



HAL
open science

Développement d'un modèle préclinique chez la souris éveillée et stratégie thrombolytique ciblée pour l'AVC ischémique

Myriam Abioui Mourgues

► **To cite this version:**

Myriam Abioui Mourgues. Développement d'un modèle préclinique chez la souris éveillée et stratégie thrombolytique ciblée pour l'AVC ischémique. Neurosciences. Normandie Université, 2024. Français. NNT : 2024NORMC420 . tel-04851222

HAL Id: tel-04851222

<https://theses.hal.science/tel-04851222v1>

Submitted on 20 Dec 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 **ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE**

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

**Développement d'un modèle préclinique chez la souris éveillée
et stratégie thrombolytique ciblée pour l'AVC ischémique**

Présentée et soutenue par
MYRIAM ABIQUI MOURGUES

Thèse soutenue le 09/12/2024

devant le jury composé de :

M. CYRILLE ORSET	Professeur des universités - Université de Caen Normandie (UCN)	Directeur de thèse
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp - Université de Caen Normandie (UCN)	Président du jury
MME ANNE JOUTEL	Directeur de recherche à l'INSERM - Institut de Psychiatrie et Neurosciences de Paris	Membre du jury
MME NATHALIE KUBIS	Professeur des universités PraticienHosp - Université Paris Cité	Membre du jury
M. PIERRE POUGET	Directeur de recherche - Institut du Cerveau	Rapporteur du jury
M. MICKAEL TANTER	Directeur de recherche - ESPCI PARIS	Rapporteur du jury

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

Remerciements

Je tiens à ouvrir cette section de remerciements en exprimant ma gratitude aux membres du jury de ma thèse. Merci au Dr. Mickaël Tanter et au Dr. Pierre Pouget d'y avoir pris part en qualité de rapporteurs, ainsi qu'au Pr. Nathalie Kubis, au Dr. Anne Joutel, au Pr. Denis Vivien et au Pr. Cyrille Orset d'avoir pris le temps d'examiner mon travail.

Je remercie particulièrement Denis pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser mes travaux de recherche au sein de son unité. Merci pour ta confiance, et pour l'investissement que tu mets dans les projets auxquels nous contribuons. J'ai eu la chance d'évoluer dans un environnement où nous disposons des ressources et des équipements nécessaires, et où la limite reste – presque – notre imagination. Merci également pour ton aide lors de la rédaction de l'article « awake » et pour m'avoir permis de participer à plusieurs congrès scientifiques tout au long de ma thèse. Merci enfin de continuer à me faire confiance en m'offrant la possibilité de prolonger cette aventure au laboratoire pour quelques temps encore.

Je remercie également Cyrille, mon encadrant de thèse, que je connais depuis mon Master. Merci de m'avoir fait confiance pour me lancer dans cette aventure, alors que je doutais de mon niveau et mes capacités pour cela. Merci aussi d'avoir été présent et disponible pour moi tout au long de cette thèse, en sachant me laisser l'indépendance nécessaire, et libre d'organiser mon travail. J'ai beaucoup apprécié notre collaboration, et j'espère que nous aurons l'occasion de continuer à travailler ensemble !

Merci à Quentin, qui m'a guidée dès mon arrivée au laboratoire pour mon stage de Master 2. J'ai beaucoup appris à tes côtés, et ai toujours cherché à maintenir au mieux la rigueur de travail qui te caractérise. J'ai eu la chance de pouvoir compter sur un encadrant aussi impliqué et généreux de son temps.

Il est difficile de mentionner Quentin sans penser à Jonathane. Merci pour le temps que tu as toujours pris, sans compter, pour aider les étudiants sur une multitude de sujets. Des manips aux réparations en tout genre, je t'ai même un jour demandé de regarder une pièce de la pédale d'embrayage de ma voiture qui était tombée, histoire de savoir si je pouvais rentrer chez moi vivante, c'est dire ! Je me souviendrai aussi des fous rires partagés à l'ESOC avec Mélissa, Carine, Paul, Cyrille et Audrey T.

Merci d'ailleurs Carine, pour la scientifique et la personne que tu es. A la fois mentor, « maman » et copine des étudiants, tu as su apporter rigueur et bonne humeur à nos répétitions d'oraux de congrès ou de thèse, ainsi qu'à nos périodes de rédaction. Je me souviendrai de tes contrôles inopinés de manuscrits de thèse, tout comme des très bons moments passés ensembles, donc COOL !

Je pense ensuite à Sara et Maxime, deux personnes dont j'admire autant les qualités humaines que scientifiques. Vos conseils ont été d'une grande aide, et je vous suis reconnaissante d'avoir pu travailler et apprendre un peu à vos côtés !

Cela m'amène à faire référence aux collaborations enrichissantes réalisées durant ma thèse. Merci à Louise Fournier et à son directeur de thèse, Cédric Chauvierre pour ce projet passionnant. On devrait tous pouvoir avoir l'opportunité de travailler avec quelqu'un d'aussi sérieux et rigoureux que l'est Louise. Encore bravo pour le projet que tu as réalisé sur le développement des FucoMBs et la qualité de ton travail.

Merci également à Georges Chabouh et Olivier Couture. Georges, ta bonne humeur constante, tes 1 001 idées de projets, et les manips test qui bien souvent aboutissaient à un abstract ont rendu notre collaboration mouvementée et passionnante. Ça a été un vrai plaisir de travailler ensemble, j'espère que tu t'épanouis à NY, bro !

Merci aussi à Amandine qui m'a aidée sur le projet « stroke awake », pour ton investissement sans relâche. Que ce soit tôt le matin, tard le soir, ou même pendant ces fameux jours fériés ou bien souvent rien n'allait. Merci beaucoup à toi aussi pour les analyses réalisées. Merci d'ailleurs à Thomas Deffieux pour son soutien sur les scripts d'analyses. Merci aussi à Emma, qui m'a aidée sur les habitudes durant son stage de Master 1.

Un grand merci à Canelle, avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant son stage de Master 1, puis de Master 2, et désormais pendant sa thèse. J'apprécie beaucoup travailler avec toi. Merci pour l'investissement que tu mets dans les projets en y apportant ta créativité. C'est d'ailleurs à toi et à Kaciél que je dois en partie les diagrammes de connectivité. J'ai hâte de voir ton évolution lors de ta thèse, et je suis certaine que tu réaliseras un superbe travail.

Merci Marina pour nos échanges constructifs autour du stroke, et pour me faire confiance pour participer à quelques-uns de tes beaux projets à venir !

Je ne saurais oublier mes collègues du fameux bureau C048. Merci à Audrey pour ta bonne humeur sans failles, ton humour incroyable, époustouflant, étouffant, gênant (c'est ainsi que tu viens à l'instant de me le décrire), à Elsa pour ton naturel et tes réparties qui nous ont toujours fait rire, à Swannie pour tes incroyables prestations de danse et de chant, à Florent, la référence du stroke, pour tes conseils sur les manips *in vivo*, toujours avec éloquence, à Marion et Cheun pour leur bonne humeur et les moments de rigolade au bureau qui ont apporté un peu de légèreté à la période de rédaction, et à Célia, l'experte de l'inflammation, pour ses conseils toujours avisés, sa force de caractère et sa détermination. J'espère que vous vous épanouissez avec Amaury dans votre nouvelle vie en Norvège. Je n'oublierai pas tous les bons moments passés avec ceux qui ont partagé ce bureau, dont font aussi partie Paul, Manu, et Antoine. Merci aussi à Juju pour ta gentillesse, et pour les moments passés ensemble à préparer nos anniversaires, par exemple !

Merci à Andréa, que j'ai vu commencer à « stoker » à l'ESRP, pour finalement devenir gestionnaire de l'équipe, pour ta bonne humeur, les soirées mémorables, les week-ends au gîte ou à Saumur avec la team, et les innombrables fous-rires. Merci aussi un peu pour les commandes, quand même ! Merci également à Sandrine et Pauline T., pour la gestion des contrats, des missions etc.

