliale et à la thromboinflammation comme acteur principal dans la genèse de l'ICR. En effet, l'IRM moléculaire étant capable de caractériser ces phénomènes dans d'autres pathologies neurologiques, cet outil nous semble particulièrement intéressant.

Nous faisons l'**hypothèse** qu'une première phase précoce d'activation endothéliale et de thromboinflammation, que nous allons tenter de caractériser, jouerait un rôle clé dans la genèse de l'ICR après HSA.

L'**objectif** de ce travail de thèse est donc de caractériser, par différents outils, l'activation endothéliale et la thromboinflammation après HSA, dans le but de mieux comprendre les mécanismes de l'ICR, d'améliorer son diagnostic et *in fine* de cibler ses pistes thérapeutiques.

Ainsi, pour atteindre cet objectif, plusieurs axes ont été développés au cours de cette thèse :

- 1) Valider l'utilisation du modèle d'HSA sévère par double injection directe de sang dans la citerne pré chiasmatique chez la souris avec comme objectif d'évaluer la survenue ou non d'ICR (évaluation faite par IRM, doppler Speckle, immunohistochimie et étude comportementale).
  - Dans un premier temps, modification et caractérisation du modèle murin plus sévère avec une double injection afin de favoriser le risque de survenue d'ICR
  - Dans un second temps, l'évaluation de la perfusion glymphatique à un temps tardif après HSA.
- 2) Ensuite nous avons fait le constat de la nécessité de faire un état des lieux de la littérature préclinique concernant les modèles d'HSA qui se sont intéressés à l'étude du vasospasme ou de l'ICR définis selon les critères recommandés et standardisés, avec notamment le souhait de connaître la faisabilité d'un diagnostic non invasif de l'ICR par le biais de l'imagerie.
- 3) Enfin, l'objectif principal de ce projet de thèse était de caractériser à la phase précoce post-HSA l'activation endothéliale comme marqueur d'*early brain injury* dans un modèle chez la souris, au niveau cérébral et systémique :
  - D'une part par l'étude en immunohistochimie, par technique ELISA et PCR.
  - D'autre part en imagerie par IRM moléculaire et IPM.

Ces travaux de thèse ont donné lieu à la rédaction de 3 articles :

- 1) La rédaction d'un article d'une étude pilote qui englobe mes travaux réalisés lors de mon master 2 et mes premières années de thèse, intitulé « Challenges in Simulating Human delayed cerebral ischemia : A comprehensive study of the subarachnoid hemorrhage mouse model ».
- 2) Un article publié dans *Frontiers Cardiovascular Medicine* en 2021 intitulé « Delayed Cerebral Ischemia After Subarachnoid Hemorrhage : Is There a Relevant Experimental Model ? A Systematic Review of Preclinical Literature ».

- 3) La rédaction d'un article en cours de finalisation (Soumission prévue en Stroke en format Short Communication), intitulé « Molecular imaging of early brain injury in subarachnoid hemorrhage ».

# RESULTATS

ARTICLE 1: Challenges in simulating human delayed cerebral ischemia: A comprehensive study of the subarachnoid hemorrhage mouse model

*Note : Cette première partie des résultats est un étude pilote qui englobe les résultats obtenus sur un modèle plus sévère d'HSA avec double injection de sang hétérologue et que nous avons souhaité présenter dans ce manuscrit sous un format de type article original.*

**Challenges in simulating human delayed cerebral ischemia: A comprehensive study of the subarachnoid hemorrhage mouse model.**

**Authors:** Suzanne GOURSAUD <sup>1,2</sup> MD MSc, Sara MARTINEZ DE LIZARRONDO<sup>1</sup> PhD, Audrey CHAGNOT, PhD, Denis VIVIEN<sup>1,3</sup> PhD, Carine ALI<sup>1</sup>, PhD, Maxime GAUBERTI<sup>1,4</sup> MD PhD, Clément GAKUBA<sup>1,5\*</sup> MD PhD.

**Affiliations:**

1 Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, PhIND "Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders", Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, Cyceron, Caen, France

2 CHU Caen, Intensive Care Unit, Caen, France.

3 Clinical Research Department, CHU de Caen Côte de Nacre, Caen, France.

4 CHU Caen, Department of diagnostic imaging and interventional radiology, CHU de Caen Côte de Nacre, Caen, France CHU Caen

5 CHU Caen, Department of Anesthesiology and Critical Care, Caen, France.

To whom correspondence should be addressed: Clément Gakuba, MD-PhD, INSERM U1237 "Physiopathology and Imaging for Neurological Disorders (PhIND)", Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, GIP Cyceron, Bd Henri Becquerel, BP5229, 14074 Caen, France, Phone: 0033.231.47.01.55, Fax: 33.231.47.02.22, Mail: [gakuba@cyceron.fr](mailto:gakuba@cyceron.fr)



## **Abstract**

Delayed Cerebral Ischemia (DCI) is a significant complication that can occur after a subarachnoid hemorrhage (SAH). It is characterized by a reduction in cerebral blood flow that can lead to cerebral infarction, and is associated with poor outcomes and increased mortality. The available data on DCI in preclinical models of SAH primarily focuses on understanding the pathophysiological mechanisms leading to DCI but also improving the model's accuracy in simulating the human condition.

In this pilot study on a murine model SAH we aimed to validate its effectiveness in simulating DCI in mice. To that aim, we introduced a novel double injection method to increase the model's severity, reflecting the correlation between hemorrhage severity and DCI risk. The study encompasses several dimensions, including methodological details on inducing SAH, behavioral assessments, MRI analyses, and examination of the glymphatic system's function post-SAH.

We reported the presence of hydrocephalus, neuronal death, and glymphatic dysfunction in the model, yet did not observe significant DCI through imaging techniques within the experimental timeframe.

To conclude, our research underlines the complexity of replicating human DCI in mouse models and calls for further refinement in model development, in order to better understand DCI mechanisms and potential therapeutic interventions.

## Introduction

Delayed Cerebral Ischemia (DCI) is a significant complication that can occur after a subarachnoid hemorrhage (SAH) <sup>1</sup>, typically arising within the first two weeks following the initial hemorrhage <sup>2</sup>. It is characterized by a reduction in cerebral blood flow that can lead to cerebral infarction, and is associated with poor outcomes and increased mortality <sup>3,4</sup>. DCI is thought to result from a combination of factors including vasospasm (narrowing of the cerebral arteries), disruption of autoregulation of cerebral blood flow, and direct effects of blood breakdown products on the brain tissue <sup>5</sup>. The condition represents a critical phase in the management of SAH patients, requiring prompt detection and treatment to prevent permanent neurological damage <sup>6</sup>.

Current available data on DCI in preclinical models of SAH primarily focuses on understanding the pathophysiological mechanisms leading to DCI, testing the efficacy of potential therapeutic interventions, and improving the model's accuracy in simulating the human condition. These studies often utilize rodent models to investigate the role of factors such as vascular changes, inflammation, and neuronal injury. Key findings highlight the complexity of DCI development, including the significance of vasospasm, microthrombosis, and cortical spreading depolarizations <sup>7</sup>. Some recent data also emphasize the importance of the glymphatic system and the impact of blood breakdown products on cerebral arteries and brain tissue which could lead to DCI <sup>8</sup>. Thus, preclinical models are crucial for identifying potential targets for intervention and for testing pharmacological and non-pharmacological treatments aimed at preventing or mitigating DCI following SAH. Several SAH models are proposed in the preclinical literature, but it is not clear to know if these models really recapitulate the features of delayed cerebral ischemia (DCI) <sup>9</sup>.

In order to validate the use of the SAH model with direct injection of blood into the pre-chiasmatic cistern in mice, we wanted to characterize this model with several assessment tools. To characterize this SAH model, which was previously described in the literature <sup>10</sup>, we made the choice to increase its severity. Indeed, we know that risk of DCI increases with the severity of the hemorrhage <sup>11</sup>. To that aim, we proposed a double injection (at 24 hours of interval). This model was also described in rats but never in mice <sup>12</sup>.

Then, we attempted to characterize the later phase after SAH in this model. Indeed, the interest of this later phase is the possibility to consider the characterization of DCI using

different imaging techniques. Furthermore, we were interested in studying the glymphatic system at this delayed phase after SAH.

## **Material and methods**

### ***Animals***

Experiments complied with the European Directives and the French Legislation on Animal Experimentation. All the experiments were performed in male swiss mice (35-40g; CURB, Caen, France) anesthetized with isoflurane (2%) in 70%/30% NO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>. 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 first anesthesia and during the imaging procedure at +24 hours, when appropriate.

### ***Subarachnoid Hemorrhage***

Subarachnoid hemorrhage (SAH) was induced by injection of fresh arterial blood into the prechiasmatic cistern (**Supplemental figure 1**)<sup>10</sup>. The mouse was placed within a stereotactic frame. A hole was drilled in the skull 4.5 mm anterior to the bregma, after we had observed and avoided the superior sagittal sinus. A 30-gauge needle was advanced at a 40° angle for 5 mm until the skull base was touched. It was withdrawn from 0.5-1 mm, so that the tip was in the prechiasmatic cistern. Arterial blood was withdrawn from the left ventricle of another anesthetized mouse using a 25-gauge needle. 50 µL of blood were manually injected through the 30-gauge needle in 15 seconds. We chose the volume of 50 µL instead of 100 µL<sup>2</sup> in order to induce mild subarachnoid hemorrhages with fast recovery of the mice and no mortality. For sham animals, the same procedure was followed, except that the intracisternal injection solution was made of saline. All the mice were included in the final analyses. For the first part of our experiments, we choose to repeat blood injection of 50 µL 24 hours after in order to increase the severity of SAH, with the aim of mimicking.

### ***Intracisternal injection of DOTA-Gd***

As previously described, the function of the glymphatic system was evaluated either by T1-weighted MRI after intracisternal DOTA-Gd (Dotarem) microinjection (1 µL over 1 minute) into

the cisterna magna (**Supplemental figure 2**)<sup>8</sup>. To inject the tracer intracisternally, we used a pulled haematological glass micropipette (diameter= ~80 µm). This allows to perform a single small volume injection of contrast material without significant damage to the dura mater and thus, without cerebrospinal fluid leakage. The micropipette was left in place for 1 additional minute and then the wound was closed.

### ***DOTA-Gd clearance***

SAH was induced in mice and 24 hours thereafter, we performed an intrastriatal injection of 1 µL of a diluted solution of DOTA-Gd. Then, mice underwent two MRI sessions at +1 minute and +60 minutes after *in situ* DOTA-Gd injection to measure DOTA-Gd clearance from the brain. Data were quantified as a signal intensity ratio between the ipsilateral (injected) and the contralateral (control) striatum.

### ***MRI experiments***

MRI were performed on a 7T Pharmascan MRI system (Bruker, Germany) equipped with surface coils. High-resolution 3D T1-weighted imaging were performed with a Fast Low Angle Shot (FLASH) sequence with parameters set as follow: TR/TE 15/3.57 ms, Angle= 25°, Field of View= 20\*17\*14.4 mm, Matrix= 256\*218\*96 leading to a resolution of 78\*78\*0.15 µm, acquisition time= 5m 14s. T2-weighted imaging and Diffusion weighted imaging were performed as previously described. Image quantification was done using ImageJ (1.48, NIH) in a blinded manner and regions of interest were set as described on supplementary figure 2.

### ***Behavioral assessment***

Behavioral analyses of the animals were performed on day 0, 3, 5 and 7 using several behavioral tests. First, a clinical neuroscore corresponding to a simple scale rated from 0 to 4 (0: no deficit, 1: Slight deficit, 2: slight circling, 3: significant circling or immobility, 4: death). Then, in the actimetry studies mice were placed in a 30x20x20 cm acrylic cage crossed by infrared beams for total duration of 15 minutes. The spontaneous motor activity of the animal was recorded by counting the number of vertical movements (straightening). Data were normalized compared to day 0. The Climbing test evaluated the sensory-motor abilities of mice. Animals were placed on a plane inclined at 45°. The support recovery latency was timed.

Test success was defined by a rise latency of less than 30 seconds. Lastly, the string test consisted in a qualitative and quantitative evaluation of sensory-motor activity. Mice were placed on a bar, suspended by its front legs. Drop latency was measured: a score of 0 to 4 was used (0: fall; 1: hold with one paw; 2: hold with two legs; 3: hold with its three legs and 4: moves on the wire thanks to its four legs). The test was passed when the mouse obtained a score of 4.

In parallel, the weight was evaluated and normalized compared to the day 0 values. Mortality was assessed after the start of the surgical procedure. For glymphatic system, we made a long-term study and repeat weight monitoring and actimetry test at day 14.

### ***Study of cerebral perfusion by speckle laser***

Speckle laser acquisition were carried out on day 0, day 3, day 5 and day 7. The acquisition was performed for 1 minute continuously, using a Speckle moorFLPI-2 laser. The information acquired correspond to the instantaneous analysis of cortical cerebral blood (**Supplemental figure 3**).

### ***Immunohistochemistry***

Deeply anesthetized mice were transcardially perfused with cold heparinized saline (15 mL) followed by 150 mL of fixative (PBS 0.1 M, pH 7.4 containing 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid). Brains were post-fixed (18 hours; 4°C) and cryoprotected (sucrose 20% in veronal buffer; 24 hours; 4°C) before freezing in Tissue-Tek (Miles Scientific, Naperville, IL, USA). Cryomicrotome-cut transversal sections (8-10 µm) were collected on poly-lysine slides and stored at -80°C before processing. Neuronal death was studied using Fluoro Jade C marking. A labeling with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was incorporated into the final solution. Revelation with 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) staining: the rehydrated brain sections were incubated with 500 µl of solution containing the peroxidase substrate and a chromogen. DAB precipitate allows to reveal the presence of red blood cells.

For immunofluorescence analyses, sections were co-incubated overnight with chicken anti-GFAP (1:8000; Abcam) or sheep anti-fibrin(ogen) (1:4000, purified Serum from sheep immunized with fibrinogen) in veronal buffer (pH 7.4). Primary antibodies were revealed using Fab'2 fragments of Donkey anti-goat, sheep or chicken IgG linked to FITC or TRITC (1:500,

Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA). Washed sections were coverslipped with antifade medium containing DAPI and images were digitally captured using a Leica DM6000 microscope-coupled coolsnap camera and visualized with Metavue 5.0 software (Molecular Devices, USA) and further processed using ImageJ 1.48 software (NIH). Measurement of fluorescence intensity were performed using ImageJ using unprocessed images (mean fluorescence of the whole image). Three different slices per mouse were selected randomly in the target area and the mean fluorescence was computed. Image acquisition parameters were set at the same values for all the animals (Acquisition time= 1000 ms).

### ***Statistics***

Results are the mean +/- SD. Statistical analyses were performed using the Kruskal-Wallis test followed by post hoc comparison with the Mann-Whitney U test.

## Results

### Characterization of a severe mouse model of SAH by double injection of heterologous blood for the study of DCI

The study design was summarized on **Figure 1.A**, with a total of 20 animals per group at day 0. The distribution of animals in the SAH group on day 3 and day 7 according to the severity stage of SAH were as follows: 13% (n=2) with grade 0 (absence of SAH), 60% (n=9) with grade 1 (moderate SAH) and 27% (n=4) with grade 2 (SAH with intraventricular hemorrhage). All the animals in the sham group presented a grade 0 on D3 and D7. The mortality rate on day 3 amounts to 25% (n=4) in the SAH compared to 15% in the sham group (n=2). However, these results remain insignificant.

Concerning the morphological results: First, the positive diagnosis of SAH was made by revelation of peroxidase activity on histological sections of SAH brains (**Figure 1.B**). No peroxidase activity could be revealed in controls.

Looking at imaging analyses by MRI, hydrocephalus was present in 87% (n=13) of animals in the SAH group on day 3 and day 7: 53% (n=8) grade 1 (moderate hydrocephalus), 33% (n=5) grade 2 (hydrocephalus severe). No animal in the sham group showed hydrocephalus. The presence of hydrocephalus was associated with severity of the hemorrhage visualized on MRI. Indeed, among the 13 mice which presented a hydrocephalus, 77% (n=10) had SAH grade 1 or 2, while 23% (n=3) of them were grade 0 ( $p=0.01$ ) (**Figure 1.C**).

Then, MRI sequences were also performed to reveal DCI on day 3 (7 in the SAH group, 8 from sham group) and on day 7 (8 animals from SAH group, 7 animals from the sham group). Seven animals died before having an MRI (4 SAH and 3 sham). Two MRIs were not interpretable due to technical constraints (1 animal SAH and 1 animal sham). No DCI could be observed on day 3 and day 7 neither in SAH nor sham animals (data not shown).

We also looked at weight loss. Thus, weight monitoring of animals between day 0 and day 7 were performed, but did not reveal any significant difference between SAH and sham groups. The intra-group analysis of weight made it possible to highlight a significant difference between day 0, day 3, day 5 and day 7 in the SAH group ( $p<0.001$ ) (**Figure 1.D**).

Then, we look at behavioral tests. We noted an increase in the clinical neuroscore corresponding to neurological deterioration over time, even more marked in SAH group. However, we did not show any significant difference between the two groups during this follow-up until day 7 (data not shown).

Monitoring the spontaneous activity of animals by actimetry did not reveal any significant difference between the two groups regarding the study of vertical movements. We could nevertheless note a tendency towards a secondary deterioration on day 7 of the motor activity of SAH animals compared to sham animals ( $p=0.06$ ). When we made intra-group analyzes for the vertical movements between day 0, day 3, day 5 and day 7 intra-group, we could note a significant difference in the SAH group ( $p<0.01$ ) as well as for the sham group ( $p=0.01$ ) (**Figure 1.E**). The climbing test did not allow us to observe any significant difference between the sham and SAH animals regarding their success rate in this test (data not shown). Lastly, evaluation by the string test did not reveal any significant difference between SAH and sham groups on day 0, day 3, day 5 and day 7 (data not shown).

We also looked at the cerebral perfusion after severe SAH compared to sham group. No significant difference observed between the two groups. Moreover, there was no significant asymmetry of cerebral perfusion between the two hemispheres for the SAH and sham animals (**Figure 1.F**).

Lastly, we studied neuronal death after severe SAH. We were able to highlight areas of ischemia among SAH animals in 50% cases ( $n=2$ ). Indeed, the areas of ischemia were revealed by the presence of a Fluoro Jade C positive labelling (**Figure 1.G**). Neuronal death was detected at day 3 and day 7. This infarct region corresponds in both cases to a cortical area, located in the anterior part of the brain. This region is extensive and appears as an area of systematized ischemia which may correspond to the vascular territory of the anterior cerebral artery. Nevertheless, these results were inconclusive because were only present in two animals of the SAH group.

### **Long-term follow-up after experimental SAH model and glymphatic system**

After revealing that the double injection was not able to recapitulate DCI in this preclinical model, we performed another cohort of mice with a single injection of heterogenous blood.



In this cohort we decided to perform a long-term follow-up (14 days) in order to look to neuronal death and microthrombosis at latter time points.

A total of 30 animals were randomized: 15 to the SAH group and 15 to the sham group. Three animals died during surgery: 2 in the HSA group and 1 in the sham group. After surgery, 27 animals could therefore be included in our study: 13 in the SAH group and 14 in the sham group. Mortality rate (after surgery) was zero at 14-day follow-up in the SAH and sham groups. Then, we performed morphological analyses to confirm SAH. Observation on a macroscopic scale made it possible to confirm blood deposition at the prechiasmatic level with visualization of blood particularly in the regions of the middle and anterior cerebral arteries (**Figure 2.B**). Furthermore, our immunohistological study of the brains 72 hours after surgery confirmed the diagnosis of SAH. Immunostaining carried out using anti-fibrin(ogen) and anti-CD41 antibodies (platelet marker) revealed the presence of blood in the subarachnoid spaces of the prechiasmatic region, compared to the blood deposition carried out during surgery (**Figure 2C.D**). The study of DCI 14 days after SAH was carried out in histology using different approaches: a first approach by searching for recent neuronal degeneration (Fluor Jade C marking) and a second approach by searching for indirect signs of cerebral infarcts such as microthrombosis (anti-fibrin/fibrinogen and anti-platelet CD41 marking), or a glial scar (anti-GFAP marking). Fluor Jade C labeling did not reveal neuronal degeneration at day 14 (**Figure 2.E**). On the other hand, anti-fibrin(ogen) labeling coupled with anti-cd41 labeling revealed the presence of intravascular microthrombi in some SAH mice in the cortex (**Figure 2.I**). The characteristics of anti-GFAP labeling did not differ between SAH and Sham animals. It should be noted that, contrary to the histological observations made on day 3, we did not observe fibrin deposits in the perivascular spaces on day 14.

Weight monitoring of the animals revealed a significant difference between the 2 groups at 14 days post-injection. Significantly, less weight gain was observed in SAH animals compared to sham animals: +103% +/- 4% vs +107% +/- 4% ( $p=0.02$ ) (**Figure 2.F**).

We also performed actimetry test in this second cohort. Monitoring the spontaneous motor activity of the animals by actimetry revealed a significant drop in vertical movements 14 days after surgery in SAH animals compared to sham animals: 99% +/- 37% vs 142% +/- 57% ( $p=0.04$ ) (**Figure 2.G**).

Lastly, we studied the glymphatic system at 14 days after SAH. To that aim, an independent cohort of 50 mice was randomized (25 in each group). A total of 7 animals died during surgery (4 in SAH group and 3 in sham group). Data concerning glymphatic perfusion could not be obtained for 5 animals due to intracisternal injection failures: 2 in the SAH group and 3 in the sham group. Data from 19 animals in the two groups were therefore included in the analysis for the evaluation of glymphatic perfusion.

As observed on figure 2.J in the T1-Weighted images, we confirmed that the glymphatic system was greatly impaired at 14 days after SAH compared to the sham. This highlighted a significant reduction in glymphatic function in the SAH group compared to the sham group, ( $p < 0,05$ ) when we looked at the signal intensity ratio (**Figure 2.J-K**).

### **Discussion and conclusion**

At the end of this work, we can conclude on several results. First, we were able to confirm the feasibility of a double injection model, which was made for the first time in mice. In addition, we confirm the severity of this model, which reproduces severe complications in humans such obstructive hydrocephalus and intraventricular hemorrhage. Despite the severity of this model, no DCI was observed at 7 days during MRI longitudinal study. We detected neuronal cell death in histology, which was difficult to related to delayed ischemia as defined for DCI, at least in the absence of correlation with imaging. We observed a significant decrease only in the spontaneous locomotor activity on the vertical movements of animals 7 days after SAH. Even if all other behavioral tests were not significantly modified, this deficit in spontaneous locomotor activity was interesting because it was observed only at a delayed time. It was therefore probably not be related to the initial bleeding. The second objective was to increase the duration of longitudinally monitoring of animals 14 days after induction of SAH, and also study the perfusion of glymphatic system concomitantly. We could highlight a persistent and significant alteration of glymphatic function 14 days after SAH on MRI. We also observed microthrombi in the brain parenchyma which could participate in the loss of glymphatic function, by altering arterial pulsatility. Furthermore, we demonstrated in SAH mice a locomotor deficit at 14 days as well as a significant loss of weight.

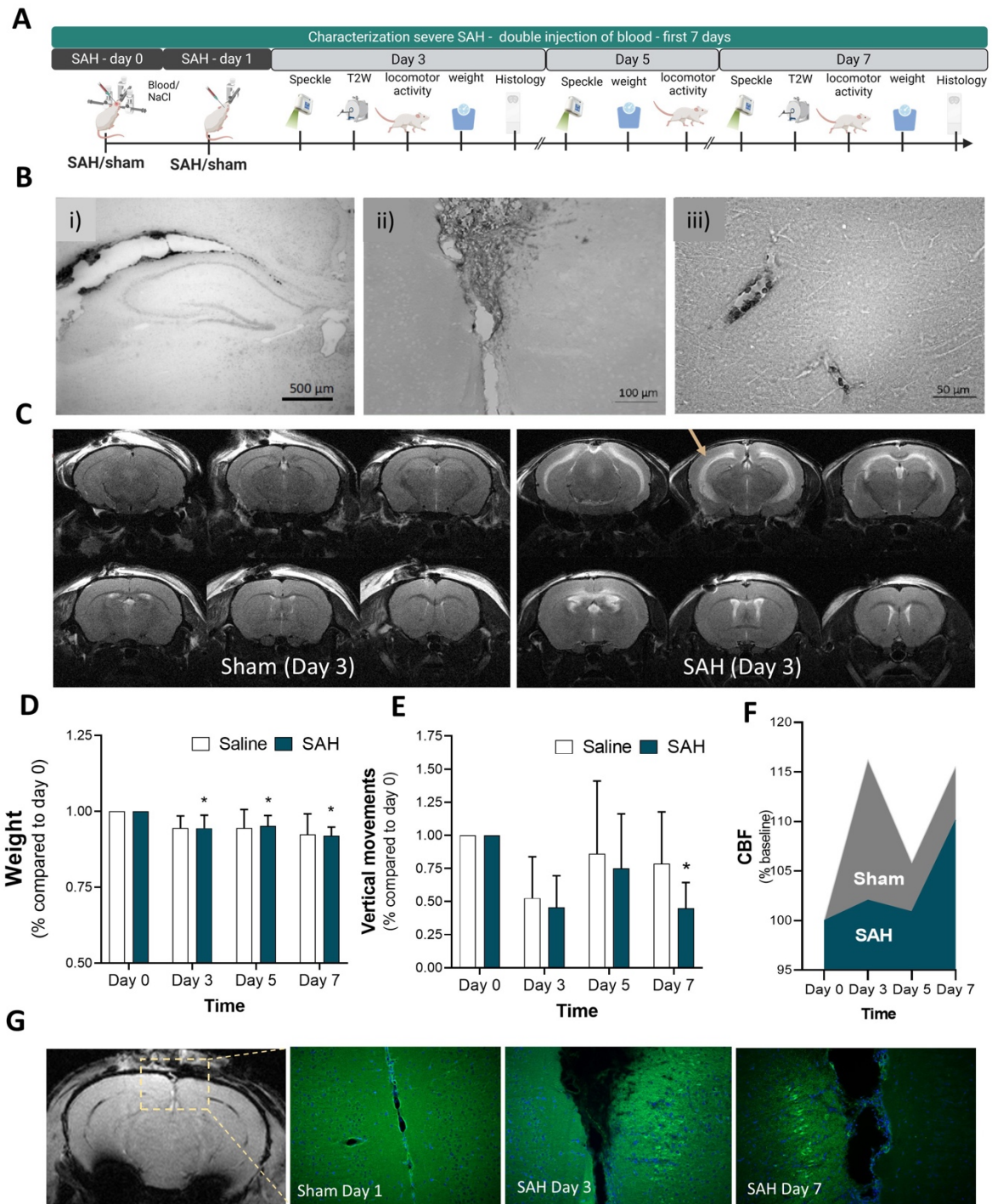
Unfortunately, we did not demonstrate DCI in this SAH injection model through imaging (MRI) as defined in humans<sup>2</sup>. To conclude, our research underlines the complexity of replicating

human DCI in mouse models and calls for further refinement in model development, in order to better understand DCI mechanisms and potential therapeutic interventions.

## **REFERENCES**

1. Kassell, N. F., Sasaki, T., Colohan, A. R. T. & Nazar, G. Cerebral Vasospasm Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* **16**, 562 (1985).
2. Vergouwen, M. D. I. *et al.* Definition of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as an outcome event in clinical trials and observational studies: proposal of a multidisciplinary research group. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **41**, 2391–5 (2010).
3. Macdonald, R. L. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nat Rev Neurol* **10**, 44–58 (2014).
4. Macdonald, R. L. & Schweizer, T. A. Spontaneous subarachnoid haemorrhage. *www.thelancet.com* **389**, (2017).
5. Foreman B. The Pathophysiology of Delayed Cerebral Ischemia. *J Clin Neurophysiol* **33**, 174–182 (2016).
6. Connolly, E. S. J. *et al.* Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **43**, 1711–1737 (2012).
7. Dodd, W. S. *et al.* Pathophysiology of Delayed Cerebral Ischemia After Subarachnoid Hemorrhage: A Review. *J Am Heart Assoc* **10**, (2021).
8. Gaberel, T. *et al.* Impaired glymphatic perfusion after strokes revealed by contrast-enhanced MRI: A new target for fibrinolysis? *Stroke* **45**, 3092–3096 (2014).
9. Marbacher, S., Fandino, J. & Kitchen, N. D. Standard intracranial in vivo animal models of delayed cerebral vasospasm. *Br J Neurosurg* **24**, 415–434 (2010).
10. Sabri, M. *et al.* Anterior circulation mouse model of subarachnoid hemorrhage. *Brain Res* **1295**, 179–185 (2009).
11. De Rooij, N. K., Rinkel, G. J. E., Dankbaar, J. W. & Frijns, C. J. M. Delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: A systematic review of clinical, laboratory, and radiological predictors. *Stroke* **44**, 43–54 (2013).
12. Vatter H, Weidauer S, Konczalla J, Dettmann E, Zimmermann M, Raabe A, et Al. Time course in the development of cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage: clinical and neuroradiological assessment of the rat double hemorrhage model. *Neurosurgery* **58**, 1190-6 (2006).

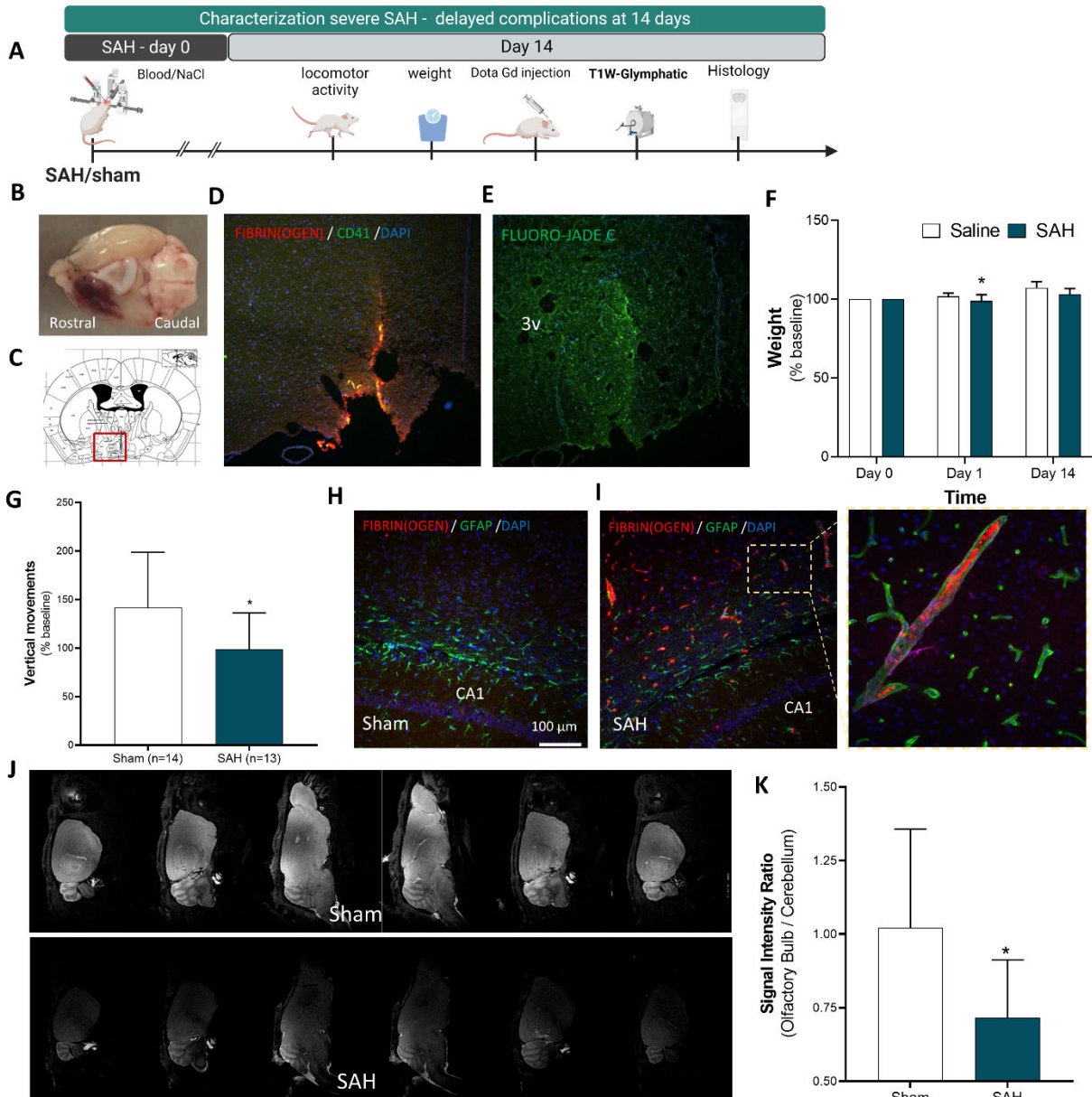
## Figures and legends



**Figure 1: Characterization of a severe model of SAH (by double injection of heterologous blood)**

(A) Study timeline (B) i) Representative brain histological section (10  $\mu$ m) revealing DAB (peroxidase activity) on a sample 3 days after SAH ii) The precipitate of DAB (associated chromogen) at the level intraventricular corresponding to the presence of an intraventricular hemorrhage iii) DAB precipitate revealing the presence of intravascular microthrombi with red

blood cells abnormally present intraluminally. **(C)** Representative T2-weighted images showing that 3 days after SAH there is dilatation of the ventricular system compared to sham animals, due to obstructive hydrocephalus (yellow narrows). **(D)** Longitudinal weight monitoring in both SAH and sham (saline) groups (n=20 at day 0 for each group). The intra-group analysis highlighted a significant difference between day 0, day 3, day 5 and day 7 in the SAH group ( $p < 0.001$ ). **(E)** Spontaneous vertical activity in the SAH and sham groups (n=18/17 respectively at day 0). Data were normalized relative to day 0 (before the surgery). **(F)** Study of cerebral blood flow (CBF) through cortical cerebral perfusion using laser Speckle (n=20 for saline and n=15 for SAH). Values were showed like mean values normalized with baseline values expressed as a percentage. We observed no significant differences between SAH and sham groups. **(G)** Neuronal death revealed by fluoro jade C labeling in correlation with the presence micro- or macro- hemorrhages by DAB marking on histological sections (green: fluoro Jade C, blue: DAPI, black in B: DAB precipitate). Representative image of a positive fluoro Jade C labelling of a cortical region of an animal on day 3 and 7 after SAH surgery. Absence of fluoro Jade C-positive neurons on one section of sham (saline) animal at the same cortical region (n= 3/group).

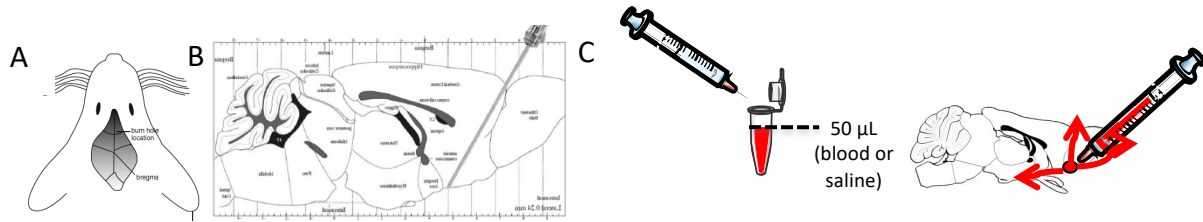


**Figure 2. Characterization of mild-delayed complications 14 days after SAH**

(A) Study timeline (B) Representative image (macroscopic) of the ventral side of a mouse brain showing the haemorrhage through the meningeal spaces in this model. (C) Image from the stereotaxic atlas showing the location of the brain region (red box) analyzed in D and E. (D) Representative immunofluorescence images showing Fibrin(ogen) and platelet (CD41) accumulation around the injection site. (E) Neuronal death revealed by Fluoro jade C labeling 100 μm from the D image (green: Fluoro Jade C, blue: DAPI) (F) Weight monitoring in both SAH and sham (saline) groups (n=10 and n=9 respectively). Significant difference between SAH and sham at day 14 ( $p < 0.05$ ). Data were normalized to day 0 for each animals (before surgery). (G) Spontaneous vertical activity in the SAH and sham groups (n=14/13 respectively) at day 14 ( $p < 0,05$ ). (H) Representative immunofluorescence imaging showing lack of fibrinogen deposits in the sham and SAH group, even if (I) we were able to observe some fibrin(ogen) labelling in one of the SAH mice. GFAP (in green) revealed the presence of astrocytes and/or immunoreactive astrocyte processes in both groups. (J) Left: T1-weighted MRI sequences one

hour after intracisternal injection of DOTA-Gd in SAH and Sham mice 14 days after surgery. We were able to observe less enhancement of the rostral regions of the brain parenchyma including the olfactory bulbs in SAH animals compared to Sham animals. **(K)** Mean Signal intensity ratio quantification, showing significantly difference between sham and SAH groups at 14 days.

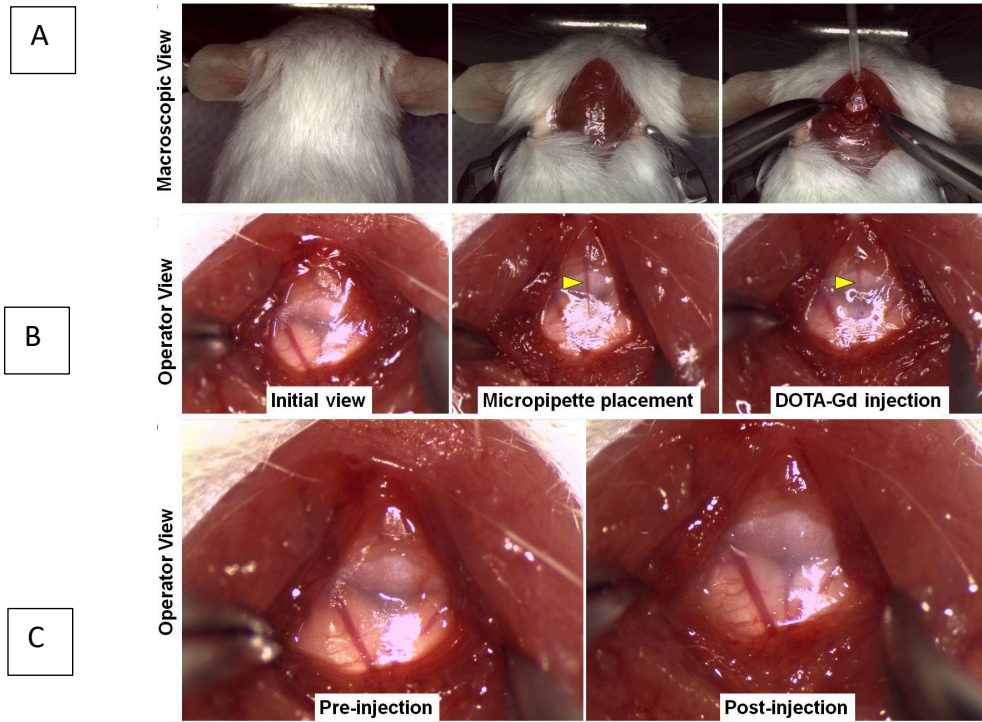
## Supplemental figures



### Supplemental figure 1: prechiasmatic direct injection model in mice to induce SAH.

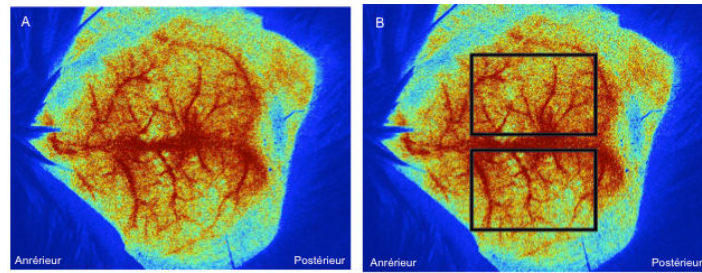
(A) Anatomical landmarks after midline incision of the scalp. (B) Anatomical representation of a longitudinal section of mouse brain with the path of the needle for injection directly into the pre-chiasmatic cistern, (C) intracardiac collection of 50 microliters of autologous blood or saline for control group in order to reinject it into the pre-chiasmatic cistern of mice.





**Supplemental figure 2: Intracisterna magna injection** described by Gaberel *et al*<sup>8</sup>.

(A) Macroscopic view of the injection method. Left: Initial position of the mouse. Middle: Neck skin incision revealing the muscular layer. Right: Final view after dissection of the muscular layer and micropipette placement. (B) Operator view of the injection method. Left: visualization of the dura mater and underlying cerebral structures. Middle: position of the micropipette (yellow arrowhead) immediately before insertion inside the *cisterna magna*. Right: final position of the micropipette and injection of DOTA-Gd. (C) Pre- and post-injection views showing the lack of apparent damage of the dura mater by the microinjection procedure.



**Supplemental figure 3: macroscopic appearance of cerebral perfusion obtained by laser speckle** on the dorsal side of the mouse skull before (A) and after (B) selection of the regions of interest on the right and left hemispheres.

ARTICLE II: Delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: is there a relevant experimental model? A systematic review of preclinical literature.

*Note : Après les résultats de notre première étude, nous avons décidé de faire une revue systématique de la littérature sur les modèles précliniques d'HSA en regardant plus précisément l'évaluation de l'ICR en tenant en compte des critères définis par la communauté scientifique.*

*Ce deuxième article original (revue systématique) dont je suis première auteure a été publié dans la revue Frontiers in Cardiovascular Medicine en 2021 dans une édition spéciale.*



# Delayed Cerebral Ischemia After Subarachnoid Hemorrhage: Is There a Relevant Experimental Model? A Systematic Review of Preclinical Literature

Suzanne Goursaud<sup>1,2\*</sup>, Sara Martinez de Lizarrondo<sup>2</sup>, François Grolleau<sup>3</sup>, Audrey Chagnot<sup>2</sup>, Véronique Agin<sup>2</sup>, Eric Maubert<sup>2</sup>, Maxime Gauberti<sup>2</sup>, Denis Vivien<sup>2,4</sup>, Carine Ali<sup>2</sup> and Clément Gakuba<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup> CHU de Caen Normandie, Service de Réanimation Médicale, Caen, France, <sup>2</sup> Normandie University, UNICAEN, INSERM, U1237, PhIND « Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders », Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, Cyceron, Caen, France, <sup>3</sup> Centre d'Epidémiologie Clinique, AP-HP (Assistance Publique des Hôpitaux de Paris), Hôpital Hôtel Dieu, Paris, France, <sup>4</sup> CHU Caen, Department of Clinical Research, CHU Caen Côte de Nacre, Caen, France, <sup>5</sup> CHU de Caen Normandie, Service d'Anesthésie-Réanimation Chirurgicale, Caen, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Yacine Boulaftali,  
Institut National de la Santé et de la  
Recherche Médicale  
(INSERM), France

### Reviewed by:

Christoph Eugen Hagemeyer,  
Monash University, Australia  
Subhi Marwari,  
University of Pennsylvania,  
United States

### \*Correspondence:

Suzanne Goursaud  
goursaud-s@chu-caen.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Atherosclerosis and Vascular  
Medicine,  
a section of the journal  
Frontiers in Cardiovascular Medicine

**Received:** 03 August 2021

**Accepted:** 21 October 2021

**Published:** 15 November 2021

### Citation:

Goursaud S, Martinez de  
Lizarrondo S, Grolleau F, Chagnot A,  
Agin V, Maubert E, Gauberti M,  
Vivien D, Ali C and Gakuba C (2021)  
Delayed Cerebral Ischemia After  
Subarachnoid Hemorrhage: Is There a  
Relevant Experimental Model? A  
Systematic Review of Preclinical  
Literature.  
Front. Cardiovasc. Med. 8:752769.  
doi: 10.3389/fcvm.2021.752769

Delayed cerebral ischemia (DCI) is one of the main prognosis factors for disability after aneurysmal subarachnoid hemorrhage (SAH). The lack of a consensual definition for DCI had limited investigation and care in human until 2010, when a multidisciplinary research expert group proposed to define DCI as the occurrence of cerebral infarction (identified on imaging or histology) associated with clinical deterioration. We performed a systematic review to assess whether preclinical models of SAH meet this definition, focusing on the combination of noninvasive imaging and neurological deficits. To this aim, we searched in PUBMED database and included all rodent SAH models that considered cerebral ischemia and/or neurological outcome and/or vasospasm. Seventy-eight publications were included. Eight different methods were performed to induce SAH, with blood injection in the *cisterna magna* being the most widely used ( $n = 39$ , 50%). Vasospasm was the most investigated SAH-related complication ( $n = 52$ , 67%) compared to cerebral ischemia ( $n = 30$ , 38%), which was never investigated with imaging. Neurological deficits were also explored ( $n = 19$ , 24%). This systematic review shows that no preclinical SAH model meets the 2010 clinical definition of DCI, highlighting the inconsistencies between preclinical and clinical standards. In order to enhance research and favor translation to humans, pertinent SAH animal models reproducing DCI are urgently needed.

**Keywords:** delayed cerebral ischemia, experimental models, subarachnoid hemorrhage, vasospasm, systematic review

## INTRODUCTION

Subarachnoid hemorrhage (SAH) is a neurological emergency characterized by the extravasation of blood into subarachnoid spaces. Around 80% of non-traumatic subarachnoid hemorrhage result from the rupture of an intracranial aneurysm, and have a high rate of death and complications. Aneurysmal SAH is therefore one of the most frequent causes of admission in neurocritical

care. Delayed cerebral ischemia (DCI) occurs in ~30% of cases after aneurysmal SAH (1) and is the leading cause of morbidity for surviving SAH patients. To date, no treatment of DCI improves neurological outcome. Unfortunately, the exact mechanisms of DCI pathophysiology remain poorly understood. The current consensus suggests that the origin of DCI is a multifactorial and complex process. It not only includes the narrowing of cerebral arteries (i.e., vasospasm) but also the activation of others pathways, including a neuroinflammatory reaction that promotes perfusion mismatch with neurovascular uncoupling, as well as other pathological phenomena such as microthrombosis, cortical spreading depolarization and breakdown of the blood-brain barrier (Figure 1) (2, 3). All these local and systemic inflammatory responses are involved in the genesis and development of DCI.

These different mechanisms start at ictus, during early brain injury, and result in neuronal injury and sometimes in parenchymal infarction. Large vessel vasospasm was commonly recognized as the main factor leading to DCI after SAH. In fact, recent studies support that large vessel narrowing is a delayed contributor to a cascade of events that starts earlier during the acute phase after SAH. This critical earlier phase with multifactorial pathophysiological pathways is probably the most promising therapeutic target to improve patient outcomes. To better understand SAH and its complications and to facilitate the development of an effective treatment, many animal models have been developed. The lack of a consensual definition of DCI led to a large diversity of terms used and parameters studied.

As a result, findings from preclinical research were controversial (4). But in 2010, an international expert panel involved in SAH research developed a definition of DCI in humans. The consortium decided that a uniform definition of DCI should capture both cerebral infarction (imaging) and clinical deterioration (functional) elements in terms of morphological and clinical characteristics. They stated that in clinical trials aiming to develop therapeutics against DCI after SAH, the two main outcome measures should be: (1) infarction identified on computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI) or proven at autopsy, after exclusion of procedure-related infarctions and (2) functional outcome (3).

The definition of DCI-related cerebral infarction was as follows: diagnosis of cerebral infarction performed by either a brain CT or MR scan within 6 weeks after SAH, or on the latest CT or MRI scan made before death within 6 weeks, or proven at autopsy, not present on the CT or MRI scan between 24 and 48 h after early aneurysm occlusion, and not attributable to other causes, such as surgical clipping or endovascular treatment.

Regarding the functional outcome, experts specified that the definition of clinical deterioration caused by DCI is the occurrence of focal neurological impairment (such as hemiparesis, aphasia, apraxia, hemianopia, or neglect), or a decrease of at least 2 points on the Glasgow Coma Scale, which is not apparent immediately after aneurysm occlusion, and cannot be attributed to other causes.

Based on clinical assessment in humans and considering the occurrence of DCI as the main determinant for the functional

## Pathophysiology of Delayed Cerebral Ischemia after SAH

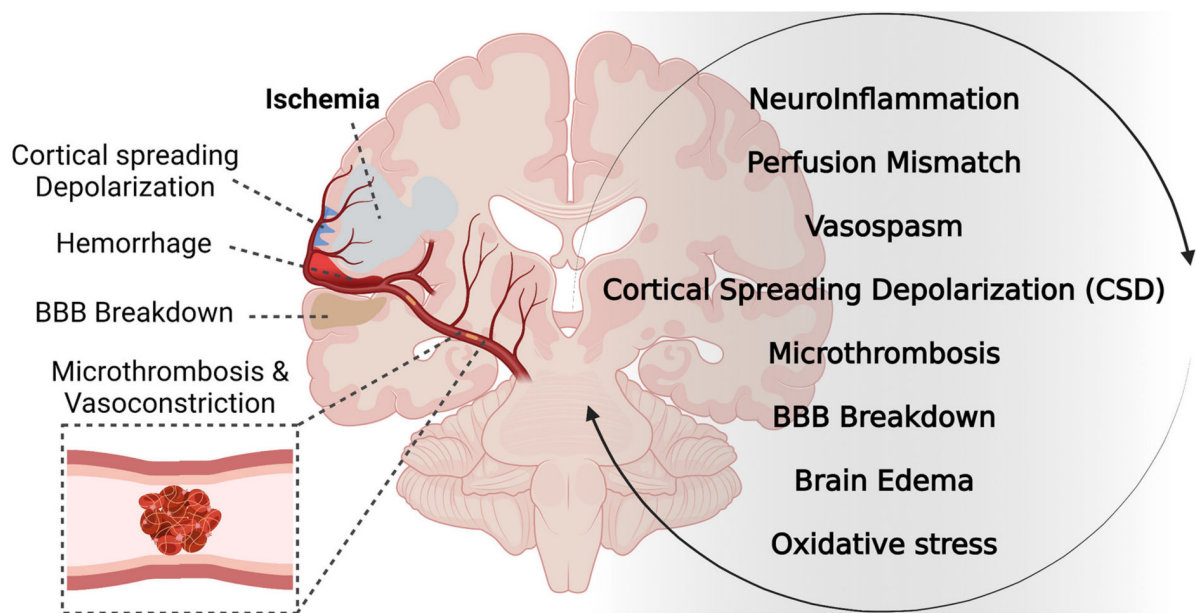


FIGURE 1 | Pathophysiology of DCI after SAH.

outcome, this consensus-building approach allowed to determine that the ideal SAH model should associate both the occurrence of cerebral infarction evidenced on brain imaging or histology and some altered functional outcome. In a translational perspective, noninvasive imaging is preferable to histology for several reasons. Brain imaging is the most common way to investigate cerebral ischemia in clinical trials, and ischemia proved on brain imaging is up to date the only paraclinical outcome that was improved with use of therapeutics that enhance SAH-patients functional outcome (5). Moreover, infarction is well defined by imaging in contrast to histology, which is difficult to define with a consensual diagnostic method.

This systematic review aimed at identifying and analyze the different murine models of SAH, and to describe the extent to which they meet the human definition of DCI, i.e., more specifically according to the associating of the two most relevant evaluation criteria that are the proof of brain ischemia with imaging and the occurrence of neurological deficits.

## MATERIALS AND METHODS

### Systematic Search

This systematic review was reported following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analysis (PRISMA) statement (6, 7). We searched the PUBMED database on July 1, 2020 with the search terms “subarachnoid hemorrhage,” “models, animal,” “mice,” “rats,” “vasospasm, intracranial,” and “delayed cerebral ischemia.” Abstracts from relevant congresses were also considered. Two authors independently screened the titles and abstracts and reviewed the full text of any potentially eligible publication. Divergences were resolved by consensus.

### Eligibility Criteria for Included Animal Studies

Studies were included if they involved (1) description and/or modification of a subarachnoid hemorrhage model in rats or mice (2) study of arterial cerebral vasospasm and/or ischemia and/or neurological outcome. Systematic reviews and meta-analyses as well as *in vitro* studies were excluded. Among the experimental studies developing a method and/or assessing therapeutic strategies, only those, which described a new SAH model, were included. The included studies were limited to articles written in English, Spanish, German, Russian, Italian, Portuguese, and French. There was no restriction for year of publication.

### Data Collection

For each study, we extracted the journal and authors names, the year of publication, number of citations for each article and the impact factor corresponding to that year. Two publications were classified as coming from the same team if they had one or more author in common considering only authors in first, second, last or penultimate position. Animal characteristics were extracted as follows: species, strain, sex, and weight; model of SAH as follows: method of induction, vascular territory, rupture of an aneurysmal vessel, location of blood

injection, using of a pharmaceutical adjuvant to induce ischemia, characteristics of blood used (nature, volume, and number of injections); anesthesia and monitoring as follows: general anesthesia, mechanical ventilation, temperature, blood glucose levels, cerebral blood flow, intracranial pressure, and blood pressure monitoring; study of vasospasm as follows: method (imaging, histology, times studies of vasospasm, study of cerebral blood flow); study of cerebral ischemia as follows: method (imaging, histology, times studies of ischemia, topography, and related searches like neuroinflammation, microthrombosis or microglial activation); mortality and behavioral study as follows: general condition, weight, sensory-motor, and cognitive tests.

### Statistical Analysis

We represented the median and extreme values (median [minimum—maximum]) of continuous variables, and the number of occurrences with proportions represented as percentages for categorical variables.

## RESULTS

### Included Rodent Studies

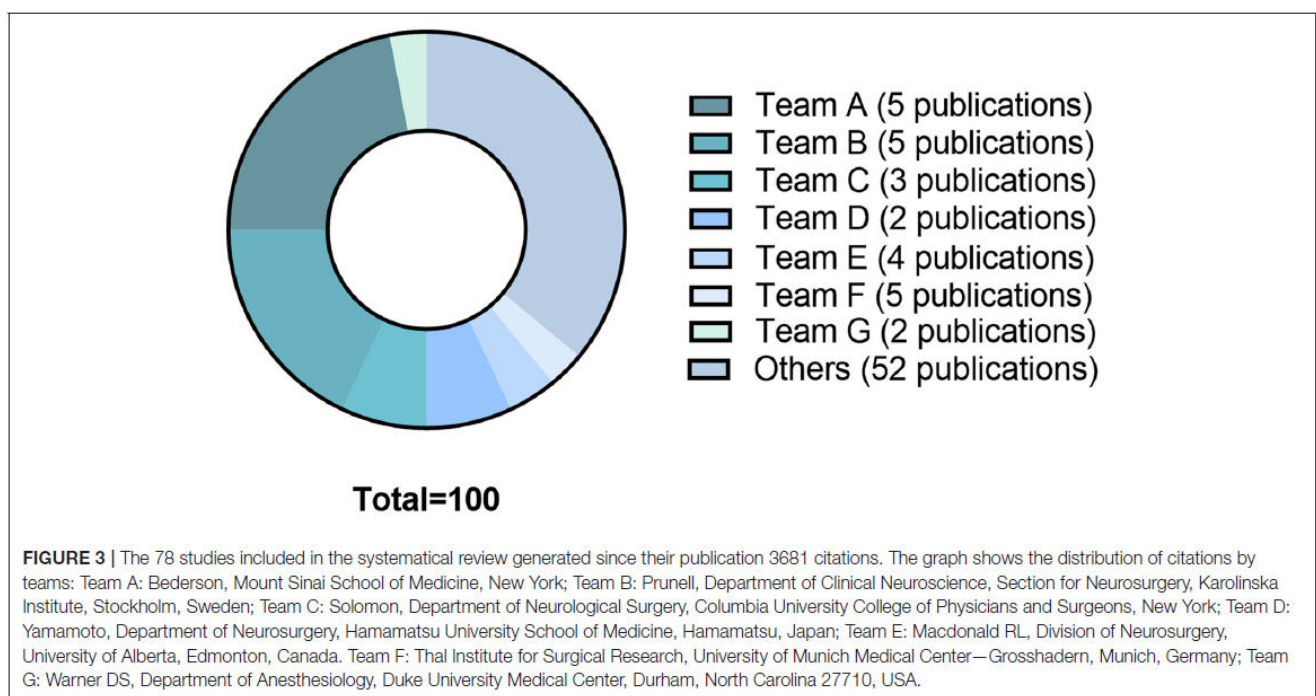
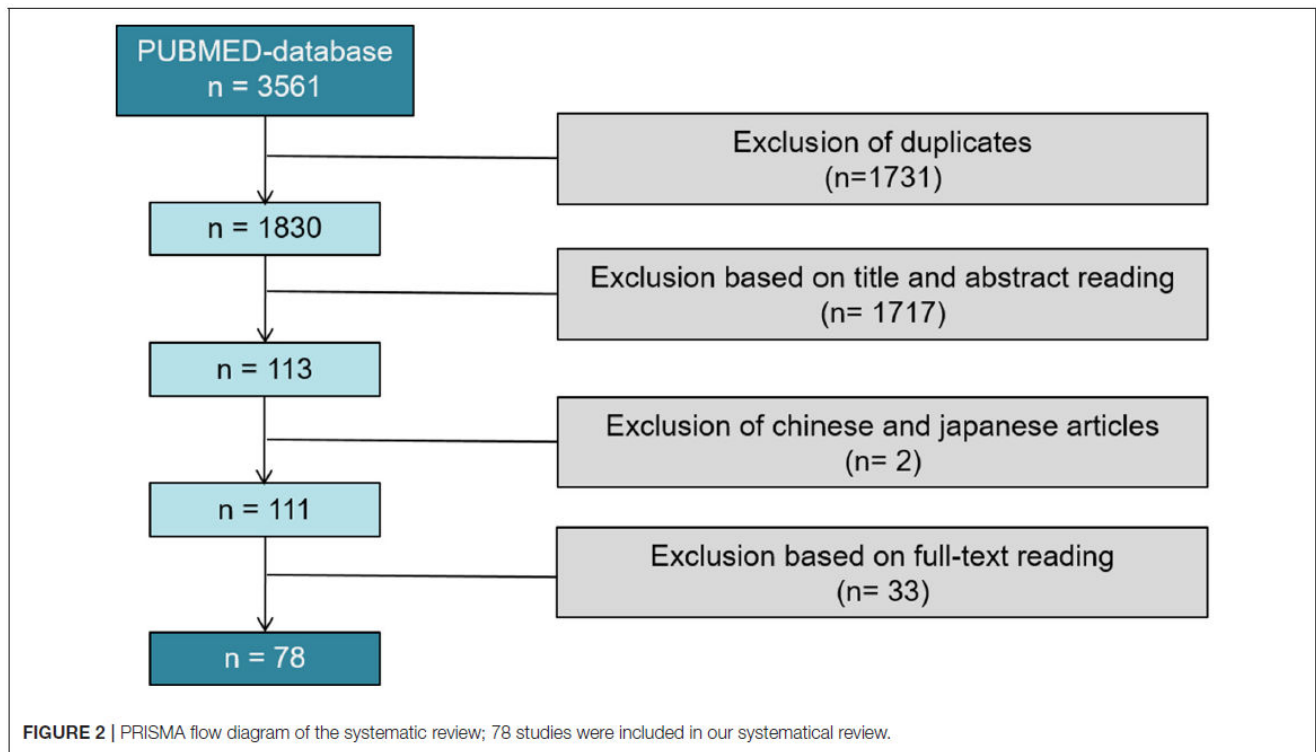
Of 3,561 articles, only 78 reports proved eligible (8–85) (Figure 2).

### Characteristics of the Rodent Studies

The 78 articles were published in 26 different journals. The median impact factor of the year of publication was 2.45 [0.82–6.12]. The year of publication ranged from 1979 to 2020. Fifty-nine studies (76%) were published between 2,000 and 2020, 27 of which were published following the 2010 article that defined DCI (3). Fifty-three different teams were identified. Half of publications ( $n = 39$ ; 50%) resulted from 14 teams. Five (6%) publications were extracted from team A (Bederson, Mount Sinai School of Medicine, New York), 5 (6%) publications were extracted from team B (Prunell, Department of Clinical Neuroscience, Section for neurosurgery, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden), and 3 (4%) publications were extracted from team C (Solomon, the Department of Neurological Surgery, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York). Almost two thirds (64%) of citations were issued from 26 studies published by 7 teams (Figure 3).

### Characteristics of SAH Models in Rats and Mice

The characteristics of SAH models are summarized in Table 1. The most commonly used species was rats (66 publications, Figure 4). The two main strains of rats were Sprague-Dawley ( $n = 49$ ; 74%) and Wistar ( $n = 17$ ; 26%). Two publications used a model with comorbidity that was diabetes (64) or hypertension (12). No model used female animals. With respect to the surgical procedure, 58% of the models ( $n = 45$ ) corresponded to SAH involving posterior cerebral circulation. The two most frequently used models were blood injection in the *cisterna magna* ( $n = 39$ ; 50%) and endovascular perforation ( $n = 23$ ; 29%) (Figure 5). Among vascular perforation models, four variants were described: endovascular perforation, endoscopic



technique, perforation of the basilar artery and perforation of subarachnoid veins. Among the direct injection models, blood was injected into the *cisterna magna*, the pre-chiasmatic cistern, the cerebral cortex or directly into the circle of Willis. Blood

was from autologous origin in 97% of publications ( $n = 76$ ). Blood could be arterial ( $n = 67$ ; 92%) or venous ( $n = 7$ ; 10%). The nature of the blood was not specified in 3 studies. The injected blood volume varied across studies: the median

**TABLE 1 |** Characteristics of SAH models.

Characteristics of subarachnoid hemorrhage models	Number (%)
<i>Species</i>	
Rats	66 (85)
Mice	13 (17)
<i>Method of induction of SAH</i>	
Vascular perforation	
Circle of Willis	23 (29)
Basilar artery	4 (5)
Subarachnoid vein	1 (1)
Direct injection	
<i>Cisterna magna</i>	39 (50)
Prechiasmatic cistern	12 (15)
Cerebral cortex	1 (1)
Circle of Willis	1 (1)
Induced hypertension and elastase	1 (1)
Models with factors promoting cerebral ischemia	4 (5)
<i>Number of direct blood injection in the subarachnoid space</i>	
0	28 (37)
1	36 (47)
2	15 (20)
<i>Vascular territory of SAH</i>	
Anterior	38 (49)
Posterior	45 (58)
<i>Blood</i>	
Arterial	67 (92)
Venous	7 (10)
No specified	4 (5)
<i>Management of anesthesia</i>	
General anesthesia	77 (99)
No specified	1 (1)
Mechanical ventilation	38 (49)
<i>Monitoring</i>	
Invasive blood pressure	45 (58)
Intracranial pressure	30 (38)
Global cerebral blood flow	23 (29)
Local cerebral blood flow	21 (27)
Temperature	58 (75)
Glucose level	9 (12)
<i>Study of cerebral ischemia</i>	30 (38)
Positive diagnostic of ischemia	24 (26)
Ischemia at distance of subarachnoid hemorrhage	21 (27)
Cerebral cortex	16 (21)
Hippocampus	16 (21)
Cerebellum	1 (1)
Basal ganglia	4 (5)
Diagnostic of cerebral ischemia	
Imaging	3 (4)
Histology	24 (31)
Fluorochrome B	5 (6)
Apoptosis	7 (9)
Quantitative assessment	8 (10)
Qualitative assessment	7 (9)

(Continued)

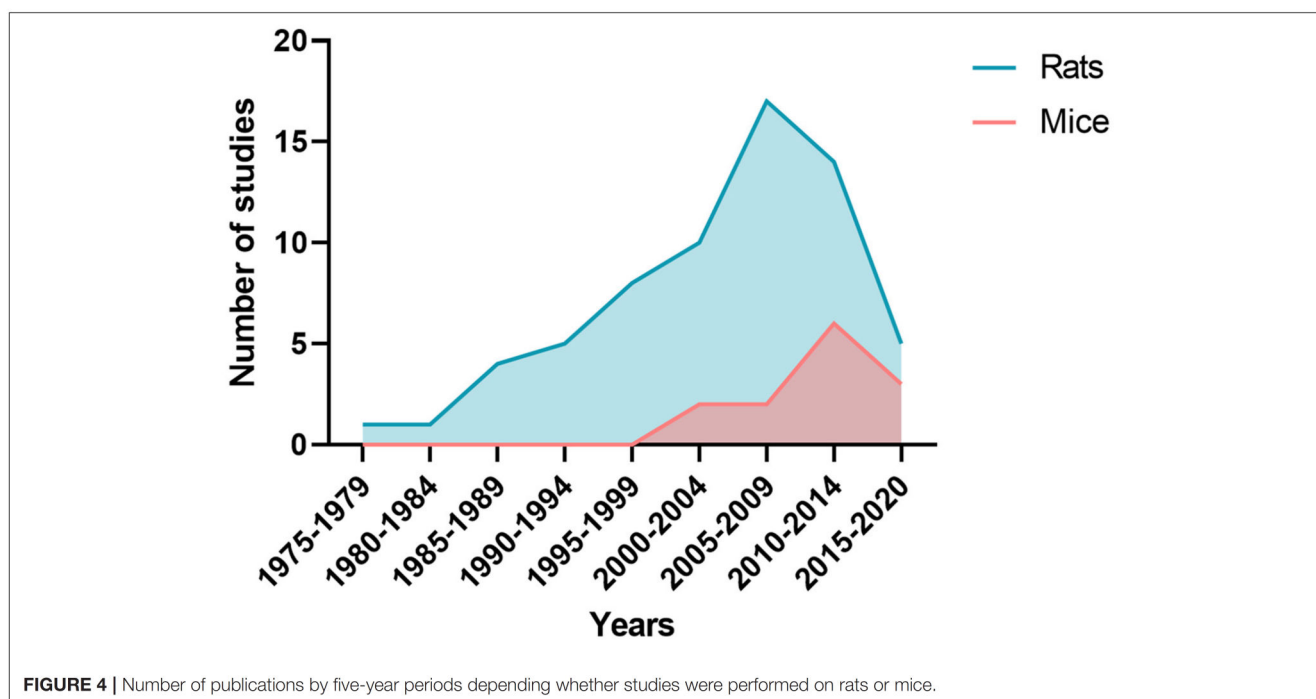
**TABLE 1 |** Continued

Characteristics of subarachnoid hemorrhage models	Number (%)
Parameters associated with ischemia	
Microthrombosis	6 (8)
Microglial activation	2 (3)
Inflammation (neutrophil polynuclear labeling)	1 (1)
<i>Study of vasospasm</i>	51 (67)
Imaging	25 (32)
Histology	34 (44)
Hematoxylin and eosin	20 (26)
Positive diagnostic of vasospasm	48 (62)
<i>Study of cerebral blood flow</i>	39 (50)
Doppler	25 (32)
Magnetic resonance imaging	11 (14)
Angiography	9 (10)
Others	7 (9)
<i>Physical and behavioral examination</i>	
Neurological assessment	19 (24)
Sensory-motor tests	18 (23)
Cognitive tests	7 (9)
General condition	32 (41)
Weight	12 (15)
Death	45 (58)

blood volume injected was 300  $\mu$ L [100–700  $\mu$ L] and 80  $\mu$ L [50–100  $\mu$ L] in rats and mice, respectively. Thirty-six studies (47%) described a model with a single injection. Two injections separated by a free period of 24 to 48 h were performed in 15 studies (20%). The aim of these double injection models was to increase the severity of the SAH, while maintaining an acceptable mortality rate. These double injection models were only performed in rats. One model used the induction of hypertension associated with elastase injection into the cerebrospinal fluid in order to promote the aneurysmal rupture (70). Some studies reported the use of adjuvants to promote the occurrence of ischemia. The first study published in 2011 described a direct injection model in insulin-resistant rats (64). Other studies combined induction of SAH by simple or double direct blood injections with the occlusion of the common carotid artery as an ischemia promoting factor (71). One of these models promoted occurrence of DCI, which was associated to the injection of blood, the occlusion of common carotid and the induction of spreading depolarization. Then, authors investigated the effect of an administration of a pro-inflammatory agent, before SAH induction (73).

In all studies, the procedure took place under general anesthesia. In 40 studies, the animals were kept in spontaneous ventilation during general anesthesia. An invasive blood pressure monitoring was used in 58% of the studies. Three studies performed an invasive monitoring of blood pressure in mice. Intracranial pressure was monitored during the procedure in 38% of the studies. One study performed an intracranial pressure monitoring in mice with the help of a sensor placed in the *cisterna magna* (42). Blood glucose monitoring was performed in 12% of studies ( $n = 9$ ) and temperature monitoring was carried out in 75% of the studies ( $n = 58$ ).





**FIGURE 4 |** Number of publications by five-year periods depending whether studies were performed on rats or mice.

## Study of Vasospasm

From the 39 studies evaluating cerebral hemodynamics, 37 observed a decreased cerebral blood flow following SAH. The study window of cerebral blood flow varied according to the publications (**Figure 6**). Twenty-five studies searched the occurrence of arterial vasoconstriction with MRI, Doppler, angiography, videomicroscopy, positron emission tomography (PET) or photomicrography. All of them observed vasospasm. Thirty-four studies assessed vasospasm with histology (**Table 1**). The main staining was Hematoxylin and Eosin (20 studies). Histological studies were performed at different times. The authors diagnosed vasospasm in 30 studies with histology. Vasospasm was studied in a total of 588 animals in 34 publications. The diagnosis was made in 513 animals (87%) but some authors did not specify the number of animals studied.

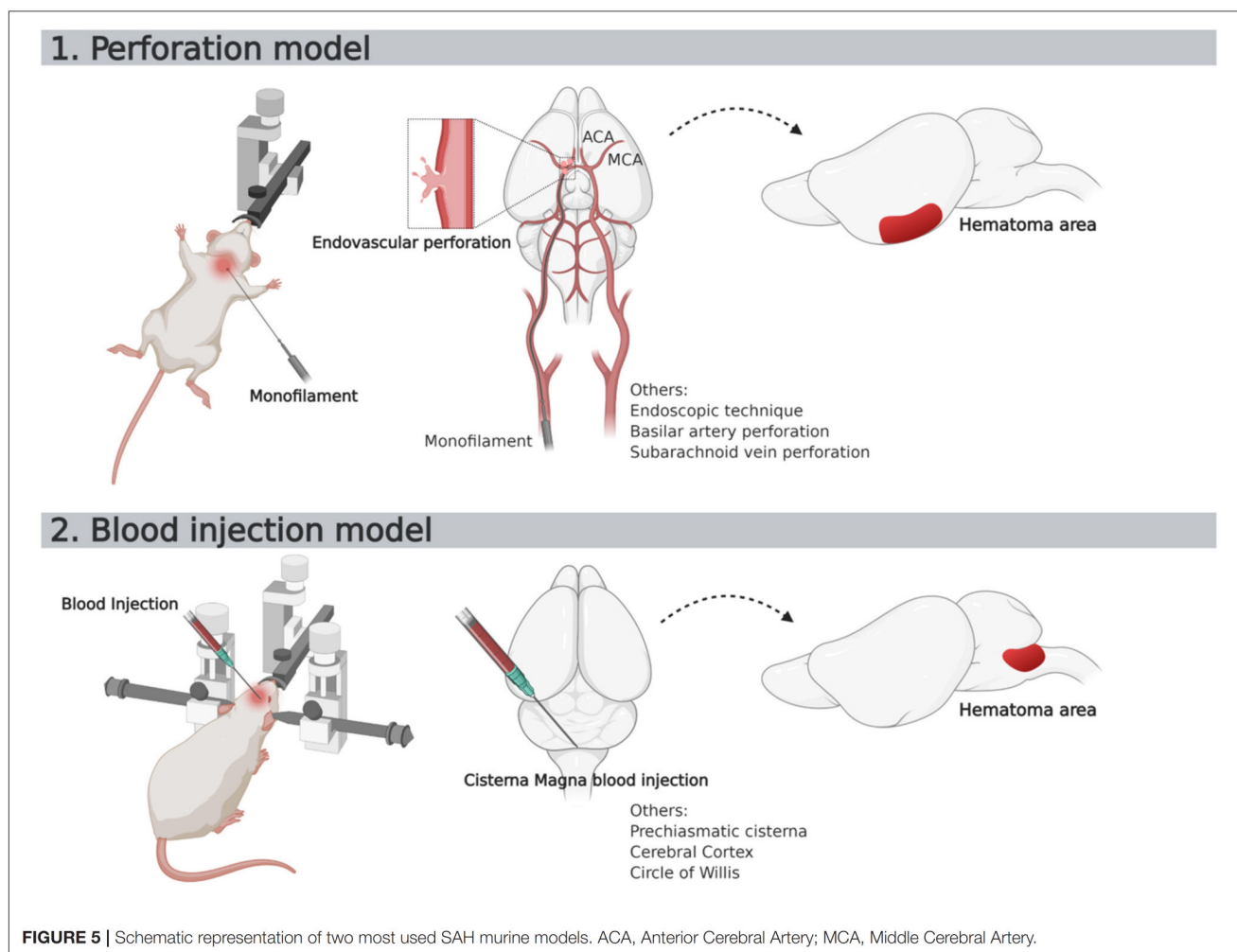
## Study of Ischemia

Overall, 532 animals were screened for cerebral ischemia in 30 publications. A positive diagnosis was made in 196 animals (37%) but some of these publications ( $n = 9$ ) did not specify the exact number of animals for which the positive diagnosis of ischemia was made. Out of 29 publications searching for ischemia with histological study, 24 reported evidence of ischemia. All these authors described occurrence of ischemia remotely from the origin of SAH. The existence of ischemia was mainly studied in two brain regions: the cortex and the hippocampus. The other brain regions explored were the cerebellum and basal ganglia. Different methods for studying ischemia were used in histology. Neuronal quantification was the main method (in 8 studies). The detection of apoptosis appeared to be the second way to explore ischemia (7 publications). Apoptosis was assessed by

TUNEL staining or caspase activity assays. A specific labeling of neuronal death was also used by fluorojade B in 5 studies. Qualitative assessment of neurons was performed in 7 studies. Histological studies of ischemia were achieved at early and/or late times, as summarized on **Figure 6**. Some publications focused on the pathophysiological mechanisms underlying ischemia. Indeed, several studies have attempted to highlight phenomena of microthrombosis and neuroinflammation. Microthrombosis was evaluated by the presence of fibrin [anti-fibrin(ogen)] and platelet (anti-platelet GpIIb/IIIa) aggregates by immunofluorescence studies. Neuroinflammation was evidenced at the local level by histological studies (neutrophils labeling), but also at the systemic level using markers, such as TNF and IL-1 $\beta$ . Two publications studied microglial activation *via* specific immuno-staining of microglia such as Iba-1 (73, 78). Only 4 studies investigated ischemia with MRI.

## Behavioral Evaluation and Body Weight Monitoring

Behavioral assessment was performed in 32 studies. The general status of animals was described using the spontaneous locomotor activity, circling behavior, whisker movements, and coat state. Eighteen studies used sensorimotor tests for the quantitative behavioral assessment. These studies were performed with delays ranging from <24-h to 4 weeks after SAH induction. Three studies used the rotarod test. Tests assessing the cognitive abilities of animals were conducted in 7 studies. Among these studies, 4 used the Morris water maze to assess working memory. Body weight monitoring was carried out in 12 studies.



## Mortality Rate

The mortality rate was reported in 58% of the studies ( $n = 45$ ). However, the mortality study period and the death rate varied between studies. The direct-injection model into the *cisterna magna* was responsible for a mortality rate between 0 and 52%. The prechiasmatic cistern injection pattern induced a mortality rate ranging from 0 to 100%. The endovascular perforation model was responsible for a mortality rate between 6 to 65%.

## Included Non-primates Studies

Finally, we also reviewed non-human primate models keeping the same eligibility criteria. Of 175 articles, citations from 22 reports were proved eligible (86–107). Then, we compared their principal characteristic to the rodent models, as shown on **Table 2**.

## DISCUSSION

In this systematic review, we evaluated 78 publications and found that 8 different methods were used to induce hemorrhage in the subarachnoid spaces. These methods can be classified into

three groups. In the first group, SAH is due to perforation of an arterial or venular vessel. In the second, a blood injection is performed in cerebrospinal fluid or directly in the brain parenchyma. In the third, SAH is induced by the combination of hypertension (angiotensin infusion) and elastase injection. The diversity of protocols notwithstanding, we found that no model was consistent with the clinical definition of DCI in humans; meaning that no model confirmed the evidence of cerebral infarction with imaging plus neurological deficits.

Many publications came from a small number of teams. In fact, over half of publications came from only 14 teams. Different modalities were used for SAH induction with various origin of the blood, vascular territory involved, severity of SAH, method for the monitoring, and management of anesthesia. The inconsistency of SAH models may threaten the reproducibility of preclinical research. For instance, in models involving injection of blood in rodent brains, stereotactic coordinates guide the injection, but the diagnostic of SAH through imaging or necropsy was rarely performed. Similarly, endovascular perforation models did not control the quantity of blood released in cerebrospinal fluid and thus variability occurs at this level.

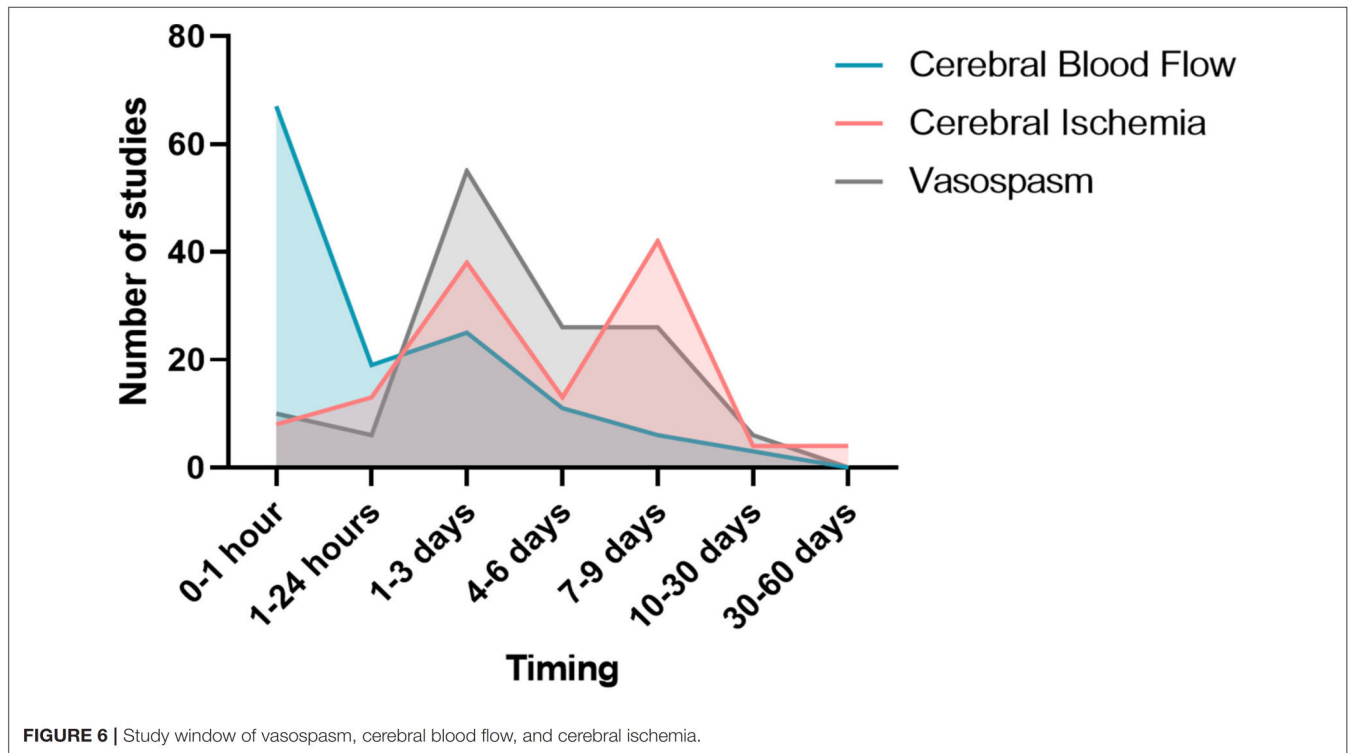


FIGURE 6 | Study window of vasospasm, cerebral blood flow, and cerebral ischemia.

TABLE 2 | Comparison between primates and rodents SAH models focusing on main characteristics.

Characteristics of experimental SAH models	Number of publications (%)	
	Primates (n = 22)	Rodents (n = 78)
<i>Species</i>		
<i>SAH induction method</i>		
Direct blood injection	22 (100)	53 (68)
Vascular perforation	0 (0)	28 (36)
<i>Study of cerebral ischemia</i>		
Imaging	3 (14)	30 (38)
Histology	0 (0)	3 (4)
<i>Study of cerebral vasospasm</i>		
Angiography	3 (14)	24 (31)
Histology	21 (95)	51 (67)
<i>Study of cerebral blood flow</i>		
Angiography	20	9 (10)
Histology	5 (23)	34 (44)
<i>Neurological examination</i>		
Positive diagnosis of vasospasm	22 (100)	48 (62)
Delayed neurological deficits	6 (27)	39 (50)
Neurological examination	15 (68)	19 (24)
Delayed neurological deficits	3 (14)	ND

ND, not documented.

Besides, different methods may result in different hemodynamic and homeostasis conditions thereby affecting cerebral perfusion differently. Another concern is the possible irrelevance of described models to humans. More than half (58%) of the here-described SAH models involve the posterior cerebral circulation. In contrast, in humans, SAH occurs in most cases (90%) in the anterior cerebral circulation. We found that arterial vasospasm was the most frequently assessed outcome (67%; n = 51). On

the other hand, cerebral ischemia, and neurological status, which lie at the root of DCI definition, were the outcomes assessed in only 38 and 24% of publications respectively (Table 1). Although it is difficult to estimate accurately the rate of vasospasm in these preclinical studies given the lack of precise data on the incidence rate, vasospasm is probably overestimated. Indeed, vasospasm was evidenced in 87% of animals as compared to a two third proportion of vasospasm observed in humans, only half of whom are symptomatic (108). With respect to ischemia outcomes, only 4 publications assessed ischemia through imaging (43). For the first of them, the result is questionable given that the surgical procedure contributes to early ischemia. This result was not consistent with the experts' definition of DCI in humans since ischemia was assessed 1 h after SAH induction while the definition excludes early lesions (occurring in the first 48 h) and procedure-related infarctions. In most publications, ischemia was assessed through histology as illustrated on the 10 most cited studies included in our systematic review (Supplementary Table). Different histological techniques were used for ischemia assessment such as neuronal counting or detection of apoptosis. These modalities could be challenged because, as in vasospasm, the incidence of ischemia may be overestimated in comparison with epidemiological human data. In humans, however, DCI is routinely diagnosed through MRI or computed tomography scan. We trust it would be valuable to use imaging more often in preclinical settings since ischemia is well defined by imaging. We found that behavioral studies of animals were rarely performed, and no standardized protocol was used to diagnose neurological deficits after brain injury.

Regarding the literature on the same topic, a previous systematic review focused on *in vivo* models of vasospasm (4). Authors concluded that despite a great number of experimental SAH methods, no consistent models could be identified and recommended. In this review, 66 inductions method of SAH were identified. But there results were not only restricted to rodents. In contrast, in our systematic review we purposely restricted our search to only rodents given that this species are far the most used in biomedical research. Rodents have a well-characterized genome, with a high quantity, and quality of resources available for preclinical studies. Another review by Kamp et al. (109) focused on the mortality in mouse models analyzing DCI after SAH. They found that the mortality rate following aneurysmal SAH and DCI was significantly lower in mice than in humans. As in our review, the timing to assess mortality was not standardized in mouse models, potentially influencing the mortality rate. The authors concluded that further analyses would be required to establish a link between mortality and DCI models. This conclusion challenge DCI models themselves as well as their outcomes. In a last systematic review, Oka et al. screened SAH animal models and focused on DCI and neurological deficit. The authors equally found that preclinical models do not consistently lead to DCI (110). These conclusions further challenge DCI models as well as their outcomes.

In we look in the literature, several pharmacological treatments have been tested in the last few years to prevent or treat DCI. Unfortunately, most were either negative or led to only mild improvement in clinical outcome.

The only treatment which has shown an improvement in the functional outcome and which is currently recommended with a Level of Evidence grade A, by the American Heart Association/American Stroke Association for prophylactic treatment after SAH is Nimodipine (111). Nimodipine is a calcium channel blocker, which has largely been tested. A meta-analysis conducted in 2011 found a reduction of death or severe disability in patients treated with a prophylactic administration as compared to controls (112). Interestingly, cerebral infarctions were reduced in the treated group, but vasospasm was not significantly impacted.

Dorhout Mees et al. made a review about antiplatelet agents that have failed to show any beneficial effect on outcome (measure by death or handicap) and DCI (113). An antagonist of Endothelin-1, Clazosentan has shown some improvement in both vasospasm and DCI, demonstrated in the large meta-analysis over 1900 patients (114). However, the phase III clinical trial CONSCIOUS 2 reported that Clazosentan has no significant effect on mortality and vasospasm-related morbidity or functional outcome (115). Besides these two targets, several anti-oxidants agents have been tested at large scale, with no positive result on the outcome (116). Statins have also been studied in large phase III randomized and controlled trials, as a therapeutic strategy blocking different pathophysiological targets at the same time, but they failed to show any beneficial effect on outcome (117).

These results of clinical trials are interesting both to understand the pathophysiology of DCI and to design better

experimental models. For instance, since it showed benefit on DCI in clinical trials, nimodipine could be used to demonstrate the clinical relevance of experimental models of SAH. In a clinically relevant model, nimodipine should have beneficial effects, whereas the other treatments presented above should not.

We hope these results will influence future SAH preclinical research. Our findings emphasize the need to standardize the method for DCI diagnosis through short and long-term behavioral motor, emotional and cognitive evaluations, histology, and/or imaging. Most of preclinical studies assessed solely intracranial vasospasm while it may not be a relevant outcome. Indeed, it has been shown in therapeutic clinical trials that pharmacological treatments can reduce the angiographic vasospasm without any effect on functional outcome or mortality (118). We believe that a comprehensive neurobehavioral assessment, mortality and imaging proof of ischemia should be the preferred outcomes in animal studies. This approach is consistent with recommendations for animal studies of ischemic stroke (119) or intracerebral hemorrhage (120). The methodological heterogeneity we observed in experimental SAH studies could also be found in pathologies such as stroke (121), intracerebral hemorrhage (120) or brain tumor (122). We trust that the assessment of ischemia through the association of neurological evaluation and imaging in experimental studies will enhance the quality of translational research.

Our review has some limitations. First, we excluded publications evaluating therapeutic agents. This may exclude a number of articles with SAH models, but we considered that the aim of these studies was not to describe new SAH models but to assess drugs' efficacy. Therefore, these studies were not considered. Moreover, most of these studies used SAH models previously described. Second, we selected only *in vivo* studies. This point can be questionable because one could consider *in vitro* studies more relevant to understand pathophysiological mechanisms and to test therapeutics. But such *in vitro* models cannot recapitulate all features of the DCI definition, in particular neurological outcome, so that preclinical animal models remain the only option.

Finally, in our meta-analysis we decided to focus on rodents and not include other animals. Our choice was justified a priori considering the prevalence of these species in biomedical research. These species offer several possibilities with genetically modified strains to focus on a therapeutic approach. Nevertheless, aware of this limit of our review, we also reviewed non-human primate models (but this was not a pre-planned analysis) (Table 2).

This review demonstrates first the high proportion of non-human primate models with blood injection either directly with perivascular clot placement or by injection into a cerebrospinal fluid cisterna (prechiasmatic or *cisterna magna*). These models have the disadvantage to shifting away from pathophysiological mechanisms involving aneurysm rupture and acute autologous arterial blood extravasation. However, non-human primate models have an unquestionable benefit for neurological examination to detect delayed neurological deficit. This is a crucial advantage over rodent models to

make longitudinal examinations in the same animal and to relate more closely to the human disease, since the occurrence of neurological deficit is a diagnostic criterion of DCI.

Furthermore, as noted with rodent models, the study of vasospasm is largely overrepresented in non-human primate models (21 studies) compared to the study of DCI (3 studies) (Table 2). Thus, despite the possibility of more efficient clinical longitudinal follow-up in non-human primates, most of the studies did not take full advantage of the possibilities offered by these experimental models. Additionally, it is difficult to consider non-human primate models for exploratory research because of reproducibility, ethical issues, and cost. Non-human primates models could be envisaged for preclinical SAH research especially to monitor neurological status, in order to test therapeutic efficacy before clinical trial.

At the end of this review, we were able to highlight that no SAH model consistently lead to DCI rodents. In order to improve translational research, efforts should focus on developing clinical relevant models rather than continuing experimental studies with irrelevant models.

Moreover, we insist on future studies with an urgent need to develop SAH models focusing on the clinically relevant outcomes. Future studies should choose the appropriate experimental design study, in accordance with the existing data in DCI, while reflecting on the choice of species, SAH induction method and experimental study to answer the question from therapeutics and/or pathophysiological mechanistic.

Furthermore, researchers should respect principles of good laboratory practice with rigor and reproducibility as it is currently recommended (123), in order to standardize preclinical studies and results.

## REFERENCES

- Kassel NF, Torner JC, Haley EC, Jane JA, Adams HP, Kongable GL. The international cooperative study on the timing of aneurysm surgery. part 1: Overall management results. *J Neurosurg.* (1990) 73:18–36. doi: 10.3171/jns.1990.73.1.0037
- Foreman B. The pathophysiology of delayed cerebral ischemia. *J Clin Neurophysiol.* (2016) 33:174–182. doi: 10.1097/WNP.0000000000000273
- Dodd WS, Laurent D, Dumont AS, Hasan DM, Jabbour PM, Starke RM, et al. Pathophysiology of delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: a review. *J Am Heart Assoc.* (2021) 10:2145. doi: 10.1161/JAHA.121.021845
- Marbacher S, Fandino J, Kitchen ND. Standard intracranial in vivo animal models of delayed cerebral vasospasm. *Br J Neurosurg.* (2010) 24:415–34. doi: 10.3109/02688691003746274
- Pickard JD, Murray GD, Illingworth R, Shaw MDM, Teasdale GM, Foy PM, et al. Effect of oral nimodipine on cerebral infarction and outcome after subarachnoid haemorrhage: British aneurysm nimodipine trial. *Bmj.* (1989) 298:636–42. doi: 10.1136/bmj.298.674.636
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses. *Ann Intern Med.* (2014) 151:264–9. doi: 10.7326/0003-4819-151-4-200908180-00135
- Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Ioannidis JP, Clarke M, et al. Annals of internal medicine academia and clinic the PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions. *Ann Intern Med.* (2009) 151:W65–94. doi: 10.1371/journal.pmed.1000100
- Barry KJ, Gogjian MA, Stein BM. Small animal model for investigation of subarachnoid hemorrhage and cerebral. *Vasospasm.* (1979) 5:538–542. doi: 10.1161/01.STR.10.5.538
- Lacy PS, Earle M. A small animal model for electrocardiographic abnormalities observed after an experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 14:371–7. doi: 10.1161/01.STR.14.3.371
- Solomon R, Antunes JL, Chen RY, Bland L, Chien S. Decrease in cerebral blood flow in rats after experimental subarachnoid hemorrhage: a new animal model. *Stroke.* (1985) 16:58–64. doi: 10.1161/01.STR.16.1.58
- Delgado TJ, Brismar J, Svendgaard NA. Subarachnoid haemorrhage in the rat: angiography and fluorescence microscopy of the major cerebral arteries. *Stroke.* 16:595–602. doi: 10.1161/01.STR.16.4.595
- Dóczi T, Joó F, Sonkodi S, Adám G. Increased vulnerability of the blood-brain barrier to experimental subarachnoid hemorrhage in spontaneously hypertensive rats. *Stroke.* (1986) 17:498–501. doi: 10.1161/01.STR.17.3.498

## CONCLUSION

We described 8 published preclinical SAH models for rats and mice. Some of them allow for the assessment of vasospasm and/or ischemia; however, none allows the assessment of DCI as the scientific community in humans defined it with association between neurological evaluation and brain imaging. We believe developing a consensual preclinical model matching the human description of DCI will help enhance translational research.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

## FUNDING

This work was supported by the French National Research Agency program PREDICT. SG was funded of Fondation pour la Recherche Medicale (FRM). Figures 1, 5 was created with BioRender.com.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2021.752769/full#supplementary-material>

13. Swift DM, Solomon R. Subarachnoid hemorrhage fails to produce vasculopathy or chronic blood flow changes in rats. *Stroke*. (1988) 19:878–82. doi: 10.1161/01.STR.19.7.878
14. Rickels E. Corrugation of cerebral vessels following subarachnoid hemorrhage : comparison of two experimental models of chronic. *Cerebr Vasospasm*. (1990) 186:178–186. doi: 10.1016/0014-4886(90)90156-M
15. Kader A, Krauss WE, Onesti ST, Elliott JP, Solomon RA. Chronic cerebral blood flow changes following experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke*. (1990) 21(4):577–81.
16. Jackowski, Crockard, Burnstock G, Russell RR, Kristek F. The time course of intracranial pathophysiological changes following experimental subarachnoid haemorrhage in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. (1990) 10:835–849. doi: 10.1038/jcbfm.1990.140
17. Ram Z, Sahar A, Hadani M. Ntdurochlrurgica vasospasm due to massive subarachnoid haemorrhage-a. *Rat Model*. (1991) 7:181–184. doi: 10.1007/BF01400688
18. Verlooy J, Van Reempts J, Haseldonckx M, Borgers M, Selosse P. The course of vasospasm following subarachnoid haemorrhage in rats. a vertebrbasilar angiographic study. *Acta Neurochir*. (1992) 117:48–52. doi: 10.1007/BF01400635
19. Bederson JB, Germano IM, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the Rat. *Stroke*. (1995) 26:1086–92. doi: 10.1161/01.STR.26.6.1086
20. Piepgras A, Thomé C, Schmiedek P. Characterization of an anterior circulation rat subarachnoid hemorrhage model. *Stroke*. (1995) 26:2347–52. doi: 10.1161/01.STR.26.12.2347
21. Veelken JA, Laing RJ, Jakubowski J. The Sheffield model of subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke*. (1995) 26:1279–1283. doi: 10.1161/01.STR.26.7.1279
22. Yamamoto S, Nishizawa S, Tsukada H, Kakiuchi T, Yokoyama T, Ryu H, et al. Cerebral blood flow autoregulation following subarachnoid hemorrhage in rats: Chronic vasospasm shifts the upper and lower limits of the autoregulatory range toward higher blood pressures. *Brain Res*. (1998) 782:194–201. doi: 10.1016/S0006-8993(97)01278-X
23. Bederson JB, Levy AL, Ding WH, Kahn R, DiPerna C, Jenkins AL, Vallabhajosyula P. Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. (1998) 42:352–62. doi: 10.1097/00006123-199802000-00091
24. Busch E, Beaulieu C, de Crespigny A, Moseley ME. Diffusion MR imaging during acute subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke*. (1998) 29:2155–61. doi: 10.1161/01.STR.29.10.2155
25. Yamamoto S, Teng W, Kakiuchi T, Tsukada H. Disturbance of cerebral blood flow autoregulation in hypertension is attributable to ischaemia following subarachnoid haemorrhage in rats: a PET study. *Acta Neurochir*. (1999) 141:1213–9. doi: 10.1007/s007010050421
26. Zhao W, Ujiie H, Tamano Y, Akimoto K, Hori T, Takakura K. Sudden death in a rat subarachnoid hemorrhage model. *Neurol Med Chir*. (1999) 39:735–741. doi: 10.2176/nmc.39.735
27. Schwartz AY, Masago A, Sehba F, Bederson JB. Experimental models of subarachnoid hemorrhage in the rat: a refinement of the endovascular filament model. *J Neurosci Methods*. (2000) 96:161–7. doi: 10.1016/S0165-0270(00)0156-4
28. Alkan T, Tureyen K, Ulutas M, Kahveci N, Goren B, Korfali E, et al. Acute and delayed vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage: local cerebral blood flow, histopathology, and morphology in the rat basilar artery. *Arch Physiol Biochem*. (2001) 109:145–53. doi: 10.1076/apab.109.2.145.4267
29. Alkan T, Kahveci N, Goren B, Korfali E, Ozluk K. Effects of interrupted and uninterrupted occlusion of the basilar artery on cerebral blood flow, and on neurological and histological outcome in rats with subarachnoid hemorrhage. *Arch Physiol Biochem*. (2001) 109:154–60. doi: 10.1076/apab.109.2.154.4275
30. Ergün R, Fernandez J, Misra M, Dujovny M. Endoscopic technique: a new model of subarachnoid hemorrhage in rats. *Neurol Res*. (2001) 2:627–30. doi: 10.1179/016164101101198910
31. Prunell GF, Mathiesen T, Svendgaard N. A new experimental model in rats for study of the pathophysiology of subarachnoid hemorrhage. *Neuroreport*. (2002) 13:2553–6. doi: 10.1097/00001756-200212200-00034
32. Longo M, Blandino a., Ascenti G, Ricciardi GK, Granata F, Vinci S. Cerebral angiography in the rat with mammographic equipment: a simple, cost-effective method for assessing vasospasm in experimental subarachnoid haemorrhage. *Neuroradiology*. (2002) 44:689–94. doi: 10.1007/s00234-002-0781-3
33. Gules I, Satoh M, Clower BENR, Nanda A, Zhang JH. Comparison of three rat models of cerebral vasospasm. *Physiology*. (2002) 3932:2551–9. doi: 10.1152/ajpheart.00616.2002
34. Glenn TC, Patel AB, Martin NA, Samii A, Jesus CDE, Hovda DA. Al GET. subarachnoid hemorrhage induces dynamic changes in regional cerebral metabolism in rats. *Physiology*. (2002) 19:2406. doi: 10.1089/08977150252932406
35. Parra A, Mcgirt MJ, Sheng H, Laskowitz DT, Pearlstein RD, Warner DS. Mouse model of subarachnoid hemorrhage associated cerebral vasospasm. *Methodol Anal*. (2002) 24:510–6. doi: 10.1179/016164102101200276
36. Lin C, Calisaneler T, Ukita N, Dumont AS, Kassell NF, Lee S. A murine model of subarachnoid hemorrhage-induced. *Cerebral v Asospasm*. (2003) 123:89–97. doi: 10.1016/S0165-0270(02)0344-8
37. Prunell GF. Experimental subarachnoid hemorrhage: subarachnoid blood volume, mortality rate, neuronal death, cerebral blood flow, and perfusion pressure in three different rat models. *Neurosurgery*. (2003) 52:165–76. doi: 10.1227/00006123-200301000-00022
38. Ono S, Date I, Onoda K, Ohmoto T. Time course of the diameter of the major cerebral arteries after subarachnoid. *Neurologic Res*. (2003) 25:535. doi: 10.1179/016164103101201535
39. Prunell GF, Mathiesen T, Svendgaard NA. Experimental subarachnoid hemorrhage: cerebral blood flow and brain metabolism during the acute phase in three different models in the rat. *Neurosurgery*. (2004) 54:426–36. doi: 10.1227/01.NEU.0000103670.09687.7A
40. Sehba F a, Mostafa G, Friedrich V, Bederson JB. Acute microvascular platelet aggregation after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. (2005) 102:1094–100. doi: 10.3171/jns.2005.102.6.1094
41. Prunell GF, Svendgaard N-A, Alkass K, Mathiesen T. Delayed cell death related to acute cerebral blood flow changes following subarachnoid hemorrhage in the rat brain. *J Neurosurg*. (2005) 102:1046–54. doi: 10.3171/jns.2005.102.6.1046
42. Tureyen K, Nazlioglu HÖ, Alkan T, Kahveci N, Korfali E. Single or multiple small subarachnoid hemorrhages by puncturing a small branch of the rat basilar artery causes chronic cerebral vasospasm. *Neurosurgery*. (2005) 56:382–9. doi: 10.1227/01.NEU.0000148004.61621.D2
43. Van Den Bergh WM, Schepers J, Veldhuis WB, Nicolay K, Tulleken CF, Rinkel GJE. Magnetic resonance imaging in experimental subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir*. (2005) 147:977–83. doi: 10.1007/s00701-005-0539-x
44. Weidauer S, Dettmann E. Assessment of vasospasm in experimental subarachnoid hemorrhage in rats by selective biplane digital subtraction angiography. *Neuroradiology*. (2006) 176–181. doi: 10.1007/s00234-005-0021-8
45. Vatter H, Weidauer S, Konczalla J, Dettmann E, Zimmermann M, Raabe A, et al. Time course in the development of cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage: clinical and neuroradiological assessment of the rat double hemorrhage model. *Neurosurgery*. (2006) 58:1190–6. doi: 10.1227/01.NEU.0000199346.74649.66