Un grand merci également à Mathys, le « monsieur Parkside » du labo, toujours prêt à bricoler et réparer ce qui peut l'être : du porte-caméra pour les tests comportementaux, à la réparation de l'imprimante 3D, en passant par la modélisation d'un porte-sonde pour l'imageur ultrasonore, et j'en oublie sûrement ! Merci aussi pour ton expertise en statistiques, qui m'aura été utile tout au long de ma thèse, bien-sûr complétée par celle de Camille.

Merci à Simon le « papa des mutants du tPA » pour tes contrôles réguliers lors de notre rédaction, histoire de t'assurer que nous restions bien sérieux. Merci à Charlotte pour ta spontanéité, tes expressions parfois complètement loufoques, et pour ce superbe mariage auquel nous avons eu la chance d'être conviés. Ça aura été un plaisir de partager ce moment de votre vie vous, mais du calme quand même.

Merci également à Paupau, la boss de la physio, pour ton rire joyeux et communicatif, les fameux « goutal », les chocolats chauds et le poney, et pour ton aide précieuse sur les manips !

Merci à Julie B. d'avoir pris le temps de faire partie de mon jury de CSI, et pour tes conseils toujours bienveillants. Merci à Louis, Maxime L. et Juliette pour les moments de rigolade souvent à leur bureau, et à Ruben pour ton aide dans la finalisation du projet FucoMBs ICH.

Je profite également de cette section pour exprimer ma considération envers les animaux utilisés à des fins scientifiques. Cela peut sembler original, mais il est important de reconnaître que sans eux, la science ne serait pas là où elle en est aujourd'hui.

Enfin, merci du fond du cœur à ma famille : à ma grand-mère, à ma mère et Eric, et à Thomas pour leur soutien indéfectible et leur présence à chaque instant. Merci aussi à Malya, Nova, Minette, et Iourk, mon double, qui restera l'ami le plus fidèle et précieux que j'aie eu dans ma vie. Et bien-sûr, un immense merci à mes amis, qui se reconnaîtront sans aucun doute.

Table des matières

PARTIE I : l'Accident Vasculaire Cérébral : Définition et Mécanismes

1.	Définition et classification des Accidents Vasculaires Cérébraux.....	14
2.	L'AVC ischémique	15
2.1.	Épidémiologie et charge de morbidité.....	15
2.2.	Facteurs de risque de l'AVC ischémique.....	16
2.2.1.	Facteurs de risque modifiables	16
2.2.2.	Facteurs de risque non modifiables	17
2.3.	Chronologie de l'AVC ischémique : de la formation du caillot aux déficits fonctionnels.....	18
2.3.1.	Étiologie de l'occlusion vasculaire.....	18
2.3.2.	Territoires vasculaires de l'AVC ischémique.....	19
2.3.3.	Composition des thrombi.....	21
2.3.4.	Du déséquilibre hémostatique à l'embolisation.....	23
2.3.5.	De l'embolisation à l'impact sur le Débit Sanguin Cérébral (DSC).....	27
2.3.5.1.	Phénomènes compensatoires	27
2.3.5.2.	Limite des phénomènes compensatoires	30
2.3.5.3.	Seuil d'ischémie cérébrale et vulnérabilité cellulaire.....	30
2.3.5.4.	Excitotoxicité.....	31
2.3.5.4.1.	Le système glutamatergique	31
2.3.5.4.2.	Les récepteurs au N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA).....	32
2.3.5.4.3.	Excitotoxicité induite par la suractivation glutamatergique.....	33
2.3.5.4.4.	Réaction inflammatoire : activation microgliale et infiltration leucocytaire.....	35
2.3.5.4.5.	Mort cellulaire : nécrose, apoptose et autophagie	36
2.3.5.5.	L'hétérogénéité du DSC et les territoires ischémiques.....	37
2.3.5.5.1.	Le foyer ischémique.....	38
2.3.5.5.2.	La pénombre ischémique.....	38
2.3.5.5.3.	L'oligémie bénigne	38
3.	Concept d'unité neurovasculaire	39
3.1.	Structure et fonctionnement de l'UNV	40
3.2.	Historique du couplage neurovasculaire.....	41
3.3.	Fonctionnement du couplage neurovasculaire	42
3.4.	De l'impact de l'ischémie au découplage neurovasculaire	44
4.	Plasticité cérébrale et récupération post-AVC	45

4.1.	Plasticité neuronale et connectivité diffuse	46
4.2.	Mécanismes de compensation sensorielle et motrice.....	47
4.3.	Localisation et compétition des territoires corticaux	48
4.4.	Remaniement des circuits et récupération fonctionnelle.....	49
4.5.	Facteurs favorisant le remodelage neuronal	49

PARTIE II : diagnostic de l'AVC ischémique

5.	Evaluation clinique en phase aiguë.....	51
6.	Suivi clinique à long terme	52
7.	Imagerie cérébrale	52
7.1.	Tomodensitométrie (TDM) cérébrale.....	53
7.1.1.	TDM non rehaussée.....	53
7.1.2.	TDM angiographique.....	54
7.1.3.	TDM de perfusion	54
7.2.	Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)	55
7.2.1.	IRM pondérée en diffusion (DWI)	56
7.2.2.	IRM de perfusion.....	57
7.2.3.	IRM d'Inversion-Récupération FLAIR.....	57
7.2.4.	Angiographie par Résonance Magnétique (MRA)	58
7.3.	Imagerie ultrasonore.....	59

PARTIE III : traitements aigus de l'AVC ischémique

8.	Thrombolyse intraveineuse	64
8.1.	Définition et histoire.....	64
8.2.	L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et sa forme recombinante (rtPA)	65
8.2.1.	Efficacité fibrinolytique du rtPA	68
8.2.2.	Effets physiopathologiques du rtPA	69
8.2.2.1.	Perméabilisation de la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE)	69
8.2.2.2.	Rôles du tPA dans le Système Nerveux Central (SNC).....	70
8.2.2.3.	tPA et potentialisation de l'excitotoxicité.....	71
8.2.2.4.	tPA et inflammation	72
8.2.3.	Limites de la thrombolyse et faible inclusion des patients	73
9.	Stratégies alternatives de recanalisation.....	74
9.1.	Thrombectomie mécanique endovasculaire	74
9.2.	Association thrombolyse intraveineuse et thrombectomie mécanique.....	75
9.3.	Mutants du tPA	76
10.	Récupération post-AVC.....	77