46. Turowski B, Hänggi D, Beck A, Aurich V. New angiographic measurement tool for analysis of small cerebral vessels : application to a subarachnoid haemorrhage model in the rat. *Neuroradiology*. (2007) 129–137. doi: 10.1007/s00234-006-0168-y
47. Britz GW, Meno JR, Park IS, Abel TJ, Chowdhary A, Nguyen TSK, et al. Time-dependent alterations in functional and pharmacological arteriolar reactivity after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. (2007) 38:1329–35. doi: 10.1161/01.STR.0000259853.43084.03
48. Sugawara T, Ayer R, Jadhav V, Zhang JH. A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model. *J Neurosci Methods*. (2008) 167:327–34. doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.08.004
49. Lee JY, Huang DL, Keep R, Sagher O. Characterization of an improved double hemorrhage rat model for the study of delayed cerebral vasospasm. *J Neurosci Methods*. (2008) 168:358–66. doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.10.029
50. Takata K, Sheng H, Borel CO, Laskowitz DT, Warner DS, Lombard FW. Long-term cognitive dysfunction following experimental subarachnoid hemorrhage. *New Perspect*. (2008) 213:336–44. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.06.009
51. Thal SC, Meßmer K, Schmid-elsaesser R, Zausinger S. Neurological impairment in rats after subarachnoid hemorrhage—a comparison of functional tests. *J Neurol Sci*. (2008) 268:150–9. doi: 10.1016/j.jns.2007.12.002
52. Park I, Meno JR, Witt CE, Suttle TK, Chowdhary A, Nguyen T, et al. Subarachnoid hemorrhage model in the rat : modification of the endovascular filament model. *J Neuro Sci Method*. (2008) 172:195–200. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.04.027
53. Altay T, Smithason S, Volokh N, Rasmussen PA, Ransohoff RM, Provencio JJ, et al. novel method for subarachnoid hemorrhage to induce vasospasm in mice. *J Neurosci Methods*. (2009) 183:136–40. doi: 10.1016/j.jneumeth.2009.06.027
54. Sabri M, Jeon H, Ai J, Tariq A, Shang X, Chen G, et al. Anterior circulation mouse model of subarachnoid hemorrhage. *Brain Res*. (2009) 1295:179–85. doi: 10.1016/j.brainres.2009.08.021
55. Sun BL, Zheng CB, Yang MF, Yuan H, Zhang SM, Wang LX. Dynamic alterations of cerebral pial microcirculation during experimental subarachnoid hemorrhage. *Cell Mol Neurobiol*. (2009) 29:235–41. doi: 10.1007/s10571-008-9316-8
56. Cansever T, Canbolat A, Talat K, Sencer A, Civelek E, Karasu A. Effects of arterial and venous wall homogenates, arterial and venous blood, and different combinations to the cerebral vasospasm in an experimental model. *Surgic Neurol*. (2009) 71:573–9. doi: 10.1016/j.surneu.2008.02.048
57. Silasi G, Colbourne F. Long-term assessment of motor and cognitive behaviours in the intraluminal perforation model of subarachnoid hemorrhage in rats. *Surgic Neurol*. (2009) 198:380–7. doi: 10.1016/j.bbr.2008.11.019
58. Westermaier T, Jauss A, Kunze E, Roosen K. Time-course of cerebral perfusion and tissue oxygenation in the first 6h after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Surgic Neurol*. (2009) 771–779. doi: 10.1038/jcbfm.2008.169
59. Güresir E, Raabe A, Jaiimsin A, Dias S, Raab P, Seifert V. Journal of the neurological sciences histological evidence of delayed ischemic brain tissue damage in the rat double-hemorrhage model. *J Neurol Sci*. (2010) 293:18–22. doi: 10.1016/j.jns.2010.03.023
60. Jeon H, Ai J, Sabri M, Tariq A, Macdonald RL. Learning deficits after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *NSC*. (2010) 169:1805–14. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.039
61. Tariq A, Ai J, Chen G, Sabri M, Jeon H, Shang X, et al. Loss of long-term potentiation in the hippocampus after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *NSC*. (2010) 165:418–26. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.10.040
62. Ramdurg SR, Suri A, Gupta D, Mewar S, Sharma U, Jagannathan NR, et al. Magnetic resonance imaging evaluation of subarachnoid hemorrhage in rats and the effects of intracisternal injection of papaverine and nitroglycerine in the management of cerebral vasospasm. *Neurol India*. (2010) 58:377–83. doi: 10.4103/0028-3886.65686
63. Feiler S, Friedrich B, Schöller K, Thal SC, Plesnila N. Standardized induction of subarachnoid hemorrhage in mice by intracranial pressure monitoring. *J Neurosci Methods*. (2010) 190:164–70. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.05.005
64. Institoris A, Snipes JA, Katakam P V, Domoki F, Boda K, Bari F, Busija DW. Impaired vascular responses of insulin-resistant rats after mild subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Methods*. (2011) 11:2080–2087. doi: 10.1152/ajpheart.01169.2010
65. Muñoz-Sánchez M, Egea-Guerrero JJ, Revuelto-Rey J, Moreno-Valladares M, Murillo-Cabezas F. A new percutaneous model of Subarachnoid Haemorrhage in rats. *J Neurosci Methods*. (2012) 211:88–93. doi: 10.1016/j.jneumeth.2012.08.010
66. Cai J, Sun Y, Yuan F, Chen L, He C, Bao Y, et al. A novel intravital method to evaluate cerebral vasospasm in rat models of subarachnoid hemorrhage : a study with synchrotron radiation. *Angiography*. (2012) 7:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0033366
67. Friedrich V, Flores R, Sehba FA. Cell death starts early after subarachnoid hemorrhage. *Neurosci Lett*. (2012) 512:6–11. doi: 10.1016/j.neulet.2012.01.036
68. Friedrich B, Müller F, Feiler S, Schöller K, Plesnila N. Experimental subarachnoid hemorrhage causes early and long-lasting microarterial constriction and microthrombosis: an in-vivo microscopy study. *J Cereb Blood Flow Metab*. (2012) 32:447–55. doi: 10.1038/jcbfm.2011.154
69. Sabri M, Ai J, Lakovic K, Ilodigwe D, Macdonald RL. Mechanisms of microthrombi formation after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Methods*. (2012) 224:26–37. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.08.002
70. Makino H, Tada Y, Wada K, Liang EI, Chang M, Mobashery S, et al. Pharmacological stabilization of intracranial aneurysms in mice: a feasibility study. *Stroke*. (2012) 43:2450–6. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.659821
71. Güresir E, Vasiliadis N, Dias S, Raab P, Seifert V, Vatter H. The effect of common carotid artery occlusion on delayed brain tissue damage in the rat double subarachnoid hemorrhage model. *Acta Neurochir*. (2012) 154:11–9. doi: 10.1007/s00701-011-1191-2
72. Duhhani R V, Kyle M, Dedeo C, Riordan M, Deshaies EM. A low mortality rat model to assess delayed cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Vis Exp*. (2013) 71:e4157. doi: 10.3791/4157
73. Smithason S, Moore SK, Provencio JJ. Low-dose lipopolysaccharide injection prior to subarachnoid hemorrhage modulates delayed deterioration associated with vasospasm in subarachnoid hemorrhage. in *Acta Neurochirurgica, Supplementum*. (2013) 13:253–258. doi: 10.1007/978-3-7091-1192-5\_45
74. Tiebosch CW, Van Den Bergh WM, Bouts MJRJ, Zwartbol R, Van Der Toorn A, Dijkhuizen RM. Progression of brain lesions in relation to hyperperfusion from subacute to chronic stages after experimental subarachnoid hemorrhage: a multiparametric MRI study. *Cerebrovasc Dis*. (2013) 36:167–72. doi: 10.1159/000352048
75. Koide M, Bonev AD, Nelson MT, Wellman GC. “Subarachnoid blood converts neurally evoked vasodilation to vasoconstriction in rat brain cortex,” in *Acta Neurochirurgica, Supplementum*, p. 167–171. (2013).
76. Boyko M, Azab AN, Kuts R, Fredrick B, Evan S, Melamed I, et al. The neuro-behavioral profile in rats after subarachnoid hemorrhage. *Brain Res*. (2013) 1491:109–16. doi: 10.1016/j.brainres.2012.10.061
77. Milner E, Holtzman JC, Friess S, Hartman RE, Brody DL, Han BH, et al. Endovascular perforation subarachnoid hemorrhage fails to cause Morris water maze deficits in the mouse. *J Cereb Blood Flow Metab*. (2014) 14:1–9. doi: 10.1038/jcbfm.2014.108
78. Kooijman E, Nijboer CH, Van Velthoven CTJ, Mol W, Dijkhuizen RM, Kesecioglu J, et al. Long-term functional consequences and ongoing cerebral inflammation after subarachnoid hemorrhage in the rat. *PLoS ONE*. (2014) 9:90584. doi: 10.1371/journal.pone.0090584
79. Hamming AM, Wermer MJH, Umesh Rudrapatna S, Lanier C, van Os HJA, van den Bergh WM, et al. Spreading depolarizations increase delayed brain injury in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. (2016) 36:1224–31. doi: 10.1177/0271678X15619189

80. Sun Y, Shen Q, Watts LT, Muir ER, Huang S, Yang GY, et al. Multimodal MRI characterization of experimental subarachnoid hemorrhage. *Neuroscience*. (2016) 316:53–62. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.12.027
81. Oka F, Hoffmann U, Lee JH, Shin HK, Chung DY, Yuzawa I, et al. Requisite ischemia for spreading depolarization occurrence after subarachnoid hemorrhage in rodents. *J Cereb Blood Flow Metab*. (2017) 37:1829–40. doi: 10.1177/0271678X16659303
82. El Amki M, Dubois M, Lefevre-Scelles A, Magne N, Roussel M, Clavier T, et al. Long-lasting cerebral vasospasm, microthrombosis, apoptosis and paravascular alterations associated with neurological deficits in a mouse model of subarachnoid hemorrhage. *Mol Neurobiol*. (2018) 55:2763–79. doi: 10.1007/s12035-017-0514-6
83. Malinova V, Psychogios MN, Tsogkas I, Koennecke B, Bleuel K, Iliev B, et al. MR-angiography allows defining severity grades of cerebral vasospasm in an experimental double blood injection subarachnoid hemorrhage model in rats. *PLoS ONE*. (2017) 12:e0171121. doi: 10.1371/journal.pone.0171121
84. Yang L, Lai WT, Wu YS, Zhang JA, Zhou XH, Yan J, et al. Simple and efficient rat model for studying delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Methods*. (2018) 304:146–53. doi: 10.1016/j.jneumeth.2018.04.011
85. Dienel A, Ammassam Veettil R, Hong SH, Matsumura K, Kumar TP, Yan Y, et al. Microthrombi correlates with infarction and delayed neurological deficits after subarachnoid hemorrhage in mice. *Stroke*. (2020) 51:2249–54. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.029753
86. Goulay R, Flament J, Gauberti M, Naveau M, Pasquet N, Gakuba C, et al. Subarachnoid hemorrhage severely impairs brain parenchymal cerebrospinal fluid circulation in nonhuman primate. *Stroke*. (2017) 48:2301–5. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017014
87. Fathi AR, Pluta RM, Bakhtian KD Qi M, Lonser RR. Reversal of cerebral vasospasm via intravenous sodium nitrite after subarachnoid hemorrhage in primates: laboratory investigation. *J Neurosurg*. (2011) 115:1213–20. doi: 10.3171/2011.7.JNS11390
88. Schatlo B, Dreier JP, Gläsker S, Fathi AR, Moncrief T, Oldfield EH, et al. Report of selective cortical infarcts in the primate clot model of vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. (2010) 67:721–8. doi: 10.1227/01.NEU.0000378024.70848.8F
89. Schatlo B, Gläsker S, Zauner A, Thompson BG, Oldfield EH, Pluta RM. Continuous neuromonitoring using transcranial Doppler reflects blood flow during carbon dioxide challenge in primates with global cerebral ischemia. *Neurosurgery*. (2009) 64:1148–54. doi: 10.1227/01.NEU.0000343542.61238.DF
90. Clatterbuck RE, Gailloud P, Tierney T, Clatterbuck VM, Murphy KJ, Tamargo RJ. Controlled release of a nitric oxide donor for the prevention of delayed cerebral vasospasm following experimental subarachnoid hemorrhage in nonhuman primates. *J Neurosurg*. (2005) 103:745–51. doi: 10.3171/jns.2005.103.4.0745
91. Clatterbuck RE, Gailloud P, Ogata L, Gebremariam A, Dietsch GN, Murphy KJ, et al. Prevention of cerebral vasospasm by a humanized anti-CD11/CD18 monoclonal antibody administered after experimental subarachnoid hemorrhage in nonhuman primates. *J Neurosurg*. (2003) 99:376–82. doi: 10.3171/jns.2003.99.2.0376
92. Macdonald RL, Zhang ZD, Curry D, Elas M, Aihara Y, Halern H, Jahromi BS, Johns L. Intracisternal sodium nitroprusside fails to prevent vasospasm in nonhuman primates. *Neurosurgery*. (2002) 51:761–770. doi: 10.1097/00006123-200209000-00027
93. Handa Y, Kaneko M, Takeuchi H, Tsuchida A, Kobayashi H, Kubota T. Effect of an antioxidant, ebselen, on development of chronic cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in primates. *Surg Neurol*. (2000) 53:323–9. doi: 10.1016/S0090-3019(00)00168-3
94. Handa Y, Kaneko M, Matuda T, Kobayashi H, Kubota T. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy for metabolic changes in brain during chronic cerebral vasospasm in primates. *Neurosurgery*. (1997) 40:773–81. doi: 10.1097/00006123-199704000-00023
95. Pluta RM, Thompson BG, Dawson TM, Snyder SH, Boock RJ, Oldfield EH. Loss of nitric oxide synthase immunoreactivity in cerebral vasospasm. *J Neurosurg*. (1996) 84:648–54. doi: 10.3171/jns.1996.84.4.0648
96. Hariton GB, Findlay JM, Weir BKA, Kasuya H, Grace MGA, Mielke BW. Comparison of intrathecal administration of urokinase and tissue plasminogen activator on subarachnoid clot and chronic vasospasm in a primate model. *Neurosurgery*. (1993) 33:691–7. doi: 10.1227/00006123-199310000-00020
97. Kobayashi H, Ide H, Aradachi H, Arai Y, Handa Y, Kubota T. Histological studies of intracranial vessels in primates following transluminal angioplasty for vasospasm. *J Neurosurg*. (1993) 78:481–6. doi: 10.3171/jns.1993.78.3.0481
98. Handa Y, Kubota T, Tsuchida A, Kaneko M, Caner H, Kobayashi H, et al. Effect of systemic hypotension on cerebral energy metabolism during chronic cerebral vasospasm in primates. *J Neurosurg*. (1993) 78:112–9. doi: 10.3171/jns.1993.78.1.0112
99. Handa Y, Hayashi M, Takeuchi H, Kubota T, Kobayashi H, Kawano H. Time course of the impairment of cerebral autoregulation during chronic cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in primates. *J Neurosurg*. (1992) 76:493–501. doi: 10.3171/jns.1992.76.3.0493
100. Macdonald RL, Weir BKA, Runzer TD, Grace MGA, Findlay JM, Saito K, et al. Etiology of cerebral vasospasm in primates. *J Neurosurg*. (1991) 75:415–24. doi: 10.3171/jns.1991.75.3.0415
101. Handa Y, Kabuto M, Kobayashi H, Kawano H, Takeuchi H, Hayashi M. The correlation between immunological reaction in the arterial wall and the time course of the development of cerebral vasospasm in a primate model. *Neurosurgery*. (1991) 10:542. doi: 10.1097/00006123-199104000-00010
102. Takeuchi H, Handa Y, Kobayashi H, Kawano H, Hayashi M. Impairment of cerebral autoregulation during the development of chronic cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in primates. *Neurosurgery*. (1991) 19:41. doi: 10.1097/00006123-199101000-00007
103. Kanamaru K, Weir BK, Findlay JM, Grace M, Macdonald RL. A dosage study of the effect of the 21-aminosteroid U74006F on chronic cerebral vasospasm in a primate model. *Neurosurgery*. (1990) 27:28–29. doi: 10.1097/00006123-199007000-00004
104. Findlay JM, Weir BK, Kanamaru K, Grace M, Baughman R. The effect of timing of intrathecal fibrinolytic therapy on cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. (1990) 26:201–16. doi: 10.1097/00006123-199002000-00003
105. Noseworthy TW, Weir B, Boisvert D, Espinosa F, Overton T, Marshal ML. Effect of reserpine-kanamycin treatment on chronic vasospasm after platelet-enriched subarachnoid hemorrhage in primates. *Neurosurgery*. (1984) 14:193–7. doi: 10.1227/00006123-198402000-00013
106. Svendgaard NA, Brismar J, Delgado T, Egund N, Owman C, Rodacki MA, et al. Late cerebral arterial spasm: the cerebrovascular response to hypercapnia, induced hypertension and the effect of Nimodipine on blood flow autoregulation in experimental subarachnoid hemorrhage in primates. *Gen Pharmacol*. (1983) 14:167–72. doi: 10.1016/0306-3623(83)90093-9
107. Rothberg CS, Weir B, Overton TR. Treatment of subarachnoid hemorrhage with sodium nitroprusside and phenylephrine: An experimental study. *Neurosurgery*. (1979) 5:588–95. doi: 10.1227/00006123-197910000-00008
108. Vergouwen MDI, Ildigwe D, Macdonald RL. Contributes to poor outcome by vasospasm-dependent and -independent effects. *Stroke*. (2011) 42:924–929. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.597914
109. Kamp MA, Lieshout JH, Van, Dibué-adjei M, Weber JK, Schneider T, Restin T, Fischer I. A systematic and meta-analysis of mortality in experimental mouse models analyzing delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Transl Stroke Res*. (2017) 8:206–19. doi: 10.1007/s12975-016-0513-3
110. Care N, Oka F, Chung DY, Suzuki M, Ayata C. Delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: experimental—clinical disconnect and the unmet need. *Neurocrit Care*. (2019) 32:238–51. doi: 10.1007/s12028-018-0650-5
111. Connolly ES, Rabinstein AA, Carhuapoma JR, Derdeyn CP, Dion J, Higashida RT, et al. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. (2012) 43:1711–37. doi: 10.1161/STR.0b013e3182587839
112. Liu GJ, Luo J, Zhang LP, et al. Meta-analysis of the effectiveness and safety of prophylactic use of nimodipine in patients with an aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. (2011) 10:834–44. doi: 10.2174/187152711798072383
113. Dorhout Mees SM, Kinkel GJ, Feigin VL, Alga A, van der Bergh WM, Vermeulen M, van Gijn J. Calcium antagonists for aneurysmal



- subarachnoid haemorrhage. *Cochrane database Syst Rev.* (2007) 2007:pub3. doi: 10.1002/14651858.CD000277.pub3
114. Guo J, Shi Z, Yang K, Jiang L. Endothelin receptor antagonists for subarachnoid hemorrhage. *Cochrane database Syst Rev.* (2012) 9:pb2. doi: 10.1002/14651858.CD008354.pub2
  115. Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, Mayer SA, Molyneux A, Raabe A, Vajkoczy P, Wanke I, Bach D, Frey A, et al. Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial (CONSCIOUS-2). *Lancet Neurol.* (2011) 10:618–25. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70108-9
  116. Zhang S, Wang L, Liu M, Wu B. Tirilazad for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev.* (2010) 12:688362. doi: 10.1002/14651858.CD006778.pub2
  117. Kirkpatrick PJ, Turner CL, Smith C, Hutchinson PJ, Murray GD. STASH collaborators. Simvastatin in aneurysmal subarachnoid haemorrhage (STASH): a multicentre randomised phase 3 trial. *Lancet Neurol.* (2014) 13:666–75. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70084-5
  118. Trial PPD, Macdonald RL, Kassell NF, Mayer S, Ruefenacht D, Schmiedek B, et al. Clazosentan to overcome neurological ischemia and hemorrhage (CONSCIOUS-1). *Stroke.* (2008) 8:3015–21. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.519942
  119. Bart van der Worp H, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O'Collins V, Macleod MR. Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med.* (2010) 7:1–8. doi: 10.1371/journal.pmed.1000245
  120. Frantzas J, Sena ES, MacLeod MR, Salman RAS. Treatment of intracerebral hemorrhage in animal models: Meta-analysis. *Ann Neurol.* (2011) 69:389–99. doi: 10.1002/ana.22243
  121. Van Der Worp HB, De Haan P, Morrema E, Kalkman CJ. Methodological quality of animal studies on neuroprotection in focal cerebral ischaemia. *J Neurol.* (2005) 252:1108–14. doi: 10.1007/s00415-005-0802-3
  122. Hirst TC, Vesterinen HM, Sena ES, Egan KJ, MacLeod MR, Whittle IR. Systematic review and meta-analysis of temozolomide in animal models of glioma: Was clinical efficacy predicted. *Br J Cancer.* (2013) 108:64–71. doi: 10.1038/bjc.2012.504
  123. Percie du Stert N, Hurst V, Ahluwalia A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* (2020) 18:3000140. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410

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

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Goursaud, Martinez de Lizarrondo, Grolleau, Chagnot, Agin, Maubert, Gauberti, Vivien, Ali and Gakuba. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: is there a relevant experimental model? A systematic review of preclinical literature.**

Suzanne Goursaud<sup>1,2</sup>, Sara Martinez de Lizarrondo<sup>2</sup>, François Grolleau<sup>3</sup>, Audrey Chagnot<sup>2</sup>, Véronique Agin<sup>2</sup>, Eric Maubert<sup>2</sup>, Carine Ali<sup>2</sup>, Maxime Gaubert<sup>2</sup>, Denis Vivien<sup>2,4</sup>, Clement Gakuba<sup>2,3</sup>

Supplementary table:

Characteristics of the SAH models described in the ten most cited studies included in the systematic review (*NA: not available*).

Studies	Citations (number)	Animal species	Models	Blood volume	Vasospasm	Cerebral ischemia		
						Imaging	Histology	Behavioral study
<i>Bederson. 1995</i>	360	Rats	Endovascular perforation	Uncontrolled	NA	NA	NA	No focal neurological deficit
<i>Bederson. 1998</i>	245	Rats	Endovascular perforation	Uncontrolled	Yes (doppler and histology)	NA	NA	NA
<i>Delgado. 1985</i>	234	Rats	Direct injection into the <i>cisterna magna</i>	70 et 300 µL	Yes (angiography)	NA	NA	NA
<i>Solomon. 1985</i>	175	Rats	Direct injection into the <i>cisterna magna</i>	300 µL	NA	NA	NA	NA
<i>Prunell. 2003</i>	175	Rats	Direct injection into the <i>cisterna magna</i> / prechiasmatic cistern	200 et 300 µL	NA	NA	Yes (neuronal death in the hippocampus and the cortex)	Yes (Hemiparesis observed in the SAH group)
<i>Jackowski. 1990</i>	154	Rats	Direct injection into the <i>cisterna magna</i>	300 µL	Yes (histology)	NA	NA	NA
<i>Sugawara. 2008</i>	129	Rats	Endovascular perforation	Uncontrolled	Yes (histology)	NA	NA	Yes (Severe to moderate neurological deficits observed in the SAH group)
<i>Veelken. 1995</i>	119	Rats	Endovascular perforation	Uncontrolled	NA	NA	Yes (neuronal loss in the hippocampus)	NA
<i>Gules. 2002</i>	112	Rats	Direct injection into the <i>cisterna magna</i>	300 µL	Yes (histology)	NA	NA	No focal neurological deficit
<i>Doczi. 1986</i>	102	Spontaneous hypertensive rats	Direct injection injection to the surface of the cortex	200 µL	NA	NA	NA	NA

ARTICLE III: Molecular imaging of early brain injury in subarachnoid hemorrhage.

*Note : Ce troisième article original dont je suis co-première auteure est en cours de finalisation. Une soumission en format Short Communication est prévue dans le journal Stroke dans les semaines à venir.*

## Molecular imaging of early brain injury in subarachnoid hemorrhage

**Authors:** Suzanne GOURSAUD\*<sup>1,2</sup> MD MSc, Manuel NAVARRO-OVIEDO\*<sup>1</sup> PhD, Benoit ROUSSEL<sup>1</sup> PhD, Clément GAKUBA<sup>1,3</sup> MD PhD, Peter J. LENTING<sup>4</sup> PhD, Mikael NAVEAU<sup>5</sup> PhD, Denis VIVIEN<sup>1,6</sup> PhD, Carine ALI<sup>1</sup> PhD, Sara MARTINEZ DE LIZARRONDO<sup>§1</sup> PhD, Maxime GAUBERTI<sup>§1,7</sup> MD PhD.

\* These authors contributed equally, alphabetical order.

§ These authors share senior authorship

### Affiliations:

1 Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, PhIND "Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders", Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, Cyceron, Caen, France

2 CHU Caen, Intensive Care Unit, Caen, France.

3 CHU Caen, Department of Anesthesiology and Critical Care, Caen, France.

4 Laboratory for Hemostasis, Inflammation & Thrombosis, Unité Mixed de Recherche 1176, INSERM, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France

5 Normandie Université, UNICAEN, CNRS UMS 3408, Caen, France ;

6 CHU Caen, Clinical Research Department, CHU de Caen Côte de Nacre, Caen, France.

7 CHU Caen, Department of diagnostic imaging and interventional radiology, CHU de Caen Côte de Nacre, Caen, France.

To whom correspondence should be addressed: Sara Martinez de Lizarrondo, PhD, or Maxime Gauberti, INSERM U1237 "Physiopathology and Imaging for Neurological Disorders (PhIND)", Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, GIP Cyceron, Bd Henri Becquerel, BP5229, 14074 Caen, France, Phone: 0033.231.47.01.55, Fax: 33.231.47.02.22, Mail: [smartinez@cyceron.fr](mailto:smartinez@cyceron.fr) or [gauberti@cyceron.fr](mailto:gauberti@cyceron.fr)

## **ABSTRACT**

**Background:** Subarachnoid hemorrhage (SAH) is the third most common subtype of stroke, frequently leading to severe neurological deficits and high mortality rates. Early brain injury (EBI), manifesting within the first 72 hours after SAH, encompasses a spectrum of pathological changes, including cerebral edema, microcirculatory dysfunction and neuroinflammation. Although associated with clinical outcome, these changes are often imperceptible with conventional imaging techniques, underscoring the need for new biomarkers.

**Methods:** SAH was induced by prechiasmatic injection of blood in mice. At 24 hours, 72 hours, and 7 days after SAH, we performed molecular imaging of endothelial activation using microparticles of iron oxide (MPIO) targeted to P-Selectin or Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1). Probes distribution was revealed by magnetic resonance imaging (immuno-MRI) and by a new modality called magnetic particle imaging.

**Results:** At 24 hours after SAH, immuno-MRI revealed a massive over-expression of VCAM-1 (but not P-Selectin) in the cerebral vasculature. This was confirmed by qPCR and immunohistology. Thereafter, VCAM-1 expression and other markers of endothelial activation progressively returned to baseline after 7 days. Interestingly, the change in VCAM-1 expression at 24 hours after SAH can be detected using magnetic particle imaging, paving the way for bedside monitoring of EBI.

**Conclusions:** EBI induces early endothelial activation throughout the brain after experimental SAH. Molecular imaging of VCAM-1 using immuno-MRI or MPI is a new biomarker for EBI.

## INTRODUCTION

Subarachnoid hemorrhage (SAH) is characterized by the accumulation of blood in the subarachnoid space, often leading to severe neurological deficits and high mortality rates<sup>1,2</sup>. Early brain injury (EBI), occurring within the first 72 hours post-hemorrhage, is a major predictor of clinical outcome<sup>3</sup>. This phase includes a variety of pathological processes such as microcirculatory dysfunction, blood-brain barrier breakdown, neuroinflammation, cerebral edema, oxidative stress, and neuronal death. Using computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI), it is for instance possible to detect global cerebral edema following SAH, which is an independent risk factor for long term neurological morbidity<sup>4</sup>. However, neither CT nor MRI fully capture the extent of EBI, which is a dynamic and multifaceted process. Therefore, there is a growing interest in developing sensitive biomarkers/technics that can provide a more comprehensive assessment of EBI.

Previous studies revealed that early circulating levels of endothelial cell activation markers predict outcome in aneurysmal SAH<sup>5-7</sup>, suggesting that endothelial activation is a potential biomarker of EBI. In the last few years, we developed a molecular imaging method called immuno-MRI, based on the use of micro-sized particles of iron oxide conjugated to monoclonal antibodies targeting endothelial adhesion molecules<sup>8,9</sup>. In the present study, we investigated whether immuno-MRI of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)<sup>10</sup> and P-Selectin<sup>11,12</sup> can reveal EBI after experimental SAH.

## **METHODS**

### **Animals**

All experiments were performed on 6- to 12-week-old male Swiss mice (Janvier, France). Animals were maintained under specific pathogen-free conditions at the Centre Universitaire de Ressources Biologiques (CURB, Basse-Normandie, France), and all had free access to food and tap water. Experiments were approved by the local ethical committee of Normandy (CENOMEXA, APAFIS#9390 and APAFIS#24549). A catheter was inserted into the tail vein of mice for intravenous administration of the contrast agent.

### **Subarachnoid Hemorrhage**

Subarachnoid hemorrhage (SAH) was induced by injection of fresh arterial blood into the prechiasmatic cistern. The mouse was placed within a stereotactic frame. A hole was drilled in the skull 4.5 mm anterior to the bregma, after we had observed and avoided the superior sagittal sinus. A 30-gauge needle was advanced at a 40° angle for 5 mm until the skull base was touched. It was withdrawn from 0.5-1 mm, so that the tip was in the prechiasmatic cistern. Arterial blood was withdrawn from the left ventricle of another anesthetized mouse using a 25 gauge needle. Fifty  $\mu\text{L}$  of blood were manually injected through the 30 gauge needle in 15 seconds. We chose the volume of 50  $\mu\text{L}$  order to induce mild-subarachnoid hemorrhages with fast recovery of the mice and no mortality. For sham animals, the same procedure was followed, except that the intracisternal injection solution was made of saline. All the mice were included in the final analyses.

### **Targeting-moiety conjugation to MPIO**

Microparticles of iron oxide (MPIO; diameter 1.08  $\mu\text{m}$ ) with p-toluenesulphonyl reactive surface groups (Invitrogen) were covalently conjugated to purified monoclonal rat anti-mouse monoclonal antibodies for VCAM-1, P-Selectin or IgG (as controls). Briefly, purified monoclonal

rat anti-mouse antibodies for VCAM-1 (clone A(429); BD Biosciences), P-Selectin (MAB737, R&D Systems) or control rat IgG (Sigma) were covalently conjugated to MPIOs in borate buffer (pH 9.5), by incubation at 37 °C for 48 h. 40 µg of targeting molecule was used for the coating of 1 mg of reactive MPIOs. MPIOs were then washed in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) and incubated at 37 °C for 24 h, to block the remaining active groups. MPIOs were then rinsed in PBS (0.1% BSA). To disperse MPIO aggregates, a sonication procedure at low intensity was performed for 60 seconds. Thereafter, MPIOs were stored at 4°C in a PBS buffer under constant agitation to avoid aggregate formation.

#### ***In silico* MPIO relaxivity measurements**

Relaxometry scans using the RELAX module on the Momentum MPI were performed on 100 µl of either the MPIO IgG (0.1162 mg/ml) or MPIO VCAM (0.1993 mg/ml) and 3 µl of Vivotrax (5.5 mg/ml) in individual plastic microtubes. The scans generate Point Spread Function (PSF) data that can be used to calculate the resolution (mm) and sensitivity (a.u./mg Fe) of the particles. Resolution is calculated by dividing the Full-Width Half Maximum value of the PSF with the scan gradient. Sensitivity is determined as the peak value of the PSF adjusted to the amount of iron scanned.

#### ***In vivo* immuno-MRI**

Experiments were carried out on a Pharmascan 7-T/12-cm system using surface coils (Bruker, Germany). Mice were anesthetized with isoflurane (1.5 to 2.0%) and maintained at 37°C by the integrated heat animal holder, and the breathing rate was monitored during the imaging procedure. To image the brain, T2-weighted images were acquired using an MSME sequence (spatial resolution of 70 µm by 70 µm by 500 µm) with TE/TR 51 ms/2500 ms and a flip angle of 90°. T2\*-weighted images were acquired using a 3D FLASH gradient echo imaging (spatial resolution of 78 µm by 78 µm by 150 µm) with TE/TR 8.6 ms/50 ms, and a flip angle of 20° was



performed to reveal MPIOs (acquisition time, 17 min). High-resolution T2\*-weighted images presented in this study are minimum intensity projections of three consecutive slices (yielding a Z resolution of 450  $\mu\text{m}$ ). T2-weighted images were acquired using a 2D RARE sequence (spatial resolution of 67  $\mu\text{m}$  by 67  $\mu\text{m}$  by 750  $\mu\text{m}$ ) with TE/TR 36 ms/2500 ms and a flip angle of 90°. When appropriate, mice randomly received targeted MPIOs or appropriate control. When appropriate, T2\*-weighted images were acquired both before and after injection of contrast agent. Although injections of contrast agent were usually performed outside the magnet, the positions of the mice during pre- and postcontrast acquisitions did not change (the mice were placed exactly at the same position and were not removed from the animal holder).

### ***In vivo* MPI Imaging**

Whole body magnetic particle and CT imaging was performed 24 hours after inducing SAH. Anesthetized mice were placed in the MPI/CT bed (Momentum CT, Magnetic Insight) with the temperature maintained at 37°C and received intravenous injection of 2.0 mg/kg (equivalent Fe) of conjugated MPIOs. Imaging was performed directly after MPIO administration. Total scan time per mouse was around 4 minutes for 2D imaging and between 18 and 23 minutes for 3D imaging. 3D images were acquired using a 5.7 T/m gradient, 21 projections and a FOV of 10 x 6 x 6 cm (thickness of 0.25 mm). More detailed MPI protocol is available on demand.

### **Laser Speckle Imaging**

We used laser speckle imaging to assess the superficial cerebral blood flow (CBF) 1h, 4h and 24h after SAH model. 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 and contralateral hemispheres. CBF intensities go from low (blue) to high (red).

### **Immunofluorescence**

Mice were intracardially perfused with heparinized saline and 4% phosphate-buffered PFA, and the brain and liver were harvested. The organs were cryoprotected in 20% PBS sucrose for 24 hours and embedded in a Cryomatrix (Tissue-Tek OCT) before cryostat sectioning. Cryostat-cut sections (thickness, 10  $\mu$ m) were collected on polylysine slides and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before processing. Sections were coincubated overnight with goat anti-mouse podocalyxin (1:200; R&D, AF1556), goat anti-mouse collagen IV (1:1000; SouthernBiotech,1340), rabbit anti-VWF (1/1000, Dako, A0082) or rat anti-mouse VCAM-1 (1:500; BD Bioscience, 553330). Primary antibodies were revealed by using Fab'2 fragments of donkey anti-rabbit linked to Cy3, anti-rat linked to Cy3, and anti-goat IgG linked to FITC (1:500; Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA). Washed sections were coverslipped with antifade medium containing DAPI. Epifluorescence images (~10 images per section) were digitally captured using a Leica DM6000 epifluorescence microscope coupled CoolSNAP camera, visualized with Leica MM AF 2.2.0 software (Molecular Devices, USA), and further processed using ImageJ 1.51k software.

### **Quantitative real-time PCR**

Total RNA was isolated from brains with TRI reagent according to the manufacturer instructions. Total RNA was treated with TURBO DNase (Ambion, Saint Aubin, France) to avoid DNA contamination and quantified by spectrophotometry (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). One  $\mu$ g of total RNA was reverse-transcribed by using the M-MLV Reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions with the following cycle conditions:  $42^{\circ}\text{C}$  (90 min);  $85^{\circ}\text{C}$  (5 min). RT-qPCR was performed from 1:20 diluted cDNA in iQ

SYBR Green Supermix (Bio-Rad; Marnes-la-Coquette, France) containing 500 nM of each primer. Based on mRNA-coding sequences ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), mouse-specific primers for VCAM-1, ICAM-1, P-Selectin, E-Selectin, TNF and VWF were designed by using the Primer3Plus software (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Assays were run in triplicate on the CFX96 real-time system c1000 thermal cycler (Bio-Rad), with the following cycle conditions: 95 °C (3 min); (95 °C (2 s), 60 °C (20 s)) × 39; 70 °C (30 s). Normalization was performed according to the results of the geNorm analysis (QBase+ software, Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium) as previously described.

### **Plasma VWF levels**

Blood samples were collected from intracardiac puncture in 3.2% (w/v) sodium citrate tubes. Platelet free plasma was isolated by centrifugation (2× 2500g for 15 min at RT) and kept at -80°C until use. Concentrations of VWF were determined using Asserachrom VWF:Ag kit and following manufacturer instructions.

### **Statistical analyses**

Results are presented as means ± SD. Statistical analyses were performed using Mann-Whitney U test. When more than two groups were compared, statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis (for multiple comparisons) followed by Mann-Whitney post hoc U test. When comparing two groups, a  $P < 0.05$  was considered significant (two-sided).

## RESULTS

### **Immuno-MRI reveals brain wide overexpression of VCAM-1 24 hours after SAH.**

SAH was induced in mice by prechiasmatic injection of 50  $\mu$ l of fresh arterial blood (Figure 1A) and immuno-MRI was performed before and 24 hours, 72 hours, and 7 days after SAH. In this model, SAH animals presented hydrocephalus and cerebral hypoperfusion persisting for a few hours after blood injection (Supplementary Figure 1 and 2). An iron sensitive sequence was performed both before and after intravenous injection of MPIO targeted to VCAM-1 (MPIO@VCAM-1) or P-Selectin (MPIO@P-Selectin). Immuno-MRI of VCAM-1 revealed a brain wide overexpression of VCAM-1 at 24 hours, progressively returning to baseline value at 7 days (Figure 1B and C). In control and sham animals, VCAM-1 expression was significantly lower than in SAH animals at 24 hours (Supplementary Figure 3). Interestingly, the pattern of VCAM-1 overexpression at 24 hours after SAH was stereotyped, with a relative sparing of the peri-middle cerebral artery areas (Figure 1D). Immuno-MRI did not reveal a significant overexpression of P-Selectin at any time-points. Importantly, intravenous injection of MPIO coated with irrelevant immunoglobulin (MPIO@IgG) did not induce any signal void, confirming the high specificity of immuno-MRI. Immunohistofluorescence analyses confirmed VCAM-1 overexpression at 24 hours (Figure 1E).

### **Endothelial activation after SAH.**

To further characterize the profile of endothelial activation after SAH, we measured the expression of markers of endothelial activation in the brain at different time points after SAH (Figure 2A). We found overexpression of VCAM-1 and Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) at 24 hours (Figure 2B). Expression of both proteins came back to the baseline value after 7 days, in line with immuno-MRI findings. E-Selectin expression was not significantly

modified at any time points. The pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor peaked at 1 hour after SAH but was not significantly overexpressed thereafter (Figure 2E). Interestingly, von Willebrand Factor (VWF) expression followed the same pattern as VCAM-1 and ICAM-1, with a peak at 24 hours after SAH and a return to baseline at day 7 (Figure 2F). Accordingly, plasma VWF levels were increased at 24 hours and immunohistofluorescence analyses revealed that brain microvascular endothelial cells released most of their VWF content at this time point (Figure 2G and H).

### **Magnetic particle imaging (MPI) reveals endothelial activation in the brain after SAH.**

MPI is a new non-invasive medical imaging technology<sup>13</sup>. Unlike MRI that detects the effect of superparamagnetic material on the signal of water (1H MRI), MPI directly detect the magnetization of exogenously injected contrast agents. Our preclinical MPI system is coupled to a CT to provide anatomical landmarks. In the present study, we investigated whether MPI after intravenous injection of MPIO@VCAM-1 can detect EBI after SAH (Figure 3A and B). First, we confirmed *in vitro* that MPI can detect MPIO@VCAM-1 (Figure 3C). Then *in vivo*, following the same experimental paradigm as for immuno-MRI, we performed molecular MPI of VCAM-1 in the whole body of control and SAH mice, at 24 hours. Whole body MPI after intravenous injection of MPIO@VCAM-1 revealed binding of the contrast agent specifically in the brain (Figure 3D), in addition to its expected passive accumulation in the liver (reticulo-endothelial system). 3D MPI acquisitions of the brain demonstrated a significantly higher MPIO@ $\alpha$ VCAM-1 signal in SAH compared to sham mice (Figure 3E and F).

## DISCUSSION

In this study, we demonstrated that immuno-MRI of VCAM-1 can reveal endothelial activation as a marker of EBI after SAH. This endothelial activation occurs in the whole brain 24 hours post-SAH, and in our experimental model, comes back to baseline at day 7. These data highlight the potential of molecular imaging of endothelial activation to detect EBI in SAH patients. Although the commercial MPIOs used in the present study are made of polystyrene and are not biodegradable, we recently reported a formulation of biodegradable and biocompatible MPIOs that could be used in humans<sup>14,15</sup>. By enabling earlier and more accurate detection of brain injury, such a biomarker could guide therapeutic interventions, improve patient outcomes, and provide a valuable tool for research into the pathophysiology of SAH. Moreover, our data support that MPI, a new imaging technology, could be used to detect endothelial activation at the bedside after SAH. Indeed, Graeser et al. previously reported a MPI device designed for human brain imaging<sup>16</sup>. It is highly sensitive and allows the detection of clinically relevant concentrations of iron, albeit at lower resolution than MRI. Importantly, this device is self-shielded and can be used in clinical environments such as intensive care units. Coupled to biodegradable MPIO targeting VCAM-1, such technology could allow longitudinal monitoring of EBI in SAH patients at the bedside.

In line with the fact that there is no delayed cerebral ischemia (DCI) in this experimental model of SAH, we did not detect delayed endothelial activation. It is likely that in other SAH models or in humans, there would be a delayed occurrence of endothelial activation, in line with the findings of biomarkers study showing elevated plasmatic levels of P-Selectin and CSF levels of VCAM-1 in patients with DCI<sup>17,18</sup>. Accordingly, the possibility to monitor DCI by imaging endothelial activation at the bedside using MPI could help to select patients for specific therapies.

In conclusion, we demonstrate that immuno-MRI and immuno-MPI of VCAM-1 can detect the endothelial activation associated with EBI after SAH. Future works should focus on translating this technology to clinical practice.

## REFERENCES

1. Macdonald RL, Schweizer TA. Spontaneous subarachnoid haemorrhage. *Lancet*. 2017;389:655-666. doi: 10.1016/s0140-6736(16)30668-7
2. Claassen J, Park S. Spontaneous subarachnoid haemorrhage. *Lancet*. 2022;400:846-862. doi: 10.1016/s0140-6736(22)00938-2
3. Lauzier DC, Jayaraman K, Yuan JY, Diwan D, Vellimana AK, Osbun JW, Chatterjee AR, Athiraman U, Dhar R, Zipfel GJ. Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage: Incidence and Mechanisms. *Stroke*. 2023;54:1426-1440. doi: 10.1161/strokeaha.122.040072
4. Claassen J, Carhuapoma JR, Kreiter KT, Du EY, Connolly ES, Mayer SA. Global cerebral edema after subarachnoid hemorrhage: frequency, predictors, and impact on outcome. *Stroke*. 2002;33:1225-1232. doi: 10.1161/01.str.0000015624.29071.1f
5. Frijns CJ, Rinkel GJ, Castigliego D, Van Gijn J, Sixma JJ, Fijnheer R. Endothelial cell activation after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2002;50:1223-1229; discussion 1229-1230. doi: 10.1097/00006123-200206000-00009
6. Frijns CJ, Fijnheer R, Algra A, van Mourik JA, van Gijn J, Rinkel GJ. Early circulating levels of endothelial cell activation markers in aneurysmal subarachnoid haemorrhage: associations with cerebral ischaemic events and outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77:77-83. doi: 10.1136/jnnp.2005.064956
7. Duris K, Lipkova J, Splichal Z, Madaraszova T, Jurajda M. Early Inflammatory Response in the Brain and Anesthesia Recovery Time Evaluation After Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Translational stroke research*. 2018. doi: 10.1007/s12975-018-0641-z
8. Bonnard T, Gauberti M, Martinez de Lizarrondo S, Campos F, Vivien D. Recent Advances in Nanomedicine for Ischemic and Hemorrhagic Stroke. *Stroke*. 2019;50:1318-1324. doi: 10.1161/strokeaha.118.022744
9. Gauberti M, Fournier AP, Docagne F, Vivien D, Martinez de Lizarrondo S. Molecular Magnetic Resonance Imaging of Endothelial Activation in the Central Nervous System. *Theranostics*. 2018;8:1195-1212. doi: 10.7150/thno.22662
10. Belliere J, Martinez de Lizarrondo S, Choudhury RP, Quenault A, Le Béhot A, Delage C, Chauveau D, Schanstra JP, Bascands JL, Vivien D, et al. Unmasking Silent Endothelial Activation in the Cardiovascular System Using Molecular Magnetic Resonance Imaging. *Theranostics*. 2015;5:1187-1202. doi: 10.7150/thno.11835
11. Quenault A, Martinez de Lizarrondo S, Etard O, Gauberti M, Orset C, Haelewyn B, Segal HC, Rothwell PM, Vivien D, Touzé E, et al. Molecular magnetic resonance imaging discloses endothelial activation after transient ischaemic attack. *Brain*. 2017;140:146-157. doi: 10.1093/brain/aww260
12. Fournier AP, Quenault A, Martinez de Lizarrondo S, Gauberti M, Defer G, Vivien D, Docagne F, Macrez R. Prediction of disease activity in models of multiple sclerosis by molecular magnetic resonance imaging of P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:6116-6121. doi: 10.1073/pnas.1619424114
13. Gleich B, Weizenecker J. Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. *Nature*. 2005;435:1214-1217. doi: 10.1038/nature03808
14. Gauberti M, Martinez de Lizarrondo S. Molecular MRI of Neuroinflammation: Time to Overcome the Translational Roadblock. *Neuroscience*. 2021;474:30-36. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.08.016
15. Martinez de Lizarrondo S, Jacqmarcq C, Naveau M, Navarro-Oviedo M, Pedron S, Adam A, Freis B, Allouche S, Goux D, Razafindrakoto S, et al. Tracking the immune response by MRI using biodegradable and ultrasensitive microprobes. *Sci Adv*. 2022;8:eabm3596. doi: 10.1126/sciadv.abm3596



16. Graeser M, Thieben F, Szwargulski P, Werner F, Gdaniec N, Boberg M, Griese F, Möddel M, Ludewig P, van de Ven D, et al. Human-sized magnetic particle imaging for brain applications. *Nature communications*. 2019;10:1936. doi: 10.1038/s41467-019-09704-x
17. Polin RS, Bavbek M, Shaffrey ME, Billups K, Bogaev CA, Kassell NF, Lee KS. Detection of soluble E-selectin, ICAM-1, VCAM-1, and L-selectin in the cerebrospinal fluid of patients after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1998;89:559-567. doi: 10.3171/jns.1998.89.4.0559
18. Frijns CJ, Kasius KM, Algra A, Fijnheer R, Rinkel GJ. Endothelial cell activation markers and delayed cerebral ischaemia in patients with subarachnoid haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77:863-867. doi: 10.1136/jnnp.2005.081539

## **FUNDING**

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche “FLAMRING” ANR-20-CE19-0032-01 (to S.M.d.L., P.J.L); and “Fondation Bettencourt Schueller” for a CCA-Inserm-Bettencourt position (to M.G.).

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Conceptualization: S.G., M.N-O., S.M.d.L., and M.G. Investigation: S.G., M.N-O., B.R, C.G., P.J.L., M.N., C.A., S.M.d.L., and M.G. Funding acquisition: S.M.d.L., D.V. and M.G. Project administration: D.V. and M.G. Supervision: C.A., D.V., S.M.d.L., and M.G. Writing (original draft): S.M.d.L. and M.G. Writing (review and editing): All authors participated in the reviewing and editing of the manuscript.

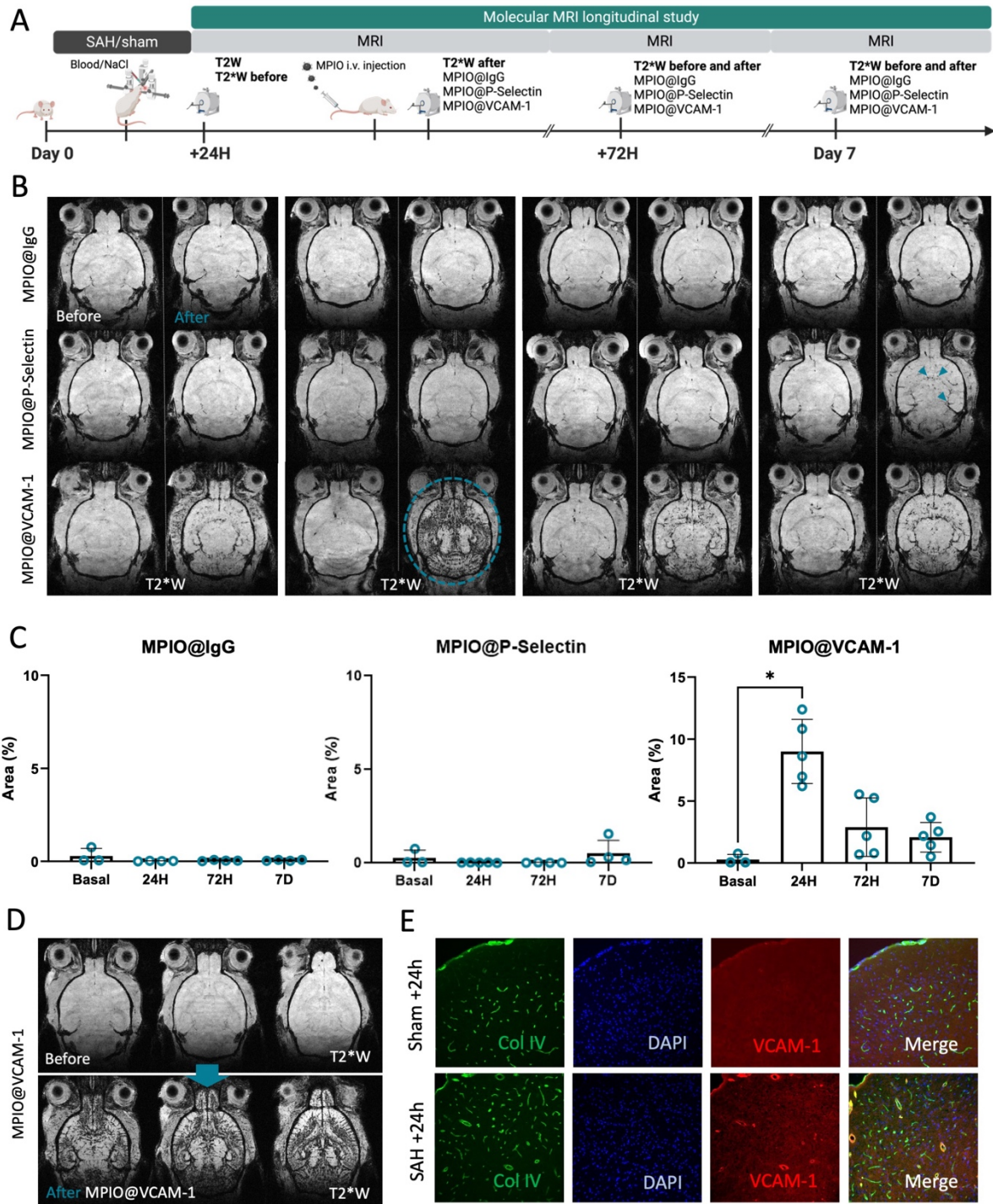
## **COMPETING INTERESTS**

The authors declare that they have no competing interests.