PARTIE IV : recherche préclinique sur l'AVC

11. Pourquoi utiliser des modèles animaux ?.....	78
12. Étude sur l'AVC chez le petit animal.....	80
12.1. Modèles d'induction de l'ischémie cérébrale chez le rongeur	81
12.1.1. Électrocoagulation de l'ACM.....	81
12.1.2. Occlusion mécanique de l'ACM.....	81
12.1.3. Infarctus par administration d'endothéline-1	81
12.1.4. Injection de thrombine dans l'ACM.....	82
12.1.5. Occlusion endoluminale par filament.....	82
12.1.6. Modèles photo-induits.....	83
12.1.7. Injection de thrombus autologue.....	83
12.1.8. Infarctus induit par chlorure de fer ou d'aluminium.....	84
12.1.9. Infarctus cérébral par embolisation de microsphères.....	84
12.2. Limites des modèles animaux.....	85
12.2.1. Similitudes inter-spécifiques :.....	85
12.2.1.1. Mécanismes de base de la mort cellulaire.....	85
12.2.1.2. Mécanismes fondamentaux de l'ischémie.....	85
12.2.1.3. Neuroanatomie	86
12.2.1.4. Plasticité et récupération fonctionnelle	86
12.2.2. Spécificités physiopathologiques	87
12.2.2.1. Anatomie cérébrale.....	87
12.2.2.2. Système immunitaire et réponse inflammatoire	87
12.2.2.3. Anatomie vasculaire et hémodynamique	88
12.2.2.4. Barrière Hémato-Encéphalique	88
12.2.2.5. Spécificités génétiques et épigénétiques	89
12.3. Améliorer la transposition des résultats précliniques	89
12.3.1. L'anesthésie utilisée en recherche préclinique.....	92
12.3.1.1. Influence sur les paramètres physiologiques, métaboliques et fonctionnels.....	94
12.3.1.2. Influence dans le cadre de l'AVC ischémique.....	95
12.3.2. L'imagerie en recherche préclinique	97
12.3.2.1. L'imagerie anatomique et hémodynamique du petit animal.....	97
12.3.2.1.1. IRM	97
12.3.2.1.2. Tomographie par Émission de Positons (TEP) et de Photons Uniques (SPECT)	100
12.3.2.1.3. Débitmétrie laser doppler et imagerie de contraste à granularité laser.....	101
12.3.2.1.4. Imagerie photoacoustique	102
12.3.2.1.5. Imagerie ultrasonore	102
12.3.2.2. Imagerie fonctionnelle chez le petit animal.....	103

12.3.2.2.1.	IRM fonctionnelle (IRMf).....	104
12.3.2.2.2.	Imagerie fonctionnelle par ultrasons (fUS).....	105

PARTIE V : défis dans la recherche et le traitement de l'AVC

13.	Défi 1 : La pertinence et la translation des essais précliniques.....	107
14.	Défi 2 : Diagnostic et accessibilité aux techniques d'imagerie avancées.....	107
15.	Défi 3 : Optimisation des stratégies thérapeutiques et inclusion des patients.....	108

PARTIE VI : résultats

16.	Article 1 : Improving Stroke Prognosis Through Early Ultrasound Imaging of Functional Midline Shift in Awake Mice.....	110
16.1.	Contexte de l'étude.....	111
16.2.	Objectifs de l'étude	112
16.3.	Principales méthodes utilisées.....	112
16.4.	Principaux résultats	114
17.	Brève communication : An open-source platform for 3D transcranial Ultrasound Localization Microscopy in awake mice.....	145
17.1.	Contexte de l'étude.....	146
17.2.	Objectifs de l'étude	146
17.3.	Principales méthodes utilisées.....	146
17.4.	Principaux résultats	147
18.	Article 2 : rtPA-loaded fucoidan polymer microbubbles for the targeted treatment of stroke.....	158
18.1.	Contexte de l'étude.....	158
18.2.	Objectifs de l'étude	160
18.3.	Principales méthodes utilisées.....	160
18.4.	Principaux résultats	161

PARTIE VII : discussion et Conclusion

19.	Discussion.....	176
20.	Conclusion générale	183

Index des Figures

Figure 1 : incidence et types d'AVC.....	14
Figure 2 : incidence de l'AVC ischémique en 2019	15
Figure 3 : anatomie des principales artères cérébrales et de l'Artère Cérébrale Moyenne	20
Figure 4 : territoires vasculaires des artères cérébrales	21
Figure 5 : composition des thrombi dans les AVC ischémique aigus	22
Figure 6 : hétérogénéité des thrombi dans les AVC ischémiques aigus.....	22
Figure 7 : hémostase primaire.....	24
Figure 8 : cascade de la coagulation.....	25
Figure 9 : acteurs de la fibrinolyse.....	26
Figure 10 : équilibre fragile de la balance hémostatique	27
Figure 11 : circulation collatérale primaire et secondaire	28
Figure 12 : anastomoses leptoméningées chez trois souches de souris.....	29
Figure 13 : système nerveux central (SNC).....	30
Figure 14 : la synapse glutamatergique.....	32
Figure 15 : inflammation cérébrale en condition d'ischémie.....	36
Figure 16 : cascade des événement délétères lors de l'ischémie cérébrale focale	37
Figure 17 : territoires ischémiques.....	39
Figure 18 : réseau cérébrovasculaire	40
Figure 19 : association neurovasculaire le long de l'arbre cérébrovasculaire : des artères piales et pénétrantes, aux artérioles et capillaires intraparenchymateux.....	41
Figure 20 : principaux mécanismes par lesquels le glutamate régule le flux sanguin cérébral.....	44
Figure 21 : organisation somatotopique et homoncule sensoriel	46
Figure 22 : cortex sensorimoteur de la souris	47
Figure 23 : plasticité de la zone péri-infarctus post-AVC chez le rongeur	48
Figure 24: TDM axiale sans rehaussement	54
Figure 25: angio-TDM axiale	54
Figure 26 : CT de perfusion axiale	55
Figure 27 : principe de la résonance magnétique nucléaire utilisée en IRM.....	55
Figure 28 : DWI et carte d'ADC	56
Figure 29 : carte de perfusion cérébrale (ASL)	57
Figure 30 : comparaison du signal DWI et FLAIR après un AVC ischémique aigu ou tardif.....	58
Figure 31 : angiographie par résonance magnétique.....	58
Figure 32 : imagerie Doppler des érythrocytes	60
Figure 33 : fenêtres crâniennes et territoires vasculaires	61
Figure 34 : Doppler transcrânien chez le nouveau-né	62
Figure 35 : ULM transcrânienne d'un anévrisme profond chez l'adulte.....	63
Figure 36 : parc IRM et Unité Neuro-Vasculaire Mobile.....	63
Figure 37 : structure et fonctions du tPA.....	66
Figure 38 : expression du tPA dans les cellules du Système Nerveux Central chez la souris.....	67
Figure 39 : voies de signalisation de la fibrinolyse.....	68
Figure 40 : la barrière hémato-encéphalique.....	69
Figure 41 : potentialisation de la mort neuronale et de l'activation microgliale par le tPA	73
Figure 42 : dispositifs de thrombectomie	75
Figure 43 : activateur du plasminogène et dérivés du plasminogène et de la plasmine	76
Figure 44 : questionnaire sur l'utilisation de modèles animaux.....	79
Figure 45 : animaux utilisés à des fins scientifiques en France en 2022	80
Figure 46 : principaux modèles d'ischémie du territoire de l'ACM.....	85
Figure 47 : relation phylogénétique entre les principaux groupes de mammifères.....	86

Figure 48 : volume cérébraux et ratios substance grise	87
Figure 49 : les trois piliers de l'anesthésie générale	93
Figure 50 : divergences entre les facteurs impliqués dans l'AVC expérimental et clinique	93
Figure 51 : effets de l'isoflurane sur la physiologie vasculaire cérébrale.....	94
Figure 52 : interactions des anesthésiques avec les événements post-AVC	96
Figure 53 : IRM cérébrale aiguë chez la souris	98
Figure 54 : IRM cérébrale subaiguë chez la souris.	99
Figure 55 : IRM en phase chronique de l'AVC chez la souris	100
Figure 56 : imagerie de contraste à granularité laser chez la souris	101
Figure 57 : imagerie photoacoustique chez la souris	102
Figure 58 : imagerie Doppler et ULM de l'AVC chez la souris	103
Figure 59 : IRM fonctionnelle chez la souris.....	105
Figure 60 : imagerie fonctionnelle ultrasonore chez la souris et le rat	106
Figure 61 : techniques d'imagerie cérébrale chez le rongeur	113
Figure 62 : première mesure de la pression artérielle par Stephen Hales	177

Index des Tableaux

Tableau 1 : métriques sur l'Accident Vasculaire Cérébral ischémique	16
Tableau 2 : échelle NIHSS de gravité de l'AVC.....	51
Tableau 3 : échelle de Rankin d'évaluation du handicap post-AVC	52
Tableau 4 : imagerie de l'AVC aigu	53
Tableau 5 : Doppler transcrânien des territoires vasculaires cérébraux.....	60
Tableau 6 : fonctions du tPA	66
Tableau 7 : recommandations STAIR.....	91
Tableau 8 : recommandations ARRIVE	92
Tableau 9 : modèles d'AVC ischémique chez les rongeurs, anesthésiés ou non	178

Liste des abréviations

20-HETE : <i>20-Hydroxyeicosatetraenoic acid</i>	AV : Artère Vertébrale
2D : 2 Dimensions	AVC : Accident Vasculaire Cérébral
3D : 3 Dimensions	AVI : Années Vécues avec Incapacité
AA : Acide Arachinodique	Balb-c : Bagg Albino-c
AB : Artère Basilaire	BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
ACA : Artère Cérébrale Antérieure ou <i>Anterior Cerebral Artery</i>	B-mode : <i>Brightness-mode</i>
ACHA : <i>Anterior CHoroidal Artery</i>	BOLD : <i>Blood Oxygenation Level Dependent</i>
ACI : Artère Carotide Interne	C57/BL/6 : <i>Clarence Cook Little 57 Black 6</i>
ACIt : Artère Carotide Interne terminale	Ca ²⁺ : Calcium (ion)
ACM : Artère Cérébrale Moyenne	CAP : <i>Cofilin-Associated Protein</i>
ACP : Artère Cérébrale Postérieure	CBF : <i>Cerebral Blood Flow</i>
ADC : <i>Apparent Diffusion Coefficient</i>	CBV : <i>Cerebral Blood Volume</i>
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	CD : <i>Cluster of Differentiation</i>
ADP : Adénosine DiPhosphate	CE : Communauté Européenne
AG : Anesthésie Générale	cGMP : <i>cyclic Guanosine Monophosphate</i>
AIIt : <i>Annexin II</i>	CHU : Centre Hospitalier Universitaire
AIT : Accident Ischémique Transitoire	CONSORT : <i>Consolidated Standards Of Reporting Trials</i>
AMPA : Acide alpha amino 3 hydroxy-5méthyl-4-isoxanole-propionique	CT : <i>Computed Tomography</i>
Anti-SMA-Cy3 : <i>Anti-Smooth Muscle Actin-Cyanine 3</i>	DAMP : <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
AO : Artère Ophthmique	DiO : 3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanine perchlorate
AP-HP : Assistance Publique-Hôpitaux de Paris	DLD : Débitmétrie par Laser Doppler
ARRIVE : <i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>	DNA : <i>DesoxyriboNucleic Acid</i>
ASCOD : <i>Atherosclerosis Small-vessel disease Cardiac pathology Other causes Dissection</i>	DSC : Débit Sanguin Cérébral
ASL : <i>Arterial Spin Labeling</i>	DSC : <i>Dynamic Susceptibility Contrast</i>
Asp : Acide aspartique	DTI : <i>Diffusion Tensor Imaging</i>
ATP : Adénosine TriPhosphate	DWI : <i>Diffusion Weighted Imaging</i>
	EAAT : <i>Excitatory Amino Acid Transporter</i>
	EET : Époxyeicosatriénoïde

EGF : <i>Epidermal Growth Factor</i>	Mg ²⁺ : Magnésium (ion)
EMA : <i>European Medicines Agency</i>	mGluR : <i>metabotropic Glutamate Receptor</i>
EVT : <i>EndoVascular Thrombectomy</i>	mHL : <i>motor cortex HindLimb</i>
FDA : <i>Food and Drug Administration</i>	MMP : <i>Métalloprotéinases Matricielles</i>
FLAIR : <i>FLuid-Attenuated Inversion Recovery</i>	MPIO : <i>MicroParticles of Iron Oxide</i>
fMLS : <i>functional MidLine Shift</i>	MRA : <i>Magnetic Resonance Angiography</i>
fULM : <i>functional Ultrasound Localization Microscopy</i>	MRI : <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
fUS : <i>functional UltraSound</i>	mRS : <i>modified Rankin Scale</i>
GAP : <i>Growth Associated Protein</i>	MSB : <i>Martius Scarlet Blue</i>
GBD : <i>Global Burden of Disease</i>	MTT : <i>Mean Transit Time</i>
GHU : <i>Groupement Hospitalier Universitaire</i>	Na ⁺ : Sodium (ion)
GP : <i>GlycoProtein</i>	NET : <i>Neutrophil Extracellular Trap</i>
His : Histidine	NIHSS : <i>National Institutes of Health Stroke Scale</i>
HMGB : <i>High Mobility Group Box</i>	NINDS : <i>National Institute of Neurological Disorders and Stroke</i>
iDISCO : <i>immunolabeling-enabled three-Dimensional Imaging of Solvent-Cleared Organs</i>	NIRF : <i>Near-Infrared Fluorescence Imaging</i>
IHME : <i>Institute of Health Metrics and Evaluation</i>	NMDA : <i>N-méthyl-D-aspartate</i>
IL : InterLeukine	nNOS : <i>neuronal Nitric Oxide Synthase</i>
IRM : <i>Imagerie par Résonance Magnétique</i>	NO : <i>Nitric Oxide</i>
IRMf : <i>Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle</i>	NOS2 : <i>Nitric Oxide Synthase 2</i>
K ⁺ : Potassium (ion)	NS : <i>NeuroSerpine</i>
LCR : <i>Liquide Céphalo-Rachidien</i>	NVU : <i>NeuroVascular Unit</i>
LRP : <i>Low density lipoprotein Receptor-related Protein</i>	OPA : <i>Optical-resolution PhotoAcoustic microscopy</i>
LSA : <i>LenticuloStriate Arteries</i>	PAI : <i>Plasminogen Activator Inhibitor</i>
LSCI : <i>Laser Speckle Contrast Imaging</i>	PAM : <i>Pression Artérielle Moyenne</i>
LVTS : <i>Laboratory for Vascular Translational Science</i>	PAT : <i>PhotoAcoustic Tomography</i>
mARCKS : <i>Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate</i>	PCA : <i>Posterior Cerebral Artery</i>
MEMRI : <i>Manganese-Enhanced Magnetic Resonance Imaging</i>	PDGF CC : <i>Platelet-Derived Growth Factor C Chain</i>
mFL : <i>motor cortex ForeLimb</i>	PDGF : <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
	PDGFR : <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
	PDW : <i>Proton Density Weighted Imaging</i>

PG : ProstaGlandine	SSS-TOAST : <i>Stop Stroke Study-Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment</i>
PICA : <i>Posterior Inferior Cerebellar Artery</i>	STAIR : <i>Stroke Therapy Academic Industry Roundtable</i>
PL : Phospholipase	TAFI : <i>Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor</i>
PN-1 : Protéase Nexine-1	tc-tPA : <i>two-chains tissue-type Plasminogen Activator</i>
PVM : <i>PeriVascular Macrophage</i>	TDM : TomoDensitoMétrie
PWI : <i>Perfusion Weighted Imaging</i>	TEP : Tomographie par Émission de Positons
Rabep2-/- : <i>RAB Effector Protein 2 -/-</i>	TICI : <i>Thrombolysis In Cerebral Infarction</i>
RBC : <i>Red Blood Cell</i>	Tmax : <i>Time to maximum</i>
RF : RadioFréquence	TNF : <i>Tumor Necrosis Factor</i>
RMH : <i>Royal Melbourne Hospital</i>	TOAST : <i>Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment</i>
ROS : <i>Reactive Oxygen Species</i>	TOF : <i>Time-Of-Flight</i>
RS : <i>Rankin Scale</i>	tPA : <i>tissue-type Plasminogen Activator</i>
rtPA : <i>recombinant tissue Plasminogen Activator</i>	UE : Union Européenne
SCA : <i>Superior Cerebellar Artery</i>	ULM : <i>Ultrasound Localization Microscopy</i>
sc-tPA : <i>single-chain tissue-type Plasminogen Activator</i>	UNV : Unité NeuroVasculaire
Ser : Sérine	uPA : <i>urokinase-type Plasminogen Activator</i>
sFL : <i>somatosensory cortex ForeLimb</i>	uPAR : <i>urokinase-type Plasminogen Activator Receptor</i>
sHL : <i>somatosensory cortex HindLimb</i>	VCAM : <i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
SMC : <i>Smooth Muscle Cell</i>	VGLUT : <i>Vesicular GLUTamate Transporter</i>
SNARE : <i>N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor</i>	VWF : <i>VonWillebrand Factor</i>
SNC : Système Nerveux Central	
SPECT : <i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>	