## **DATA AND MATERIALS AVAILABILITY**

All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials.

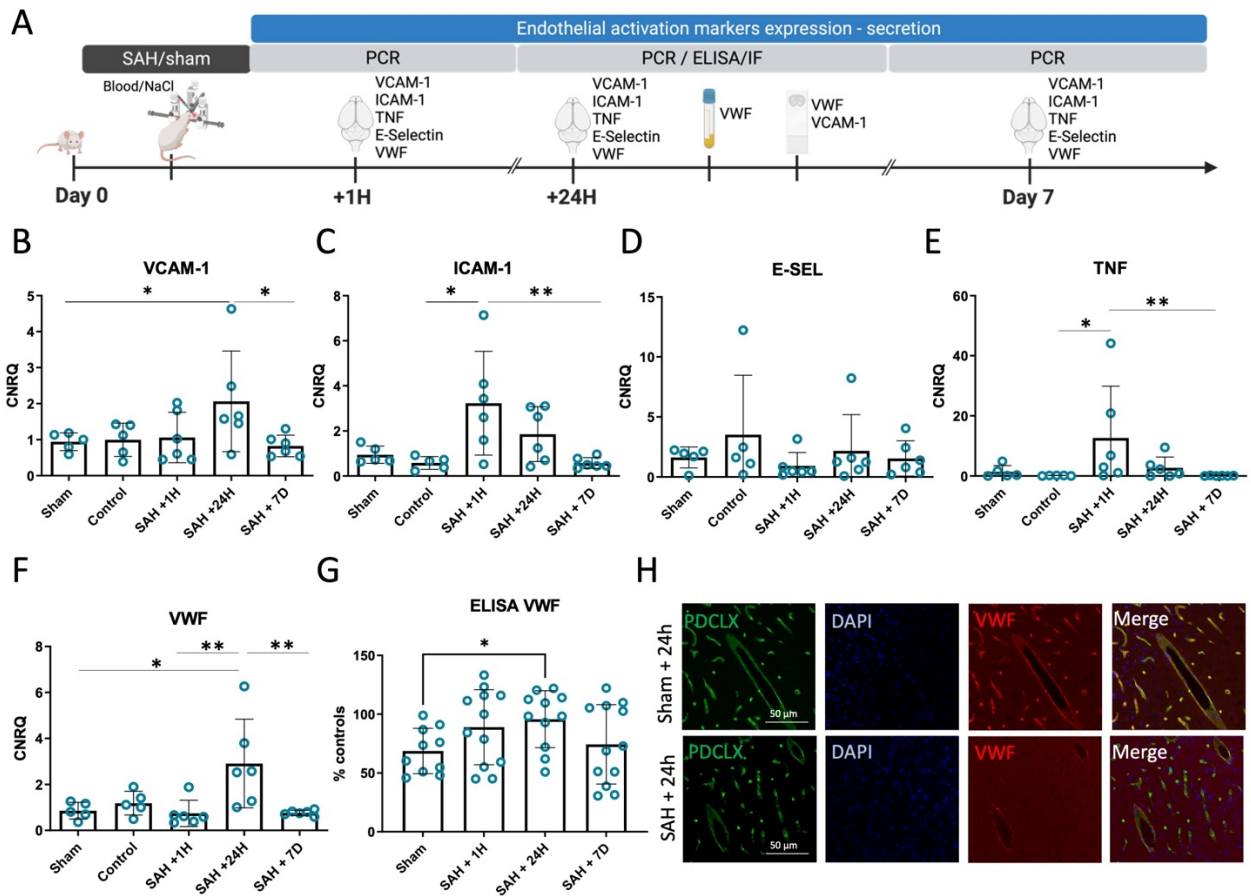
## Figure and Figure legends



**Figure 1. Immuno-MRI reveals brain wide over-expression of VCAM-1 after SAH.**

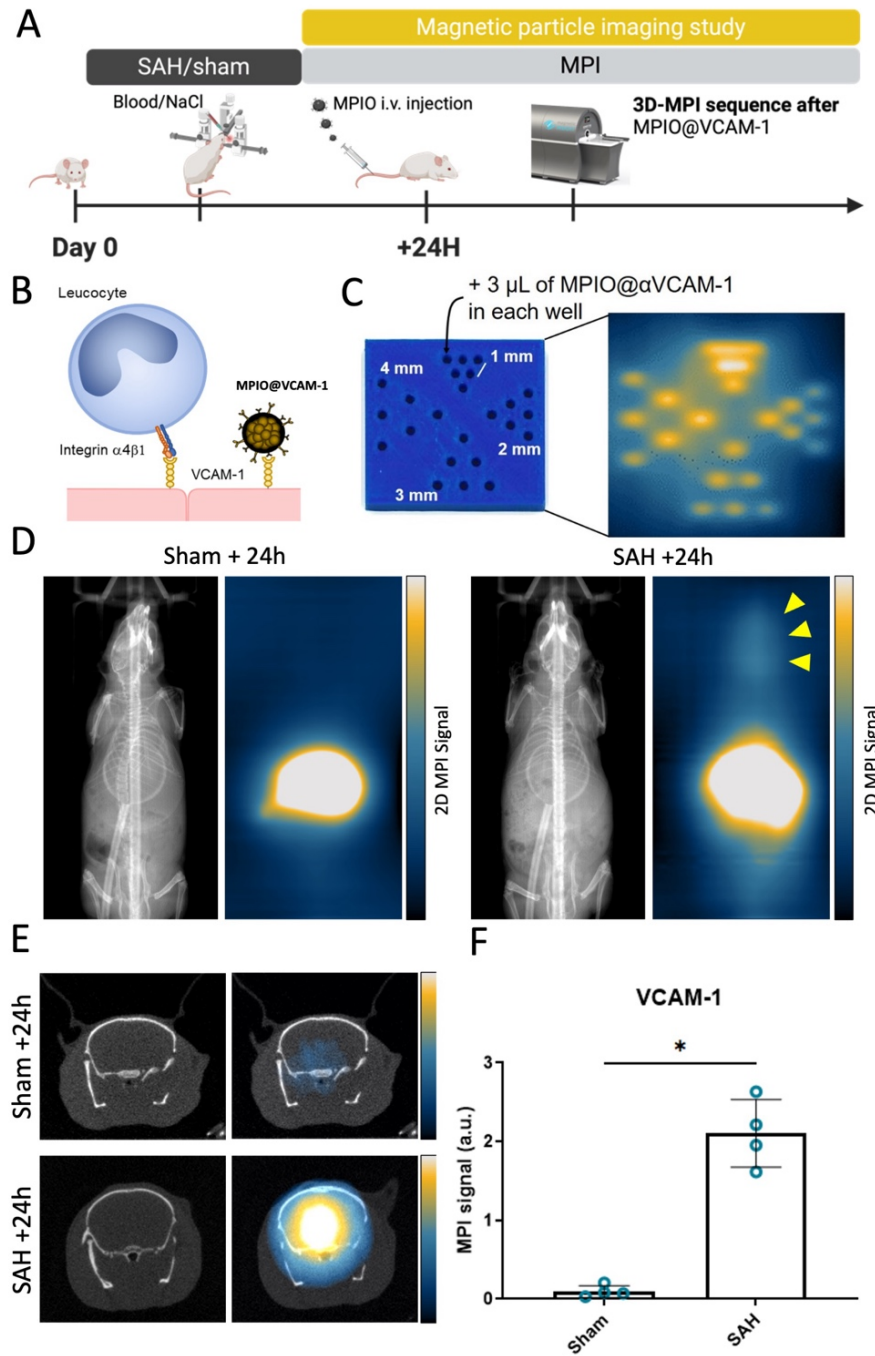
(A) Timeline of the procedure. (B) Representative T2\*-weighted images before and after successive intravenous injection of MPIOs targeted against @IgG, @P-Selectin and @VCAM-1 (up to 4 mg/kg equivalent iron) at 24 hours, 72h and 7 days after SAH. (C) Corresponding quantification of targeted MPIOs induced signal void in the brain ( $n = 4-5$ ). (D) Representative

T2\*-weighted images (three slices per animal) before and after intravenous injection of MPIO@ $\alpha$ VCAM-1 (4 mg/kg) 24 hours after SAH. (E) Representative immunofluorescence images of the cortex of mice at 24 hours after SAH and compared to sham. Col IV labels the endothelium. \* $P < 0.05$ .



**Figure 2. Study of the endothelial and thrombo-inflammatory markers at the acute phase of SAH.**

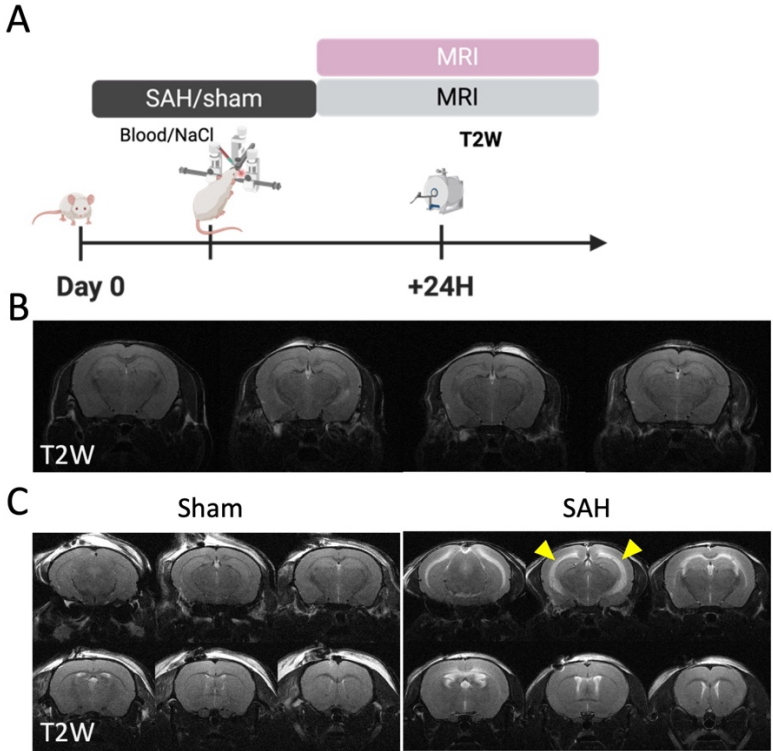
(A) Timeline of the procedure. (B) VCAM-1, (C) ICAM-1, (D) E-Selectin and (E) TNF RT-PCR expression profiles in sham, control and SAH mice after +1h, 24h and 7D. (F) VWF brain and (G) plasmatic expression profiles after SAH. (H) Representative immunofluorescence images of the cortex of mice at 24 hours after SAH and compared to sham showing that VWF is stored in small round bodies at the luminal surface of endothelial cells at basal conditions and secreted after SAH. PDCLX (podocalyxin) labels the endothelium. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ .



**Figure 3. Immuno-MPI reveals brain over-expression of VCAM-1 after SAH.**

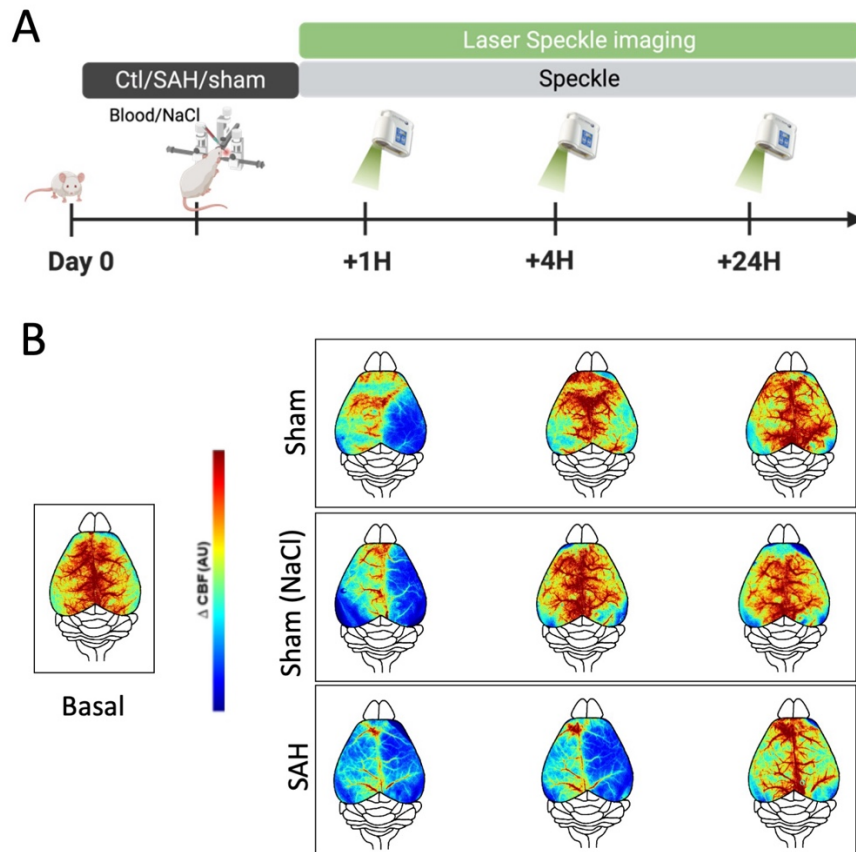
(A) Timeline of the procedure. (B) Schematic representation of the findings that MPIO@ $\alpha$ VCAM-1 binds VCAM-1 on the surface of endothelial cells, thereby mimicking activated leucocytes. (C) In vitro test of MPIO@VCAM-1 resolution. (D) Representative 2D CT-MPI images after intravenous injection of MPIO@VCAM-1 at 24 hours after SAH AS compared to controls (E) Representative CT-MPI images of the brain of mice showing MPIO@VCAM-1 signal in SAH group at 24h (F) Corresponding quantification of targeted MPIOs induced MPI in the brain in SAH at 24h as compared to sham ( $n = 4$ ). \* $P < 0.05$ .

Supplemental figures



**Supplemental figure 1. SAH promotes hydrocephalus.**

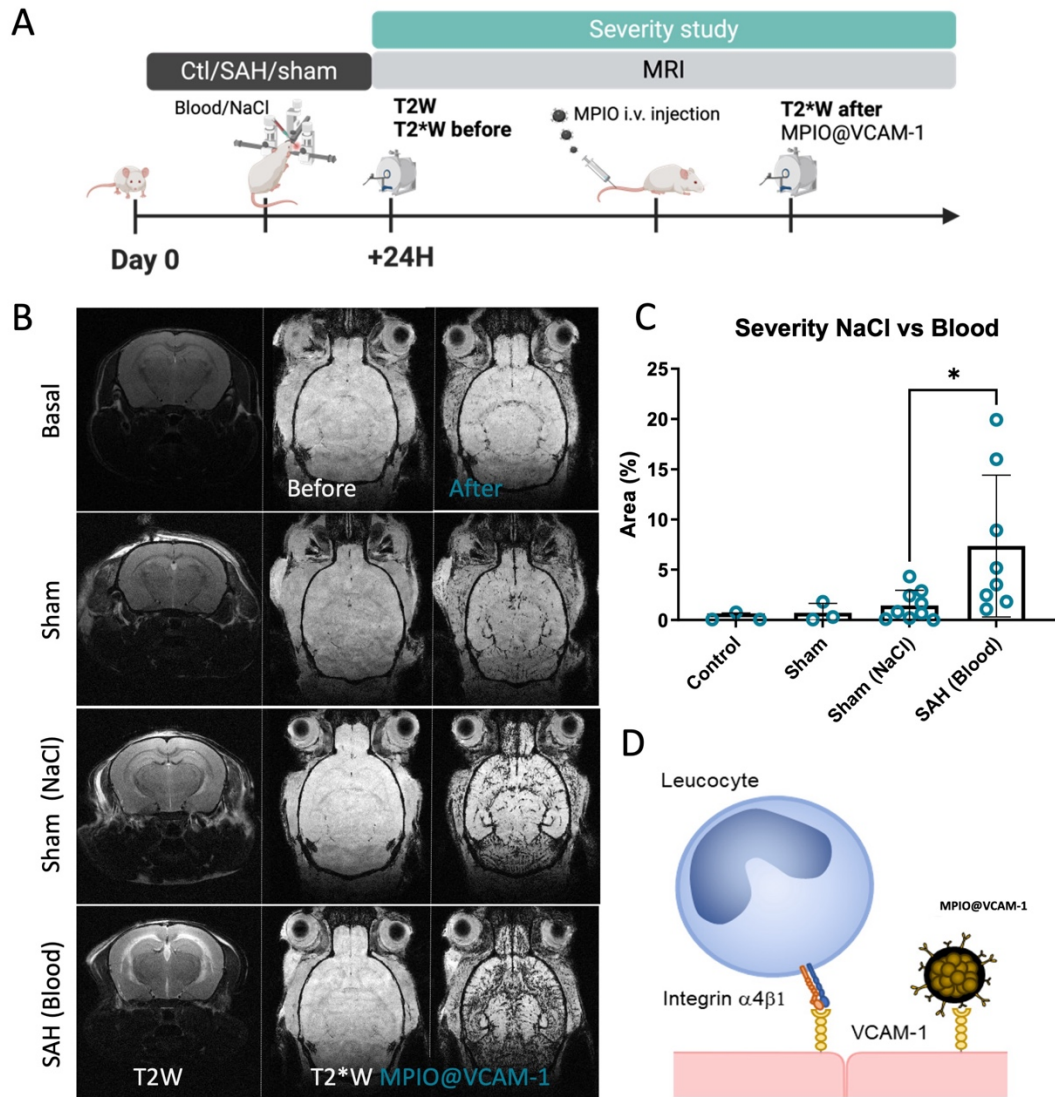
(A) Timeline of the procedure. (B) Representative T2-weighted images of 4 different animals at baseline conditions. (C) Representative T2-weighted images (six slices per animal) at 24 hours after SAH on sham, showing presence of hydrocephalus (yellow arrow heads) in the SAH group.



**Supplemental figure 2. Laser Speckle Imaging after SAH shows cerebral hypoperfusion several hours after SAH.**

**(A)** Timeline of the procedure. **(B)** Laser Speckle Imaging was used to assess the superficial cerebral blood flow (CBF) +1h, +4h and +24h after SAH model as compared to sham (NaCl) or sham (craniotomy only). Color intensities go from blue (low CBF) to red (high CBF).





**Supplemental figure 3. Immuno-MRI reveals degrees of VCAM-1 overexpression related to SAH severity.** (A) Timeline of the procedure. (B) Representative T2- and T2\*-weighted images before and after successive intravenous injection of MPIO@VCAM-1 at basal and 24 hours after sham (either craniotomy, + NaCl or SAH (blood) injection). (C) Corresponding quantification of targeted MPIOs induced signal void in the brain ( $n = 4$ ) showing blood injection promotes higher VCAM-1 signal compared to sham (NaCl,  $n = 4$ ).  $*P < 0.05$ . (D) Schematic representation of the findings that MPIO@ $\alpha$ VCAM-1 binds VCAM-1 on the surface of endothelial cells, thereby mimicking activated leukocytes.

## DISCUSSION

## 1. Caractérisation d'un modèle murin d'HSA et étude de survenue de l'ICR : de la théorie à la pratique.

Dans la première partie de mon travail, l'objectif était la caractérisation du modèle d'HSA chez la souris par injection directe de sang dans la citerne préchiasmatiche. L'objectif principal était d'étudier la survenue d'ICR, en s'appuyant sur sa définition clinique retenue depuis 2010, à savoir, la survenue d'un déficit moteur associé à la preuve d'une ischémie constituée à l'imagerie (et/ou en histologie). Afin d'augmenter la probabilité de survenue d'ischémie secondaire, nous avons fait le choix de développer un modèle plus sévère que celle du modèle initialement développé chez le rat, ceci en effectuant une double injection de sang dans la citerne préchiasmatiche, chacune étant espacée de 24 heures. Ce modèle n'avait pas encore été réalisé chez la souris, mais à l'issue de ce travail, j'ai pu conclure à sa faisabilité chez cette espèce. De plus, j'ai pu confirmer le caractère sévère de ce modèle, puisqu'il reproduit des complications liées à la gravité de l'HSA, notamment l'hydrocéphalie obstructive ou encore l'hémorragie intra-ventriculaire. Dans ce modèle, **nous n'observons pas d'ischémie cérébrale retardée lors du suivi en IRM dans les 7 jours suivant l'HSA**. En revanche, nous détectons de la mort neuronale en histologie, mais qu'il est donc difficile de rattacher à de l'ischémie secondaire telle que définie dans l'ICR, du moins en l'absence de corrélation à l'imagerie. Il a néanmoins été noté une baisse significative de l'activité locomotrice spontanée des animaux (sur leurs mouvements verticaux) 7 jours après HSA. Même si les autres tests comportementaux réalisés n'étaient pas modifiés, ce déficit de l'activité locomotrice spontanée est un résultat intéressant car observé à distance de l'HSA. Il n'est donc pas à rattacher *a priori* au saignement initial.

Le second objectif de cette première partie de projet était d'augmenter la durée de suivi des animaux après induction d'une HSA, mais aussi d'étudier la perfusion du système glymphatique à distance de l'HSA. Comme avancé dans notre introduction concernant les mécanismes physiopathologiques, le système glymphatique serait un des éléments pouvant favoriser la survenue d'ICR, par son rôle important dans le drainage du sang issu de l'HSA. La perturbation de ce système glymphatique serait alors à l'origine d'une réponse inflammatoire disproportionnée (Chen et al., 2020). Notre équipe a montré une altération de la perfusion glymphatique 24 heures après une HSA chez la souris (Gaberel et al. 2014). En revanche,

personne ne s'était encore intéressé au système glymphatique plus à distance du saignement initial. Pour cela, nous avons quantifié le signal en T1 issu du parenchyme cérébral, après injection dans la *cisterna magna*, de DOTA-gadolinium dont le faible poids moléculaire (750 Da) lui permet d'atteindre l'interstitium cérébral par cette voie. Notre travail a pu mettre en évidence une **altération persistante et significative de la fonction du système glymphatique 14 jours après HSA en IRM**. Cette technique a été proposée pour la première fois par Iliff *et al* en 2013 comme alternative à l'étude du transport de traceurs fluorescents (Iliff *et al.* 2013). Cette méthode permet l'étude du fonctionnement du glymphatique de manière aisée chez des animaux vivants et offre des possibilités de translation clinique, car l'étude de la diffusion du DOTA-gadolinium dans le LCS chez l'homme est d'ores-et-déjà réalisable (Eide *et al.* 2015). Le transport de molécules via le système glymphatique dépend de plusieurs facteurs : la pulsativité artérielle (Rennels *et al.* 1985), la perméabilité de l'espace périvasculaire (Gaberel *et al.* 2014; Luo *et al.* 2016), la présence de canaux Aquaporine-4 (AQP4) au niveau des pieds astrocytaires périvasculaires (Iliff *et al.* 2012) et le volume de l'espace interstitiel. Il avait été précédemment suggéré que la perte de fonction du glymphatique à la phase aiguë d'une HSA puisse être en rapport avec l'obstruction des espaces de Virchow-Robin par des dépôts de fibrine (Gaberel *et al.* 2014). A 14 jours, les microthrombi mis en évidence dans notre travail au niveau du parenchyme cérébral peuvent également participer à cette perte de fonction, en altérant la pulsativité artérielle de façon semblable aux thrombi intra-artériels à la phase aiguë d'un d'infarctus cérébral. Par ailleurs, nous avons mis en évidence chez les animaux avec HSA un déficit locomoteur à quatorze jours ainsi qu'une perte significative de poids. Afin de renforcer la pertinence clinique de notre travail, il serait intéressant de rechercher des déficits cognitifs qui constituent un trouble important persistant à distance par les patients qui survivent à la phase aiguë d'une HSA. Ces résultats peuvent être intéressants car ils orientent vers la possibilité de la persistance d'une phase prolongée dite « à risque » de survenue d'ICR à distance de l'HSA. Néanmoins, la conséquence clinique d'une obstruction chronique du flux glymphatique reste à établir. S'il existe une association entre dysfonction du glymphatique et déficit neurologique, nous ne pouvons pour l'instant établir de lien de causalité. Toutefois, nous pouvons émettre l'hypothèse, compte-tenu du rôle joué par le glymphatique dans le nettoyage des déchets du secteur interstitiel cérébral, d'une neurotoxicité prolongée des molécules libérées dans les suites immédiates d'une HSA : acides aminés excitateurs, molécules pro-inflammatoires, agents pro-oxydatifs, et composés neurotoxiques directement

issus du sang. De plus, il existe un lien avéré chez l'homme entre affection neurologique aiguë, comme le traumatisme crânien ou les AVC, et l'apparition secondaire de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Par conséquent, ces éléments peuvent ouvrir des perspectives thérapeutiques, notamment via l'administration intraventriculaire de thrombolytiques à la phase aiguë de l'HSA, essai multicentrique FIVHeMA dont les inclusions sont clôturées, et les résultats sont en attente (Gaberel et al. 2019).

## 2. Étude pré-clinique de l'ICR : quel modèle idéal ?

A l'issue de la première partie de ce travail de thèse, nous n'avons donc pas mis en évidence d'ischémie retardée sur ce modèle murin d'HSA. Nous nous sommes donc questionnés sur les données de la littérature à ce sujet. Ainsi, la seconde partie de ce projet de thèse a consisté en une revue systématique de la littérature préclinique sur les modèles murins d'HSA. A l'issue de ce travail, nous avons pu conclure qu'actuellement, **aucun modèle préclinique ne permet d'observer de l'ICR, notamment en imagerie, selon la définition précisée par les experts.** Nous avons constaté que la majorité des études avait comme critère de jugement l'étude du vasospasme après HSA, alors même qu'il est désormais bien établi que le vasospasme n'est qu'un mécanisme pouvant conduire à l'ICR, mais que sa pertinence clinique est mauvaise. Sur des essais cliniques de grande ampleur, l'administration de molécules permettant de réduire l'incidence du vasospasme angiographique, comme le Clazosentan, ne permettait pas d'obtenir de résultat significatif sur la mortalité ou encore le devenir neurologique (MacDonald et al. 2008). Par ailleurs, nous avons pu retrouver à travers cette revue de littérature que l'étude comportementale permettant d'évaluer la survenue d'un déficit neurologique chez les animaux n'était pas standardisée. Malheureusement, les tests utilisés sont peu discriminants pour la recherche d'un déficit focal tel que défini dans l'ICR. En ce sens, nous pouvons également nous questionner sur la **relevance clinique** de ces données expérimentales, d'une part en termes de qualité de critères de jugements utilisés, et d'autre part du fait de l'absence de standardisation des méthodes et critères utilisés. De même, il est difficile de connaître la **reproductibilité des résultats** obtenus compte tenu l'hétérogénéité des modèles et critères d'évaluations utilisés selon les études. Il faut cependant noter que cette revue de la littérature présente des limites. Par exemple, nous avons exclu notamment les études thérapeutiques,

puisque ces études n'ont pas comme objectif la caractérisation d'un modèle d'HSA mais davantage l'utilisation d'un modèle déjà décrit dont l'objectif est de tester une thérapeutique. Enfin, nous nous sommes focalisés sur les études qui concernent le rat et la souris. Des modèles d'HSA sont décrits sur des espèces telles que les lagomorphes, les chiens ou les primates non humains. Ce choix a néanmoins été fait en considérant que les rats et souris représentent la majorité des espèces utilisées dans les procédures expérimentales.

Dans le but d'améliorer la recherche fondamentale sur ce sujet, nous pouvons nous poser la question de ce que serait le modèle idéal pour étudier l'ICR. **Le modèle idéal doit répondre à certains critères prédéfinis.** Des recommandations en ce sens ont été émises dans le domaine de l'expérimentation animale pour les modèles d'AVC ischémiques (Van Der Worp et al. 2005) ou hémorragiques (Frantzas et al. 2011).

Il s'agit donc, dans le cadre de l'HSA, de tendre vers un modèle qui répond à plusieurs objectifs :

- Ce modèle doit permettre une étude standardisée de l'ICR à travers une évaluation comportementale précoce et plus tardive (tests moteurs, sensitifs et cognitifs), associée à une évaluation histologique, mais surtout en imagerie. En effet, il semble davantage pertinent sur le plan clinique de privilégier une méthode de diagnostic de l'ischémie en imagerie pour plusieurs raisons. D'une part parce qu'il s'agit de la base du diagnostic d'ICR chez l'homme telle que défini par les experts. D'autre part, dans un but de respect de l'éthique animale, il paraît pertinent d'utiliser l'imagerie non invasive, conférant un degré de souffrance légère à modérée durant la procédure, et qui va permettre un suivi longitudinal d'un même animal. De plus, la majorité des études de l'ischémie après HSA a utilisé des méthodes d'histologie non standardisées. L'étude histologique empêche également le suivi longitudinal d'un même animal.
- Le modèle « idéal » doit également être reproductible. En effet, à travers cette revue de la littérature, il est intéressant de noter que la confirmation de l'HSA n'est que très rarement réalisée. Il est donc difficile d'affirmer, pour ces modèles, leur caractère reproductible.
- La question de l'espèce utilisée pour le modèle est aussi primordiale. En effet, la majorité des études est faite chez le rongeur, permettant de réaliser un plus grand nombre d'expérimentations. De plus, l'utilisation de souris ou de rats va permettre de

façon aisée un accès à des espèces génétiquement modifiées, ce qui ouvre des perspectives intéressantes pour la compréhension mécanistique de la physiopathologie de l'HSA et de ses complications, mais également un intérêt en termes de thérapeutiques. Dans le but de se rapprocher au mieux des caractéristiques physiologiques de l'espèce humaine, l'approche avec des primates non humains semble être la plus pertinente, mais elle a bien sûr des limites en termes réglementaire et éthique, et avec un coût qui ne permet pas d'envisager des expérimentations avec un nombre important d'animaux.

Nous espérons donc que le choix d'un modèle d'HSA « idéal » permettant l'étude de l'ICR à travers **l'association d'une imagerie et d'une évaluation neurocomportemental standardisée, permettra d'améliorer la qualité de la recherche translationnelle** sur ce sujet.

### 3. Caractérisation de l'ICR sur des modèles précliniques : vers de nouveaux outils d'imagerie !

A travers notre revue de la littérature préclinique et après notre expérience sur l'utilisation d'un modèle d'HSA chez la souris, nous pouvons conclure que **la mise en évidence d'ICR par le biais d'une imagerie cérébrale d'utilisation usuelle chez l'homme apparait difficile chez le petit animal**. Les raisons de ces difficultés qui peuvent être avancées sont multiples. En effet, la pertinence des modèles utilisés peut être remise en question. Ces modèles sont-ils trop éloignés de la physiopathologie humaine ? La sévérité des modèles est-elle suffisante ? La temporalité à laquelle sont réalisées les imageries est-elle pertinente, et notamment est-elle corrélée à la survenue d'un déficit neurologique ? Un suivi standardisé par imagerie cérébrale a peu de pertinence clinique. En effet, en pratique clinique, l'ICR est suspectée lorsque le patient présente une modification de son examen neurologique, cette suspicion sera confirmée ou non par la preuve d'une ischémie visualisée par IRM ou au scanner cérébral. *Serait-il plus pertinent d'imager, toujours de façon non (ou mini) invasive, des mécanismes impliqués plus précocement qu'une ischémie déjà constituée à l'IRM ?* C'est en ce sens, que nous nous sommes intéressés à la phase précoce d'*early brain injury*, nous avons donc testé la faisabilité de l'utilisation de nouvelles techniques d'imagerie moléculaire, permettant la détection de mécanismes à l'origine de l'ICR. Plus spécifiquement, notre objectif a été de caractériser les **mécanismes d'activation endothéliale** à la phase précoce post-HSA grâce à

l'utilisation de l'IRM moléculaire, technique développée dans notre laboratoire dans le cadre d'autres pathologies. Nous discuterons également dans cette partie la possibilité d'accès à d'autres outils d'imagerie tel que le MPI avec ce même objectif. Notre intérêt se portera enfin sur la visualisation de la **micro-circulation**.

*a) L'IRM moléculaire : validation dans l'HSA d'un outil de détection de l'activation endothéliale.*

A l'issue de ce travail, nous avons pu mettre en évidence en IRM moléculaire une importante activation endothéliale caractérisant cette phase précoce d'*early brain injury* post-HSA. Ainsi, nous avons donc pu observer une **expression importante et spécifique de VCAM-1 à la phase aiguë (24 heures), et dans une moindre mesure, à la phase subaiguë (72 heures)**. L'expression de VCAM-1 était significativement plus basse chez les animaux contrôles et SHAM. Ce résultat était corrélé avec l'expression des ARNm codant pour VCAM-1 au niveau cérébral, mesurée par technique de RT-PCR. Il est intéressant de noter qu'il n'a pas été détecté de persistance d'activation endothéliale retardée à 7 jours. Ce résultat est à mettre en parallèle avec ce que nous avons pu observer dans la première partie de notre travail de thèse, concernant l'absence de survenue d'ICR pour ce modèle d'HSA. En effet, ce résultat est à remettre dans le contexte des données de la littérature qui suggèreraient pourtant une élévation des biomarqueurs d'activation endothéliale (P-sélectine dans le plasma et VCAM-1 dans le LCS) chez les patients qui vont développer une ICR (Polin et al. 1998; Frijns et al. 2006). Nous pouvons donc conclure, grâce à **l'imagerie moléculaire cérébrale, à l'existence d'une activation endothéliale associée à l'*early brain injury* après HSA**. Cette technique ouvre donc des possibilités en terme de stratégie diagnostic précoce.

Dans le laboratoire, il a été démontré, dans des modèles murins d'autres pathologies neurologiques, que l'utilisation de l'immuno-IRM permet de détecter l'activation endothéliale avec une excellente sensibilité et spécificité (Gauberti et al. 2018). Ainsi, les MPIO-VCAM-1 permettent de détecter l'inflammation post-ischémie cérébrale mais également autour des hématomes intracrâniens (Fournier et al. 2017). Les MPIO-P-Sélectine révèlent l'activation endothéliale post accident ischémique transitoire (Quenault et al. 2017), et la neuroinflammation cérébrale et médullaire dans des modèles de sclérose en plaques (Bonnard



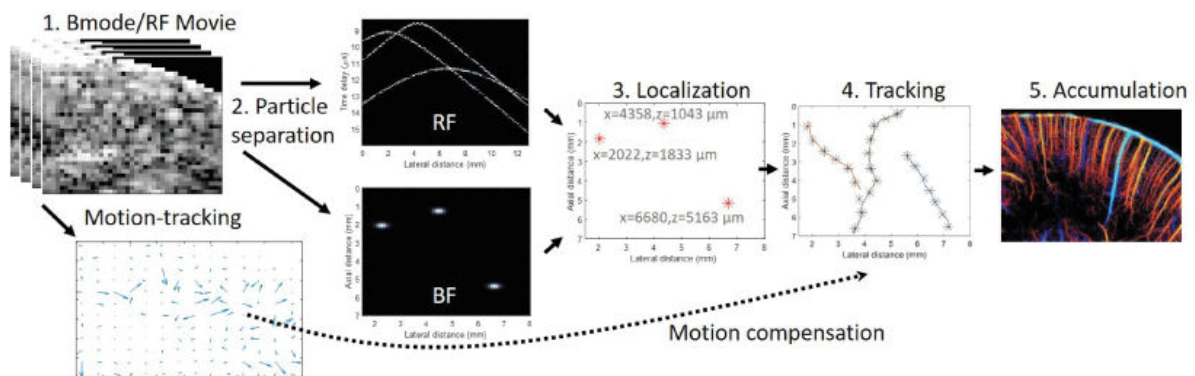
et al. 2019). D'autres molécules d'adhésion sont également pertinentes pour d'autres lits vasculaires (MPIO-MAdCAM-1 pour l'inflammation intestinale par exemple) (Fournier et al. 2020). **Les limites principales de ce type d'agent sont leur non-biocompatibilité, mais aussi la faible sensibilité de l'IRM pour détecter des agents de contraste exogènes.** Pour pallier ces problèmes, notre équipe a synthétisé des MPIO biocompatibles et biodégradables (de Lizarrondo et al. 2022). Ainsi, une nouvelle famille d'agents de contraste a été développée pour l'IRM moléculaire par un mécanisme d'autoassemblage de nanocristaux d'oxyde de fer en présence de dopamine. Les particules produites (M3P, de l'ordre du micromètre) sont biodégradables et contiennent 40000 fois plus de matériel supra-magnétique que les MPIO commerciales. Dans cette étude faisant preuve de concept, les particules M3P ont été ciblées contre des marqueurs de l'inflammation à l'aide d'anticorps monoclonaux. Ceci a permis de cartographier l'inflammation cérébrale de façon spécifique avec une résolution de 100 microns chez la souris dans des modèles d'encéphalopathie et de pathologies neurovasculaires. Enfin, il a pu être mis en évidence l'absence de toxicité de ces M3P avec l'incorporation progressive de l'oxyde de fer au sein du pool ferrique de l'organisme. Donc, dans des perspectives translationnelles directes chez l'homme, le caractère ultrasensible, le profil sécuritaire et la biodégradabilité de ces nouvelles particules en font une entité particulièrement attrayante pour l'avenir.

*b) La microscopie par localisation ultrasonore (ULM) : imager la microcirculation dans l'HSA au lit du patient ?*

Les techniques actuelles de visualisation de la microcirculation sont souvent invasives et limitées en profondeur (micro-CT *ex vivo* ou microscopie de surface). **La microscopie par localisation ultrasonore offre une résolution spatiale du système vasculaire au-delà de la limite de diffraction acoustique, en suivant des microbulles intravasculaires isolées par échographie ultra rapide.** C'est pourquoi, la possibilité d'imager la microcirculation paraît particulièrement pertinente dans l'ICR.

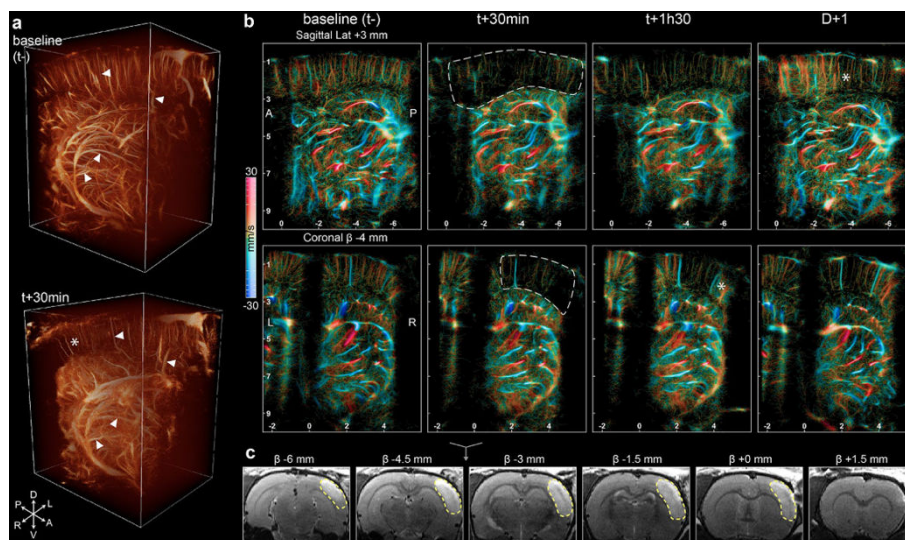
Tout d'abord, il faut décrire brièvement les différentes techniques utilisées en combinaison pour aboutir à l'ULM. L'échographie en mode contraste (CREUS) utilise des microbulles de gaz inertes (agents de contraste), encapsulées dans une membrane phospholipidique. Ces microbulles, de quelques micromètres de diamètre, vont être injectées par voie intra-veineuse

et diffusent dans les structures vasculaires des différents organes, puis sont éliminées naturellement. Le temps d'arrivée de ces microbulles dans les différents organes est caractéristique de l'état perfusionnel de l'organe exploré. Cette méthode d'échographie de contraste est couramment utilisée en clinique afin d'évaluer la perfusion tissulaire. Les agents de contraste ultrasonores utilisés sont biocompatibles. Nous pouvons retrouver les Sonovue® utilisées en Europe, qui ont un diamètre de 0,6 à 4,5  $\mu\text{m}$  et sont considérées comme les plus sûres en utilisation clinique. Cependant, l'échographie conventionnelle est limitée en terme de cadence d'imagerie. Ainsi, l'utilisation de l'échographie ultrarapide a permis d'atteindre une cadence beaucoup plus élevée, améliorant donc la résolution temporelle. Cette amélioration a pu être appliquée à l'imagerie de contraste et ainsi a permis un meilleur suivi des microbulles (Couture. 2016.). L'échographie super résolue est une technique d'imagerie ultrasonore, inspirée de la microscopie par localisation optique inventée dans les années 2000. La super résolution a ensuite été transférée dans le domaine de l'ultrason grâce à l'injection de microbulles telles que les Sonovue®, qui sont particulièrement échogènes. Les étapes aboutissant à une **cartographie vasculaire** super résolue grâce à l'ULM sont décrites ci-dessous (figure 28).



**Figure 28 :** différentes étapes de l'ULM d'après (Couture et al. 2018). 1/ la première étape consiste en l'acquisition d'images échographiques, sans mouvement, dans lesquelles des microbulles intravasculaires sont visibles 2/ une fois l'acquisition enregistrée, les images sont filtrées afin de rehausser le signal des microbulles par rapport aux tissus 3/ localisation des fonctions d'étalement du point (ou PSF, *Point Spread Function*) générées par les microbulles et réhaussées par le filtrage 4/ retracer la trajectoire des microbulles localisées précédemment 5/ accumulation et affichage afin de finaliser une image super-résolue.

Des études précliniques, notamment chez le rat et la souris, ont montré des résultats très encourageants pour pouvoir d'ores et déjà **transposer cette technique d'imagerie non invasive chez l'homme** (Chavignon et al. 2022; Demené et al. 2021; Chavignon et al. 2022; Hingot et al. 2020). Pour exemple, chez le rat ayant eu une craniectomie, l'ULM a permis la visualisation de vaisseaux de diamètre de l'ordre de  $9\ \mu\text{m}$  à environ 12 mm de profondeur (Errico et al. 2015). Outre le fait que la résolution soit excellente, cette étude a montré que l'imagerie non invasive en profondeur *in vivo* est possible en ULM. Plus récemment, des modèles d'AVC ischémiques et hémorragiques ont été reproduits chez le rat (figure 29) (Chavignon et al. 2022). Ces travaux ont mis en évidence, à la phase précoce de l'AVC ischémique, une vaste zone corticale siège d'une hypoperfusion dans le territoire de l'artère occluse. Dans le cadre du modèle d'AVC hémorragique, l'hypoperfusion était plus diffuse.

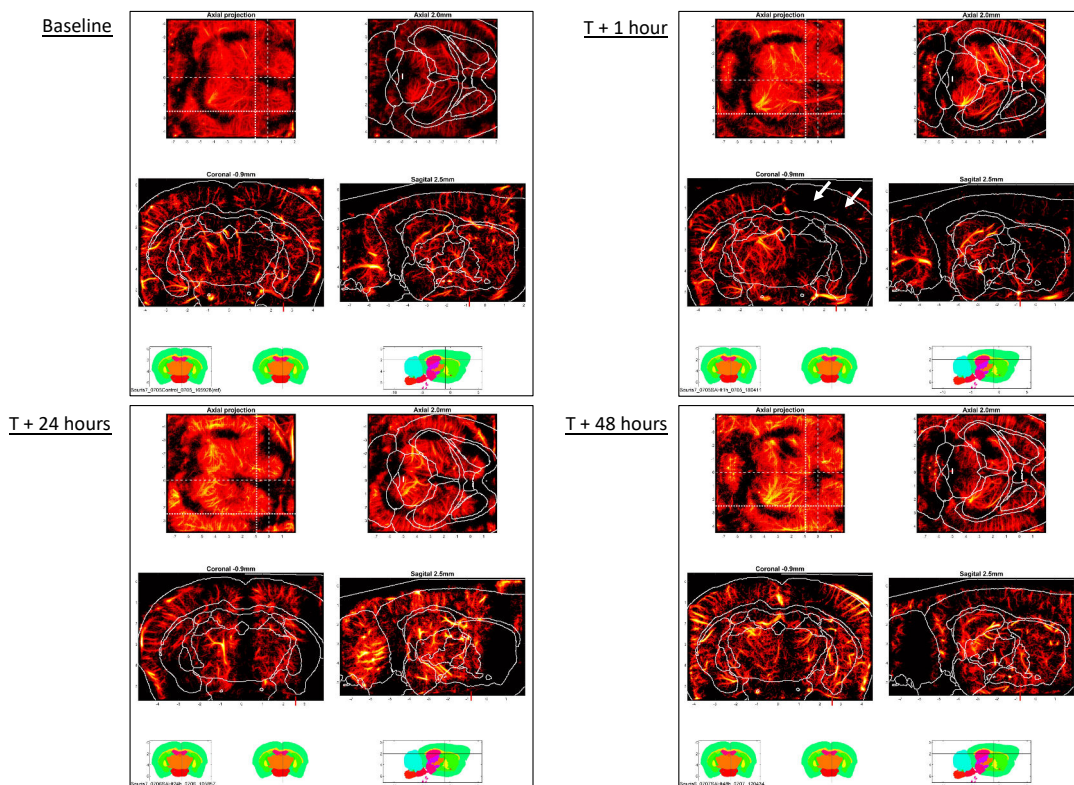


**Figure 29** : modèle d'AVC ischémique par occlusion de l'ACM chez la souris, étudié en ULM à la phase aiguë d'après (Chavignon et al. 2022).

**a/** images 3D avant et 30 min après induction de l'AVC **b/** coupes sagittales et coronales de 600  $\mu\text{m}$  d'épaisseur avec rendu des vitesses à différents temps. Zone d'ischémie corticale délimitée par les pointillés blancs. Vitesse max 30 mm/s. Flux ascendant rouge et flux descendant bleu. **c/** IRM séquence T2 à J1 avec zone d'ischémie constituée délimitée par la zone de pointillé jaune

Plus récemment, les études cliniques ont vu le jour avec la réalisation de cartographies vasculaires du rein (Huang et al. 2021), du foie (Huang et al. 2021), des membres inférieurs (Harput et al. 2018) ou encore au niveau cérébral en trans-crânien avec l'étude d'un anévrisme cérébral (Demené et al. 2021)

Afin de caractériser la microcirculation cérébrale en ULM3D dans la pathologie de l’HSA chez le petit animal (projet ERC-POC Stroke Monitor, Dr Couture), le Dr Georges Chabouh, post-doctorant dans l’équipe du Docteur Olivier COUTURE (laboratoire d’Imagerie Biomédicale à Sorbonne Université), a pris en charge les procédures d’imagerie par ULM et le traitement des images, sur les souris soumises à notre modèle d’HSA (par injection unique de sang dans la citerne préchiasmatiche). Nos résultats préliminaires (7 animaux seulement), suggèrent à la phase aiguë sur l’acquisition réalisée 1 heure après HSA, une perte de signal du côté homolatéral à l’injection de sang, correspondant à une zone hypoperfusée. Ce signal est restauré 24 heures post-hémorragie (figure 30). Le calcul du coefficient de diffusion en oxygène n’a pas mis en évidence de différence entre les animaux hémorragiques et contrôles (total n=7).



**Figure 30 : suivi longitudinal en ULM 3D d’une souris HSA.**

Visualisation à la phase aiguë 1 heure après HSA d’une zone corticale avec un defect perfusionnel (flèches blanches), du côté homo latéral à l’injection de sang. Restauration quasi-totale de ce même territoire vasculaire à 24 puis 48 heures.

### c) L'IPM : une technique d'imagerie pertinente dans l'HSA ?

Au cours de cette thèse, nous avons pu tester pour la première fois l'utilisation de l'imagerie par particules magnétiques moléculaires dans le cadre de la pathologie de l'HSA. Suivant le même protocole expérimental que pour l'immuno-IRM, nous avons réalisé une acquisition en MPI de l'ensemble du corps des souris HSA et contrôles. Nous avons observé, après injection de MPIO@VCAM-1, une hyperfixation significative et diffuse de l'ensemble du parenchyme cérébral 24 heures après hémorragie, qui révèle la présence d'une activation endothéliale précoce. Nous pouvons noter l'absence totale de signal chez les animaux contrôles. Ces résultats en MPI viennent appuyer les résultats obtenus en immuno-IRM et ainsi confirmer la présence d'une activation endothéliale cérébrale précoce associée à la phase d'*early brain injury* sur ce modèle d'HSA. Malgré le faible effectif, ces résultats sont encourageants, nouveaux dans cette pathologie et viennent compléter les résultats obtenus par l'équipe avec l'IPM dans des modèles d'inflammation systémique et cérébrale (Lizarrondo et al. 2023). L'inflammation cérébrale n'est pas spécifique de l'HSA, néanmoins en vue d'une translation chez l'homme, la **détection d'une inflammation précoce, qui puisse être quantifiable**, aurait un intérêt pronostique voire thérapeutique à explorer. En effet, cet imageur présente l'intérêt principal d'être transposable en pratique clinique. Des études de faisabilité ont déjà été publiées, en particulier sur la réalisation de mesure du débit sanguin cérébral dans les pathologies neurovasculaires, avec l'utilisation de traceurs validés comme Resovist® ou Feraheme® (Graeser et al. 2019). Cette technique d'imagerie est décrite comme étant réalisable « au lit du patient », l'**intérêt en soins critiques** serait donc majeur puisqu'il permettrait d'éviter des transports intra-hospitaliers pour la réalisation d'imageries itératives, tout en permettant un suivi longitudinal non invasif. Bien que cette technique soit très séduisante en terme de transfert vers la clinique chez l'homme, il faut néanmoins rappeler les principales limites de l'IPM actuellement, qui sont sa résolution spatiale ainsi que son coût.