PARTIE I : L'Accident Vasculaire Cérébral : Définition et Mécanismes

1. Définition et classification des Accidents Vasculaires Cérébraux

L'Accident Vasculaire Cérébral (AVC) se caractérise par la perte soudaine d'une ou plusieurs fonctions neurologiques, causée par une diminution, ou un arrêt du Débit Sanguin Cérébral (DSC) local, privant ainsi le cerveau de l'oxygène essentiel à son fonctionnement. Il existe trois types d'AVC (**Figure 1**).

- ⌘ L'AVC **ischémique**, généralement causé par l'occlusion d'une artère cérébrale par un caillot sanguin (thrombus).
- ⌘ L'AVC **hémorragique**, qui survient lorsqu'un vaisseau sanguin se rompt, provoquant un épanchement de sang dans le parenchyme (pour les hémorragies cérébrales), ou dans les méninges (pour les hémorragies méningées).

Ces deux types d'AVC sont caractérisés par des symptômes cliniques persistants pouvant entraîner des lésions cérébrales permanentes.

- ⌘ L'**Accident Ischémique Transitoire (AIT)**, qui se distingue par des symptômes temporaires ne durant généralement pas plus d'une heure en raison de l'interruption transitoire du DSC. L'AIT ne laisse en général pas de lésion observable en imagerie, mais constitue un signal d'alerte important, car le risque de survenue d'un AVC dans les 90 jours suivant un AIT est estimé entre 10 % et 18 % ([Amin et al., 2023](#)).

Cette thèse se concentre spécifiquement sur l'AVC **ischémique**, en lien avec les travaux de recherche menés au sein du laboratoire.

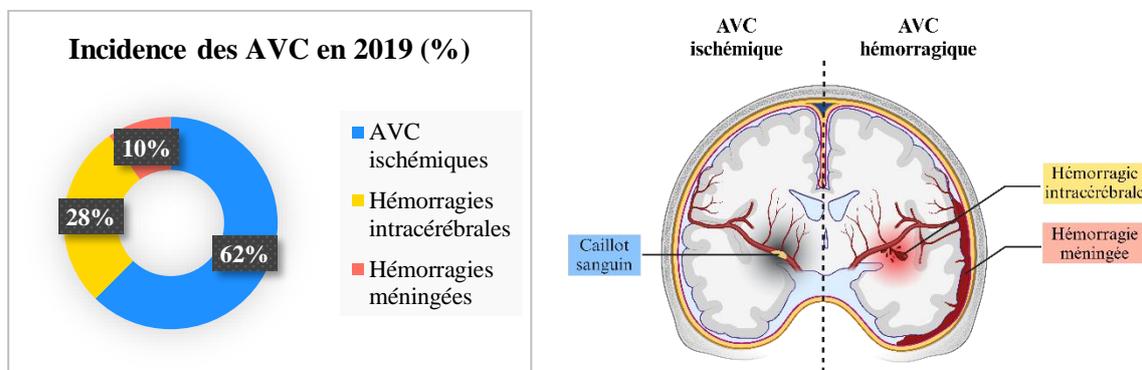


Figure 1 : incidence et types d'AVC.

Les AVC ischémiques représentent la majorité des AVC ([GBD Compare, IHME](#)), devant les hémorragies intracérébrales et méningées. Schéma réalisé sur *Biorender* ([M. Abioui-Mourgues](#)).

2. L'AVC ischémique

Le terme « ischémie » provient du grec « ἰσχαῖμος » (« *ischaimos* »), formé des racines « ἰσχ- » (« retenir ») et « αἷμα » (« sang »), se traduisant littéralement par « retenir le sang » ou « arrêter le sang ».

Aujourd'hui, le terme « d'AVC ischémique », aussi appelé « infarctus cérébral » fait référence à cette perturbation d'apport en sang dans le cerveau, à la suite de l'**obstruction d'un vaisseau sanguin cérébral**, généralement une artère, mais aussi plus rarement une veine (moins de 1 % de tous les types d'AVC) (Zhou *et al.*, 2022).

2.1. Épidémiologie et charge de morbidité

L'AVC ischémique représente la majorité des cas d'Accidents Vasculaires Cérébraux, avec 62,4 % des cas en 2019. Sur les 7,63 millions de personnes victimes d'un AVC ischémique dans le monde (Figure 2), 3,29 millions en sont décédées, faisant de cette pathologie la **deuxième cause de décès** à l'échelle mondiale.

Cette même année en France, sur 70 000 nouveaux cas d'infarctus cérébral, presque 29 000 personnes en sont décédées, ce qui représente 12 % du nombre total de décès toutes causes confondues (GBD Compare, IHME).

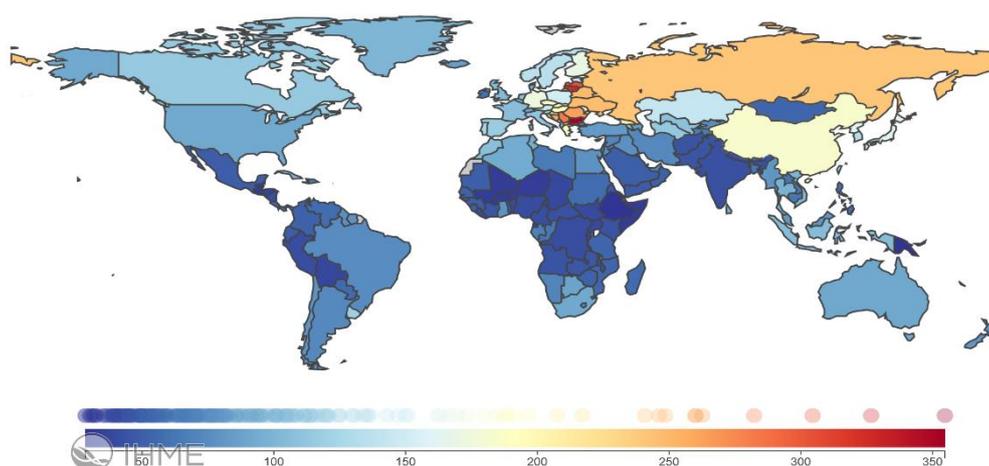


Figure 2 : incidence de l'AVC ischémique en 2019.

Les données sont exprimées en nombre de nouveaux cas pour 100 000 personnes (GBD Compare, IHME).

La gravité de l'AVC se manifeste non seulement par le nombre élevé de décès qu'il provoque, mais aussi par son impact significatif sur le développement de **handicaps**. En effet, l'AVC ischémique est la troisième cause de handicap acquis chez l'adulte et la deuxième cause de démence (Feigin *et al.*, 2023). La mesure des Années Vécues avec Incapacité (AVI) donne une évaluation quantitative de l'impact de cette maladie sur la qualité de vie d'une population (Tableau 1). Par exemple, en France, on estime que la population vit collectivement 109 000 années avec une qualité de vie réduite à cause de l'AVC ischémique, ce qui est plus élevé que l'AVI liée aux accidents de la route (83 858 années).

Entre 1990 et 2019, le nombre de cas d'AVC ischémique a augmenté de 88 %, témoignant de l'expansion préoccupante de cette maladie (GBD Compare, IHME).

Accident Vasculaire Cérébral ischémique (données 2019)		
	France	Monde
Incidence (nombre de personnes)	70 K	7 630 K
AVI (années)	109 K	10 733 K
Décès (nombre de personnes)	29 K	3 290 K

Tableau 1 : métriques sur l'Accident Vasculaire Cérébral ischémique.

L'incidence, les Années Vécues avec Incapacité et le nombre de décès constituent des données permettant de quantifier la gravité de l'AVC (GBD Compare, IHME).

2.2. Facteurs de risque de l'AVC ischémique

Identifier les **facteurs de risque** et les **causes** sous-jacentes de l'AVC ischémique permet de mieux comprendre cette maladie. Cela contribue à réduire son incidence et à améliorer sa prise en charge, en identifiant des cibles potentielles pour des interventions thérapeutiques et préventives. Les facteurs de risque peuvent être **modifiables**, et donc susceptibles à prévention, ou **non modifiables**.

2.2.1. Facteurs de risque modifiables

Les facteurs de risque modifiables incluent des comportements et des conditions de santé qui peuvent être modifiés par des **interventions médicales** ou des changements de **mode de vie**.

La présence concomitante de plusieurs maladies ou conditions médicales chez un même individu, appelée **comorbidité**, peut influencer sur l'incidence, la réponse au traitement et les séquelles d'un AVC ischémique.

- ⌘ L'**hypertension artérielle** est le principal risque modifiable. Son contrôle pourrait prévenir jusqu'à 45,7 % des infarctus cérébraux (Keun-Sik Hong, 2017).
- ⌘ L'**obésité centrale** (au niveau du tour de taille) est également un facteur de comorbidité important, sachant que 36 % des patients ayant subi un AVC entre 1983 et 2011 étaient obèses (Walter *et al.*, 2012).
- ⌘ En outre, le **diabète** (Mosenzon *et al.*, 2023), les **maladies coronariennes** (Alawneh *et al.*, 2020) et la **dyslipidémie** (Tziomalos *et al.*, 2009) sont des comorbidités significatives qui augmentent le risque d'AVC et influencent le pronostic des patients.
- ⌘ Les pratiques quotidiennes ont aussi une influence sur la prévalence de l'infarctus cérébral, comme la consommation excessive de **tabac** (Shah et Cole, 2010a) et d'**alcool** (Jeong *et al.*, 2022), le manque d'**activité physique** (Lu *et al.*, 2024), l'**alimentation** (Spence, 2019), la **contraception orale** (Li *et al.*, 2019), ainsi que les facteurs de risques **psychosociaux** (dépression, stress, qualité du sommeil) (O'Donnell *et al.*, 2016).

Il est estimé qu'en agissant sur l'ensemble des facteurs de risque modifiables, il serait possible de réduire le risque de survenue d'AVC de 80 % (Carmit Libruder *et al.*, 2022).

2.2.2. Facteurs de risque non modifiables

En plus des facteurs de risque modifiables, les facteurs non modifiables jouent un rôle prépondérant dans la prédisposition à l'AVC ischémique.

- ⌘ L'**âge avancé** est un facteur majeur, car le risque d'infarctus cérébral double tous les 10 ans après 55 ans. De plus, environ trois-quarts des AVC ischémiques touchent des personnes de plus de 65 ans (Yousufudd et Young, 2019).
- ⌘ Le **sexe** de l'individu est également à prendre en compte : les hommes sont plus à risque entre 20 et 54 ans, tandis que les femmes voient leur risque augmenter avant 20 ans et après 70 ans (source : *GBD Compare, IHME, 2019*).

- ⌘ Les antécédents familiaux d'AVC accroissent la probabilité de survenue d'un infarctus cérébral, indiquant une possible **prédisposition génétique**. Bien que cette prédisposition puisse parfois être influencée par les interactions gène-environnement, elle est souvent considérée comme un facteur non modifiable (Boehme *et al.*, 2017).
- ⌘ L'**origine ethnique** est également un facteur de risque important, avec une incidence plus élevée chez les afro-américains et les hispaniques (Gardener *et al.*, 2020), ainsi qu'une mortalité importante chez les populations asiatiques (Turana, 2020).
- ⌘ Les **antécédents** personnels d'AVC ou d'AIT augmentent aussi le risque de récurrence. De plus, certaines **maladies héréditaires**, comme diverses vasculopathies ou la maladie de Moyamoya peuvent prédisposer à l'AVC ischémique (K. Zhang *et al.*, 2023).

La reconnaissance de ces facteurs, bien qu'ils ne puissent pas être modifiés par des changements de mode de vie ou des interventions médicales, est essentielle pour une évaluation globale du risque et une prévention ciblée.

2.3. Chronologie de l'AVC ischémique : de la formation du caillot aux déficits fonctionnels

2.3.1. Étiologie de l'occlusion vasculaire

L'obstruction peut concerner différents vaisseaux, et peut avoir diverses origines. En 1993, une classification standardisée a été développée pour catégoriser les AVC ischémiques selon leur **étiologie**. Il s'agit de la classification **TOAST** (« *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment* »), permettant notamment de guider les traitements en fonction des causes sous-jacentes des AVC.

Depuis sa création, la classification TOAST est devenue un outil standard dans la recherche et la pratique clinique pour classer les AVC ischémiques en fonction de leur cause présumée. Des versions mises à jour de ce système ainsi que des classifications alternatives, telles que le **SSS-TOAST** et l'**ASCOD**, ont été développées pour améliorer la précision et la pertinence clinique de classification des AVC.

En tenant compte de ces outils, l'**athérosclérose** des grandes artères est identifiée comme la cause la plus fréquente d'AVC ischémique. Un thrombus se forme au contact

d'une plaque d'athérome dans la circulation systémique, puis migre vers une artère cérébrale *via* la circulation sanguine (Banerjee et Chimowitz, 2017).

Les **cardiopathies emboligènes**, responsables de la formation de caillots de sang au niveau cardiaque pouvant migrer vers la circulation cérébrale, sont à l'origine d'environ 25 % des AVC ischémiques. Les facteurs pouvant être à l'origine de ces caillots sont les **maladies auriculaires** (fibrillation atriale, syndrome bradycardie-tachycardie), les **maladies structurelles** (foramen ovale perméable), les **valvulopathies**, les **anomalies ventriculaires** structurelles et fonctionnelles (anévrismes ventriculaires et du septum, insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection réduite), et l'**infarctus du myocarde** (Pillai *et al.*, 2023).

L'**occlusion des petites artères** (40 μm à 900 μm), ou AVC lacunaire, représente 20 % des AVC ischémiques. Il s'agit de petits AVC (entre 3 mm et 20 mm) situés dans des zones cérébrales non corticales, causés par la maladie des petits vaisseaux, pouvant englober diverses atteintes vasculaires cérébrales (Joutel, 2020).

L'AVC ischémique peut également avoir d'autres causes plus rares, mais qui restent déterminées, comme la **dissection artérielle**, les **maladies artérielles** infectieuses, inflammatoires, ou de la paroi des artères, des **troubles du système hémostatique**, une **coagulopathie liée au cancer**, l'AVC associé à la **migraine** ou à la **prise de médicaments**, des **syndromes héréditaires** et d'hypoperfusion, ou encore une **cause iatrogène** (Grotta, 2013).

Enfin, le terme d'AVC **cryptogénique** définit un infarctus cérébral sans cause clairement identifiée.

Après avoir exploré les différentes causes de l'occlusion vasculaire, il est nécessaire d'examiner les conséquences directes de ces obstructions sur les **territoires vasculaires spécifiques**. En effet, la localisation de l'ischémie dépend du **réseau vasculaire** touché, ce qui détermine les **zones cérébrales affectées** et l'**étendue des lésions**.