### 4. Facteur Von Willebrand et ICR : Intérêts diagnostique et thérapeutique ?

Nous nous sommes aussi intéressés à la thromboinflammation et plus particulièrement au VWF et son rôle possible dans la survenue de l'ICR. Pour ce faire, nous avons quantifié l'expression cérébrale et le relargage systémique du VWF. Nous avons pu observer une

augmentation significative de l'expression du VWF à l'étage cérébral ainsi qu'une augmentation significative de sa sécrétion plasmatique à la phase aiguë 24 heures après HSA, comparativement aux animaux contrôles. Ceci a permis de montrer que l'expression protéique à l'étage cérébral et la sécrétion plasmatique se produisent au même moment que l'activation endothéliale. En effet, pour rappel, les résultats sur ce même travail ont mis en évidence en IRM moléculaire une activation endothéliale importante 24 heures après HSA. **Le VWF est donc sécrété lors de la phase aiguë de l'activation endothéliale et son expression augmente dans le même temps, reflétant probablement la reconstitution du « pool » de VWF.** Il nous semble à ce stade pertinent de faire un état des lieux de la littérature sur le VWF dans l'HSA, avant de discuter de son implication dans l'utilisation de nouveaux outils d'imagerie. Enfin, le rôle du VWF en tant que cible thérapeutique sera discuté.

#### *a) Contexte HSA et VWF*

La microthrombose est donc impliquée dans la survenue de l'ICR (Vergouwen et al. 2008; Stein et al. 2006; Sabri et al. 2012; Friedrich et al. 2012; Suzuki et al. 1990). La formation des microthrombi résulte de l'activation de l'hémostase primaire et secondaire, et l'inhibition de la fibrinolyse. L'hémostase primaire implique une activation de l'endothélium avec le relargage et l'exposition du VWF, puis le recrutement et l'activation plaquettaire, et enfin la phase d'agrégation. Les microthrombi se composent principalement d'un agrégat de plaquettes, de fibrine et souvent de leucocytes (Suzuki et al. 1990). Le VWF plasmatique est principalement synthétisé et sécrété par les cellules endothéliales. Son expression et sa libération sont augmentées lorsque les cellules endothéliales sont activées (Ruggeri et al. 1992). En effet, le VWF nouvellement synthétisé est stocké dans les corps de Weibel-Palade et relargué en réponse à une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires. Donc, une augmentation du taux plasmatique de VWF peut être secondaire à une dysfonction des cellules endothéliales et pourrait prédisposer aux phénomènes de thrombose. Des études ont montré que **l'accumulation plasmatique de multimères de VWF était associée à la formation de thromboses artérielles** comme l'infarctus du myocarde ou l'AVC ischémique (Horii et al. 2008; Sonneveld et al. 2014). La protéase plasmatique ADAMTS13 régule la fonction du VWF en le clivant au niveau de son domaine central A2. Il en résulte une diminution du taux plasmatique de VWF dans sa forme multimérique, pouvant ainsi réduire son effet pro-thrombotique en

inhibant son activité hémostatique. Le rôle joué par l'interaction étroite entre ADAMTS13 et VWF dans la formation de microthrombi a bien été démontré, notamment dans la pathologie du purpura thrombotique thrombocytopénique.

La caractérisation du VWF et de l'ADAMTS13 chez l'homme et leur lien avec la microthrombose et la survenue d'ICR ont donc déjà fait l'objet d'études chez l'homme (Vergouwen et al. 2009c). Une méta-analyse réalisée par l'équipe de Vergouwen *et al.* a permis d'inclure un total de 24 études qui se sont intéressées à 39 biomarqueurs explorant l'hémostase et la fibrinolyse après HSA (Boluijt et al. 2015). La méta-analyse conclut à l'époque qu'aucun des biomarqueurs étudiés ne permet de diagnostiquer ou de prédire la survenue d'ICR. De même, elle met en avant le fait que les patients qui vont présenter une ICR ont un taux plasmatique de VWF et de facteur d'activation plaquettaire plus élevé 5 à 9 jours après HSA, et un taux de facteur tissulaire plus élevé dans le LCS 5 à 9 jours après HSA, comparé aux patients qui n'ont pas d'ICR. Les auteurs insistent néanmoins sur la faible robustesse des études retenues. De façon intéressante, sur une cohorte de 40 patients victimes d'HSA, il a été montré une augmentation significative du taux plasmatique de VWF (dosage des antigènes) comparativement aux sujets sains, associée à une réduction de l'activité ADAMTS13 (Kumar et al. 2017). Le suivi des dosages plasmatiques était effectué sur une période de 10 jours après rupture anévrismale. Les auteurs ont pu mettre en évidence une association entre la réduction de l'activité ADAMTS13 corrélée à une augmentation de la mortalité, et la sévérité de la maladie. Ils concluent donc à la présence d'une association significative, mais ne permettant pas d'établir un lien de causalité entre les dosages plasmatiques de VWF et ADAMTS13 et la morbi-mortalité, d'autant que l'augmentation du VWF plasmatique n'est pas spécifique de cette pathologie. Ces résultats sont confortés par une autre étude sur 83 patients, qui a permis d'observer une corrélation entre les dosages de VWF, du marqueur moléculaire d'activation plaquettaire GMP-140 (glycoprotéine-140 de membrane plaquettaire), d'ADAMTS13 et la survenue de vasospasme et ICR (W.-H. Li et al. 2017). De même, Qi-Feng *et al.* ont pu observer sur une cohorte de 54 patients avec une HSA, qu'une augmentation du VWF plasmatique associée à une baisse de l'activité ADAMTS13 (illustré par l'utilisation du rapport VWF/ADAMTS13), était associée à la survenue d'ICR et à une évolution neurologique défavorable (Qi-Feng Tang et al. 2015). Pour faire un parallèle dans le domaine pré-clinique, il a été observé que des souris « knock out » pour l'ADAMTS13 (*Adamts 13<sup>-/-</sup>*) présentaient une zone plus large de microthrombose cérébrale, comparées aux souris sauvages.

L'administration d'ADAMTS13 recombinant permettait de réduire l'extension de la microthrombose (Vergouwen et al. 2014). La même équipe s'est intéressée plus tard à la phase plus précoce, mais qui pourrait jouer un rôle clé dans la pathogénicité de l'ICR, qui est la phase de lésion cérébrale précoce (ou « *early brain injury* ») (Wan et al. 2018). En effet, cette phase qui débute immédiatement après le saignement est à l'origine d'une stimulation de l'agrégation plaquettaire (Friedrich et al. 2010). Dans cette étude qui a utilisé des souches « *knock out* » de souris pour VWF et ADAMTS13, il a pu être mis en avant le rôle du VWF dans la pathogénicité des lésions cérébrales précoces. Cette étude conforte également les résultats précédents sur l'intérêt de l'administration d'ADAMTS13 recombinant qui diminuait l'activation microgliale et la perte neuronale, 2 heures après l'HSA induite par injection directe de sang en préchiasmatisque chez la souris.

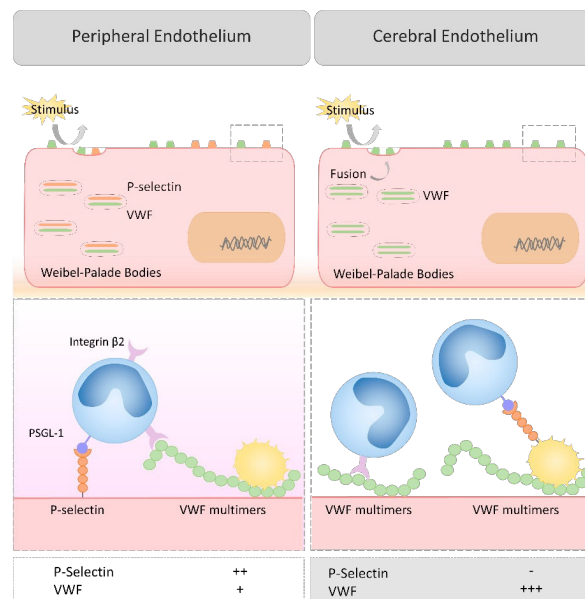
Pour résumer, le dosage de biomarqueurs explorant l'hémostase a permis d'établir une **association entre l'augmentation du VWF et la survenue d'ICR**. Actuellement, les données sont insuffisantes pour l'utiliser en routine en tant que biomarqueur diagnostique et pronostique. De plus, par des contraintes techniques, **son dosage plasmatique et intra-thécal en pratique pour un suivi longitudinal paraît difficilement réalisable**. Néanmoins, toutes ces études ouvrent des pistes d'exploration du VWF qui nous permettent d'envisager des perspectives thérapeutiques. En effet, l'essor d'études expérimentales sur le VWF, avec pour exemple la mise au point d'un modèle murin qui permet de caractériser l'effet antithrombotique de certaines molécules ciblant le VWF humain, et permet d'envisager des études dans la pathologie de l'HSA (Navarrete et al. 2012) .

#### *b) Perspective diagnostique : l'utilisation de l'IRM moléculaire du VWF ?*

Comme nous l'avons vu, les processus de thrombose et d'inflammation sont étroitement liés dans l'HSA mais également dans de nombreuses pathologies neurovasculaires. Pour exemple, dans l'AVC ischémique, la phase initiale ischémique se traduit par une activation endothéliale. Les cellules endothéliales modifient alors leurs phénotypes pour passer d'un phénotype anti-thrombotique à un phénotype pro-thrombotique. Ceci aboutit secondairement à l'adhésion des leucocytes à la paroi vasculaire et à l'occlusion de micro-vaisseaux (microthrombose), ce qui est à l'origine d'une aggravation des lésions cérébrales initiales. Cette thrombose induite par l'inflammation est à l'origine du concept de thromboinflammation, qui est considéré



aujourd’hui comme ayant un rôle majeur dans la physiopathologie de nombreuses pathologies neurovasculaires (De Meyer et al. 2016). Au niveau cérébral, les mécanismes qui permettent l’adhésion des plaquettes et des leucocytes à la paroi vasculaire, à la phase précoce de l’activation endothéliale, ne sont pas connus parfaitement. Dans la plupart des organes, la molécule d’adhésion p-selectine intervient dans la phase de roulement des leucocytes sur les cellules endothéliales. P-sélectine est exprimée par des cellules endothéliales au repos et est stockée dans les corps de Weibel-Palade. Lorsque l’activation endothéliale survient, on assiste à un relargage des corps de Weibel-Palade, permettant l’exposition de P-sélectine. Dans les suites, les plaquettes et leucocytes vont alors interagir avec P-selectine par la liaison du ligand 1 de la glycoprotéine de P-sélectine (PSGL-1), qui va déclencher la cascade de la thromboinflammation. Cependant, les cellules endothéliales cérébrales n’expriment pas la P-sélectine (Barkalow et al. 1996) . Au niveau cérébral, de plus en plus de données suggèrent que le VWF, lui aussi stocké dans les corps de Weibel-Palade, pourrait jouer le même rôle que la P-selectine dans ces situations (figure 31).



**Figure 31 : rôles de P-sélectine et VWF au niveau de l’endothélium périphérique et cérébral**

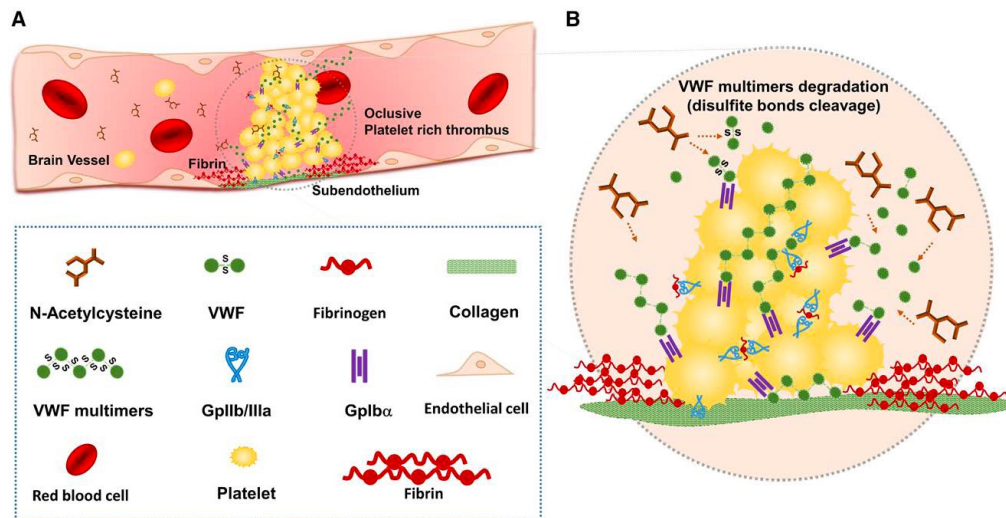
Alors que les corps de Weibel-Palade contiennent du VWF et P-sélectine au niveau de l’endothélium périphérique, ils ne contiennent pas de P-selectine au niveau cérébral. Ainsi, les mécanismes par lesquels les leucocytes et les plaquettes adhèrent aux cellules endothéliales activées dans les premiers instants après activation (avant l’expression de toutes les molécules d’adhésion) est encore mal connu dans le cerveau. Des résultats suggèrent que le VWF pourrait « remplacer » P-sélectine par liaison directe ou indirecte avec les leucocytes.

Le VWF est une protéine multimérique exprimée par les cellules endothéliales et les plaquettes. Il est exprimé de façon importante au niveau cérébral, notamment au niveau des microvaisseaux, mais son rôle n'est pas complètement élucidé. Plusieurs travaux suggèrent que les leucocytes peuvent adhérer au VWF par des mécanismes directs et indirects. Au moment de l'activation endothéliale, le VWF qui est stocké va être relargué et apparaître à la surface de l'endothélium où il reste ancré (Kawecki et al. 2017). Il a été montré que les leucocytes pouvaient se lier de façon directe au VWF par le biais d'interactions entre leucocytes-intégrine $\beta$ 2 spécifique et PSGL-1 et le domaine N-terminal du VWF englobant les domaines D'-D3-A1 (Pendou et al. 2006). L'autre mécanisme indirect décrit est celui dans lequel les leucocytes adhèrent aux plaquettes qui adhèrent au VWF, à la surface des cellules endothéliales activées. Ce mécanisme pourrait intervenir lorsque les mécanismes classiques d'adhésion plaquettaire sont dépassés, en particulier lorsque les contraintes de cisaillement sont importantes (Bernardo et al. 2005). Pour renforcer ces résultats, l'équipe de Cécile Denis a pu démontrer que l'absence de VWF au niveau des cellules endothéliales était corrélée à un déficit de recrutement des leucocytes chez la souris (Denis et al. 2001). Le VWF pourrait donc créer une **zone d'adhésion à la surface des cellules endothéliales activées**, afin de capturer les leucocytes et les plaquettes, et ainsi initier la cascade de la thromboinflammation. Dans ce contexte, la **détection non invasive du VWF exposé par les cellules endothéliales** est un réel enjeu, puisqu'il permettrait de révéler les toutes premières étapes de la cascade de la thromboinflammation, et donc de pouvoir la prévenir. L'incapacité de détecter l'activation endothéliale, avant la thromboinflammation et la diapédèse des leucocytes, fait partie des limitations des outils d'imagerie actuels qui ciblent des molécules d'adhésion classiques comme ICAM-1 ou VCAM-1 qui mettent plusieurs heures à être exprimées et exposées à la surface de l'endothélium. En pratique clinique, cela permettrait d'introduire des thérapeutiques ciblées sur la thromboinflammation avant la survenue de dommages secondaires irréversibles. C'est en ce sens que le projet FLAMRING (unmasking thromboinFLAMmation using molecular magnetic Resonance ImaING), mené par les Dr Martinez de Lizarondo et Dr Lenting a pour objectifs 1/ l'identification et la caractérisation de nanobodies ciblant le VWF puis 2/ la production d'un agent de contraste pour IRM de type MPIO couplé aux nanobodies identifiés pour révéler la thromboinflammation de façon non invasive et enfin 3/ étudier les mécanismes *in vivo* du VWF et de la thromboinflammation dans différents modèles expérimentaux. Son application dans l'HSA et le rôle de la

thromboinflammation dans la physiopathologie de l'ICR prend donc tout son sens. **L'élaboration d'un outil d'imagerie moléculaire ciblé sur le VWF permettrait de réaliser un suivi longitudinal des animaux.** Notre hypothèse est que la détection en IRM du VWF exposé à la surface des vaisseaux cérébraux se fait en **deux temps**. Un premier temps correspond à la phase aiguë des lésions cérébrales en lien avec l'issue brutale de sang dans les espaces sous arachnoïdiens responsable d'une HTIC, phase communément appelée d'*early brain injury*. Une deuxième phase retardée, dont on ne connaît pas encore le délai de survenue, correspondrait au relargage des substances pro-inflammatoires de l'hématome dans le LCS, en communication avec les espaces périvasculaires. Ce projet est en cours et rencontre des difficultés au stade de la conception d'un nanobody ciblant VWF.

### *c) Thérapeutiques ciblées sur la thromboinflammation et le VWF : la N-Acétylcystéine ?*

Comme nous l'avons vu précédemment, le VWF joue un rôle clé dans la formation des microthrombi. La protéolyse du VWF pourrait donc être une stratégie thérapeutique efficace pour détruire les thrombi artériels riches en plaquettes (Denorme et al. 2016; Crescente et al. 2012). La N-Acétylcystéine (NAC) est un traitement très largement utilisé dans une indication mucolytique. La NAC est peu coûteuse et présente une structure moléculaire très simple avec un groupement thiol libre qui a la propriété de rompre les ponts disulfures de protéines multimériques tel que le VWF. Compte tenu de ces propriétés, des études se sont intéressées à son effet potentiel sur les thrombi riches en plaquettes (Chen et al. 2011). Dans les pathologies neurovasculaires, une étude menée par le Dr Martinez de Lizarrondo *et al.* a permis de mettre en avant plusieurs résultats (De Lizarrondo et al. 2017). Une heure après injection intraveineuse de NAC chez la souris, il a pu être démontré que **la NAC réduit la formation des longs polymères de VWF**, elle **réduit leur taille** et a une **action thrombolytique directe sur le VWF et les thrombi riches en plaquettes**. L'effet thrombolytique de la NAC est essentiellement médié par le clivage du VWF qui lie les plaquettes entre elles ([figure 32](#)).



A

**Figure 32 :** principaux résultats issus de l'étude de Martinez de Lizarrondo *et al* (Martinez de Lizarrondo et al. 2017)

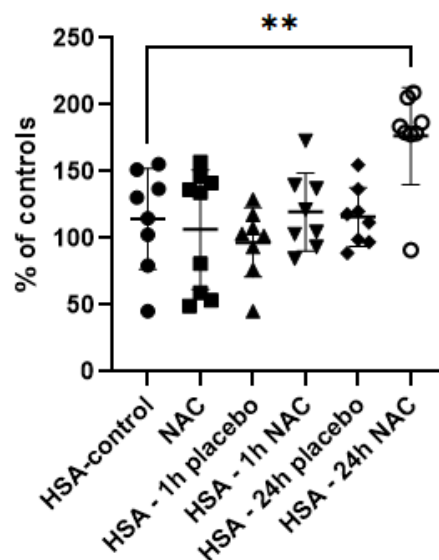
A/ représentation schématique de l'activité thrombolytique de la NAC sur les thrombi artériels B/ La NAC vient scinder les ponts disulfures des multimères de VWF qui permettent de maintenir les liens entre les plaquettes contenues dans les thrombus artériels, et ainsi permet d'induire la dissolution du thrombus.

Ces observations ont été faites sur 3 modèles murins d'AVC ischémiques. Dans le but d'évaluer la sécurité de la NAC, avec notamment la présence d'un risque de transformation hémorragique après AVC, la NAC a été testée sur un modèle d'AVC hémorragique par injection intra-striatale d'elastase. De façon intéressante, il a été montré que l'injection intra-veineuse de NAC n'était pas à l'origine d'une aggravation hémorragique à l'IRM, ni responsable d'une aggravation neurologique des animaux. Ce dernier résultat est d'autant plus pertinent si l'on s'intéresse à la NAC dans l'HSA. En effet, l'hypothèse de l'utilisation de la NAC serait basée sur son action thrombolytique afin de réduire l'incidence d'ICR, sans aggraver le saignement initial qui peut parfois être très sévère.

Des études se sont déjà intéressées à l'effet de la NAC dans l'HSA. Dans la littérature, le rationnel physiopathologique de l'utilisation de la NAC dans l'HSA serait davantage basé sur la prévention de la survenue de vasospasme, de par ses propriétés qui permettraient la protection de l'endothélium et la clairance des radicaux libres oxydatifs entre autres (Bavarsad Shahripour et al. 2014). Dans des études précliniques tout d'abord, il a été observé chez les lagomorphes que l'injection intrapéritonéale de NAC permettait de réduire le vasospasme

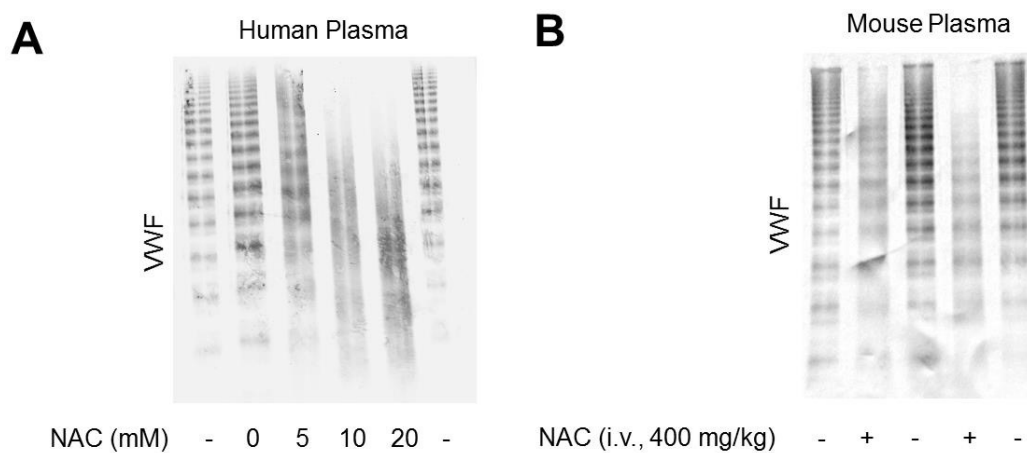
(Güney et al. 2010). De même, deux études réalisées chez le rat ont permis d'observer d'une part un effet neuroprotecteur avec la réduction du stress oxydatif de la NAC à l'origine d'une réduction des lésions cérébrales initiales (Lu et al. 2009), et d'autre part, une réduction significative de vasospasme (Azambuja et al. 2010). Il s'agit d'études datant de plus de 10 ans qui malheureusement ont pris comme critère de jugement principal, pour la plupart, la survenue de vasospasme qui, comme nous l'avons vu préalablement, n'est plus le critère à prendre en compte lorsque l'on souhaite avoir une pertinence clinique. De plus, ces études étaient centrées sur les propriétés anti-oxydantes de la NAC et non sur ses propriétés thrombolytiques qui, à la lumière des dernières études sur l'AVC ischémique, semblent être tout à fait pertinentes dans le cadre de la microthrombose et donc dans la pathogénicité de l'ICR.

C'est donc dans cette optique que nous avons débuté un travail sur notre modèle murin d'HSA, et ainsi pu faire une étude comparative entre animaux ayant reçu de la NAC et l'administration de placebo (73 animaux répartis en plusieurs groupes). A ce jour, les analyses ont pu être réalisées sur 51 échantillons répartis en 6 conditions. Il a pu être observé une augmentation significative du VWF plasmatique circulant chez les animaux HSA ayant reçu de la NAC, 24 heures après HSA (figure 33).



**Figure 33** : dosages plasmatiques de VWF (exprimés en % par rapport aux animaux contrôles) entre les groupes HSA ayant ou non reçu de la NAC. Il est observé une augmentation significative du VWF circulant 24 heures après HSA chez les animaux ayant reçu de la NAC.

Ces résultats nécessitent d'être discutés. En premier lieu, il faut rappeler que la NAC réduit la taille des multimères de VWF *in vitro* mais également *in vivo* (figure 34) (De Lizarrondo et al. 2017). Or, le dosage de VWF plasmatique que nous avons réalisé est un dosage antigénique (Asserachrom® VWF : Ag) par technique immuno-enzymatique ELISA, qui ne permet pas de discriminer le VWF sous sa forme multimérique ou des fragments de VWF de plus petites tailles scindées par la NAC. La réalisation de Western blot permettrait de contourner ce problème.



**Figure 34 :** réduction des multimères de VWF après adjonction de NAC *in vivo* puis *in vitro*.

A/ La NAC réduit la taille des multimères de VWF de façon dose-dépendante sur du plasma humain. B/ Les souris ayant reçu une injection intra-veineuse de NAC (400 mg/kg) ou un équivalent de solution saline. Les échantillons de sang sont prélevés 1 heure après l'injection. Les multimères de VWF sont ensuite analysés en électrophorèse sur gel d'agarose SDS-1,5% suivi d'un Western Blot. La NAC réduit la taille du multimère de VWF circulant également *in vivo*.

De même, il pourrait être intéressant d'effectuer un dosage fonctionnel du VWF par le biais de l'activité cofacteur de la ristocétine (VWF : RCo) qui est la technique de référence. Enfin, il faut noter que sur ces données présentées dans la discussion, nous ne mettons pas en évidence d'augmentation significative du taux de VWF 24 heures après HSA sur les échantillons de plasma n'ayant pas reçu de NAC mais un placebo. Pour rappel, les données présentées dans la section résultats montraient une augmentation significative du VWF plasmatique 24 heures après HSA, résultat qui concorde avec les données rapportées chez l'homme (Kumar et al.

2017). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées, tout d'abord le manque de puissance de nos échantillons, la variabilité inhérente à la mesure du VWF, mais également la variabilité inter-individuelle et intra-individuelle, qui est bien décrite chez l'homme, ce qui rend notamment parfois difficile la prise en charge de la maladie de von Willebrand (Torres et al. 2009). Pour illustrer ce propos, les valeurs seuils utilisées à T0 chez nos animaux HSA diffèrent selon les expérimentations, bien qu'elles soient exprimées en ratio rapporté aux animaux contrôles. Les analyses immunohistochimiques des coupes de cerveaux pour chaque groupe d'animaux sont en cours. Des analyses doivent donc être poursuivies pour mieux comprendre ces résultats préliminaires.

## CONCLUSION



Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés au diagnostic d'ICR dans un modèle préclinique sévère. Ce travail nous a conduit ensuite à réaliser une revue de la littérature colligeant les modèles expérimentaux d'HSA s'intéressant à la survenue d'ICR. A l'issue de nos premiers résultats et de la revue, nous pouvons dire qu'aujourd'hui, aucun modèle ne permet de faire le diagnostic d'ICR en imagerie, tel que cela a été défini chez l'homme en 2010 par la communauté scientifique.

Face à ce constat, qui reste un frein à la transposition de la recherche sur l'ICR, nous avons donc décidé de nous intéresser à l'activation endothéliale, pierre angulaire entre la thrombose et l'inflammation conduisant à la survenue d'ICR. C'est ainsi que dans un modèle murin, nous avons pu détecter pour la première fois l'activation endothéliale par le biais de nouveaux outils d'imagerie non invasifs tels que l'IRM moléculaire et le MPI, et ainsi montrer à la phase précoce la présence d'une activation endothéliale associée à l'*early brain injury* post-HSA. Cette phase précoce d'activation endothéliale est associée à une augmentation des marqueurs de thromboinflammation systémique et cérébrale, conformément aux données de la littérature clinique.

Ces nouvelles techniques d'imagerie moléculaire, dont l'utilisation pré-clinique a donc pu être validée dans l'HSA à l'issue de ce travail, ouvrent des perspectives de recherche translationnelle. Dans le domaine expérimental, ils permettent d'envisager une exploration pertinente des mécanismes précoces survenant à la phase d'*early brain injury* qui peuvent conduire à la survenue d'ICR, et ainsi tester des molécules sur des cibles spécifiques. En clinique, ces outils auraient un intérêt chez l'homme puisqu'ils offriraient la possibilité d'un monitoring non invasif, qui permettrait un suivi rapproché des patients après HSA, avec un intérêt pronostique et thérapeutique.

## AUTRES TRAVAUX

Research Paper

# General Anesthesia Inhibits the Activity of the “Glymphatic System”

Clement Gakuba<sup>1,2✉</sup>, Thomas Gaberel<sup>1,3</sup>, Suzanne Goursaud<sup>1,2</sup>, Jennifer Bourges<sup>1,2</sup>, Camille Di Palma<sup>1,3</sup>, Aurélien Quenault<sup>1</sup>, Sara Martinez de Lizarrondo<sup>1</sup>, Denis Vivien<sup>1,4</sup>, Maxime Gauberti<sup>1,5✉</sup>

1. Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, INSERM UMR-S U1237, “Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders” PhIND, 14000 Caen, France;
2. CHU Caen, Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, CHU Caen Côte de Nacre, 14000 Caen, France;
3. CHU Caen, Department of Neurosurgery, CHU Caen Côte de Nacre, 14000 Caen, France;
4. CHU Caen, Department of Cell Biology, CHU Caen Côte de Nacre, 14000 Caen, France;
5. CHU Caen, Department of Diagnostic Imaging and Interventional Radiology, CHU Caen Côte de Nacre, 14000 Caen, France.

✉ Corresponding authors: Maxime GAUBERTI (gauberti@cyceron.fr) or Clement GAKUBA (gakuba@cyceron.fr), INSERM, UMR-S U1237, “Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders” PhIND, GIP Cyceron, Caen-Normandy University, Bd Henri Becquerel, Caen, France. Phone: +33.2.31.47.01.66, Fax: +33.2.31.47.02.22.

© Ivyspring International Publisher. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2017.01.12; Accepted: 2017.10.21; Published: 2018.01.01

## Abstract

**INTRODUCTION:** According to the “glymphatic system” hypothesis, brain waste clearance is mediated by a continuous replacement of the interstitial milieu by a bulk flow of cerebrospinal fluid (CSF). Previous reports suggested that this cerebral CSF circulation is only active during general anesthesia or sleep, an effect mediated by the dilatation of the extracellular space. Given the controversies regarding the plausibility of this phenomenon and the limitations of currently available methods to image the glymphatic system, we developed original whole-brain *in vivo* imaging methods to investigate the effects of general anesthesia on the brain CSF circulation.

**METHODS:** We used magnetic resonance imaging (MRI) and near-infrared fluorescence imaging (NIRF) after injection of a paramagnetic contrast agent or a fluorescent dye in the cisterna magna, in order to investigate the impact of general anesthesia (isoflurane, ketamine or ketamine/xylazine) on the intracranial CSF circulation in mice.

**RESULTS:** *In vivo* imaging allowed us to image CSF flow in awake and anesthetized mice and confirmed the existence of a brain-wide CSF circulation. Contrary to what was initially thought, we demonstrated that the parenchymal CSF circulation is mainly active during wakefulness and significantly impaired during general anesthesia. This effect was especially significant when high doses of anesthetic agent were used (3% isoflurane). These results were consistent across the different anesthesia regimens and imaging modalities. Moreover, we failed to detect a significant change in the brain extracellular water volume using diffusion weighted imaging in awake and anesthetized mice.

**CONCLUSION:** The parenchymal diffusion of small molecular weight compounds from the CSF is active during wakefulness. General anesthesia has a negative impact on the intracranial CSF circulation, especially when using a high dose of anesthetic agent.

Key words: glymphatic system, anesthesia, magnetic resonance imaging, Alzheimer, choroid plexus.

## Introduction

The classical textbook model of cerebrospinal fluid (CSF) circulation in the brain describes a CSF production by the choroid plexus, followed by its flow through the ventricles and the subarachnoid spaces, finally exiting from the brain through the arachnoid granulations. Based on earlier work from

Cserr [1-3], Weller [4] and others, recent studies suggest that the physiology of CSF circulation may be more complicated than initially thought [5-7]. In this context, the description of the glymphatic system by the group of M. Nedergaard has challenged our understanding of CSF circulation by describing a bulk

flow of CSF between arterial and venous paravascular spaces in the brain parenchyma [8, 9]. This system was reported to drive the cleaning of the brain from accumulated metabolites, such as the beta-amyloid peptide, through a convective flow of CSF in the brain parenchyma following a para-arterial entry route and a para-venular efflux [10]. Therefore, some evidence suggests that the glymphatic system plays a key role in the pathophysiology of neurodegenerative disorders [11], including recent results in patients with Alzheimer's disease [12]. The interest in this system was further amplified with the recent description of functional lymphatic vessels along cerebral venous sinuses in the adult brain [13, 14].

Previous studies suggested that the glymphatic system was only active during sleep or general anesthesia, an effect mediated by an increase of 60% of the brain extracellular volume [15]. However, general anesthesia has been associated with beta-amyloid peptide aggregation and tau hyperphosphorylation in preclinical studies [16]. In humans, observational clinical studies revealed that cerebrospinal fluid biomarkers convert to an Alzheimer's disease pattern after general anesthesia [17, 18]. Additionally, discordant results on brain waste clearance under anesthesia are reported in the literature [15, 19], in particular regarding the role of CSF mediated clearance [20]. Indeed, due to technical limitations, most previous studies failed to investigate CSF circulation dynamics in the whole brain using non-invasive methods, but instead relied on superficial measurement (~100  $\mu\text{m}$  beneath the cortical surface) of tracer diffusion in the brain of craniotomized mice, thus potentially leading to misrepresentation of the whole CSF circulation. Moreover, the glymphatic concept and the expansion of the extracellular volume during general anesthesia have been challenged by several recent studies [20-23]. In this context, the impact of general anesthesia on the parenchymal CSF flow remains elusive.

Here, we developed original approaches allowing whole brain imaging of the CSF circulation in awake and anesthetized mice using contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI), near-infrared fluorescence (NIRF) and diffusion-weighted imaging. We present results demonstrating that the parenchymal diffusion of low molecular weight compounds administered in the CSF is reduced in anesthetized mice when compared with awake animals, therefore suggesting that general anesthesia impairs the circulation of CSF through the brain.

## Methods

### Approval

Animal experiments were approved by the local ethical committee (C-31.555-07, US006 CREFRE (CEEA-122)) and were performed in accordance with the French (Decree 87/848) and the European Communities Council (Directive 2010/63/EU) guidelines.

### Animals and anesthesia

Experiments were performed in male Swiss mice (35-40g; CURB, Caen, France) housed with a 12 h light/12 h dark cycle. All the experiments were performed at the same time of the dark phase corresponding to mice waking hours (8-10 PM). Surgical procedures were performed under 2% isoflurane. Thereafter, mice were either allowed to recover or maintained under general anesthesia for a 30 min or 60 min period: isoflurane (2-2.5% except if indicated otherwise), ketamine (150 mg/kg, intraperitoneal) or ketamine/xylazine (100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine). When anesthetized, mouse body temperature was monitored and maintained at 37°C with a rectal temperature probe and homeothermic heating pad. Hypnosis for mice placed under general anesthesia was established by control of loss of righting reflex, absence of limb withdrawal when applying pressure to the paw and monitoring of mean arterial pressure, and heart and respiratory rates. Awakening of the mice after purging volatile anesthetic from the ventilation system during MRI experiments was assessed by paraclinical (plethysmography) and clinical observation (responses to tactile stimulations). Mice were in prone position both in the awake and anesthesia conditions [24].

### Intracisternal injection

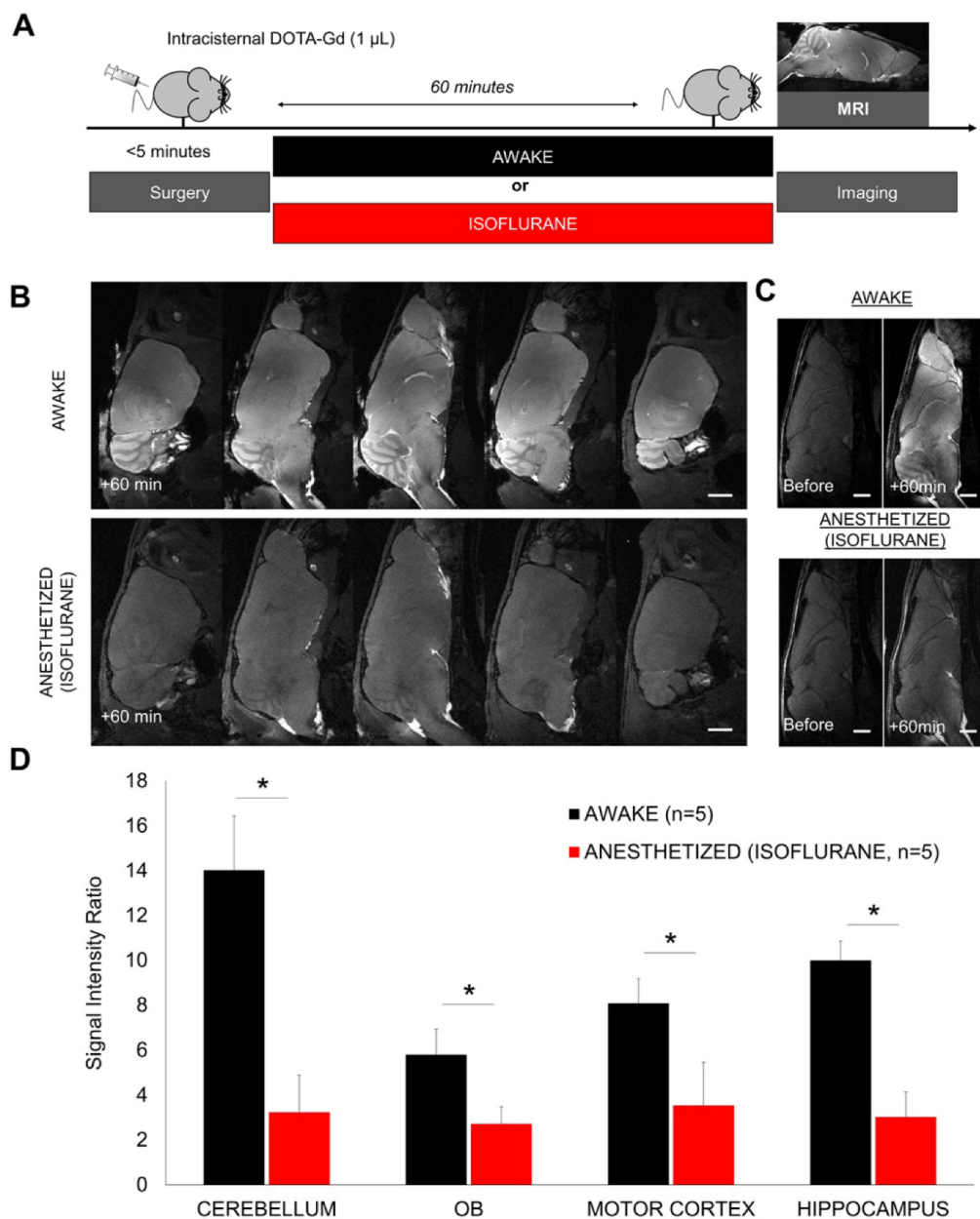
Intracisternal injection was performed as previously described [25]. Briefly, a glass micropipette was inserted in the cisterna magna of anesthetized mice (isoflurane, 2-2.5%). Then, 1  $\mu\text{L}$  or 3  $\mu\text{L}$  of contrast agent was injected over 1 min (either gadolinium chelates, Evan's blue or indocyanine green). At the end of the injection, the pipette was left in place for 1 additional minute to prevent reflux. Then the surgical site was closed after thorough control under microscope view of the absence of any fluid leakage from the cisterna magna and the mice were awakened. The injection procedure took <5 min per animal (allowing a short anesthesia duration).

### Contrast enhanced MRI

After injection of 1-3  $\mu\text{L}$  of DOTA-Gd

(DOTAREM®, Guerbet, France) in the cisterna magna, the mice were either allowed to recover or maintained under anesthesia. MRI was performed 60 min thereafter on a 7T Pharmascan MRI system (Bruker, Germany) equipped with volume transmit and surface receive coils [26]. High-resolution 3D T<sub>1</sub>-weighted imaging was performed with a Fast Low Angle Shot (FLASH) sequence with parameters set as follow: TR/TE 15/3.57 ms, Angle = 25°, Field of View = 20 × 17 × 14.4 mm, Matrix = 256 × 218 × 96 leading

to a resolution of 78 × 78 × 0.15 μm, acquisition time = 5 min 14 s. Quantification of the images was performed using ImageJ (1.48, NIH) in a blinded manner and regions of interest were set in the brain regions described in Figure 1. The signal intensity ratio was computed by dividing the signal intensity in the region of interest by an arbitrarily selected region without DOTA-Gd (vitreous humor of the right eye, Figure S1).



**Figure 1. Gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of the brain after intracisternal injection of DOTA-Gd followed by wakefulness or isoflurane general anesthesia.** (A) Schematic representation of the experimental design of the Magnetic Resonance Imaging (MRI) experiments. (B) Representative high-resolution T<sub>1</sub>-weighted images 60 min after intracisternal injection of DOTA-Gd (1 μL) in awake (top) and anesthetized mice (isoflurane 2-2.5%, bottom). Whereas DOTA-Gd (materialized by an increased signal intensity) was present mainly in the cerebrospinal fluid (CSF) of anesthetized mice, it was found in the whole brain of awake animals. (C) Representative high-resolution T<sub>1</sub>-weighted images before and 60 min after intracisternal injection of DOTA-Gd (1 μL) in awake (top) and anesthetized mice (bottom). (D) Corresponding quantification of the signal intensity in four different regions of interest (Cerebellum, Olfactory Bulbs (OB), Motor Cortex and Hippocampus). The signal intensity ratio is significantly more important in the awake group, supporting an increased activity of the CSF circulation during wakefulness when compared to anesthetized animals (n=5 mice per group). Scale bar: 2 mm.

### Ex vivo NIRF imaging

After injection of 1  $\mu$ L of Evans Blue (4%, in phosphate buffered saline, Sigma) in the cisterna magna, the mice were either allowed to recover from anesthesia or maintained under isoflurane (2%) or ketamine (150 mg/kg, intraperitoneal). 30 min thereafter, the mice were euthanized by overdose of isoflurane and the brain was removed to perform *ex vivo* NIRF imaging. The brain was placed in a photon-imager (Biospace, France) and images were acquired with excitation filter set at 600 nm and emission filter at 700 nm. The region of interest used for quantitative fluorometry encompassed the whole forebrain for the dorsal part, and the whole brain for the ventral part.

### In vivo NIRF imaging of the glymphatic system

After injection of 1  $\mu$ L of indocyanine green (ICG, 10 mg/mL, in phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich) in the cisterna magna, the mice were either allowed to recover from anesthesia or maintained under isoflurane (2%). The mice were thereafter placed in a photon-imager for 60 min and real time imaging (22 ms per frame) was performed with excitation filter set at 650 nm and emission filter at 770 nm. Quantification was performed using the built-in software of the photon-imager in the forebrain, at distance from the injection site (cisterna magna). The background value was defined on the pre-injection image for each region (especially the forebrain) and then the photon count measured on each time-point was divided by this value to get the normalized photon count. The “+5 min” image was used to define the “cisterna magna” region, allowing us to define the anterior part of the head as the forebrain.

### ADC measurement by MRI

Mice were accustomed to staying awake in the MRI animal holder for 3 weeks. The day of the experiment, the mice were placed under anesthesia (2% isoflurane) in the magnet to allow the first measurement of the ADC. Diffusion-weighted imaging data were collected by using an echo-planar sequence with two b factors (0 and 1000 s/mm<sup>2</sup>) in 6 gradient directions with the following acquisition parameters: TR/TE 2500/40 ms; Matrix = 96  $\times$  96, acquisition time = 10 s. A total of 10, 1 mm thick sections (0.5 mm gap) were acquired to cover the entire brain. ADC maps were computed using a homemade macro in ImageJ [27]. Briefly, the ADC was computed using 3 diffusion-weighted acquisitions (along 3 orthogonal diffusion directions) and a control, non-diffusion weighted acquisition. In this condition, calculation of the ADC is performed in

each direction (x, y and z) using the following equation:  $ADC(x, y, z) = \ln [S_2(x, y, z) / S_1(x, y, z)] / (b_1 - b_2)$ . We then computed the mean ADC as the arithmetic mean of ADC<sub>x</sub>, ADC<sub>y</sub> and ADC<sub>z</sub> using b values of 0 s/mm<sup>2</sup> and 1000 s/mm<sup>2</sup>.

### Physiological monitoring

Physiological data on temperature, blood pressure, heart rate and respiratory rate were acquired on separate groups of mice. Since the collection of these data required an invasive monitor installed under general anesthesia, we choose to perform these measures on other sets of mice to avoid prolonged general anesthesia when exploring the influence of anesthetics on CSF dynamics. Cannulation of the right femoral artery was performed with a polyethylene catheter connected to a pressure transducer coupled to a data acquisition system allowing continuous arterial pressure and heart rate monitoring. Ventilatory function was evaluated by plethysmography. During MRI, the temperature was maintained using temperature controlled warming blanket (Brüker). During NIRF imaging, the temperature was controlled using rectal probes and regulated manually using the built-in heating system (Biospace).

### Actimetry

Spontaneous locomotor activity (horizontal and vertical movements) was quantified over 60 min using actimetry cages (Imetronic, Pessac, France). Measurements were performed immediately after a 5 min period of 2% isoflurane anesthesia or a sham manipulation of the mice.

### Statistics

Results are the mean  $\pm$  SD. When comparing two groups, statistical analyses were performed using the Mann-Whitney U test. When comparing more than two groups, statistical analyses were performed using the Kruskal-Wallis test followed by post hoc comparison with the Mann-Whitney U test. When analyzing longitudinal values (*in vivo* NIRF), we considered each time point as an independent measurement and compared the two groups using the Mann-Whitney U test.

### Results

#### General anesthesia reduces the diffusion of intracisternally administered DOTA-Gd in the brain parenchyma.

We first evaluated the brain distribution of a low molecular weight compound (DOTA-Gd) after injection in the cisterna magna in anesthetized (2-2.5% of isoflurane) or awake mice (Figure 1A-B). DOTA-Gd

distribution was revealed 60 min after injection using MRI of the whole brain. MRI confirmed that DOTA-Gd penetrates the brain parenchyma using the glymphatic pathways as previously reported [25, 28]. But surprisingly, the concentration of DOTA-Gd was significantly higher in the awake mice in comparison with the isoflurane anesthetized mice in all the brain regions examined (Figure 1B-D). These data suggested that the CSF inflow is more active in awake mice.

An alternative interpretation of these findings could be that tracers were cleared more rapidly under anesthesia; thus, when imaging of the brains was performed 60 min post tracer injection, lower concentration of DOTA-Gd could be detected in the brain parenchyma of anesthetized versus awake animals. To address this potential issue, we first performed sequential imaging of mice placed under isoflurane anesthesia with high-resolution T<sub>1</sub>-weighted images acquired every 5 min after intracisternal injection of DOTA-Gd (Figure 2A-B). We confirmed that maximal enhancement of brain parenchyma does not occur before 60 min under isoflurane anesthesia, ruling out the possibility of an accelerated clearance of DOTA-Gd. Moreover, in a similar experiment with an earlier 30 min endpoint, the concentration of DOTA-Gd was significantly higher in the awake mice in comparison with the isoflurane anesthetized mice in the olfactory bulbs, without significant difference in the other tested brain regions (Figure S2).

However, if not through the brain, where does the CSF in anesthetized mice go? To address this question, we performed sequential imaging of mice placed under isoflurane anesthesia after intracisternal injection of a higher dose (3  $\mu$ L) of DOTA-Gd to increase the sensitivity of detection of CSF distribution. This higher dose allowed us to detect the CSF exit routes outside the brain. As shown on Figure 2C, we observed a slow diffusion of DOTA-Gd in the brain parenchyma in close vicinity to the ventral basal cisterns. Of note, the cerebellum remained free of detectable DOTA-Gd after 60 min, which is in sharp contrast with what was observed in awake mice (Figure 2D). Longitudinal MRI revealed other CSF exit routes especially around cranial nerves, the cribriform plate and cervical lymph nodes (Figure 2E). These other exit routes could explain the lack of accumulation of DOTA-Gd in the basal cisterna of anesthetized mice.