2.3.2. Territoires vasculaires de l'AVC ischémique

L'**Artère Cérébrale Moyenne** (ACM) est l'artère la plus fréquemment impliquée dans les AVC ischémiques. Elle se divise en 4 segments (M1, M2, M3, M4), et irrigue une grande partie de la surface latérale du cerveau, ainsi qu'une portion des noyaux gris

centraux et de la capsule interne (**Figure 3**). Le segment M1, aussi appelé segment horizontal, donne naissance aux artères lenticulo-striées, responsables de l'irrigation des noyaux gris centraux et de la capsule interne. Ce segment se prolonge ensuite jusqu'au segment M2, ou segment sylvien, qui irrigue l'insula, le lobe temporal supérieur, le lobe pariétal, ainsi que la partie inférolatérale du lobe frontal (Nogles et Galuska, 2024).

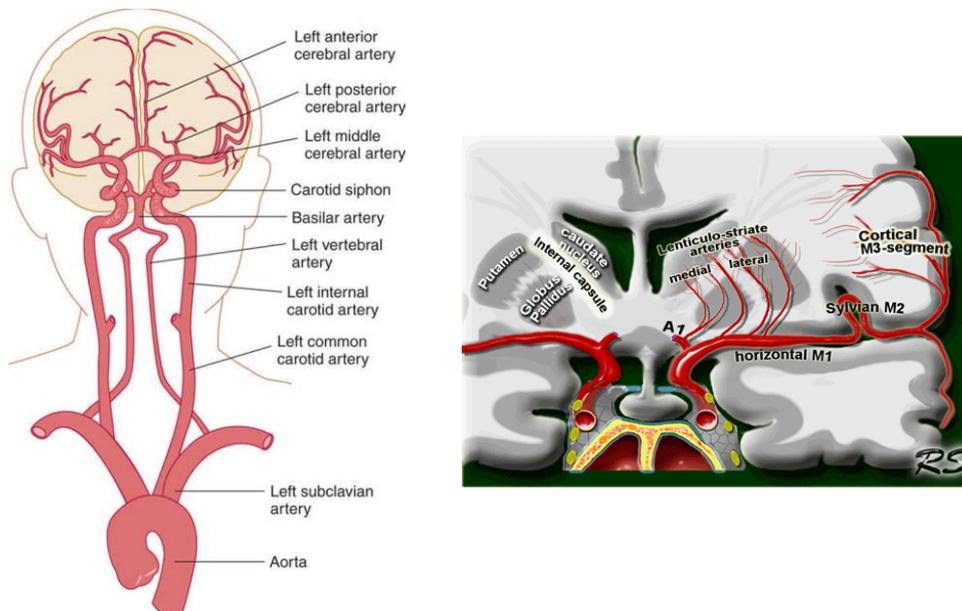


Figure 3 : anatomie des principales artères cérébrales et de l'Artère Cérébrale Moyenne.

Le cerveau est irrigué par les artères Artères Cérébrales Antérieures, les Artères Cérébrales Moyennes, ainsi que par les Artères Cérébrales Postérieures, partant du polygone de Willis.

Sources : Site internet Doctorlib.info pour la représentation des artères cérébrales (à gauche), et site internet RadiologyAssistant avec la contribution de [R. Smithuis](#) pour la schématisation de l'Artère Cérébrale Moyenne (à droite).

D'autres territoires peuvent également être affectés par un infarctus, notamment l'Artère Cérébrale Antérieure (ACA), l'Artère Cérébrale Postérieure (ACP), qu'elle soit profonde ou superficielle, ainsi que les artères vertébrales et basilaire (**Figure 4**). Le cervelet et les petites artères pénétrantes peuvent aussi être concernées (*Hui et al., 2024*).

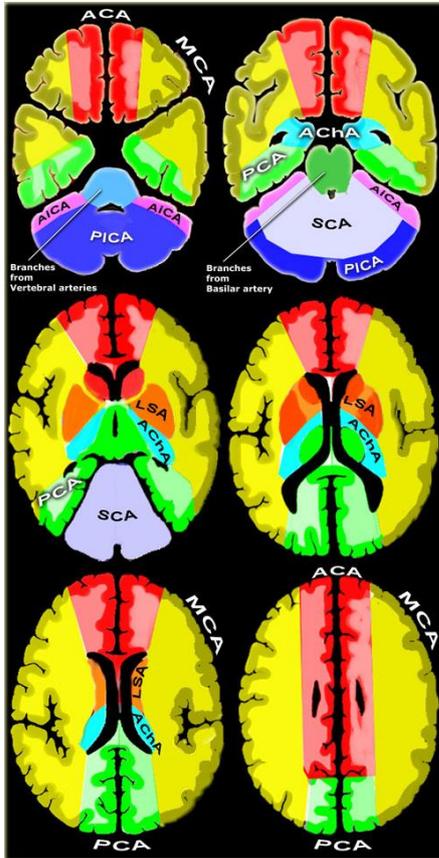


Figure 4 : territoires vasculaires des artères cérébrales.

Les différents territoires irrigués par les artères cérébrales correspondantes sont schématisés par des aires de couleur, ces aires pouvant être impactées par le manque de substrat énergétique lors de l'occlusion du vaisseau correspondant lors d'un AVC ischémique.

L'artère cérébrale postérieure (PICA)

L'artère cérébelleuse supérieure (SCA)

Les branches des artères vertébrales et basilaire

L'artère choroïdienne antérieure (ACHA)

Les artères lenticulostrées (LSA)

L'artère cérébrale antérieure (ACA)

L'artère cérébrale moyenne (MCA)

L'artère cérébrale postérieure (PCA)

Source : Site internet *radiologyassistant*, M. Savoiaro.

2.3.3. Composition des thrombi

Les récentes découvertes sur la composition des caillots formés lors des AVC ischémiques mettent en évidence une grande **hétérogénéité cellulaire** et **structurelle**.

Les thrombi présentent une organisation complexe, intégrant non seulement des **globules rouges**, mais aussi divers facteurs thrombotiques comme les **plaquettes**, le **facteur de von Willebrand** (VWF) et la **fibrine** (**Figures 5** et **6**). Des composants inflammatoires, tels que les **leucocytes** et les **NETs** (« *Neutrophil Extracellular Traps* ») constitués d'ADN, d'histones et de protéines sont également impliqués dans la structure du thrombus (*Staessens et al., 2021* ; *Staessens et De Meyer, 2021* ; *Ho-Tin-Noé et al., 2023*).

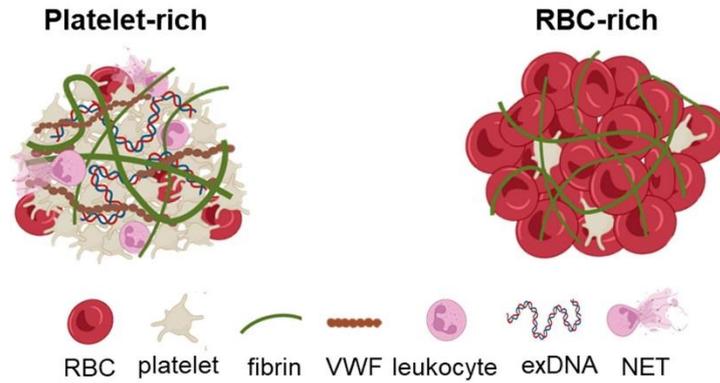


Figure 5 : composition des thrombi dans les AVC ischémique aigu.

Les deux principaux types de thrombi sont schématisés selon leur composition. Les thrombi riches en globules rouges présentent une structure relativement simple avec des globules rouges, des fibres et de la fibrine. En revanche, les thrombi riches en plaquettes sont plus complexes, intégrant des plaquettes, de la fibrine, du VWF, des leucocytes, de l'ADN, ainsi que des NETs (Vandelanotte et De Meyer, 2024).