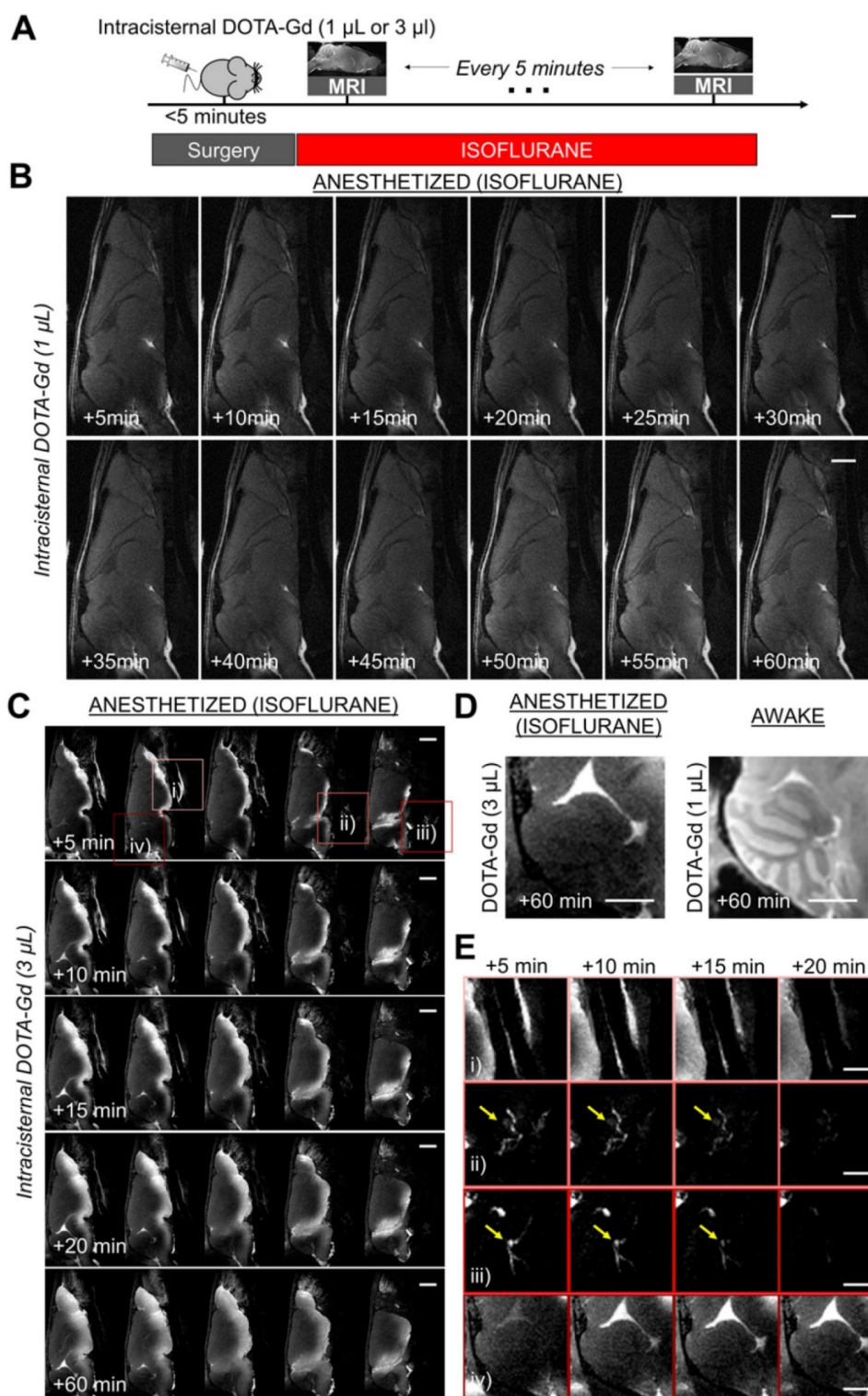
We also investigated whether there is a dose-response effect of isoflurane anesthesia on the accumulation of intracisternally administered DOTA-Gd. The surgical procedure was performed using 2.0-2.5% isoflurane to ensure sufficient anesthesia and then, the mice were switched to high-dose isoflurane

(3.0%), low-dose isoflurane (1.5%) or allowed to recover (Figure 3A). 60 min thereafter, we assessed the brain distribution of DOTA-Gd by MRI. Our results revealed a dose-response effect of isoflurane anesthesia (Figure 3B-C). Whereas the use of 3% isoflurane significantly reduced the accumulation of DOTA-Gd in all brain regions compared to awake mice, the effect of 1.5% isoflurane was milder and significant in the cerebellum and olfactory bulbs only.

We then wanted to confirm the reduced diffusion of intracisternally administered DOTA-Gd in the brain parenchyma during general anesthesia using another anesthetic regimen. To this aim, we performed a similar experiment using ketamine/xylazine (100 mg/kg and 10 mg/kg, respectively) instead of isoflurane, since it was the anesthetic regimen that was used in the study by Xie *et al.* to demonstrate a higher activity of the glymphatic system during general anesthesia [15] (Figure 4A). In line with the results obtained using isoflurane, we observed a reduced parenchymal diffusion of DOTA-Gd in the brain of ketamine/xylazine anesthetized mice compared to awake mice as assessed by MRI 60 min after intracisternal injection (Figure 4B-C). This effect was consistent across all brain regions, except in the motor cortex where it did not reach statistical significance.

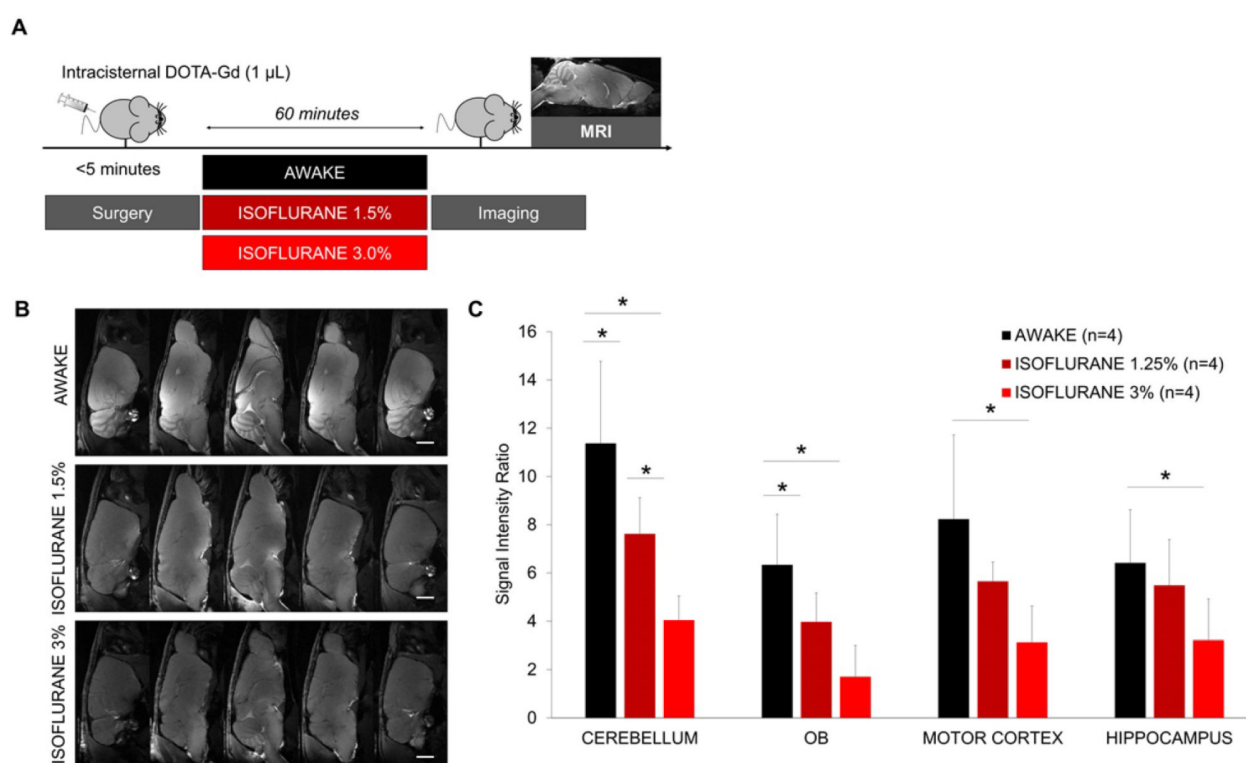
### **General anesthesia reduces the diffusion of intracisternally administered fluorescent dyes in the brain parenchyma.**

In order to confirm those results using another imaging method, we performed both bright field photography and near infrared fluorescence (NIRF) imaging of the brain (*ex vivo*) 30 min after intracisternal injection of Evans Blue (Figure 5A). Macroscopically, Evans Blue distributed in the basal cisterna and surrounded the polygon of Willis in all animals, independently of the anesthetic regimen (Figure 5B). Interestingly, the hypothalamus surface was consistently stained in awake animals but remained free from Evans Blue in anesthetized animals. This discrepancy was in favor of an impaired distribution of Evans Blue in the brain of anesthetized mice. NIRF imaging further confirmed these results: intracisternal injection of Evans Blue was associated with rapid distribution of the fluorescent dye to the whole brain in awake animals (Figure 5C-D). In contrast, Evans Blue injected in the CSF of isoflurane-anesthetized mice showed a restricted distribution, limited to the basal cisterns of the brain, when compared with the awake group. Interestingly, the same results were obtained when using an anesthetic agent (ketamine) with a different mechanism of action (Figure 5A-D).



**Figure 2. Longitudinal magnetic resonance imaging of the brain after intracisternal DOTA-Gd injection in isoflurane anesthetized mice. (A)** Schematic representation of the experimental design of the longitudinal MRI experiments. **(B)** Representative MRI after intracisternal injection of 1  $\mu\text{L}$  of DOTA-Gd in an anesthetized mouse (isoflurane 2-2.5%), showing only slight changes of MRI signal in the brain parenchyma of anesthetized mice in the first 60 min after injection. **(C)** Representative MRI after intracisternal injection of 3  $\mu\text{L}$  of DOTA-Gd in an anesthetized mouse showing passive diffusion of DOTA-Gd inside the ventral part of the brain parenchyma. Note that the cerebellum remained free from DOTA-Gd even at the latest time point (+60 min). **(D)** Representative images of the cerebellum 60 min after DOTA-Gd administration in an anesthetized and an awake mouse (to allow direct comparison of the two experimental conditions). **(E)** Magnification of regions of interest from (C) corresponding to: i) airways, ii) cervical lymphatic vessels, iii) deep cervical lymph nodes (yellow arrows) and iv) cerebellum. These data demonstrate that the CSF is rapidly excreted from the brain by cervical lymphatic vessels in anesthetized mice. The cerebellum was chosen here because passive diffusion of DOTA-Gd does not occur in this region. Scale bar: 2 mm.





**Figure 3. Dose-response effect of isoflurane on brain diffusion of intracisternally administered DOTA-Gd. (A)** Schematic representation of the experimental design of the Magnetic Resonance Imaging (MRI) experiments. **(B)** Representative high-resolution T1-weighted images 60 min after intracisternal injection of DOTA-Gd ( $1 \mu\text{L}$ ) in awake and anesthetized mice. **(C)** Corresponding quantification of the signal intensity in four different regions of interest (Cerebellum, Olfactory Bulbs (OB), Motor Cortex and Hippocampus). ( $n=4$  mice per group). Scale bar: 2 mm.

Since sequential MRI during 60 consecutive minutes was not technically feasible in awake mice, we were not able to perform longitudinal and direct comparison of the distribution of intracisternally delivered DOTA-Gd between awake and anesthetized mice. To overcome this limitation, we developed an alternative method that takes advantage of a photomultiplier to dramatically increase the signal to noise ratio of NIRF images (Figure 6A-B). Using this method, the NIRF acquisition time was reduced to 22 ms, therefore, allowing real time *in vivo* NIRF imaging of freely moving mice (45 frames per second). We injected indocyanine green (which has a farther emission spectrum than Evans blue allowing deeper and more sensitive imaging) in the cisterna magna and performed longitudinal *in vivo* NIRF imaging of mice randomized to awake or anesthetized (isoflurane) state. Comparison of signal intensity between the two groups revealed that as soon as 30 min after intracisternal indocyanine green injection, there was significantly more indocyanine green in the forebrain of awake mice (Figure 6C-D and supplementary videos 1 and 2 showing that in anesthetized mice the tracer remains in the cisterna magna, whereas it diffuses in the forebrain of awake mice). These *in vivo* data further support that the

intracranial circulation of CSF is more active in awake mice than in anesthetized mice.

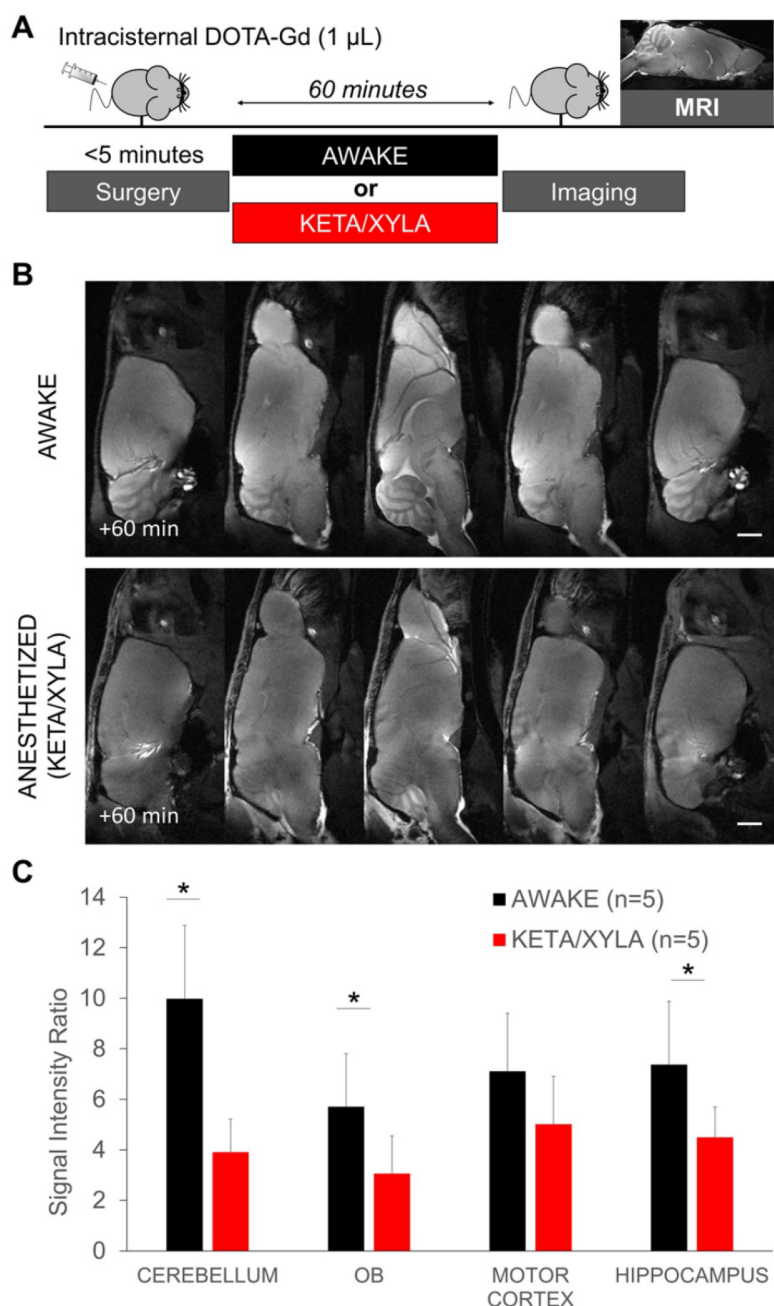
### General anesthesia does not significantly impact the brain interstitial space volume.

One study reported that the glymphatic activity is modulated by modification of the brain interstitial space [15]. Therefore, expansion of the brain interstitial space during sleep is associated with an increase in glymphatic activity [15]. In this previous study, the brain interstitial space was measured using iontophoresis, an invasive method consisting of the measurement of ionic diffusion in the extracellular space. Several biases may have influenced these results, including the existence of a monodirectional convective flow from the injection electrode to the measuring electrode during the awake state (such as the glymphatic flow) [20]. Here, we evaluated the brain interstitial space volume using diffusion-weighted imaging and computation of the apparent diffusion coefficient of water (ADC), a validated method to estimate interstitial space diffusion parameters [29]. We measured the ADC by MRI in different regions of the brain of mice either awake or under isoflurane anesthesia (Figure 7A). A delay of 15 min after switching the anesthesia regimen

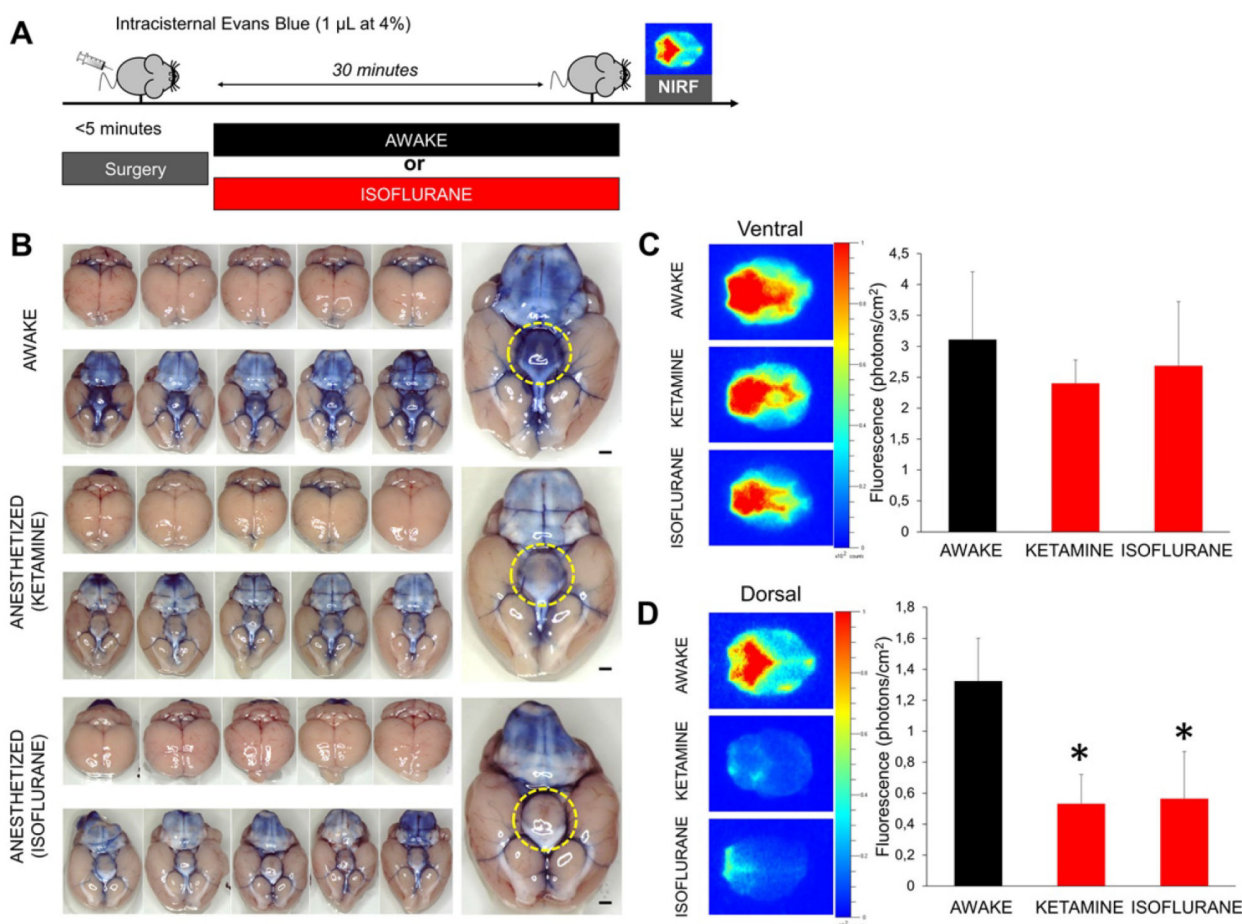
was respected before imaging to allow potential changes in interstitial volume to occur (this 15 min delay corresponds to the time needed for the extracellular volume to change after general anesthesia in a previous study [15]).

Fast imaging using echo-planar MRI allowed us to compute most ADC maps despite spontaneous movements of the awake mice (Figure 7B). The comparison of ADC calculated in different cerebral regions of interest in awake or anesthetized mice

showed no significant variation between these two states (Figure 7C). To improve the sensitivity of the method, we pooled the values of 15 (awake) and 30 measurements (anesthetized). Nevertheless, there was still no significant difference between the ADC measured in awake or anesthetized mice (Figure 7D-E). Although we cannot rule out some slight changes of the ADC between these two states, our data do not support the reported 60% increase of the interstitial space during anesthesia [15].



**Figure 4. Gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging after wakefulness or ketamine/xylazine general anesthesia. (A)** Schematic representation of the experimental design of the Magnetic Resonance Imaging (MRI) experiments. **(B)** Representative high-resolution T1-weighted images 60 min after intracisternal injection of DOTA-Gd (1  $\mu$ L) in awake (top) and anesthetized mice (bottom). **(C)** Corresponding quantification of the signal intensity in four different regions of interest (Cerebellum, Olfactory Bulbs (OB), Motor Cortex and Hippocampus). (n=5 mice per group). Scale bar: 2 mm.



**Figure 5.** Evans blue enhanced near infrared fluorometry of the brain after wakefulness or general anesthesia. **(A)** Schematic representation of the experimental design of the near infrared fluorometry (NIRF) experiments. **(B)** Left: Bright field photographs of the ventral part of mouse brain 30 min after Evans Blue (1  $\mu$ L at 4%) administration in the cisterna magna. Individual animals are represented. Right: Magnification of one representative animal per group. **(C)** Left: Representative ex vivo NIRF images (Excitation/Emission = 600/700 nm) of the ventral part of the brain (corresponding to the basal CSF cisterna) from animals in the awake and anesthetized (isoflurane 2% or ketamine 150 mg/kg) groups 30 min after Evans Blue administration in the cisterna magna. We can see that the fluorescent dye is distributed along the polygon of Willis in the perivascular spaces. Right: corresponding quantification showing no significant difference between the three experimental groups (n=5 mice/group). **(D)** Left: Representative ex vivo NIRF images of the dorsal part of the brain (corresponding to the brain parenchyma) from animals in the awake and anesthetized (isoflurane 2% or ketamine 150 mg/kg) groups 30 min after Evans Blue administration (1  $\mu$ L at 4%) in the cisterna magna. The fluorescent dye is distributed in the cerebellum and along the large brain arteries (middle and anterior cerebral arteries) in the awake group. In contrast, almost no fluorescence was detectable in the two anesthetized groups of mice. Right: corresponding quantification showing significantly higher fluorescence intensity in the awake group (n=5 mice/group). These results demonstrate that diffusion of Evans blue in the brain parenchyma is significantly reduced by anesthesia. Scale bar: 2 mm.

## Discussion

In the present study, we developed new methods to study CSF dynamics in the brain of anesthetized and awake mice. Altogether, our results demonstrate that i) CSF circulated through the brain during wakefulness, ii) the activity of this CSF circulation is reduced during general anesthesia and iii) the volume of the interstitial space does not significantly vary between the awake and anesthetized states in mice. These results are contradictory with the recent claims made by Nedergaard's group [15]. Although we confirm the existence of a CSF-mediated transport of low molecular weight compounds to the brain parenchyma [6], this flow of CSF is elevated in the awake state in comparison with the anesthetized state.

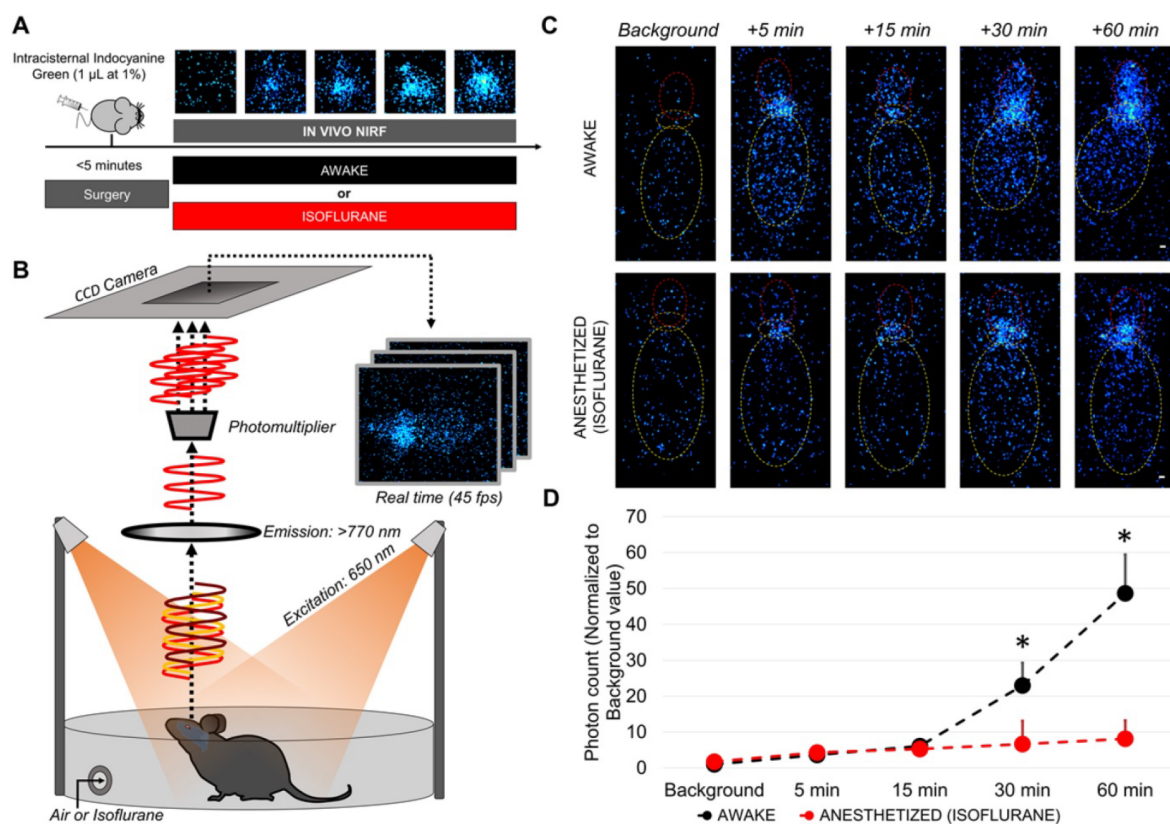
Methodological differences between our study

and previous reports may explain the observed discrepancies [5]. We injected smaller volumes of tracer in the cisterna magna compared to previous studies on the glymphatic system (1  $\mu$ L vs  $\sim$ 10  $\mu$ L). Use of a large volume to infuse into the CSF of a mouse may have altered pressures and flows within the brain [7, 20]. Due to technical limitations, we were not able to measure the intracranial pressure during injection of the tracers in the CSF. A previous study from the literature imaging intracranial CSF circulation used an injection rate of 1.6  $\mu$ L/min in the cisterna magna [30]. In another study, the intracranial pressure was not significantly increased 10 minutes after injection of 3  $\mu$ L of a solution in the cisterna magna in mice [31]. In the present study, the injection rate was 1  $\mu$ L/min except for the experiments presented in Figure 2 (3  $\mu$ L/min). Even if we cannot exclude that different anesthetic regimens alter the

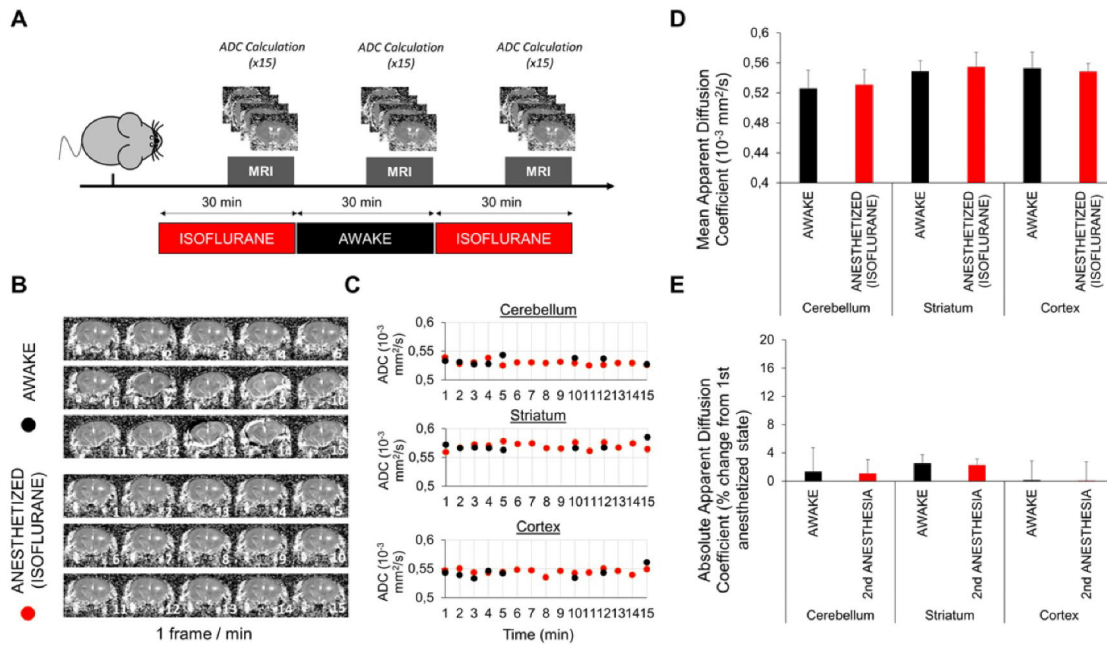
capacity of the brain parenchyma, CSF and vascular compartments to accommodate these volumes, these data suggest that the intracranial pressure was not significantly increased in experiments comparing awake to anesthetized animals. Moreover, we measured parenchymal influx of intracisternally administered contrast agents in the whole brain using MRI and NIRF, whereas the previous studies measured fluorescent dye influx in a restricted portion of the brain using two-photon microscopy [8, 15, 28]. In our study, the complete picture is in favor of an active parenchymal CSF circulation during wakefulness, which is reduced during general anesthesia, especially using high doses of isoflurane.

Still, there are major discrepancies in the observed diffusion of small molecule compounds injected in the CSF between studies that used MRI. In anesthetized rats, Iliff et al. failed to detect gadolinium in deep brain areas despite acquisitions performed up to 4 h after intracisternal injection, and observed enhancement in more superficial areas starting ~45 min after injection [28]. In serially imaged rats, Liu et al. observed a delayed diffusion of gadolinium chelate, which remained mostly within the CSF spaces, despite awake states between the successive

scans [32]. In serially imaged mice, Petiet et al. observed that significant brain enhancement occurred more than 4 h after intraventricular injection of DOTA-Gd [33]. Differences in species, methods of gadolinium injection, anesthetic regimen and imaging procedure may explain those discrepancies. Moreover, the stress experienced by the mice after the surgical procedure might be a confounding factor in our experimental conditions. Therefore, other anesthetic agents, other anesthetic doses and the impact of general anesthesia in other species on the parenchymal diffusion of small molecular weight compounds deserve further investigation. Our dose response experiments suggest that the lower the dose of anesthetic agents, the smaller are their effects on CSF circulation, which may explain some discrepancies between the studies. Accordingly, we recently demonstrated that intracisternally administered DOTA-Gd rapidly diffuses in the brain parenchyma in non-human primates that were anesthetized using a low, clinical dose of propofol (0.05–0.25 mg/kg/min) [34]. According to our results, it is tempting to speculate that this diffusion would be even faster in awake animals.



**Figure 6.** Longitudinal in vivo NIRF imaging of awake and anesthetized mice after intracisternal indocyanine green injection. **(A)** Schematic representation of the experimental design of the diffusion-weighted imaging experiments. **(B)** Schematic representation of the experimental setup for in vivo NIRF imaging of freely moving mice. **(C)** Representative in vivo NIRF images of an awake (top) and an anesthetized mice (bottom). Yellow: mouse body, orange: cisterna magna (indocyanine green injection site), red: forebrain. Whereas in awake mice the fluorescent tracer diffuses through the brain and is readily detectable in the forebrain, it remains near the injection site in the anesthetized mice. **(D)** Quantification of the data presented in (C) (n=4/group). \* means significant vs anesthetized mice at the same time point. Scale bar: 2 mm.



**Figure 7. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in awake and anesthetized mice.** (A) Schematic representation of the experimental design of the diffusion-weighted imaging experiments. We used 2.0-2.5% isoflurane in these experiments. (B) Representative Apparent Diffusion Coefficient (ADC) maps obtained in awake and anesthetized mice (1 frame per minute). Some movement is perceptible in awake but not in anesthetized mice. (C) ADC values in different brain regions of awake and anesthetized mice. Some points are missing in the awake group because the ADC maps of some timepoints were discarded because of movements. No difference is apparent. (D) Mean ADC values after pooling of the 15 (awake) and 30 measurements (anesthetized) in different parts of the brain (n=5). No significant difference was detected. (E) Absolute variation in percent of the ADC during awake and anesthetized states compared to the initial measurement of the ADC during the first period of anesthesia (n=5). No significant variation was found between experimental groups, arguing against change in the interstitial volume between general anesthesia and wakefulness.

Given the interactions between anesthesia and CSF circulation, the results of recent studies on the glymphatic system performed in anesthetized animals should be interpreted with caution. For instance, anesthesia may be a confounding factor in the studies regarding the diminished activity of the glymphatic system during aging or in animals with neurodegenerative disorders, since both conditions are associated with changes in anesthesia sensibility [35, 36]. New studies should therefore involve awake animals. Due to technical limitations, we were not able to perform the experiments in sleeping mice. Although the effects of naturally occurring sleep and general anesthesia on the glymphatic system were deemed to be equivalent [15], extrapolation of our findings from anesthesia to sleep should be done with caution. Another limitation of our study is the use of a short period of anesthesia to allow the intracisternal injection of contrast agents. This method was chosen because it is more reliable than catheter implantation to inject a small and reproducible volume, therefore avoiding the increase in brain intracranial pressure associated with large volume infusion while preserving the possibility to perform inter-animal comparison [20]. Moreover, the anesthesia time was

reduced to a minimum of 5 min to limit its impact on the glymphatic system. In this regard, the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of volatile agents such as isoflurane allow rapid recovery from general anesthesia [37] (see also Figure S3, showing that the locomotor activity of mice after a 5 min period of isoflurane anesthesia is similar to non-anesthetized mice). Regarding NIRF imaging, it is important to consider that we used fluorescence intensity as a proxy for parenchymal distribution of the fluorescent tracer. Since NIRF imaging can detect fluorescence coming from several millimeters below the cortical surface, both the superficial tracer accumulation (in subarachnoid spaces) and intraparenchymal tracer accumulation were detected. Therefore, the observed differences can be explained both by a reduced surface coverage due to a slower CSF circulation and by a slower diffusion in the brain parenchyma. It should also be acknowledged that due to the relatively low spatial resolutions of the methods performed, we did not directly image paravascular influx of the paramagnetic and fluorescent tracers. It is possible that brain wide influx does not perfectly mirror perivascular influx.

The mechanisms driving the negative impact of

general anesthesia on the diffusion of DOTA-Gd in the brain parenchyma remain elusive, especially considering the contradictory reports published so far. Notably, most recent studies failed to support the existence of a convective flow of CSF in the brain parenchyma following a para-arterial entry route and a para-venular efflux [21-23] and thus invalidate the main proposal of the glymphatic system hypothesis. Rather, the results are consistent with a convective or dispersive CSF flow in the para-arterial spaces followed by passive diffusion in the brain parenchyma. In fact, our results are consistent with a dispersive flow in the paravascular spaces driven by cardiac and respiratory motions [38] allowing the injected DOTA-Gd to mix with the CSF, before its parenchymal diffusion from paravascular spaces through the pial sheath. During general anesthesia, the observed reduction in heart rate, blood pressure, arterial pulsatility and respiratory rate (Figure S4) could all participate in the reduction of the dispersive flow in the paravascular space and, therefore, prevent DOTA-Gd to diffuse into the brain parenchyma. This is further supported by the relationship between the anesthetic dose and the brain uptake of intracisternally injected DOTA-Gd that we observed. Another factor explaining discrepancies regarding CSF dynamics between awake and anesthetized brain could be related to a decreased rate of CSF production [39].

In conclusion, we evidenced that the CSF circulation from the basal cisterna to the brain parenchyma is more active in awake than in anesthetized mice. This result challenges the current view of wakefulness as a cerebral waste accumulation phase ahead of a cleaning phase mediated by the glymphatic system during general anesthesia (or more commonly, sleep). Our study raises the intriguing possibility that anesthesia for brain-injured patients may negatively impact neurological outcome by hampering the brain waste clearance system [25, 40]. Interestingly, a recent study demonstrated that surgery with anesthesia is associated with ventricular enlargement as well as cognitive and functional decline [41], in line with our current finding linking general anesthesia with CSF flow impairment.

## Abbreviations

ADC: apparent diffusion coefficient; CSF: cerebrospinal fluid; DOTA-Gd: gadoterate; FLASH: fast low angle shot; ICG: indocyanine green; OB: Olfactory bulbs; MRI: magnetic resonance imaging; NIRF: near infrared fluorescence; SD: standard deviation.

## Supplementary Material

Supplementary figures.

<http://www.thno.org/v08p0710s1.pdf>

Supplementary video 1.

<http://www.thno.org/v08p0710s2.mp4>

Supplementary video 2.

<http://www.thno.org/v08p0710s3.mp4>

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Société Française d'Anesthésie et Réanimation and Fondation pour la Recherche Médicale (SPE20150331891).

## Authors' contribution

C.G., T.G., S.G., J.B., C.D.P., A.Q., S.M.D.L. and M.G. performed the experimental work. C.G. and M.G. carried out the statistical analysis. C.G., D.V. and M.G. analyzed the data. C.G. and M.G. designed the study and wrote the manuscript. All authors participated in manuscript revision.

## Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

## References

- Csern HF. Physiology of the choroid plexus. *Physiol Rev.* 1971; 51: 273-311.
- Csern HF, Cooper DN, Suri PK, Patlak CS. Efflux of radiolabeled polyethylene glycols and albumin from rat brain. *Am J Physiol.* 1981; 240: F319-28.
- Csern HF, Harling-Berg CJ, Knopf PM. Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. *Brain Pathol.* 1992; 2: 269-76.
- Carare RO, Bernardes-Silva M, Newman TA, Page AM, Nicoll JA, Perry VH, et al. Solute, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008; 34: 131-44.
- Brinker T, Stopa E, Morrison J, Klinge P. A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids and barriers of the CNS.* 2014; 11: 10.
- Bedussi B, van der Wel NN, de Vos J, van Veen H, Siebes M, VanBavel E, et al. Paravascular channels, cisterns, and the subarachnoid space in the rat brain: A single compartment with preferential pathways. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016.
- Bakker EN, Bacskaï BJ, Arbel-Ornath M, Aldea R, Bedussi B, Morris AW, et al. Lymphatic Clearance of the Brain: Perivascular, Paravascular and Significance for Neurodegenerative Diseases. *Cell Mol Neurobiol.* 2016; 36: 181-94.
- Illiff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med.* 2012; 4: 147ra11.
- Nedergaard M. Neuroscience. Garbage truck of the brain. *Science.* 2013; 340: 1529-30.
- Strittmatter WJ. Bathing the brain. *The Journal of clinical investigation.* 2013; 123: 1013-5.
- Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, et al. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2015; 11: 457-70.
- Zeppenfeld DM, Simon M, Haswell JD, D'Abreo D, Murchison C, Quinn JF, et al. Association of Perivascular Localization of Aquaporin-4 With Cognition and Alzheimer Disease in Aging Brains. *JAMA neurology.* 2017; 74: 91-9.
- Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature.* 2015.
- Aspelund A, Antila S, Proulx ST, Karlsson TV, Karaman S, Detmar M, et al. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *The Journal of experimental medicine.* 2015.
- Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, et al. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science (New York, NY).* 2013; 342: 373-7.

16. Xie Z, Dong Y, Maeda U, Moir RD, Xia W, Culley DJ, et al. The inhalation anesthetic isoflurane induces a vicious cycle of apoptosis and amyloid beta-protein accumulation. *J Neurosci*. 2007; 27: 1247-54.
17. Tang JX, Baranov D, Hammond M, Shaw LM, Eckenhoff MF, Eckenhoff RG. Human Alzheimer and inflammation biomarkers after anesthesia and surgery. *Anesthesiology*. 2011; 115: 727-32.
18. Palotas A, Reis HJ, Bogats G, Babik B, Racsmany M, Engvau L, et al. Coronary artery bypass surgery provokes Alzheimer's disease-like changes in the cerebrospinal fluid. *J Alzheimers Dis*. 2010; 21: 1153-64.
19. Groothuis DR, Vavra MW, Schlageter KE, Kang EW, Itskovich AC, Hertzler S, et al. Efflux of drugs and solutes from brain: the interactive roles of diffusional transcapillary transport, bulk flow and capillary transporters. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007; 27: 43-56.
20. Hladky SB, Barrand MA. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. *Fluids and barriers of the CNS*. 2014; 11: 26.
21. Smith AJ, Yao X, Dix JA, Jin BJ, Verkman AS. Test of the 'glymphatic' hypothesis demonstrates diffusive and aquaporin-4-independent solute transport in rodent brain parenchyma. *eLife*. 2017; 6.
22. Asgari M, de Zelicourt D, Kurtcuoglu V. Glymphatic solute transport does not require bulk flow. *Sci Rep*. 2016; 6: 38635.
23. Jin BJ, Smith AJ, Verkman AS. Spatial model of convective solute transport in brain extracellular space does not support a "glymphatic" mechanism. *J Gen Physiol*. 2016; 148: 489-501.
24. Lee H, Xie L, Yu M, Kang H, Feng T, Deane R, et al. The Effect of Body Posture on Brain Glymphatic Transport. *J Neurosci*. 2015; 35: 11034-44.
25. Gaberel T, Gakuba C, Goulay R, Martinez De Lizarrondo S, Hanouz JL, Emery E, et al. Impaired glymphatic perfusion after strokes revealed by contrast-enhanced MRI: a new target for fibrinolysis? *Stroke*. 2014; 45: 3092-6.
26. Belliere J, Martinez de Lizarrondo S, Choudhury RP, Quenault A, Le Behot A, Delage C, et al. Unmasking Silent Endothelial Activation in the Cardiovascular System Using Molecular Magnetic Resonance Imaging. *Theranostics*. 2015; 5: 1187-202.
27. Briens A, Gauberti M, Parcq J, Montaner J, Vivien D, Martinez de Lizarrondo S. Nano-zymography Using Laser-Scanning Confocal Microscopy Unmasks Proteolytic Activity of Cell-Derived Microparticles. *Theranostics*. 2016; 6: 610-26.
28. Iliff JJ, Lee H, Yu M, Feng T, Logan J, Nedergaard M, et al. Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *The Journal of clinical investigation*. 2013; 123: 1299-309.
29. Vorisek J, Sykova E. Measuring diffusion parameters in the brain: comparing the real-time iontophoretic method and diffusion-weighted magnetic resonance. *Acta physiologica*. 2009; 195: 101-10.
30. Yang L, Kress BT, Weber HJ, Thiyagarajan M, Wang B, Deane R, et al. Evaluating glymphatic pathway function utilizing clinically relevant intrathecal infusion of CSF tracer. *J Transl Med*. 2013; 11: 107.
31. Mathieu E, Gupta N, Macdonald RL, Ai J, Yucel YH. In vivo imaging of lymphatic drainage of cerebrospinal fluid in mouse. *Fluids and barriers of the CNS*. 2013; 10: 35.
32. Liu CH, D'Arceuil HE, de Crespigny AJ. Direct CSF injection of MnCl<sub>2</sub> for dynamic manganese-enhanced MRI. *Magn Reson Med*. 2004; 51: 978-87.
33. Petiet A, Santin M, Bertrand A, Wiggins CJ, Petit F, Houitte D, et al. Gadolinium-staining reveals amyloid plaques in the brain of Alzheimer's transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2012; 33: 1533-44.
34. Goulay R, Flament J, Gauberti M, Naveau M, Pasquet N, Gakuba C, et al. Subarachnoid Hemorrhage Severely Impairs Brain Parenchymal Cerebrospinal Fluid Circulation in Nonhuman Primate. *Stroke*. 2017; 48: 2301-5.
35. Kanonidou Z, Karystianou G. Anesthesia for the elderly. *Hippokratia*. 2007; 11: 175-7.
36. Kress BT, Iliff JJ, Xia M, Wang M, Wei HS, Zeppenfeld D, et al. Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Ann Neurol*. 2014; 76: 845-61.
37. Gupta A, Stierer T, Zuckerman R, Sakima N, Parker SD, Fleisher LA. Comparison of recovery profile after ambulatory anesthesia with propofol, isoflurane, sevoflurane and desflurane: a systematic review. *Anesth Analg*. 2004; 98: 632-41.
38. Yamada S, Miyazaki M, Yamashita Y, Ouyang C, Yui M, Nakahashi M, et al. Influence of respiration on cerebrospinal fluid movement using magnetic resonance spin labeling. *Fluids and barriers of the CNS*. 2013; 10: 36.
39. Artru AA. Effects of halothane and fentanyl on the rate of CSF production in dogs. *Anesthesia and analgesia*. 1983; 62: 581-5.
40. Brinjikji W, Murad MH, Rabinstein AA, Cloft HJ, Lanzino G, Kallmes DF. Conscious sedation versus general anesthesia during endovascular acute ischemic stroke treatment: a systematic review and meta-analysis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015; 36: 525-9.
41. Schenning KJ, Murchison CF, Mattek NC, Silbert LC, Kaye JA, Quinn JF. Surgery is associated with ventricular enlargement as well as cognitive and functional decline. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2016; 12: 590-7.



## Experimental Study

## Modification of apparent intracerebral hematoma volume on T2\*-weighted images during normobaric oxygen therapy may contribute to false diagnosis



Romain Goulay<sup>a,1</sup>, Antoine Drieu<sup>a,1</sup>, Camille Di Palma<sup>a,b</sup>, Palma Pro-Sistiaga<sup>c</sup>, Nicolas Delcroix<sup>c</sup>, Laurent Chazalviel<sup>d</sup>, Romaric Saulnier<sup>c</sup>, Clément Gakuba<sup>a,e</sup>, Suzanne Goursaud<sup>a,e</sup>, Allan R. Young<sup>a</sup>, Maxime Gauberti<sup>a,f</sup>, Cyrille Orset<sup>a</sup>, Evelyne Emery<sup>a,b</sup>, Denis Vivien<sup>a,d,\*</sup>, Thomas Gaberel<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>INSERM, UMR-S U1237, Pathophysiology and Imaging of Neurological Disorders, University Caen-Normandy, CHU Caen, GIP Cyceron, Bd Henri Becquerel, Caen, France

<sup>b</sup>Department of Neurosurgery, Caen University Hospital, Avenue de la côte de Nacre, Caen, France

<sup>c</sup>UMS 3408, UNICAEN, CNRS, GIP Cyceron, Bd Henri Becquerel, Caen, France

<sup>d</sup>UMR6301-ISTCT, CNRS, CERVOxy Group, GIP Cyceron, Bd Henri Becquerel, Caen, France

<sup>e</sup>Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Caen University Hospital, Avenue de la côte de Nacre, Caen, France

<sup>f</sup>Department of Radiology, Caen University Hospital, Avenue de la cote de Nacre, Caen, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 July 2017

Accepted 8 January 2018

## Keywords:

Diagnostic errors

Intracerebral hemorrhage

Magnetic resonance imaging

Oxygen inhalation therapy

## ABSTRACT

It was previously reported that normobaric oxygen therapy (NBO) significantly affected T2\*-weighted imaging in a mouse model of intracerebral hemorrhage (ICH). However, it is unclear whether a similar phenomenon exists in large volume ICH as seen in human pathology. We investigated the effects of NBO on T2\*-weighted images in a pig model of ICH. Our data show that NBO makes disappear a peripheral crown of the hematoma, which in turn decreases the apparent volume of ICH by 18%. We hypothesized that this result could be translated to ICH in human, and subsequently could lead to inaccurate diagnosis.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Magnetic resonance imaging (MRI) is the most recommended modalities to evaluate hemorrhagic and ischemic stroke patients [1]. As an important part of these patients requires normobaric oxygen therapy (NBO) [1], the MRI related NBO impact has to be investigated. It was reported that NBO dramatically decreased the sensibility of T2\*-weighted imaging to detect intracranial hemorrhage (ICH) in a rodent model [2]. However, ICH volume in mice is very limited, so the generalization of this finding to human pathology was not possible. In the present study, we investigated the effects of NBO on standard T2\*-weighted imaging in a pig model of ICH. The report was carried out in accordance with the ARRIVE guidelines, the European Directives and the French Legislation on Animal Experimentation, and also approved by the local ethic committee (#7754 CENOMEXA, N°51, 2657–01). A total of 13 Langrace pigs (35–40 kg) were included. During the surgical and imaging procedures, anesthesia was maintained with propofol

(80–120 µg/kg/min) and sevoflurane (1.5–2.0%). For ICH induction, a 3-mm burr hole was drilled at +2.4 cm anterior and +0.6 cm to the right of the bregma, and the dura mater was opened. The tip of a Fogarty catheter was introduced into the right frontal lobe and the balloon was inflated for 1 min. A catheter was then inserted into the preformed cavity and five ml of autologous arterial blood were injected (1.5 ml/min). The catheter was then removed and the wound closed [3].

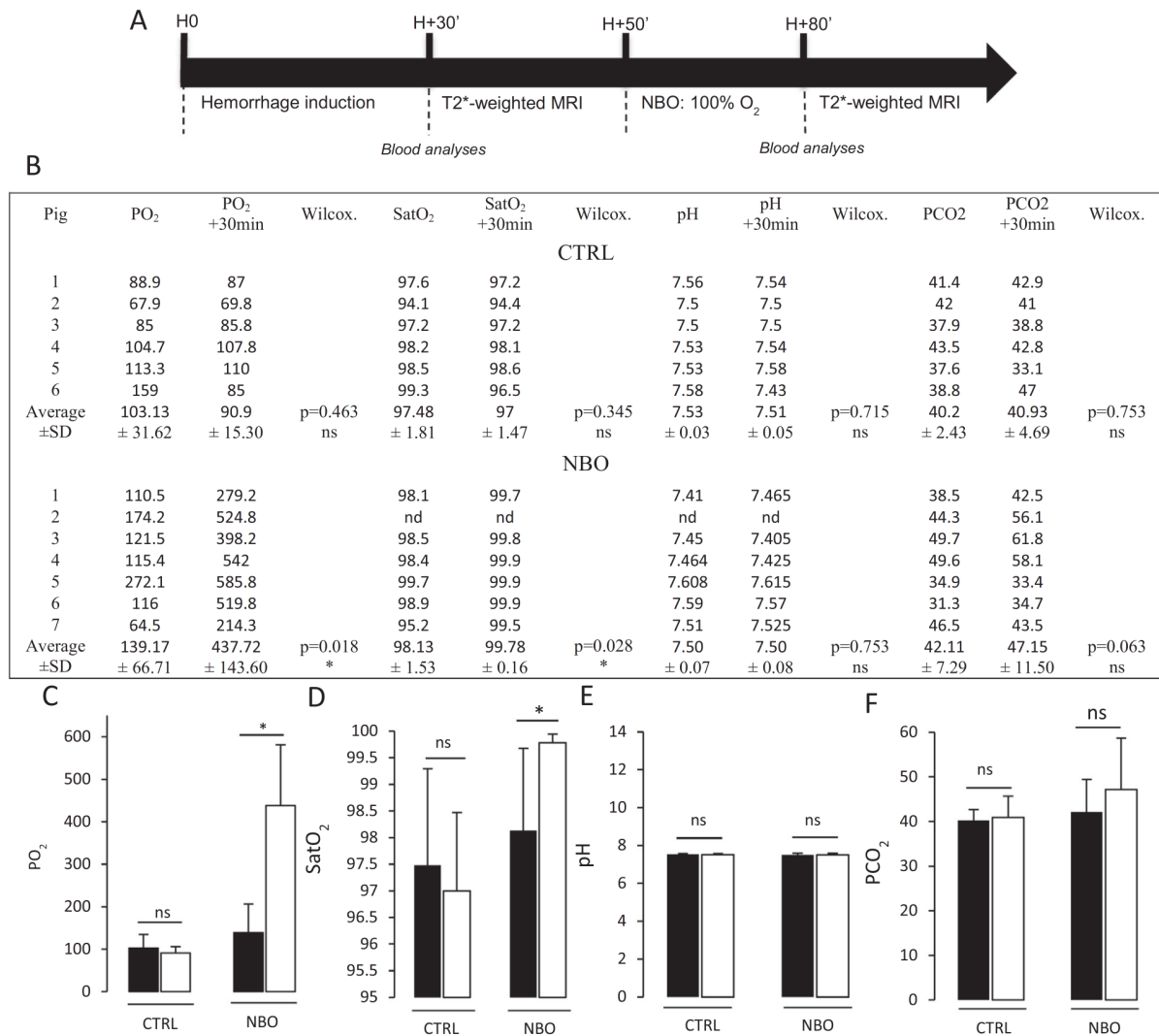
Pigs were first exposed to normoxia (fraction of inspired oxygen, FiO<sub>2</sub> = 20%) during ICH induction and for an additional 30 min. A first MRI acquisition was performed, then pigs were exposed to NBO (FiO<sub>2</sub> = 100%, NBO group, n = 7) or normoxia (CTRL group, n = 6) during 30 min. A second set of MRI acquisition was then performed. At each stage, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and pH arterial blood levels were measured using an automatic gas analyzer (Rapidlab, Siemens) (Fig. 1A). Experiments were performed in a 3 T scanner with the R3.2.3 release (Achieva quasar dual, Philips Healthcare; Amsterdam; The Netherlands) using small two elements flexible surface coil (FlexS, Philips Healthcare; Amsterdam; The Netherlands). The protocol consisted of a T2-weighted FFE sequence with these following sequence parameters: TR = 828.530 ms; TE = 16.1 ms; matrix size = 288 × 227; FOV = 230 × 182 × 71 mm;

\* Corresponding author at: Inserm, UMR-S U1237, Pathophysiology and Imaging of Neurological Disorders, University Caen-Normandy, CHU Caen, GIP Cyceron, Bd Henri Becquerel, Caen, France.

E-mail address: [vivien@cyceron.fr](mailto:vivien@cyceron.fr) (D. Vivien).

<sup>1</sup> Author with an equal contribution.





**Fig. 1.** NBO increases blood O<sub>2</sub> concentration. (A) Timeline of the performed experiments. (B) All the data are presented in the table. In comparison with CTRL group, NBO challenge increases (C) arterial blood PO<sub>2</sub> ( $139.17 \pm 66.7$  vs  $437.72 \pm 143.60$ ,  $p = 0.018$ ) and (D) SatO<sub>2</sub> ( $98.13 \pm 1.53$  vs  $99.78 \pm 0.16$ ,  $p = 0.028$ ). In both NBO and CTRL group, no significant changes were notice for (E) pH and (F) PCO<sub>2</sub>. "nd" means no data available. Wilcoxon signed rank test, \* =  $p < 0.05$ .

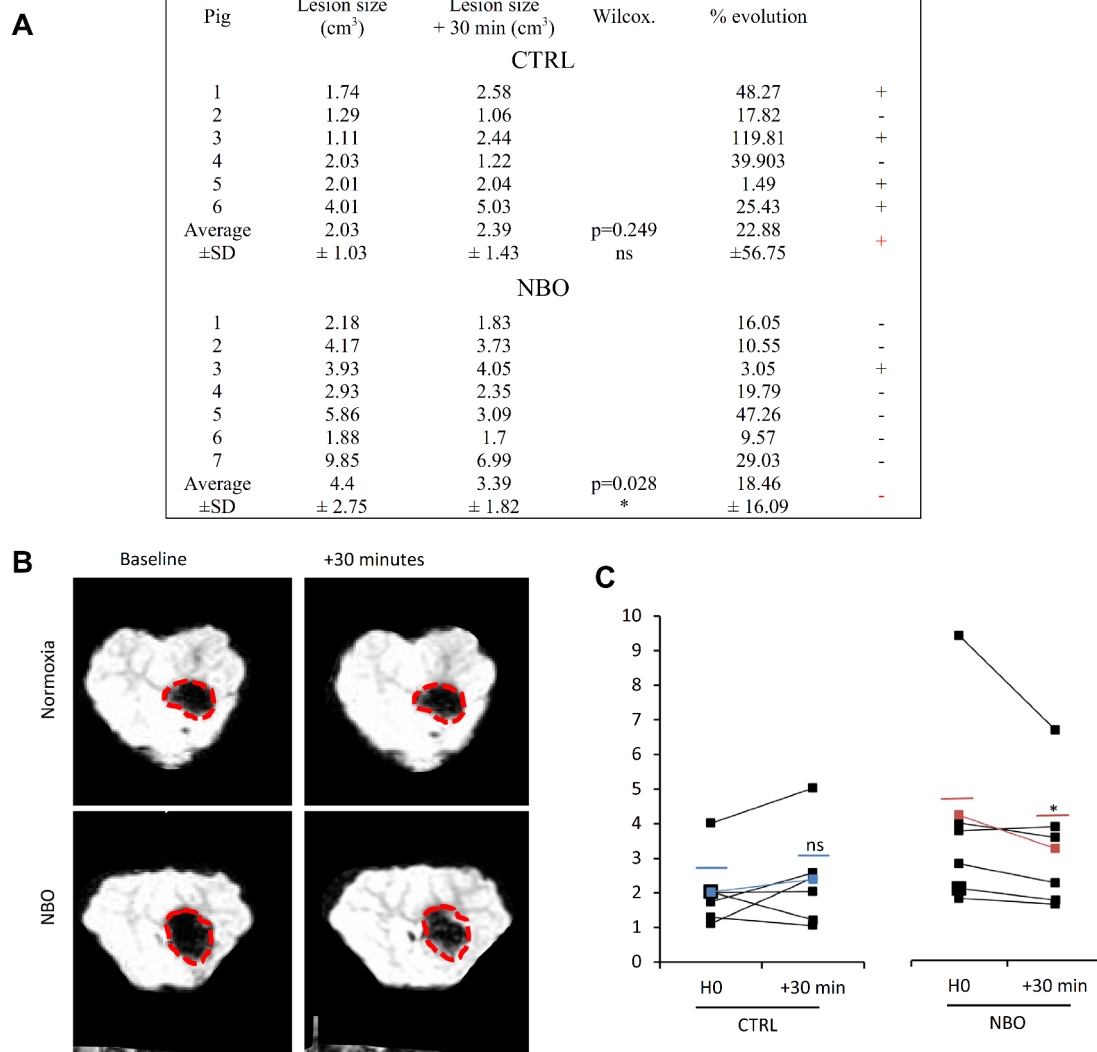
measurement time 151 s for 24 slices. Hemorrhagic volumes were then blindly quantified before and after normoxia or NBO challenge, using MRICron 6.6 (2013) software [4]. Wilcoxon signed rank tests were performed with the SYSTAT 13 software package.

Although not modified after 30 min of normoxia, PO<sub>2</sub> was 3 times higher after NBO ( $p = 0.018$ ) (Fig. 1B, C) and the blood O<sub>2</sub> saturation significantly increased ( $p = 0.028$ ) (Fig. 1B–D). General pH (Fig. 1B–E) and PCO<sub>2</sub> (Fig. 1B–F) did not differ after both conditions. Evolution of the hematoma volumes (Fig. 2A, B) revealed an 18% decrease of the apparent hematoma volume after 30 min of NBO ( $-18\%$ ,  $p = 0.028$ ), although the apparent hematoma volume slightly increased in normoxia ( $+22\%$ ,  $p = 0.249$ ) (Fig. 2C).

These data provide evidence in a large animal model that ICH signal on T2\*-weighted imaging is significantly affected by NBO, which confirm our previous work in mice [2]. This phenomenon can be explained by the transformation of deoxyhemoglobin (paramagnetic) to oxyhemoglobin (diamagnetic) due to a higher increased tissue concentration of O<sub>2</sub> induced by NBO, leading to normalization of the tissue magnetic susceptibility and therefore to an increase in magnetic resonance signal on T2\*-weighted images in hemorrhagic areas [5]. Interestingly, apparent hema-

toma volume in the normoxia group slightly increases. We hypothesized that this phenomenon is related to the transformation of oxyhemoglobin, present in the freshly induced hematoma, to deoxyhemoglobin. These results have several implications in preclinical studies. First, preclinical studies performed under anesthesia, involving measurement of hematoma volumes by T2\*-weighted imaging, should be considered with caution, and the PO<sub>2</sub> should be carefully monitored and reported as previously recommended [6,7]. We also unveil potential pitfalls of NBO therapy for T2\*-weighted imaging in patients, as our results suggest that T2\*-weighted imaging could 1) underestimate by about 18% the hematoma volume in patients treated by NBO and 2) fail to identify hematoma growth, which is a major risk factor of poor outcome. This would be particularly relevant for patients requiring respiratory support which are frequently ventilated with 100% O<sub>2</sub> during transport to the MRI facilities.

Nevertheless, since NBO is safe after ICH [8], identification of the underlying cause which remains a radiological challenge, may benefit from NBO preparation for revealing the brain parenchyma at the periphery of the hematoma. However, we must discuss



**Fig. 2.** NBO decreases the apparent hematoma volume on T2\*-weighted imaging. (A) All the volume of the lesion and their evolution are presented in the table. These data are calculated from (B) representative T2\*-weighted images under normoxia or NBO following ICH. Hypo-intensity related to hemoglobin presence partially disappears after NBO. (C) Absolute individual values of hematoma volume before and after normoxia (CTRL) or NBO challenge show a significant decrease of the hematoma visualization after NBO ( $4.40 \pm 2.75$  vs  $3.39 \pm 1.82$ ,  $p = 0.028$ , Orange ligne) but not after normoxia ( $2.03 \pm 1.03$  vs  $2.39 \pm 1.43$ ,  $p = 0.249$ , Blue ligne). Wilcoxon signed rank test, \*  $p < 0.05$ .

some limits of the present data. We investigated the effects of NBO therapy only 30 min after ICH onset. The efficiency of NBO preparation to induce disappearance of ICH on T2\*-weighted imaging later after ICH appearance remains to be investigated [9]. Finally, the clinical implications of our findings remain elusive and deserve to be adequately confirmed by human studies.

**Author contribution statement**

JP, DV, CO, RG and TG designed the experiments. TG, RG, AD, CDP, SG, LC, RS, CG, and PPS performed the experiments. PPS, ND, RG, AD acquired and analyzed the data. TG, RG, AD, PPS and DV wrote the manuscript.

**Disclosure/conflicts of interest**

The authors declare that they have no competing interest

**Acknowledgements**

This work was supported by the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, the French Ministry of Research and Technology. We thank Anthony LEVILLY, Severine LEVILLAIN and Claudine FAUCHON for their valuable technical support.

**Appendix A. Supplementary data**

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.01.046>.

**References**

[1] Jauch EC, Saver JL, Adams HP, Bruno A, Connors JJB, Demerschalk BM. 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 2013;44(3):870–947.

- [2] Gaberel T, Gakuba C, Hebert M, Montagne A, Agin V, Rubio M. Intracerebral hematomas disappear on T<sup>2</sup>-weighted images during normobaric oxygen therapy. *Stroke* 2013;44(12):3482–9.
- [3] Rohde V, Rohde I, Thiex R, Ince A, Jung A, Dücker G. Fibrinolysis therapy achieved with tissue plasminogen activator and aspiration of the liquefied clot after experimental intracerebral hemorrhage: rapid reduction in hematoma volume but intensification of delayed edema formation. *J Neurosurg* 2002;97(4):954–62.
- [4] Rorden C, Karnath H-O, Bonilha L. Improving lesion-symptom mapping. *J Cogn Neurosci* 2007;19(7):1081–8.
- [5] Thulborn KR, Waterton JC, Matthews PM, Radda GK. Oxygenation dependence of the transverse relaxation time of water protons in whole blood at high field. *Biochim Biophys Acta* 1982;714(2):265–70.
- [6] Dirnagl U. Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26(12):1465–78.
- [7] Sudduth TL, Powell DK, Smith CD, Greenstein A, Wilcock DM. Induction of hyperhomocysteinemia models vascular dementia by induction of cerebral microhemorrhages and neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013;33(5):708–15.
- [8] Fujiwara N, Mandeville ET, Geng X, Luo Y, Arai K, Wang X. Effect of normobaric oxygen therapy in a rat model of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2011;42(5):1469–72.
- [9] Linfante I, Llinas RH, Caplan LR, Warach S. MRI features of intracerebral hemorrhage within 2 hours from symptom onset. *Stroke* 1999;30(11):2263–7.

**Exogenous nanovesicles bearing tissue factor improve outcome in intracranial hemorrhage stroke models by acting as hemostatic patches.**

**Authors:** Fanny Potzeha<sup>1</sup>, Alice Grangier\*<sup>2</sup>, Manuel Navarro-Oviedo\*<sup>1</sup>, Suzanne Goursaud<sup>1</sup>, Marina Rubio<sup>1</sup>, Charlene Jacqmarcq<sup>1</sup>, Mervé Yetim<sup>1</sup>, Yohann Repessé<sup>1,3</sup>, Florence Gazeau<sup>2</sup>, Claire Wilhelm<sup>2</sup>, Thomas Gaberel<sup>1,4</sup>, Amanda K.A. Silva<sup>2</sup>, Denis Vivien<sup>1,5</sup>, Maxime Gauberti<sup>§1,6</sup> Sara Martinez de Lizarrondo<sup>§1</sup>

\* These authors contributed equally, alphabetical order.

§ These authors share senior authorship

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Normandie Univ, UNICAEN, IN SERM, PhIND "Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders", Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, Cyceron, 14000 Caen, France

<sup>2</sup>MSC, Université de Paris CNRS, UMR7057, 45 rue des Saints Pères 75006, Paris, France.

<sup>3</sup>CHU Caen, Department of Hematology and Hemostasis, CHU de Caen Côte de Nacre, Caen, France.

<sup>4</sup>CHU Caen, Department of Neurosurgery, CHU de Caen Côte de Nacre, Caen, France.

<sup>5</sup>CHU Caen, Clinical Research Department, CHU de Caen Côte de Nacre, Caen, France.

<sup>6</sup>CHU Caen, Department of diagnostic imaging and interventional radiology, CHU de Caen Côte de Nacre, Caen, France.

To whom correspondence should be addressed: Sara Martinez de Lizarrondo, PhD, INSERM U1237 "Physiopathology and Imaging for Neurological Disorders (PhIND)", Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, GIP Cyceron, Bd Henri Becquerel, BP5229, 14074 Caen, France, Phone: 0033.231.47.01.55, Fax: 33.231.47.02.22, Mail: smartinez@cyceron.fr

## **ABSTRACT**

Intracerebral hemorrhage (ICH) is the most severe stroke subtype. Stopping the ongoing bleeding using pro-hemostatic agents is a promising therapeutic strategy that remains limited by serious side effects such as uncontrolled thrombosis. In the present study, we developed an original therapeutic strategy for ICH based on the administration of nanosized extracellular vesicles (EVs) that can trigger the coagulation cascade specifically at the site of active bleeding. We first generated large amounts of EVs from TNF-stimulated THP-1 monocytes in bioreactors. Those monocyte-EVs presented a mean size of ~300 nm, a high pro-hemostatic activity reducing the clotting time in a dose- and TF-dependent manner and a high expression of a targeting protein on their surface (P-Selectin Glycoprotein Ligand 1, PSGL-1). In preclinical models of ICH in mice, intravenous injection of mEVs improved stroke outcome in a dose-dependent manner. mEVs at 1 mg/kg prevented hematoma growth by 43% and improved neurological score at 24h compared to control mice ( $p < 0.01$ ,  $n = 15/\text{group}$ ). These effects were also present in more severe models of ICH (enoxaparin or warfarin treated mice). Importantly, the beneficial effect was blocked when using antibodies blocking either TF or PSGL-1, suggesting that both the pro-coagulant activity and the ability to target damaged brain vessels are mandatory for the therapeutic efficacy of EVs. To conclude, exogenous mEVs bearing TF and PSGL-1 improve outcome after collagenase-induced ICH by acting as intravascular hemostatic patches.

# BIBLIOGRAPHIE

- Ahmed, S. R. et al. 2011. « Prostaglandin D2 regulates CD4+ memory T cell trafficking across blood vascular endothelium and primes these cells for clearance across lymphatic endothelium ». *J Immunol*, 187(3), 1432-1439.
- Alan, W, C Mutch, and W A C Mutch. n.d. "New Concepts Regarding Cerebral Vasospasm: Glial-Centric Mechanisms Nouveaux Concepts Concernant Le Vasospasme Cérébral: Des Mécanismes Centrés Sur La Glie." Accessed October 2, 2023.
- Algra, Annemijn M., Catharina J.M. Klijn, Frans M. Helmerhorst, Ale Algra, and Gabriël J.E. Rinkel. 2012. "Female Risk Factors for Subarachnoid Hemorrhage." *Neurology* 79 (12): 1230–36.
- Allen, George S., Hyo S. Ahn, Thomas J. Preziosi, Roy Battye, Stephen C. Boone, Shelley N. Chou, David L. Kelly, et al. 1983. "Cerebral Arterial Spasm--a Controlled Trial of Nimodipine in Patients with Subarachnoid Hemorrhage." *The New England Journal of Medicine* 308 (11): 619–24.
- Al-Mufti, Fawaz, Krishna Amuluru, Nitesh Damodara, Vincent Dodson, David Roh, Sachin Agarwal, Philip M. Meyers, et al. 2019. "Admission Neutrophil-Lymphocyte Ratio Predicts Delayed Cerebral Ischemia Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *Journal of Neurointerventional Surgery* 11 (11): 1135–40.
- Anderson, Craig S., Valery Feigin, Derrick Bennett, Ruey Bin Lin, Graeme Hankey, and Konrad Jamrozik. 2004. "Active and Passive Smoking and the Risk of Subarachnoid Hemorrhage: An International Population-Based Case-Control Study." *Stroke* 35 (3): 633–37.
- Anderson, Steven W, Michael M Todd, Bradley J Hindman, William R Clarke, James C Torner, Daniel Tranel, Bongin Yoo, Julie Weeks, Kenneth W Manzel, and Satwant Samra. 2006. "Effects of Intraoperative Hypothermia on Neuropsychological Outcomes after Intracranial Aneurysm Surgery." *Ann Neurol* 60: 518–27.
- Asikainen, Aleksanteri, Miikka Korja, Jaakko Kaprio, and Ilari Rautalin. 2023. "Case Fatality in Patients With Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage in Finland." *Neurology* 100 (3): e348–56.
- Augustin H, Kozián D, Johnson R. 1994. "Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes". *Bioessays* 901-906.
- Ayata, Cenk, and Martin Lauritzen. 2015. "Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature." *Physiological Reviews* 95 (3): 953–93.
- Azambuja Pereira Filho, Nelson de, Arthur de Azambuja Pereira Filho, Fabiano Pasqualotto Soares, and Ligia Maria Barbosa Coutinho. 2010. "Effect of N-Acetylcysteine on Vasospasm in Subarachnoid Hemorrhage." *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 68 (6): 918–22.

- Badjatia, Neeraj, Aimee Monahan, Amanda Carpenter, Jacqueline Zimmerman, J. Michael Schmidt, Jan Claassen, E. Sander Connolly, Stephan A. Mayer, Wahida Karmally, and David Seres. 2015. "Inflammation, Negative Nitrogen Balance, and Outcome after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *Neurology* 84 (7): 680–87.
- Banks, Jamie L, and Charles A Marotta. 2007. "Outcomes Validity and Reliability of the Modified Rankin Scale: Implications for Stroke Clinical Trials A Literature Review and Synthesis."
- Barkalow, Fern J, Michael J Goodman, Mary E Gerritsen, and Tanya N Mayadas. 1996. "Brain Endothelium Lack One of Two Pathways of P-Selectin-Mediated Neutrophil Adhesion." *Blood* 88 (12): 4585–93.
- Bart van der Worp, H., David W. Howells, Emily S. Sena, Michelle J. Porritt, Sarah Rewell, Victoria O'Collins, and Malcolm R. Macleod. 2010. "Can Animal Models of Disease Reliably Inform Human Studies?" *PLoS Medicine* 7 (3): 1–8.
- Bavarsad Shahripour, Reza, Mark R. Harrigan, and Andrei V. Alexandrov. 2014. "N-Acetylcysteine (NAC) in Neurological Disorders: Mechanisms of Action and Therapeutic Opportunities." *Brain and Behavior* 4 (2): 108–22.
- Bederson, Joshua B., E. Sander Connolly, H. Hunt Batjer, Ralph G. Dacey, Jacques E. Dion, Michael N. Diringer, John E. Duldner, Robert E. Harbaugh, Aman B. Patel, and Robert H. Rosenwasser. 2009. "Guidelines for the Management of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Statement for Healthcare Professionals from a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association." *Stroke* 40 (3): 994–1025.
- Belliere, Julie, Sara Martinez de Lizarrondo, Robin P. Choudhury, Aurélien Quenault, Audrey Le Béhot, Christine Delage, Dominique Chauveau, et al. 2015. "Unmasking Silent Endothelial Activation in the Cardiovascular System Using Molecular Magnetic Resonance Imaging." *Theranostics* 5 (11): 1187–1202.
- Bernardo, A., C. Ball, L. Nolasco, H. Choi, J. L. Moake, and J. F. Dong. 2005. "Platelets Adhered to Endothelial Cell-Bound Ultra-Large von Willebrand Factor Strings Support Leukocyte Tethering and Rolling under High Shear Stress." *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 3 (3): 562–70.
- Boluijt, Jacoline, Joost C.M. Meijers, Gabriel J.E. Rinkel, and Mervyn D.I. Vergouwen. 2015. "Hemostasis and Fibrinolysis in Delayed Cerebral Ischemia after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 35 (5): 724–33.
- Bonnard, Thomas, Maxime Gauberti, Sara Martinez De Lizarrondo, Francisco Campos, and Denis Vivien. 2019. "Recent Advances in Nanomedicine for Ischemic and Hemorrhagic Stroke." *Stroke* 50 (5): 1318–24.



- Broos, K et al. 2011. "Platelets at work in primary hemostasis". *Blood Reviews* 25 (4) 155-167.
- Budohoski, K P, M Czosnyka, P J Kirkpatrick, P Smielewski, J D Pickard, L A Steiner, Karol P Budohoski, et al. 2013. "Clinical Relevance of Cerebral Autoregulation Following Subarachnoid Haemorrhage." *Nat. Rev. Neurol* 9: 152–63.
- Bühler, Dominik, Kathrin Schüller, and Nikolaus Plesnila. 2014. "Protocol for the Induction of Subarachnoid Hemorrhage in Mice by Perforation of the Circle of Willis with an Endovascular Filament." *Translational Stroke Research* 5 (6): 653–59.
- Butzkueven, H., A. H. Evans, A. Pitman, C. Leopold, D. J. Jolley, A. H. Kaye, C. J. Kilpatrick, and S. M. Davis. 2000. "Onset Seizures Independently Predict Poor Outcome after Subarachnoid Hemorrhage." *Neurology* 55 (9): 1315–20.
- Cahill, W. Julian, John H. Calvert, and John H. Zhang. 2006. "Mechanisms of Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26 (11): 1341–53.
- Catieau B et al. 2018. "Endothelial cell surface limits coagulation without modulating the antithrombin potency". *Thromb Res*, 167, 88-95.
- Chauhan, Anil K., Janka Kisucka, Alexander Brill, Meghan T. Walsh, Friedrich Scheiflinger, and Denisa D. Wagner. 2008. "ADAMTS13: A New Link between Thrombosis and Inflammation." *The Journal of Experimental Medicine* 205 (9): 2065–74.
- Chavignon, Arthur, Baptiste Heiles, Vincent Hingot, Cyrille Orset, Denis Vivien, and Olivier Couture. 2022. "3D Transcranial Ultrasound Localization Microscopy in the Rat Brain With a Multiplexed Matrix Probe." *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering* 69 (7): 2132–42.
- Chavignon, Arthur, Vincent Hingot, Cyrille Orset, Denis Vivien, and Olivier Couture. 2022. "3D Transcranial Ultrasound Localization Microscopy for Discrimination between Ischemic and Hemorrhagic Stroke in Early Phase." *Scientific Reports* 12 (1).
- Chen, Jinman, Linmei Wang, Hao Xu, Lianping Xing, Zixin Zhuang, Yangkang Zheng, Xuefei Li, et al. 2020. "Meningeal Lymphatics Clear Erythrocytes That Arise from Subarachnoid Hemorrhage." *Nature Communications* 11 (1).
- Chen, Junmei, Adili Rehemani, Francisca C. Gushiken, Leticia Nolasco, Xiaoyun Fu, Joel L. Moake, Heyu Ni, and José A. López. 2011. "N-Acetylcysteine Reduces the Size and Activity of von Willebrand Factor in Human Plasma and Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (2): 593–603.
- Chen, Sheng, Jinqi Luo, Cesar Reis, Anatol Manaenko, and Jianmin Zhang. 2017. "Hydrocephalus after Subarachnoid Hemorrhage: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment." *BioMed Research International* 2017.

- Choi, H. Alex, Suhas S. Bajgur, Wesley H. Jones, Jude P.J. Savarraj, Sang Bae Ko, Nancy J. Edwards, Tiffany R. Chang, et al. 2016. "Quantification of Cerebral Edema After Subarachnoid Hemorrhage." *Neurocritical Care* 25 (1): 64–70.
- Claassen, Jan, Gary L. Bernardini, Kurt Kreiter, Joseph Bates, Yunling E. Du, Daphne Copeland, E. Sander Connolly, and Stephan A. Mayer. 2001. "Effect of Cisternal and Ventricular Blood on Risk of Delayed Cerebral Ischemia After Subarachnoid Hemorrhage." *Stroke* 32 (9): 2012–20.
- Claassen, Jan, J. Ricardo Carhuapoma, Kurt T. Kreiter, Evelyn Y. Du, E. Sander Connolly, and Stephan A. Mayer. 2002. "Global Cerebral Edema after Subarachnoid Hemorrhage: Frequency, Predictors, and Impact on Outcome." *Stroke* 33 (5): 1225–32.
- Claassen, Jan, and Soojin Park. 2022. "Spontaneous Subarachnoid Haemorrhage." *Lancet* 400 (10355): 846–52.
- Connolly, E Sander Jr, Alejandro A Rabinstein, J Ricardo Carhuapoma, Colin P Derdeyn, Jacques Dion, Randall T Higashida, Brian L Hoh, et al. 2012. "Guidelines for the Management of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Guideline for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association." *Stroke* 43 (6): 1711–37.
- Couture Olivier, Vincent Hingot, Baptiste Heiles, Pauline Muleki-Seya, and Mickael Tanter. 2018. "Ultrasound Localization Microscopy and Super-Resolution: A State of the Art." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 65 (8): 1304–20.
- Cozzolino, Olga, Maria Marchese, Francesco Trovato, Enrico Pracucci, Gian Michele Ratto, Maria Gabriella Buzzi, Federico Sicca, and Filippo M. Santorelli. 2018. "Understanding Spreading Depression from Headache to Sudden Unexpected Death." *Frontiers in Neurology* 9 (FEB).
- Crescente, Marilena, Grace M. Thomas, Melanie Demers, Jaymie R. Voorhees, Siu Ling Wong, Benoit Ho-Tin-Noe, and Denisa D. Wagner. 2012. "ADAMTS13 Exerts a Thrombolytic Effect in Microcirculation." *Thrombosis and Haemostasis* 108 (3): 527–32.
- Crobeddu, Emanuela, Manoj K. Mittal, Stefan Dupont, Eelco F.M. Wijdicks, Giuseppe Lanzino, and Alejandro A. Rabinstein. 2012. "Predicting the Lack of Development of Delayed Cerebral Ischemia after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *Stroke* 43 (3): 697–701.
- Crowley, R Webster, ; R Medel, Aaron S Dumont, Neal F Kassell, Stephan A Mayer, Daniel Ruefenacht, Peter Schmiedek, Stephan Weidauer, Alberto Pasqualin, and ; R Loch Macdonald. 2011. "Angiographic Vasospasm Is Strongly Correlated With Cerebral Infarction After Subarachnoid Hemorrhage." *Stroke* 42(4): 919-23.
- Cucurull E, Gharavi A. 1997. "Thrombomodulin: a new frontier in lupus research?". *Clin Exp Rheumatol*, pp1-4.

- Dayyani, Mojtaba, Behnam Sadeghirad, James C. Grotta, Samira Zabihyan, Saba Ahmadvand, Yuting Wang, Gordon H. Guyatt, and Sepideh Amin-Hanjani. 2022. "Prophylactic Therapies for Morbidity and Mortality After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Randomized Trials." *Stroke* 53 (6): 1993–2005.
- Deddens, Lisette H., Geralda A.F. van Tilborg, Kajo van der Marel, Hedi Hunt, Annette van der Toorn, Max A. Viergever, Helga E. de Vries, and Rick M. Dijkhuizen. 2017. "In Vivo Molecular MRI of ICAM-1 Expression on Endothelium and Leukocytes from Subacute to Chronic Stages After Experimental Stroke." *Translational Stroke Research* 8 (5): 440–48.
- Deddens, Lisette H., Geralda A.F. Van Tilborg, Annette Van Der Toorn, Kajo Van Der Marel, Leonie E.M. Paulis, Louis Van Bloois, Gert Storm, et al. 2013. "MRI of ICAM-1 Upregulation after Stroke: The Importance of Choosing the Appropriate Target-Specific Particulate Contrast Agent." *Molecular Imaging and Biology* 15 (4): 411–22.
- Demené, Charlie, Justine Robin, Alexandre Dizeux, Baptiste Heiles, Mathieu Pernot, Mickael Tanter, and Fabienne Perren. 2021a. "Transcranial Ultrafast Ultrasound Localization Microscopy of Brain Vasculature in Patients." *Nature Biomedical Engineering* 5 (3): 219–28. <https://doi.org/10.1038/S41551-021-00697-X>.
- Denis, Cécile V., Patrick André, Simin Saffaripour, and Denisa D. Wagner. 2001. "Defect in Regulated Secretion of P-Selectin Affects Leukocyte Recruitment in von Willebrand Factor-Deficient Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (7): 4072–77.
- Denorme, Frederik, Friederike Langhauser, Linda Desender, Aline Vandebulcke, Hanspeter Rottensteiner, Barbara Plaimauer, Olivier François, et al. 2016. "ADAMTS13-Mediated Thrombolysis of t-PA-Resistant Occlusions in Ischemic Stroke in Mice." *Blood* 127 (19): 2337–45.
- Dhar, Rajat, and Michael N. Diringer. 2008. "The Burden of the Systemic Inflammatory Response Predicts Vasospasm and Outcome after Subarachnoid Hemorrhage." *Neurocritical Care* 8 (3): 404–12.
- Dhar, Rajat, Michael T. Scalfani, Spiros Blackburn, Allyson R. Zazulia, Tom Videen, and Michael Diringer. 2012. "Relationship between Angiographic Vasospasm and Regional Hypoperfusion in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *Stroke* 43 (7): 1788–94.
- Diacovo, Thomas G., Kamal D. Puri, R. Aaron Warnock, Timothy A. Springer, and Ulrich H. Von Andrian. 1996. "Platelet-Mediated Lymphocyte Delivery to High Endothelial Venules." *Science (New York, N.Y.)* 273 (5272): 252–55.
- Dodd, William S., Dimitri Laurent, Aaron S. Dumont, David M. Hasan, Pascal M. Jabbour, Robert M. Starke, Koji Hosaka, Adam J. Polifka, Brian L. Hoh, and Nohra Chalouhi. 2021a.

“Pathophysiology of Delayed Cerebral Ischemia After Subarachnoid Hemorrhage: A Review.” *Journal of the American Heart Association* 10 (15).

Dorhout Mees, S. M., Gabriel J.E. Rinkel, V. L. Feigin, A. Algra, W. M. Van Den Bergh, M. Vermeulen, and J. Van Gijn. 2007. “Calcium Antagonists for Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage.” *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 3.

Dreier, J. P., N. Ebert, J. Priller, D. Megow, U. Lindauer, R. Klee, U. Reuter, et al. 2000. “Products of Hemolysis in the Subarachnoid Space Inducing Spreading Ischemia in the Cortex and Focal Necrosis in Rats: A Model for Delayed Ischemic Neurological Deficits after Subarachnoid Hemorrhage?” *Journal of Neurosurgery* 93 (4): 658–66.

Dreier, Jens P., Sebastian Major, Andrew Manning, Johannes Woitzik, Christoph Drenckhahn, Jens Steinbrink, Christos Tolia, et al. 2009. “Cortical Spreading Ischaemia Is a Novel Process Involved in Ischaemic Damage in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage.” *Brain : A Journal of Neurology* 132 (Pt 7): 1866–81.

Dreier, Jens P., Olaf Windmüller, Gabor Petzold, Ute Lindauer, Karl M. Einhäupl, and Ulrich Dirnagl. 2002. “Ischemia Triggered by Red Blood Cell Products in the Subarachnoid Space Is Inhibited by Nimodipine Administration or Moderate Volume Expansion/Hemodilution in Rats.” *Neurosurgery* 51 (6): 1457–67.

Dreier, Jens P., Johannes Woitzik, Martin Fabricius, Robin Bhatia, Sebastian Major, Christoph Drenckhahn, Thomas Nicolas Lehmann, et al. 2006. “Delayed Ischaemic Neurological Deficits after Subarachnoid Haemorrhage Are Associated with Clusters of Spreading Depolarizations.” *Brain : A Journal of Neurology* 129 (Pt 12): 3224–37.

Dumas, Sébastien J., Elda Meta, Mila Borri, Yonglun Luo, Xuri Li, Ton J. Rabelink, and Peter Carmeliet. 2021. “Phenotypic Diversity and Metabolic Specialization of Renal Endothelial Cells.” *Nature Reviews. Nephrology* 17 (7): 441.

Duong, Cao Nguyen, Astrid F. Nottebaum, Stefan Butz, Stefan Volkery, Dagmar Zeuschner, Martin Stehling, and Dietmar Vestweber. 2020. “Interference With ESAM (Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule) Plus Vascular Endothelial-Cadherin Causes Immediate Lethality and Lung-Specific Blood Coagulation.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 40 (2): 378–93.

Egashira, Y., H. Shishido, Y. Hua, R. F. Keep, and G. Xi. 2014. “New Grading System Based on Magnetic Resonance Imaging in a Mouse Model of Subarachnoid Hemorrhage.” *Stroke* 46 (2): 582–84.

Eide, Per Kristian, and Geir Ringstad. 2015. “MRI with Intrathecal MRI Gadolinium Contrast Medium Administration: A Possible Method to Assess Glymphatic Function in Human Brain.” *Acta Radiologica Open* 4 (11): 205846011560963.

- Errico, Claudia, Juliette Pierre, Sophie Pezet, Yann Desailly, Zsolt Lenkei, Olivier Couture, and Mickael Tanter. 2015. "Ultrafast Ultrasound Localization Microscopy for Deep Super-Resolution Vascular Imaging." *Nature* 527 (7579): 499–502.
- Etminan, Nima, Han-Sol Chang, Katharina Hackenberg, Nicolien K de Rooij, Mervyn D I Vergouwen, Gabriel J E Rinkel, and Ale Algra. 2019. "Worldwide Incidence of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage According to Region, Time Period, Blood Pressure, and Smoking Prevalence in the Population A Systematic Review and Meta-Analysis Supplemental Content." *JAMA Neurol* 76 (5): 588–97.
- Fayol, P, H Carrière, D Habonimana, P-M Preux, and J.-J Dumond. 2004. "Article Original." <https://doi.org/10.1016/j.annrmp.2004.01.004>.
- Feigin, V. L., G. J.E. Rinkel, A. Algra, M. Vermeulen, and J. Van Gijn. 1998. "Calcium Antagonists in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review." *Neurology* 50 (4): 876–83.
- Feigin, Valery L., Gabriel J.E. Rinkel, Carlene M.M. Lawes, Ale Algra, Derrick A. Bennett, Jan Van Gijn, and Craig S. Anderson. 2005. "Risk Factors for Subarachnoid Hemorrhage." *Stroke* 36 (12): 2773–80.
- Feigin, Valery L., Benjamin A. Stark, Catherine Owens Johnson, Gregory A. Roth, Catherine Bisignano, Gdiom Gebreheat Abady, Mitra Abbasifard, 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): 795.
- Feigin, Valery, Varsha Parag, Carlene M M Lawes, Anthony Rodgers, Il Suh, Mark Woodward, Konrad Jamrozik, and Hirotsugu Ueshima. 2005. "Smoking and Elevated Blood Pressure Are the Most Important Risk Factors for Subarachnoid Hemorrhage in the Asia-Pacific Region An Overview of 26 Cohorts Involving 306 620 Participants."
- Figueiredo, Rodrigo T, Patricia L Fernandez, Diego S Mourao-Sa, Bá N rbara Porto, Fabianno F Dutra, Letícia S Alves, Marcus F Oliveira, Pedro L Oliveira, Auré V lio Graça-Souza, and Marcelo T Bozza. 2007. "Characterization of Heme as Activator of Toll-like Receptor 4 \*."
- Fisher, C. M., J. P. Kistler, and J. M. Davis. 1980. "Relation of Cerebral Vasospasm to Subarachnoid Hemorrhage Visualized by Computerized Tomographic Scanning." *Neurosurgery* 6 (1): 1–9.
- Fishman, Alfred P. 1982. "Endothelium: A Distributed Organ of Diverse Capabilities." *Annals of the New York Academy of Sciences* 401 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1982.TB25702.X>.
- Fournier, Antoine P., Sara Martinez De Lizarrondo, Adrien Rateau, Axel Gerard-Brisou, Maximilian J. Waldner, Markus F. Neurath, Denis Vivien, Fabian Docagne, and Maxime Gauberti. 2020a. "Ultrasensitive Molecular Imaging of Intestinal Mucosal Inflammation

Using Leukocyte-Mimicking Particles Targeted to MAdCAM-1 in Mice.” *Science Translational Medicine* 12 (560).

- Fournier, Antoine Philippe, Aurélien Quenault, Sara Martinez De Lizarrondo, Maxime Gauberti, Gilles Defer, Denis Vivien, Fabian Docagne, and Richard MacRez. 2017. “Prediction of Disease Activity in Models of Multiple Sclerosis by Molecular Magnetic Resonance Imaging of P-Selectin.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (23): 6116–21.
- Frantzas, Joseph, Emily S. Sena, Malcolm R. MacLeod, and Rustam Al Shahi Salman. 2011. “Treatment of Intracerebral Hemorrhage in Animal Models: Meta-Analysis.” *Annals of Neurology* 69 (2): 389–99.
- Friedrich, Benjamin, Frank Müller, Sergej Feiler, Karsten Schöller, and Nikolaus Plesnila. 2012. “Experimental Subarachnoid Hemorrhage Causes Early and Long-Lasting Microarterial Constriction and Microthrombosis: An in-Vivo Microscopy Study.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32 (3): 447–55.
- Friedrich, Victor, Rowena Flores, Artur Muller, and Fatima A. Sehba. 2010. “Luminal Platelet Aggregates in Functional Deficits in Parenchymal Vessels after Subarachnoid Hemorrhage.” *Brain Research* 1354 (October): 179–87.
- Frijns, C. J.M., K. M. Kasius, A. Algra, R. Fijnheer, and G. J.E. Rinkel. 2006. “Endothelial Cell Activation Markers and Delayed Cerebral Ischaemia in Patients with Subarachnoid Haemorrhage.” *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 77 (7): 863–67.
- Frontera, Jennifer A, Andres Fernandez, ; J Michael Schmidt, Jan Claassen, Katja E Wartenberg, Neeraj Badjatia, ; E Sander Connolly, and Stephan A Mayer. 2009. “Defining Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage What Is the Most Clinically Relevant Definition?”
- Frontera, Jennifer A., John J. Lewin, Alejandro A. Rabinstein, Imo P. Aisiku, Anne W. Alexandrov, Aaron M. Cook, Gregory J. del Zoppo, et al. 2015. “Guideline for Reversal of Antithrombotics in Intracranial Hemorrhage.” *Neurocritical Care* 2015 24:1 24 (1): 6–46.
- Fuh, Kenneth F., Robert D. Shepherd, Jessica S. Withell, Brayden K. Kooistra, and Kristina D. Rinker. 2021. “Fluid Flow Exposure Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Adhesion of Breast Cancer Cells to Endothelial Cells.” *Breast Cancer Research : BCR* 23 (1).
- Fujii, Mutsumi, Junhao Yan, William B. Rolland, Yoshiteru Soejima, Basak Caner, and John H. Zhang. 2013. “Early Brain Injury, an Evolving Frontier in Subarachnoid Hemorrhage Research.” *Translational Stroke Research* 4 (4): 432–46.
- Furchgott, Robert F., and John V. Zawadzki. 1980. “The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine.” *Nature* 288 (5789): 373–76. <https://doi.org/10.1038/288373A0>.

- Furie, B, Furie B C, and Flaumenhaft R. 2001. "A Journey with Platelet P-Selectin: The Molecular Basis of Granule Secretion, Signalling and Cell Adhesion - PubMed." *Tromb. Haemost.* July 2001. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11487009/>.
- Gaberel, T., C. Gakuba, F. Fournel, E. Le Blanc, C. Gaillard, L. P. Saint Paul, F. Chaillot, P. Tanguy, J. J. Parienti, and E. Emery. 2019a. "FIVHeMA: Intraventricular Fibrinolysis versus External Ventricular Drainage Alone in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Randomized Controlled Trial." *Neuro-Chirurgie* 65 (1): 14–19. <https://doi.org/10.1016/J.NEUCHI.2018.11.004>.
- Gaberel, Thomas, Clement Gakuba, Romain Goulay, Sara Martinez De Lizarrondo, Jean Luc Hanouz, Evelyne Emery, Emmanuel Touze, Denis Vivien, and Maxime Gauberti. 2014a. "Impaired Glymphatic Perfusion after Strokes Revealed by Contrast-Enhanced MRI: A New Target for Fibrinolysis?" *Stroke* 45 (10): 3092–96.
- García-Rodríguez, Luis A., David Gaist, Jonathan Morton, Charlotte Cookson, and Antonio González-Pérez. 2013. "Antithrombotic Drugs and Risk of Hemorrhagic Stroke in the General Population." *Neurology* 81 (6): 566–74.
- Gauberti, Maxime, Antoine P. Fournier, Fabian Docagne, Denis Vivien, and Sara Martinez de Lizarrondo. 2018. "Molecular Magnetic Resonance Imaging of Endothelial Activation in the Central Nervous System." *Theranostics* 8 (5): 1195–1212.
- Gauberti, Maxime, Sara Martinez De Lizarrondo, and Denis Vivien. 2016. "The 'Inflammatory Penumbra' in Ischemic Stroke: From Clinical Data to Experimental Evidence." *European Stroke Journal* 1 (1): 20–27.
- Gauberti, Maxime, and Sara Martinez de Lizarrondo. 2021. "Molecular MRI of Neuroinflammation: Time to Overcome the Translational Roadblock." *Neuroscience* 474 (October): 30–36.
- Gauberti, Maxime, Axel Montagne, Oscar A. Marcos-Contreras, Audrey Le Béhot, Eric Maubert, and Denis Vivien. 2013. "Ultra-Sensitive Molecular MRI of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Reveals a Dynamic Inflammatory Penumbra after Strokes." *Stroke* 44 (7): 1988–96.
- Gauberti, Maxime, Antoine P. Fournier, Denis Vivien, and Sara Martinez de Lizarrondo. 2018. "Molecular Magnetic Resonance Imaging (MMRI)." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1718: 315–27.
- Gijn, Jan van, Richard S. Kerr, and Gabriel JE Rinkel. 2007. "Subarachnoid Haemorrhage." *The Lancet* 369 (9558): 306–18.

- Giller, Cole A, Matthew J Wills, Angela M Giller, and Duke Samson. 1998. "Work-in-Progress Distribution of Hematocrit Values After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *J Neuroimaging* 8: 169–70.
- Gimbrone, Michael A., Ramzi S. Cotran, and Judah Folkman. 1974. "Human Vascular Endothelial Cells in Culture. Growth and DNA Synthesis." *The Journal of Cell Biology* 60 (3): 673–84.
- Goursaud, Suzanne, Sara Martinez de Lizarrondo, François Grolleau, Audrey Chagnot, Véronique Agin, Eric Maubert, Maxime Gauberti, Denis Vivien, Carine Ali, and Clément Gakuba. 2021. "Delayed Cerebral Ischemia After Subarachnoid Hemorrhage: Is There a Relevant Experimental Model? A Systematic Review of Preclinical Literature." *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 8.
- Graeser, M., F. Thieben, P. Szwargulski, F. Werner, N. Gdaniec, M. Boberg, F. Griese, et al. 2019. "Human-Sized Magnetic Particle Imaging for Brain Applications." *Nature Communications* 2019 10:1 10 (1): 1–9.
- Güney, Onder, Fatih Erdi, Hasan Esen, Aysel Kiyici, and Yalcin Kocaogullar. 2010. "N-Acetylcysteine Prevents Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage." *World Neurosurgery* 73 (1): 42–49.
- Güresir, Erdem, Nikos Vasiliadis, Santosh Dias, Peter Raab, Volker Seifert, and Hartmut Vatter. 2012. "The Effect of Common Carotid Artery Occlusion on Delayed Brain Tissue Damage in the Rat Double Subarachnoid Hemorrhage Model." *Acta Neurochirurgica* 154 (1): 11–19.
- Hanafy, Khalid A. 2013. "The Role of Microglia and the TLR4 Pathway in Neuronal Apoptosis and Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage Khalid A Hanafy." *Journal of Neuroinflammation* 10: 1.
- Harput S, Christensen-Jeffries K, Brown J, Li Y, Williams KJ, Davies AH, Eckersley RJ, et al. 2018. "Two-Stage Motion Correction for Super-Resolution Ultrasound Imaging in Human Lower Limb." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 65 (5): 803–14.
- He L *et al.* 2008. "Vascular dermatan sulfate regulates the antithrombotic activity of heparin cofactor II". *Blood*, 111(8), 4118-4125.
- Hingot, Vincent, Camille Brodin, Florent Lebrun, Baptiste Heiles, Audrey Chagnot, Mervé Yetim, Maxime Gauberti, et al. 2020. "Early Ultrafast Ultrasound Imaging of Cerebral Perfusion Correlates with Ischemic Stroke Outcomes and Responses to Treatment in Mice." *Theranostics* 10 (17): 7480–91.
- Ho, Emily L., S. Andrew Josephson, Han S. Lee, and Wade S. Smith. 2009. "Cerebrovascular Complications of Methamphetamine Abuse." *Neurocritical Care* 10 (3): 295–305.



- Horii, Manabu, Shiro Uemura, Masahito Uemura, Masanori Matsumoto, Hiromichi Ishizashi, Keiichi Imagawa, Hajime Iwama, et al. 2008. "Acute Myocardial Infarction as a Systemic Prothrombotic Condition Evidenced by Increased von Willebrand Factor Protein over ADAMTS13 Activity in Coronary and Systemic Circulation." *Heart and Vessels* 23 (5): 301–7.
- Hospital, John Radcliffe, Kyle Pattinson, John Radcliffe, Matthew Rowland, Hospital Uk, Sinai Medical, Stephan Mayer, Michael N Diringer, Liam Flynn, and Peter Andrews. 2015. "Advances in the Understanding of Delayed Cerebral Ischaemia after Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage [Version 1; Referees: 4 Approved]." <https://doi.org/10.12688/f1000research.6635.1>.
- Huang, Chengwu, Wei Zhang, Ping Gong, U. Wai Lok, Shanshan Tang, Tinghui Yin, Xirui Zhang, et al. 2021. "Super-Resolution Ultrasound Localization Microscopy Based on a High Frame-Rate Clinical Ultrasound Scanner: An in-Human Feasibility Study." *Physics in Medicine and Biology* 66 (8).
- Hughes, Joshua D., Kamila M. Bond, Rania A. Mekary, Michael C. Dewan, Abbas Rattani, Ronnie Baticulon, Yoko Kato, Hildo Azevedo-Filho, Jacques J. Morcos, and Kee B. Park. 2018. "Estimating the Global Incidence of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review for Central Nervous System Vascular Lesions and Meta-Analysis of Ruptured Aneurysms." *World Neurosurgery* 115 (July): 430-447.e7.
- Hunt, W. E., and R. M. Hess. 1968. "Surgical Risk as Related to Time of Intervention in the Repair of Intracranial Aneurysms." *Journal of Neurosurgery* 28 (1): 14–20.
- Ignarro, L. J. 1990. "Nitric Oxide. A Novel Signal Transduction Mechanism for Transcellular Communication." *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 16 (5): 477–83.
- Iliff, Jeffrey J., Hedok Lee, Mei Yu, Tian Feng, Jean Logan, Maiken Nedergaard, and Helene Benveniste. 2013. "Brain-Wide Pathway for Waste Clearance Captured by Contrast-Enhanced MRI." *The Journal of Clinical Investigation* 123 (3): 1299–1309.
- Iliff, Jeffrey J., Minghuan Wang, Yonghong Liao, Benjamin A. Plogg, Weiguo Peng, Georg A. Gundersen, Helene Benveniste, et al. 2012. "A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid  $\beta$ ." *Science Translational Medicine* 4 (147).
- Instititoris, Adam, James A. Snipes, Prasad V. Katakam, Ferenc Domoki, Krisztina Boda, Ferenc Bari, and David W. Busija. 2011. "Impaired Vascular Responses of Insulin-Resistant Rats after Mild Subarachnoid Hemorrhage." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 300 (6).
- Jaffe, E. A., R. L. Nachman, C. G. Becker, and C. R. Minick. 1973. "Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. Identification by Morphologic and Immunologic Criteria." *The Journal of Clinical Investigation* 52 (11): 2745–56.

- Jagt, M. Van Der, Djo Hasan, H. W.C. Bijvoet, H. Pieterman, D. W.J. Dippel, F. H. Vermeij, and C. J.J. Avezaat. 1999. "Validity of Prediction of the Site of Ruptured Intracranial Aneurysms with CT." *Neurology* 52 (1): 34–34.
- Jaja, Blessing N R, Daniel Attalla, • R Loch Macdonald, Tom A Schweizer, Michael D Cusimano, Nima Etminan, Daniel Hanggi, et al. 2014. "The Subarachnoid Hemorrhage International Trialists (SAHIT) Repository: Advancing Clinical Research in Subarachnoid Hemorrhage." *Neurocrit Care* 21: 551–59.
- Jamwal, Shalini, and Saurabh Sharma. 2018. "Vascular Endothelium Dysfunction: A Conservative Target in Metabolic Disorders." *Inflammation Research : Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]* 67 (5): 391–405.
- Jin, Yuefei, Wangquan Ji, Haiyan Yang, Shuaiyin Chen, Weiguo Zhang, and Guangcai Duan. 2020. "Endothelial Activation and Dysfunction in COVID-19: From Basic Mechanisms to Potential Therapeutic Approaches." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1).
- Juvela, Seppo, Jari Siironen, Joonas Varis, Kristiina Poussa, and Matti Porras. 2005. "Risk Factors for Ischemic Lesions Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *Journal of Neurosurgery* 102 (2): 194–201.
- Kamp, Marcel A, Jasper H Van Lieshout, Maxine Dibué-adjé, Jasmin K Weber, Toni Schneider, Tanja Restin, and Igor Fischer. 2017. "A Systematic and Meta-Analysis of Mortality in Experimental Mouse Models Analyzing Delayed Cerebral Ischemia After Subarachnoid Hemorrhage." *Translational Stroke Research* 8 (3): 206–19.
- Kassell, N F, T Sasaki, A R T Colohan, and G Nazar. 1985. "Cerebral Vasospasm Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *Stroke* 16: 562.
- Kawecki, C., P. J. Lenting, and C. V. Denis. 2017. "Von Willebrand Factor and Inflammation." *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 15 (7): 1285–94.
- Kaynar, Mehmet Yasar, Taner Tanriverdi, Ali Metin Kafadar, Tibet Kacira, Hafize Uzun, Seval Aydin, Koray Gumustas, Ahmet Dirican, and Cengiz Kuday. 2004. "Detection of Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Both Cerebrospinal Fluid and Serum of Patients after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *Journal of Neurosurgery* 101 (6): 1030–36.
- Kerfoot, Steven M., and Paul Kubes. 2002. "Overlapping Roles of P-Selectin and Alpha 4 Integrin to Recruit Leukocytes to the Central Nervous System in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (2): 1000–1006.
- Kim, Chi Kyung, Beom Joon Kim, Wi-Sun Ryu, Seung-Hoon Lee, and Byung-Woo Yoon. 2012. "Impact of Smoking Cessation on the Risk of Subarachnoid Haemorrhage: A Nationwide Multicentre Case Control Study." *Ol Neurosurg Psychiatry* . 83 (11): 1100–1103.

- Kirkpatrick, Peter J, Carole L Turner, Christopher Smith, Peter J Hutchinson, and Gordon D Murray. 2014. "Simvastatin in Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage (STASH): A Multicentre Randomised Phase 3 Trial" 13
- Kistler, J. P., R. M. Crowell, K. R. Davis, R. Heros, R. G. Ojemann, T. Zervas, and C. M. Fisher. 1983. "The Relation of Cerebral Vasospasm to the Extent and Location of Subarachnoid Blood Visualized by CT Scan: A Prospective Study." *Neurology* 33 (4): 424–36.
- Ko, Sang Bae, H. Alex Choi, Amanda Mary Carpenter, Raimund Helbok, J. Michael Schmidt, Neeraj Badjatia, Jan Claassen, E. Sander Connolly, Stephan A. Mayer, and Kiwon Lee. 2011. "Quantitative Analysis of Hemorrhage Volume for Predicting Delayed Cerebral Ischemia after Subarachnoid Hemorrhage." *Stroke* 42 (3): 669–74.
- Korja, Miikka, Karri Silventoinen, ; Peter Mccarron, Slobodan Zdravkovic, Axel Skyttthe, Arto Haapanen, ; Ulf De Faire, et al. 2010. "Clinical Sciences Genetic Epidemiology of Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage Nordic Twin Study."
- Kramer, Andreas H., and Jeffrey J. Fletcher. 2010. "Locally-Administered Intrathecal Thrombolytics Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Neurocritical Care* 2010 14:3 14 (3): 489–99.
- Kumar, Monisha, Wenjing Cao, Jenny K. McDaniel, Huy P. Pham, Dheeraj Raju, Kelsey Nawalinski, Suzanne Frangos, et al. 2017. "Plasma ADAMTS13 Activity and von Willebrand Factor Antigen and Activity in Patients with Subarachnoid Haemorrhage." *Thrombosis and Haemostasis* 117 (4): 691–99.
- Kwok, George, Chu Wong, Wai S Poon, Matthew T V Chan, Ronald Boet, Tony Gin, Stephanie C P Ng, ; Beny, and C Y Zee. 2010. "Intravenous Magnesium Sulphate for Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage (IMASH) A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Multicenter Phase III Trial."
- Lam, Joseph M.K., Peter Smielewski, Marek Czosnyka, John D. Pickard, and Peter J. Kirkpatrick. 2000. "Predicting Delayed Ischemic Deficits after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Using a Transient Hyperemic Response Test of Cerebral Autoregulation." *Neurosurgery* 47 (4): 819–26.
- Langfitt, Thomas W., Neal F. Kassell, and James D. Weinstein. 1965. "CEREBRAL BLOOD FLOW WITH INTRACRANIAL HYPERTENSION." *Neurology* 15 (8): 761–73.
- Lauzier, David C., Keshav Jayaraman, Jane Y. Yuan, Deepti Diwan, Ananth K. Vellimana, Joshua W. Osburn, Arindam R. Chatterjee, Umeshkumar Athiraman, Rajat Dhar, and Gregory J. Zipfel. 2023. "Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage: Incidence and Mechanisms." *Stroke* 54 (5): 1426–40.
- Lawson, Charlotte, and Sabine Wolf. 2009. "ICAM-1 Signaling in Endothelial Cells." *Pharmacological Reports : PR* 61 (1): 22–32.

- Lawton, Michael T., and G. Edward Vates. 2017. "Subarachnoid Hemorrhage." Edited by Caren G. Solomon. *The New England Journal of Medicine* 377 (3): 257–66.
- Levine, S. R., J. C.M. Brust, N. Futrell, L. M. Brass, D. Blake, P. Fayad, L. R. Schultz, C. H. Millikan, K. L. Ho, and K. M.A. Welch. 1991. "A Comparative Study of the Cerebrovascular Complications of Cocaine: Alkaloidal versus Hydrochloride--a Review." *Neurology* 41 (8): 1173–77.
- Lewis, L. J., J. C. Hoak, R. D. Maca, and G. L. Fry. 1973. "Replication of Human Endothelial Cells in Culture." *Science (New York, N.Y.)* 181 (4098): 453–54.
- Lindbohm, Joni Valdemar, Jaakko Kaprio, Pekka Jousilahti, Veikko Salomaa, and Miikka Korja. 2016. "Sex, Smoking, and Risk for Subarachnoid Hemorrhage." *Stroke* 47 (8): 1975–81.
- Lindbohm, Joni Valdemar, Jaakko Kaprio, and Miikka Korja. 2016. "Cholesterol as a Risk Factor for Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review."
- Liu, Guang Jian, Jie Luo, Li Ping Zhang, Zheng Jun Wang, Li Li Xu, Guo Hou He, Yan Jun Zeng, and Yun Fu Wang. 2011. "Meta-Analysis of the Effectiveness and Safety of Prophylactic Use of Nimodipine in Patients with an Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage." *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 10 (7): 834–44.
- Lizarrondo, Sara Martinez De, Clément Gakuba, Bradley A. Herbig, Yohann Repessé, Carine Ali, Cécile V. Denis, Peter J. Lenting, et al. 2017. "Potent Thrombolytic Effect of N-Acetylcysteine on Arterial Thrombi." *Circulation* 136 (7): 646–60.
- Lizarrondo, Sara Martinez de, Charlene Jacqmarcq, Mikael Naveau, Manuel Navarro-Oviedo, Swannie Pedron, Alexandre Adam, Barbara Freis, et al. 2022. "Tracking the Immune Response by MRI Using Biodegradable and Ultrasensitive Microprobes." *Science Advances* 8 (28).
- Lizarrondo, Sara Martinez de, Swannie Pedron, Denis Vivien, Thomas Bonnard, and Maxime Gauberti. 2023. "Abstract 17831: Magnetic Particle Imaging Using Microparticles of Iron Oxide Targeted to Endothelial Adhesion Molecules Reveals Leucocyte - Endothelium Interaction During Sepsis and Neuroinflammation." *Circulation* 148 (Suppl\_1).
- Louveau, Antoine, Tajie H. Harris, and Jonathan Kipnis. 2015. "Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege." *Trends in Immunology* 36 (10): 569–77.
- Louveau, Antoine, Igor Smirnov, Timothy J. Keyes, Jacob D. Eccles, Sherin J. Rouhani, J. David Peske, Noel C. Derecki, et al. 2015. "Structural and Functional Features of Central Nervous System Lymphatic Vessels." *Nature* 523 (7560): 337–41.
- Lu, Hua, Dong Mei Zhang, Hui Ling Chen, Yi Xing Lin, Chun Hua Hang, Hong Xia Yin, and Ji Xin Shi. 2009. "N-Acetylcysteine Suppresses Oxidative Stress in Experimental Rats with Subarachnoid Hemorrhage." *Journal of Clinical Neuroscience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 16 (5): 684–88.

- Luo, C., X. Yao, J. Li, B. He, Q. Liu, H. Ren, F. Liang, et al. 2016. "Paravascular Pathways Contribute to Vasculitis and Neuroinflammation after Subarachnoid Hemorrhage Independently of Glymphatic Control." *Cell Death & Disease* 7 (3).
- M Vlak, M H, A Algra, R Brandenburg, G J E Rinkel, Monique H M Vlak, Ale Algra, Raya Brandenburg, and Gabriël J E Rinkel. 2011. "Prevalence of Unruptured Intracranial Aneurysms, with Emphasis on Sex, Age, Comorbidity, Country, and Time Period: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Articles Lancet Neurol* 10: 626–62.
- MacDonald, R. Loch, Elke Hunsche, René Schüler, John Wlodarczyk, and Stephan A. Mayer. 2012. "Quality of Life and Healthcare Resource Use Associated with Angiographic Vasospasm after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *Stroke* 43 (4): 1082–88.
- MacDonald, R. Loch, Neal F. Kassell, Stephan Mayer, Daniel Ruefenacht, Peter Schmiedek, Stephan Weidauer, Aline Frey, Sebastien Roux, and Alberto Pasqualin. 2008. "Clazosentan to Overcome Neurological Ischemia and Infarction Occurring after Subarachnoid Hemorrhage (CONSCIOUS-1): Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Dose-Finding Trial." *Stroke* 39 (11): 3015–21.
- Macdonald, R. Loch, Ryszard M. Pluta, and John H. Zhang. 2007. "Cerebral Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage: The Emerging Revolution." *Nature Clinical Practice. Neurology* 3 (5): 256–63.
- Madhusudhan, Thati, Bryce A. Kerlin, and Berend Isermann. 2016. "The Emerging Role of Coagulation Proteases in Kidney Disease." *Nature Reviews. Nephrology* 12 (2): 94–109.
- Makino, Hiroshi, Yoshiteru Tada, Kosuke Wada, Elena I. Liang, Mayland Chang, Shahriar Mobashery, Yasuhisa Kanematsu, et al. 2012. "Pharmacological Stabilization of Intracranial Aneurysms in Mice: A Feasibility Study." *Stroke* 43 (9): 2450–56.
- Marbacher, Serge, Javier Fandino, and Neil D. Kitchen. 2010. "Standard Intracranial in Vivo Animal Models of Delayed Cerebral Vasospasm." *British Journal of Neurosurgery* 24 (4): 415–34.
- McAteer, Martina A., Nicola R. Sibson, Constantin Von Zur Muhlen, Jurgen E. Schneider, Andrew S. Lowe, Nicholas Warrick, Keith M. Channon, Daniel C. Anthony, and Robin P. Choudhury. 2007. "In Vivo Magnetic Resonance Imaging of Acute Brain Inflammation Using Microparticles of Iron Oxide." *Nature Medicine* 13 (10): 1253–58.
- McBride, Devin W., Spiros L. Blackburn, T. Peeyush Kumar, Kanako Matsumura, and John H. Zhang. 2017. "The Role of Thromboinflammation in Delayed Cerebral Ischemia after Subarachnoid Hemorrhage." *Frontiers in Neurology* 8 (OCT).
- McEver, R. P., K. L. Moore, and R. D. Cummings. 1995. "Leukocyte Trafficking Mediated by Selectin-Carbohydrate Interactions." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (19): 11025–28.

- McEver, Rodger P. 2015. "Selectins: Initiators of Leucocyte Adhesion and Signalling at the Vascular Wall." *Cardiovascular Research* 107 (3): 331–39.
- McGirt MJ, Mavropoulos JC, McGirt LY, Alexander MJ, Friedman AH, Laskowitz DT, Lynch JR. 2003. "Leukocytosis as an independent risk factor for cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage". *J Neurosurg* 98:1222-1226.
- McMahon, Catherine J., Stephen Hopkins, Andy Vail, Andrew T. King, Debi Smith, Karen J. Illingworth, Simon Clark, Nancy J. Rothwell, and Pippa J. Tyrrell. 2013. "Inflammation as a Predictor for Delayed Cerebral Ischemia after Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage." *Journal of Neurointerventional Surgery* 5 (6): 512–17.
- Medzhitov, Ruslan. 2008. "Origin and Physiological Roles of Inflammation." *Nature* 454 (7203): 428–35.
- Mees, Dorhout S, van WM den Bergh, Rinkel GJE Dorhout MeesS, and van den BerghWM. 2010. "Cochrane Library Cochrane Database of Systematic Reviews Antiplatelet Therapy for Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage (Review)."
- Mees, Dorhout S, Rinkel Gje, van WM den Bergh, van J Gijn Dorhout MeesS, van den BerghWM, and van GijnJ. 2008. "Cochrane Library Cochrane Database of Systematic Reviews Calcium Antagonists for Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage (Review)."
- Melo, Kierstin P., Ashley V. Makela, Natasha N. Knier, Amanda M. Hamilton, and Paula J. Foster. 2022. "Magnetic Microspheres Can Be Used for Magnetic Particle Imaging of Cancer Cells Arrested in the Mouse Brain." *Magnetic Resonance in Medicine* 87 (1): 312–22.
- Messina, Antonio, Yaroslava Longhitano, Christian Zanza, Lorenzo Calabrò, Federico Villa, Gianmaria Cammarota, Filippo Sanfilippo, Maurizio Cecconi, and Chiara Robba. 2023. "Cardiac Dysfunction in Patients Affected by Subarachnoid Haemorrhage Affects In-Hospital Mortality: A Systematic Review and Metanalysis." *European Journal of Anaesthesiology* 40 (6): 442–49.
- Meyer, Simon F. De, Frederik Denorme, Friederike Langhauser, Eva Geuss, Felix Fluri, and Christoph Kleinschnitz. 2016. "Thromboinflammation in Stroke Brain Damage." *Stroke* 47 (4): 1165–72.
- Molyneux, Andrew J, Richard S C Kerr, Jacqueline Birks, Najib Ramzi, Julia Yarnold, Mary Sneade, and Joan Rischmiller. 2009. "Risk of Recurrent Subarachnoid Haemorrhage, Death, or Dependence and Standardised Mortality Ratios after Clipping or Coiling of an Intracranial Aneurysm in the International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT): Long-Term Follow-Up." *The Lancet Neurology* 8: 427–33.
- Moncada, S, R M Palmer, and E A Higgs. 1991. "Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology." *Pharmacological Reviews* 43 (2).

- Montagne, Axel, Maxime Gauberti, Richard Macrez, Amandine Jullienne, Aurélien Briens, Jean Sébastien Raynaud, Gaelle Louin, et al. 2012. "Ultra-Sensitive Molecular MRI of Cerebrovascular Cell Activation Enables Early Detection of Chronic Central Nervous System Disorders." *NeuroImage* 63 (2): 760–70.
- Muehlschlegel, Susanne. 2018. "Subarachnoid Hemorrhage." *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology* 24 (6): 1623–57.
- Muroi C, Hugelshofer M, Seule M, Keller E. 2014. « The impact of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on inflammatory response after aneurysmal subarachnoid hemorrhage". *Neurocrit Care* 20:240-246.
- Narahara N *et al.* 1994. "Polar expression of tissue factor in human umbilical vein endothelial cells". *Arterioscler Thromb*, 14(11): 1815-1820.
- Naidech, Andrew M., Borko Jovanovic, Katja E. Wartenberg, Augusto Parra, Noeleen Ostapkovich, E. Sander Connolly, Stephan A. Mayer, and Christopher Commichau. 2007. "Higher Hemoglobin Is Associated with Improved Outcome after Subarachnoid Hemorrhage." *Critical Care Medicine* 35 (10): 2383–89.
- Nakahara T, Tsuruta R, Kaneko T, Yamashita S, Fujita M, Kasaoka S, Hashiguchi T, Suzuki M, Maruyama I, Maekawa T. 2009. " High-mobility group box 1 protein in CSF of patients with subarachnoid hemorrhage". *Neurocrit Care* 11:362-268.
- Nassiri F, Ibrahim GM, Badhiwala JH, Witiw CD, Mansouri A, Alotaibi NM, Macdonald RL. 2016. "A propensity score-matched study of the use of non-steroidal anti-inflammatory agents following aneurysmal subarachnoid hemorrhage". *Neurocrit Care* 25:351-358.
- Navarrete, Ana Maria, Caterina Casari, Paulette Legendre, Isabelle Marx, Jiun Ruey Hu, Peter J. Lenting, Olivier D. Christophe, and Cécile V. Denis. 2012. "A Murine Model to Characterize the Antithrombotic Effect of Molecules Targeting Human von Willebrand Factor." *Blood* 120 (13): 2723–32.
- Neil-dwyer, G., and J. Cruickshank. 1974. "The Blood Leucocyte Count and Its Prognostic Significance in Subarachnoid Haemorrhage." *Brain : A Journal of Neurology* 97 (1): 79–86.
- Nishinaga M and Shimada K. 1994. "Heparan sulfate proteoglycan of endothelial cells: homocysteine suppresses anticoagulant active heparan sulfate in cultured endothelial cells". *The Japanese journal of clinical pathology* 42(4): 240-245.
- Nissen JJ, Mantetle D, Gregson B, Mendelow AD, 2001. "Serum concentration of adhesion molecules in patients with delayed ischaemic neurological deficit after aneurysmal subarachnoid haemorrhage: the immunoglobulin and selectin superfamilies". *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:329-333.

- Nourshargh, Sussan, and Ronen Alon. 2014. "Leukocyte Migration into Inflamed Tissues." *Immunity* 41 (5): 694–707.
- Nuki, Yoshitsugu, Tsung Ling Tsou, Chie Kurihara, Miyuki Kanematsu, Yasuhisa Kanematsu, and Tomoki Hashimoto. 2009. "Elastase-Induced Intracranial Aneurysms in Hypertensive Mice." *Hypertension* 54 (6): 1337–44.
- Oelze, Beatrice, Kirsten Elger, Patrik Schadzek, Laura Burmeister, Anika Hamm, Sandra Laggies, Virginia Seiffart, Gerhard Gross, and Andrea Hoffmann. 2021. "The Inflammatory Signalling Mediator TAK1 Mediates Lymphocyte Recruitment to Lipopolysaccharide-Activated Murine Mesenchymal Stem Cells through Interleukin-6." *Molecular and Cellular Biochemistry* 476 (10): 3655–70.
- Ohkuma, Hiroki, Katsuhiko Itoh, Seiko Shibata, and Shigeharu Suzuki. 1997. "Morphological Changes of Intraparenchymal Arterioles after Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Dogs." *Neurosurgery* 41 (1): 230–35.
- Oka, Fumiaki, David Y. Chung, Michiyasu Suzuki, and Cenk Ayata. 2020. "Delayed Cerebral Ischemia After Subarachnoid Hemorrhage: Experimental-Clinical Disconnect and the Unmet Need." *Neurocritical Care* 32 (1): 238–51.
- Okamoto, Kazushi, Rokuro Horisawa, Takashi Kawamura, Akihiko Asai, Masataka Ogino, Takuya Takagi, and Yoshiyuki Ohno. 2003. "Family History and Risk of Subarachnoid Hemorrhage A Case-Control Study in Nagoya, Japan."
- Onathan, J, A E Dlow, L Ouis, and R C Aplan. 2000. "AVOIDING PITFALLS IN THE DIAGNOSIS OF SUBARACHNOID HEMORRHAGE" 342: 29.
- Oshiro, Eric M., Kevin A. Walter, Steven Piantadosi, Timothy F. Witham, and Rafael J. Tamargo. 1997. "A New Subarachnoid Hemorrhage Grading System Based on the Glasgow Coma Scale: A Comparison with the Hunt and Hess and World Federation of Neurological Surgeons Scales in a Clinical Series." *Neurosurgery* 41 (1): 140–48.
- Ostrowski, Robert P., Austin R. Colohan, and John H. Zhang. 2006. "Molecular Mechanisms of Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage." *Neurological Research* 28 (4): 399–414.
- Palabrica, Theresa, Roy Lobb, Barbara C. Furie, Mark Aronovitz, Christopher Benjamin, Yen Ming Hsu, Susan A. Sajer, and Bruce Furie. 1992. "Leukocyte Accumulation Promoting Fibrin Deposition Is Mediated in Vivo by P-Selectin on Adherent Platelets." *Nature* 359 (6398): 848–51.
- Pendu, Ronan, Virginie Terraube, Olivier D. Christophe, Carl G. Gahmberg, Philip G. De Groot, Peter J. Lenting, and Cecile V. Denis. 2006. "P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 and Beta2-Integrins Cooperate in the Adhesion of Leukocytes to von Willebrand Factor." *Blood* 108 (12): 3746–52.



- Percie du Sert, Nathalie, Viki Hurst, Amrita Ahluwalia, Sabina Alam, Marc T Avey, Monya Baker, William J Browne, et al. 2020. "The ARRIVE Guidelines 2.0: Updated Guidelines for Reporting Animal Research." *PLoS Biology* 18 (7): e3000410.
- Phan, Kevin, Justin M. Moore, Christoph J. Griessenauer, Christopher S. Ogilvy, and Ajith J. Thomas. 2017. "Aspirin and Risk of Subarachnoid Hemorrhage: Systematic Review and Meta-Analysis." *Stroke* 48 (5): 1210–17.
- Pickard, J. D., G. D. Murray, R. Illingworth, M. D.M. Shaw, G. M. Teasdale, P. M. Foy, P. R.D. Humphreys, et al. 1989. "Effect of Oral Nimodipine on Cerebral Infarction and Outcome after Subarachnoid Haemorrhage: British Aneurysm Nimodipine Trial." *British Medical Journal* 298 (6674): 636–42.
- Pickard, J D, G D Murray, R Illingworth, M Shaw, G M Teasdale, P M Foy, P R D Humphrey, et al. n.d. "Effect of Oral Nimodipine on Cerebral Infarction and Outcome after Subarachnoid Haemorrhage: British Aneurysm Nimodipine Trial." Accessed September 14, 2023.
- Pisani, Antonio, Paolo Calabresi, Alessandro Tozzi, Vincenza D'Angelo, and Giorgio Bernardi. 1998. "L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Blockers Attenuate Electrical Changes and Ca<sup>2+</sup> Rise Induced by Oxygen/Glucose Deprivation in Cortical Neurons." *Stroke* 29 (1): 196–202.
- Pluta, Ryszard M., John K.B. Afshar, Robert J. Boock, and Edward H. Oldfield. 1998. "Temporal Changes in Perivascular Concentrations of Oxyhemoglobin, Deoxyhemoglobin, and Methemoglobin after Subarachnoid Hemorrhage." *Journal of Neurosurgery* 88 (3): 557–61.
- Polin, Richard S., Murad Bavbek, Mark E. Shaffrey, Kevin Billups, Christopher A. Bogaev, Neal F. Kassell, and Kevin S. Lee. 1998. "Detection of Soluble E-Selectin, ICAM-1, VCAM-1, and L-Selectin in the Cerebrospinal Fluid of Patients after Subarachnoid Hemorrhage." *Journal of Neurosurgery* 89 (4): 559–67.
- Qi-Feng Tang, Shi-Qi Lu, Yi-Ming Zhao, and Jin-Xian Qian. 2015. "The Changes of von Willebrand Factor/a Disintegrin-like and Metalloprotease with Thrombospondin Type I Repeats-13 Balance in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage - PubMed." *Int J Clin Exp Med*. 2015.
- Quenault, Aurélien, Sara Martinez De Lizarrondo, Olivier Etard, Maxime Gauberti, Cyrille Orset, Benoît Haelewyn, Helen C. Segal, et al. 2017. "Molecular Magnetic Resonance Imaging Discloses Endothelial Activation after Transient Ischaemic Attack." *Brain : A Journal of Neurology* 140 (1): 146–57.
- Rabinstein, Alejandro A, Jonathan A Friedman, Stephen D Weigand, Robyn L McClelland, Jimmy R Fulgham, Edward M Manno, John L D Atkinson, ; Eelco, and F M Wijdicks. 2004. "Predictors of Cerebral Infarction in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage."

- Rabinstein, Alejandro A., Giuseppe Lanzino, and Eelco FM Wijdicks. 2010. "Multidisciplinary Management and Emerging Therapeutic Strategies in Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage." *The Lancet. Neurology* 9 (5): 504–19.
- Rabinstein, Alejandro A., Stephen Weigand, John L.D. Atkinson, and Eelco F.M. Wijdicks. 2005. "Patterns of Cerebral Infarction in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *Stroke* 36 (5): 992–97.
- Rennels, Marshall L., Thomas F. Gregory, Otis R. Blaumanis, Katsukuni Fujimoto, and Patricia A. Grady. 1985. "Evidence for a 'paravascular' Fluid Circulation in the Mammalian Central Nervous System, Provided by the Rapid Distribution of Tracer Protein throughout the Brain from the Subarachnoid Space." *Brain Research* 326 (1): 47–63.
- "Report of World Federation of Neurological Surgeons Committee on a Universal Subarachnoid Hemorrhage Grading Scale." 1988. *Journal of Neurosurgery* 68 (6). <https://doi.org/10.3171/JNS.1988.68.6.0985>.
- Romano, Jose G., Alejandro A. Rabinstein, Kristopher L. Arheart, Sandra Nathan, Iszet Campo-Bustillo, Sebastian Koch, and Alejandro M. Forteza. 2008. "Microemboli in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *Journal of Neuroimaging : Official Journal of the American Society of Neuroimaging* 18 (4): 396–401.
- Rooij N, Greinig JP, Rinkel GJ, Frijnt CJ De. 2013. "Early Prediction of Delayed Cerebral Ischemia After Subarachnoid Hemorrhage | Enhanced Reader." *Stroke*. 2013.
- Rooij, Nicolien K. De, Gabriel J.E. Rinkel, Jan Willem Dankbaar, and Catharina J.M. Frijns. 2013. "Delayed Cerebral Ischemia after Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review of Clinical, Laboratory, and Radiological Predictors." *Stroke* 44 (1): 43–54.
- Rosengart, Axel J, ; Kim, E Schultheiss, Jocelyn Tolentino, and Ma ; R Loch Macdonald. 2007. "Prognostic Factors for Outcome in Patients With Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage."
- Sabri, M., J. Ai, K. Lakovic, J. D'abbondanza, D. Ilodigwe, and R. L. MacDonald. 2012. "Mechanisms of Microthrombi Formation after Experimental Subarachnoid Hemorrhage." *Neuroscience* 224 (November): 26–37.
- Sabri, Mohammed, Jinglu Ai, and R. Loch MacDonald. 2011. "Dissociation of Vasospasm and Secondary Effects of Experimental Subarachnoid Hemorrhage by Clazosentan." *Stroke* 42 (5): 1454–60.
- Salman, Rustam Al Shahi, Daniel L. Labovitz, and Christian Stapf. 2009. "Spontaneous Intracerebral Haemorrhage." *BMJ* 339 (7715): 284–89.
- Sanchez-Peña, Paola, Ana Rosa Pereira, Nader Antoine Sourour, Alessandra Biondi, Lise Lejean, Chantal Colonne, Anne Laure Boch, Mossab Al Hawari, Lamine Abdennour, and

- Louis Puybasset. 2008. "S100B as an Additional Prognostic Marker in Subarachnoid Aneurysmal Hemorrhage." *Critical Care Medicine* 36 (8): 2267–73.
- Sandoo, Aamer, Jet J.C.S Veldhuijzen van Zanten, George S Metsios, Douglas Carroll, and George D Kitas. 2010. "The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone." *The Open Cardiovascular Medicine Journal* 4 (1): 302–12.
- Sapp, Ryan M., William S. Evans, Lauren E. Eagan, Catalina A. Chesney, Evelyn M. Zietowski, Steven J. Prior, Sushant M. Ranadive, and James M. Hagberg. 2019. "The Effects of Moderate and High-Intensity Exercise on Circulating Markers of Endothelial Integrity and Activation in Young, Healthy Men." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 127 (5): 1245–56.
- Sarti, Cinzia, Jaakko Tuomilehto, Veikko Salomaa, Juhani Sivenius, Esko Kaarsalo, ; Erkki, V Narva, Kalervo Salmi, and Jorma Torppa. 1991. "Epidemiology of Subarachnoid Hemorrhage in Finland From 1983 to 1985." *Stroke* 22 (7): 848–53.
- Schaaf, I. Van Der, M. J. Wermer, Y. Van Der Graaf, R. G. Hoff, G. J.E. Rinkel, and B. K. Velthuis. 2006. "CT after Subarachnoid Hemorrhage: Relation of Cerebral Perfusion to Delayed Cerebral Ischemia." *Neurology* 66 (10): 1533–38.
- Schatlo, Bawarjan, Christian Fung, Martin N Stienen, Ali R Fathi, Javier Fandino, Nicolas R Smoll, Daniel Zumofen, et al. 2020. "Incidence and Outcome of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage The Swiss Study on Subarachnoid Hemorrhage (Swiss SOS)."
- Scheved. 2015. "Congenital Haemorrhagic Diseases." *Rev Prat* 65 (5): 613–17.
- Schmidt, J. Michael, Katja E. Wartenberg, Andres Fernandez, Jan Claassen, Fred Rincon, Noeleen D. Ostapkovich, Neeraj Badjatia, Augusto Parra, E. Sander Connolly, and Stephan A. Mayer. 2008. "Frequency and Clinical Impact of Asymptomatic Cerebral Infarction Due to Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage: Clinical Article." *Journal of Neurosurgery* 109 (6): 1052–59.
- Schmidt, M., M. B. Johansen, T. L. Lash, C. F. Christiansen, S. Christensen, and H. T. Sørensen. 2010. "Antiplatelet Drugs and Risk of Subarachnoid Hemorrhage: A Population-Based Case-Control Study." *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 8 (7): 1468–74.
- Schneider, Ulf C., Anja Maria Davids, Susan Brandenburg, Annett Müller, Anna Elke, Salima Magrini, Etienne Atangana, et al. 2015. "Microglia Inflict Delayed Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage." *Acta Neuropathologica* 130 (2): 215–31.
- Schwartz, Amit Y., Atsuo Masago, Fatima A. Sehba, and Joshua B. Bederson. 2000. "Experimental Models of Subarachnoid Hemorrhage in the Rat: A Refinement of the Endovascular Filament Model." *Journal of Neuroscience Methods* 96 (2): 161–67.
- Serres, Sébastien, Silvy Mardiguian, Sandra J. Campbell, Martina A. McAteer, Asim Akhtar, Alexandre Krapitchev, Robin P. Choudhury, Daniel C. Anthony, and Nicola R. Sibson.

2011. "VCAM-1-Targeted Magnetic Resonance Imaging Reveals Subclinical Disease in a Mouse Model of Multiple Sclerosis." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25 (12): 4415–22.
- Shattil, S.J and Bennett, J. S. 11981 "Platelets and their membranes in hemostasis. Physiology and Pathophysiology". *Annals of Internal Medicine* 94: 108-118.
- Shea, Alisa M., Shelby D. Reed, Lesley H. Curtis, Michael J. Alexander, John J. Villani, and Kevin A. Schulman. 2007. "Characteristics of Nontraumatic Subarachnoid Hemorrhage in the United States in 2003." *Neurosurgery* 61 (6): 1131–37.
- Sills, Allen K., Richard E. Clatterbuck, Reid C. Thompson, Paul L. Cohen, and Rafael J. Tamargo. 1997. "Endothelial Cell Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 in Experimental Posthemorrhagic Vasospasm." *Neurosurgery* 41 (2): 453–61.
- Søfteland, Marie, Sandvei ; Pål, Richard Romundstad, ; Tomm, Brostrup Müller, Lars Vatten, and Anne Vik. 2009. "Risk Factors for Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage in a Prospective Population Study The HUNT Study in Norway."
- Solenski, N. J., E. C. Haley, N. F. Kassell, G. Kongable, T. Germanson, L. Truskowski, J. C. Torner, et al. 1995. "Medical Complications of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Report of the Multicenter, Cooperative Aneurysm Study. Participants of the Multicenter Cooperative Aneurysm Study." *Critical Care Medicine* 23 (6): 1007–17.
- Sonneveld, Michelle A.H., Moniek P.M. De Maat, and Frank W.G. Leebeek. 2014. "Von Willebrand Factor and ADAMTS13 in Arterial Thrombosis: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Blood Reviews* 28 (4): 167–78.
- Soult, Michael C., Yuliya Dobrydneva, Kamal H. Wahab, L. D. Britt, and Claretta J. Sullivan. 2014. "Outer Membrane Vesicles Alter Inflammation and Coagulation Mediators." *The Journal of Surgical Research* 192 (1): 134–42.
- Springer, Timothy A. 1994. "Traffic Signals for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration: The Multistep Paradigm." *Cell* 76 (2): 301–14.
- Stein, Sherman C., Kevin D. Browne, Xiao Han Chen, Douglas H. Smith, and David I. Graham. 2006. "Thromboembolism and Delayed Cerebral Ischemia after Subarachnoid Hemorrhage: An Autopsy Study." *Neurosurgery* 59 (4): 781–87.
- Suarez, Jose I. 2015. "Diagnosis and Management of Subarachnoid Hemorrhage." *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology* 21 (5): 1263–87.
- Sugawara, Takashi, Robert Ayer, Vikram Jadhav, and John H. Zhang. 2008. "A New Grading System Evaluating Bleeding Scale in Filament Perforation Subarachnoid Hemorrhage Rat Model." *Journal of Neuroscience Methods* 167 (2): 327–34.

- Sugimoto, Kazutaka, Sadahiro Nomura, Satoshi Shirao, Takao Inoue, Hideyuki Ishihara, Reo Kawano, Akiko Kawano, et al. 2018. "Cilostazol Decreases Duration of Spreading Depolarization and Spreading Ischemia after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *Annals of Neurology* 84 (6): 873–85.
- Suzuki, S., M. Kimura, M. Souma, H. Ohkima, T. Iwabuchi, and T. Shimizu. 1990. "Cerebral Microthrombosis in Symptomatic Cerebral Vasospasm--a Quantitative Histological Study in Autopsy Cases." *Neurologia Medico-Chirurgica* 30 (5): 309–16.
- Suzuki, S., M. Suzuki, T. Iwabuchi, and Y. Kamata. 1983. "Role of Multiple Cerebral Microthrombosis in Symptomatic Cerebral Vasospasm: With a Case Report." *Neurosurgery* 13 (2): 199–203.
- Takagi, Kiyoshi, Akira Tamura, Tadayoshi Nakagomi, Hitoshi Nakayama, Osamu Gotoh, Kensuke Kawai, Mamoru Taneda, Nobuyuki Yasui, Hiromu Hadeishi, and Keui Sano. 1999. "How Should a Subarachnoid Hemorrhage Grading Scale Be Determined? A Combinatorial Approach Based Solely on the Glasgow Coma Scale." *Journal of Neurosurgery* 90 (4): 680–87.
- Tam, Alan K.H., Don Ilodigwe, Jay Mocco, Stephan Mayer, Neal Kassell, Daniel Ruefenacht, Peter Schmiedek, Stephan Weidauer, Alberto Pasqualin, and R. Loch MacDonald. 2010. "Impact of Systemic Inflammatory Response Syndrome on Vasospasm, Cerebral Infarction, and Outcome after Subarachnoid Hemorrhage: Exploratory Analysis of CONSCIOUS-1 Database." *Neurocritical Care* 13 (2): 182–89.
- Taylor F. 1994. "Studies on the inflammatory-coagulant axis in the baboon response to E. Coli: regulatory roles of protein C, S, C4bBP and of inhibitors of tissue factor". *Progress in clinical and biological research*, pp 175-194.
- Teasdale, Graham, and Bryan Jennett. 1974a. "ASSESSMENT OF COMA AND IMPAIRED CONSCIOUSNESS: A Practical Scale." *The Lancet* 304 (7872): 81–84.
- Teasdale, Graham M., C. G. Drake, W. Hunt, N. Kassell, K. Sano, B. Perat, and J. C. De Villeers. 1988. "A Universal Subarachnoid Hemorrhage Scale: Report of a Committee of the World Federation of Neurosurgical Societies." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 51 (11): 1457.
- Terreno, Enzo, Daniela Delli Castelli, Alessandra Viale, and Silvio Aime. 2010. "Challenges for Molecular Magnetic Resonance Imaging." *Chemical Reviews* 110 (5): 3019–42.
- "The Neurosurgical Atlas, by Aaron Cohen-Gadol, M.D." n.d. Accessed February 7, 2024. <https://www.neurosurgicalatlas.com/>.
- Tian J et al. 2021. "Contrast-enhanced ultrasound molecular imaging of activated platelets in the progression of atherosclerosis using microbubbles bearing the von Willebrand factor A1 domain". *Exp Ther Med* 22(1).

- Torres, Richard, and Yuri Fedoriw. 2009. "Laboratory Testing for von Willebrand Disease: Toward a Mechanism-Based Classification." *Clinics in Laboratory Medicine* 29 (2): 193–228.
- Tropea, B. I., P. Huie, J. P. Cooke, P. S. Tsao, R. K. Sibley, and C. K. Zarins. 1996. "Hypertension-Enhanced Monocyte Adhesion in Experimental Atherosclerosis." *Journal of Vascular Surgery* 23 (4): 596–605.
- "US9329260B2 - Method and Device for Ultrasound Imaging " 2016. Olivier Couture <https://patents.google.com/patent/US9329260B2/fr>.
- Vatter, Hartmut, Erdem Güresir, Joachim Berkefeld, Jürgen Beck, Andreas Raabe, Richard Du Mesnil De Rochemont, Volker Seifert, and Stefan Weidauer. 2011. "Perfusion-Diffusion Mismatch in MRI to Indicate Endovascular Treatment of Cerebral Vasospasm after Subarachnoid Haemorrhage." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 82 (8): 876–83.
- Vergouwen, M. D.I., V. L. Knaup, J. J.T.H. Roelofs, O. J. de Boer, and J. C.M. Meijers. 2014. "Effect of Recombinant ADAMTS-13 on Microthrombosis and Brain Injury after Experimental Subarachnoid Hemorrhage." *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 12 (6): 943–47.
- Vergouwen, Mervyn D I, Marinus Vermeulen, Bert a Coert, Erik S G Stroes, and Yvo B W E M Roos. 2008. "Microthrombosis after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: An Additional Explanation for Delayed Cerebral Ischemia." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28 (11): 1761–70.
- Vergouwen, Mervyn D.I., Kamran Bakhtiari, Nan Van Geloven, Marinus Vermeulen, Yvo Bwem Roos, and Joost C.M. Meijers. 2009. "Reduced ADAMTS13 Activity in Delayed Cerebral Ischemia after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29 (10): 1734–41.
- Vergouwen, Mervyn D.I., Don Ilodigwe, and R. Loch MacDonald. 2011. "Cerebral Infarction after Subarachnoid Hemorrhage Contributes to Poor Outcome by Vasospasm-Dependent and -Independent Effects." *Stroke* 42 (4): 924–29.
- Vergouwen, Mervyn D.I., Marinus Vermeulen, Jan van Gijn, Gabriel J.E. Rinkel, Eelco F. Wijdicks, J. Paul Muizelaar, A. David Mendelow, et al. 2010. "Definition of Delayed Cerebral Ischemia after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage as an Outcome Event in Clinical Trials and Observational Studies: Proposal of a Multidisciplinary Research Group." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 41 (10): 2391–95.
- Vlak, Monique H M, Gabriel J E Rinkel, Paut Greebe, Jacoba P Greving, and Ale Algra. 2013. "Lifetime Risks for Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage: Multivariable Risk Stratification." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84 (6): 619–23.

- Walcheck, Bruce, Kevin L. Moore, Rodger P. McEver, and Takashi Kei Kishimoto. 1996. "Neutrophil-Neutrophil Interactions under Hydrodynamic Shear Stress Involve L-Selectin and PSGL-1. A Mechanism That Amplifies Initial Leukocyte Accumulation of P-Selectin in Vitro." *The Journal of Clinical Investigation* 98 (5): 1081–87.
- Wan, H., Y. Wang, J. Ai, S. Brathwaite, H. Ni, R. L. Macdonald, E. M. Hol, J. C.M. Meijers, and M. D.I. Vergouwen. 2018. "Role of von Willebrand Factor and ADAMTS-13 in Early Brain Injury after Experimental Subarachnoid Hemorrhage." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 16 (7): 1413–22.
- Wang L, Zhang Z, Liang L, Wu Y, Zhong J, Sun X. 2019. « Anti-high mobility group box-1 antibody attenuated vascular smooth muscle cell phenotypic switching and vascular remodelling after subarachnoid hemorrhage in rats". *Neurosci Lett* 708:134338.
- Weissleder, Ralph, and Matthias Nahrendorf. 2015. "Advancing Biomedical Imaging." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (47): 14424–28.
- W.-H. LI, C.-J. HUI, H. JU. 2017. "Expression and Significance of VWF, GMP-140 and ADAMTS13 in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2017.
- Wiebers, David O. 2003. "Unruptured Intracranial Aneurysms: Natural History, Clinical Outcome, and Risks of Surgical and Endovascular Treatment." *Lancet* 362 (9378): 103–10.
- Woitzik, Johannes, Jens P. Dreier, Nils Hecht, Ingo Fiss, Nora Sandow, Sebastian Major, Maren Winkler, et al. 2012a. "Delayed Cerebral Ischemia and Spreading Depolarization in Absence of Angiographic Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32 (2): 203–12.
- Wolf, Stefan, Dorothee Mielke, Christoph Barner, Vesna Malinova, Thomas Kerz, Maria Wostrack, Patrick Czorlich, et al. 2023. "Effectiveness of Lumbar Cerebrospinal Fluid Drain Among Patients With Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage A Randomized Clinical Trial Visual Abstract Supplemental Content." *JAMA Neurol* 80 (8): 833–42.
- Wong, George Kwok Chu, Sandy Wai Lam, Karine Ngai, Adrian Wong, Deyond Siu, Wai Sang Poon, and Vincent Mok. 2013. "Cognitive Domain Deficits in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage at 1 Year." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 84 (9): 1054–58.
- Worp, H. Bart Van Der, Peter De Haan, Erik Morrema, and Cor J. Kalkman. 2005. "Methodological Quality of Animal Studies on Neuroprotection in Focal Cerebral Ischaemia." *Journal of Neurology* 252 (9): 1108–14.

- Wu, Fengjiao, Lixin Liu, and Hong Zhou. 2017. "Endothelial Cell Activation in Central Nervous System Inflammation." *Journal of Leukocyte Biology* 101 (5): 1119–32.
- Xu, Long Biao, Hua Dong Huang, Ming Zhao, Guo Chong Zhu, and Zhen Xu. 2021. "Intranasal Insulin Treatment Attenuates Metabolic Distress and Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage in Mice." *Neurocritical Care* 34 (1): 154–66.
- Yang H, Wang H, Andersson U. 2020. "Targeting inflammation driven by HMGB1". *Front Immunol* 11:484.
- Yao, Xiyang, Kai Zhang, Jieyong Bian, and Gang Chen. 2016. "Alcohol Consumption and Risk of Subarachnoid Hemorrhage: A Meta-Analysis of 14 Observational Studies." *Biomedical Reports* 5 (4): 428–36.
- Yundt, Kent D., Robert L. Grubb, Michael N. Diringer, and William J. Powers. 1998. "Autoregulatory Vasodilation of Parenchymal Vessels Is Impaired during Cerebral Vasospasm." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 18 (4): 419–24.
- Z M Ruggeri, and J Ware. 1992. "The Structure and Function of von Willebrand Factor - PubMed." *Thromb Haemost.* 1992.
- Zarghami, Niloufar, Manuel Sarmiento Soto, Francisco Perez-Balderas, Alexandre A. Khrapitchev, Christina Simoglou Karali, Vanessa A. Johanssen, Olaf Ansorge, James R. Larkin, and Nicola R. Sibson. 2021. "A Novel Molecular Magnetic Resonance Imaging Agent Targeting Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule as Demonstrated in Mouse Brain Metastasis Models." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 41 (7): 1592–1607.
- Zhang, John H., Ryszard M. Pluta, Jacob Hansen-Schwartz, Jens Dreier, Peter Vajkoczy, R. Loch Macdonald, Shigeru Nishizawa, et al. 2009. "Cerebral Vasospasm Following Subarachnoid Hemorrhage: Time for a New World of Thought." *Neurological Research* 31 (2): 151.
- Zhao, Xu Dong, Yi Ting Zhou, Xin Zhang, Zong Zhuang, and Ji Xin Shi. 2009. "A Meta Analysis of Treating Subarachnoid Hemorrhage with Magnesium Sulfate." *Journal of Clinical Neuroscience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 16 (11): 1394–97.
- Zuurbier, Charlotte C.M., Rob Molenberg, Liselore A. Mensing, Marieke J.H. Wermer, Seppo Juvela, Antti E. Lindgren, Juha E. Jääskeläinen, et al. 2022. "Sex Difference and Rupture Rate of Intracranial Aneurysms: An Individual Patient Data Meta-Analysis." *Stroke* 53 (2): 362–69.



## Etude de l'activation endothéliale post-hémorragie sous-arachnoïdienne : apport à la compréhension de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale retardée

### RESUME

L'hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA) est une pathologie neurovasculaire grave responsable d'une morbi-mortalité élevée et qui requiert le plus souvent une admission en soins intensifs. L'ischémie cérébrale retardée (ICR) est une complication qui survient chez 30% des patients dans les jours qui suivent l'HSA. L'ICR peut être fatale, et est le plus souvent à l'origine de séquelles fonctionnelles et/ou cognitives invalidantes. La physiopathologie de l'ICR n'est pas élucidée et sa prise en charge reste actuellement limitée. Nous avons pu conclure, à l'issue de notre étude expérimentale chez la souris et d'une revue de la littérature, au fait qu'aucun modèle expérimental murin ne satisfait actuellement aux critères diagnostiques d'ICR chez l'homme, ce qui rend la recherche dans ce domaine difficile. La phase précoce dite d'*early brain injury* comprend un ensemble de mécanismes impliqués dans la survenue d'ICR. Cette phase précoce est difficile à caractériser avec les outils standards, alors qu'elle constitue pourtant un facteur pronostic du devenir neurologique. Des études récentes ont montré que l'activation endothéliale jouerait un rôle clé dans la survenue d'ICR. L'approche diagnostique grâce à de nouveaux outils d'imagerie moléculaire permettant de caractériser cette activation endothéliale a constitué notre dernier objectif de ce travail. L'utilisation de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) moléculaire et l'imagerie à particules magnétiques (IPM) sur un modèle d'HSA chez la souris, associée à des explorations conventionnelles ont donc permis de mettre en lumière une phase d'activation endothéliale précoce associée à la phase d'*early brain injury*. Nous avons également constaté l'expression et le relargage concomitants du facteur von Willebrand (VWF), témoignant d'un mécanisme de thromboinflammation. Ces résultats permettent de caractériser des mécanismes précoces impliqués dans la survenue d'ICR, ce qui ouvre des perspectives cliniques diagnostiques et thérapeutiques.

**Mots clés :** *hémorragie sous-arachnoïdienne, ischémie cérébrale retardée, IRM moléculaire, activation endothéliale, early brain injury.*

### ABSTRACT

Subarachnoid hemorrhage (SAH) is a serious neurovascular pathology that most often requires admission to intensive care, because it causes high morbidity and mortality. Delayed cerebral ischemia (DCI) is one of the main complications, which occurs in 30% of patients in the following days after SAH. DCI can be fatal, but is most often the leading cause of functional and/or cognitive disabilities. The pathophysiology of DCI is not elucidated and its treatment are currently limited. Following a review of the literature, we were able to highlight that no experimental murine SAH model currently meets the diagnostic criteria for DCI in humans, which makes research with poor clinical relevance. Early brain injury (EBI) includes several mechanisms involved in the occurrence of DCI. This early phase is a major predictor of clinical outcome, which is difficult to characterize with standard imaging tools. Recent studies have shown that endothelial activation plays a key role after SAH in the occurrence of DCI. Diagnosis approach using new molecular imaging devices to characterize this endothelial activation was the main objective of our work. Using molecular magnetic resonance imaging (MRI) and magnetic particle imaging (MPI), we highlighted an early endothelial activation associated with EBI post-SAH in mice. Using standard methods, we were able to observe the concomitant expression and release of von Willebrand factor (VWF), illustrating the existence of thrombo-inflammatory response at the acute phase. These data make it possible to characterize EBI and its early mechanisms involved in the occurrence of DCI, which offers promising clinical perspectives.

**Keywords:** *subarachnoid hemorrhage, delayed cerebral ischemia, molecular MRI, endothelial activation, early brain injury.*