La proportion de ces composants varie en fonction de l'étiologie de l'AVC, bien qu'il reste difficile à ce jour d'établir un lien clair entre l'origine de l'AVC et la composition du caillot (Brinjikji *et al.*, 2021).

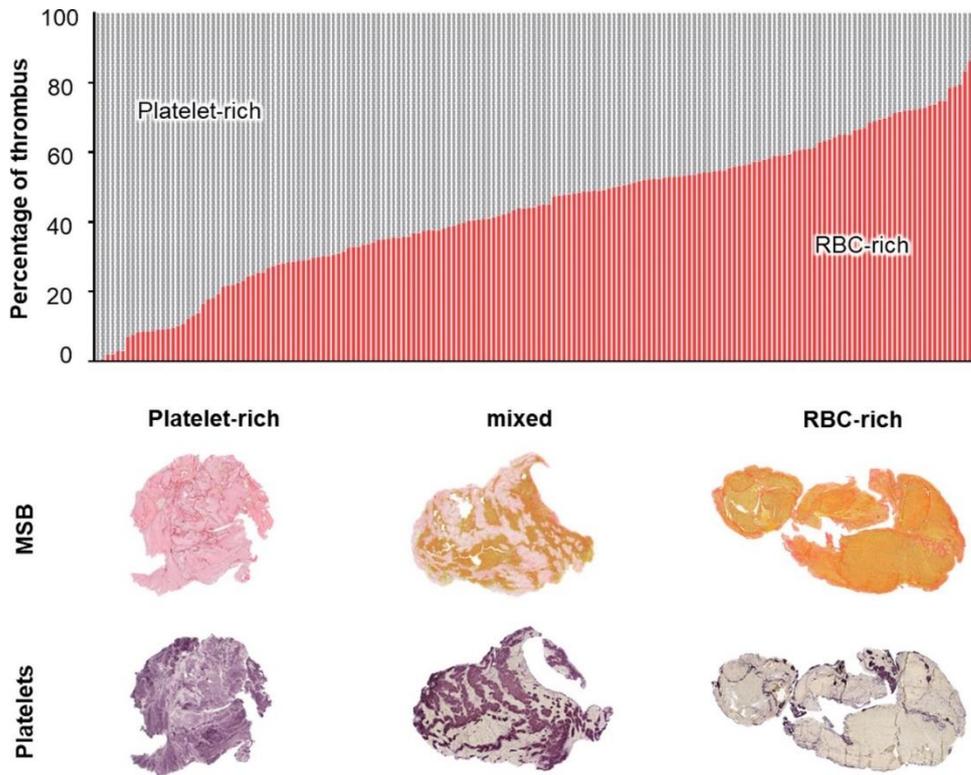


Figure 6 : hétérogénéité des thrombi dans les AVC ischémiques aigus.

La composition des thrombi récupérés chez des patients victimes d'un AVC ischémique aigu (n=177) a été analysée par coloration histologique. Les proportions relatives de matériel riche en plaquettes (en gris) et riche en globules rouges (en rouge) ont été déterminées. Chaque thrombus est représenté par une barre d'histogramme, classée selon un spectre de composition allant des thrombi riches en plaquettes (à gauche),

aux thrombi à composition mixte (au centre), jusqu'aux thrombi riches en globules rouges (à droite). Des images représentatives de thrombi riches en plaquettes (à gauche), de composition mixte (au centre), et riches en globules rouges (à droite) sont présentées sous le graphique. Ces coupes histologiques sont colorées au MSB (« *Martius Scarlet Blue* »), qui colore les globules rouges en jaune, la fibrine en rouge, le collagène en bleu, ou au CD42b, qui marque les plaquettes en violet. Barre d'échelle = 1mm. (Vandelanotte et F. De Meyer, 2024).

Enfin, la composition et la morphologie (Pikija *et al.*, 2016) des thrombi évoluent au fil du **temps**. Initialement riches en plaquettes, ils deviennent progressivement riches en fibrine, en raison de la polymérisation de celle-ci autour des agrégats plaquettaires au cours de la cascade de coagulation (Weisel et Litvinov, 2013).

2.3.4. Du déséquilibre hémostatique à l'embolisation

L'hémostase est le processus qui maintient l'intégrité du système circulatoire après un dommage vasculaire. Ce mécanisme est essentiel pour prévenir les hémorragies et ainsi maintenir l'intégrité des vaisseaux. On distingue trois étapes de l'hémostase (Teruya, 2021).

⌘ L'hémostase primaire

L'hémostase primaire débute par le **temps vasculaire**, qui concerne les événements se produisant suite à une brèche dans l'endothélium, causée par la rupture d'une plaque d'athérome ou par un traumatisme mécanique par exemple. Les cellules endothéliales lésées libèrent des médiateurs chimiques, tels que l'adrénaline, la noradrénaline et la sérotonine, induisant une première phase de vasoconstriction.

En temps normal, l'endothélium sain présente une surface non-adhésive pour les plaquettes circulantes, grâce à la prostacycline, au monoxyde d'azote et à l'héparan sulfate. Cependant, en réponse à une lésion endothéliale, le collagène de la matrice sous-endothéliale est exposé au flux sanguin, ce qui déclenche le recrutement et l'activation des plaquettes, marquant le début du **temps plaquettaire**, caractérisé par la formation du clou plaquettaire.

Ce processus de recrutement suit la **voie du collagène sous-endothélial**, et se déroule en plusieurs étapes :

Initiation : l'exposition du collagène recrute les plaquettes circulantes *via* l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (GPIa-IIa), et les active par l'intermédiaire de leur récepteur GPVI.

Interaction avec le facteur de von Willebrand : le facteur de von Willebrand circulant se lie au collagène exposé, facilitant ainsi l'adhésion des plaquettes au collagène par leurs récepteurs GP Ib-V-IX (Furie et Furie, 2008).

Activation et recrutement des plaquettes : les plaquettes adhèrent au site de la lésion, s'activent, et étendent leurs filopodes, pour augmenter leur surface d'interaction. Elles libèrent ensuite des granules denses et des granules α contenant de l'ADP et du thromboxane A₂, qui servent à recruter et à activer d'autres plaquettes.

Agrégation : les plaquettes activées s'agrègent *via* des ponts de fibrinogène formés entre leurs récepteurs GPIIb/IIIa, constituant ainsi le **bouchon hémostatique primaire** (Figure 7).

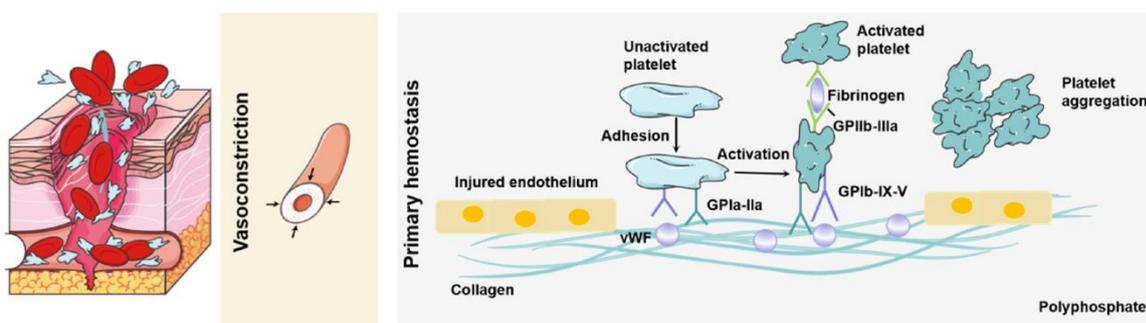


Figure 7 : hémostase primaire.

Suite à une brèche vasculaire, la voie du collagène est recrutée afin de former le bouchon hémostatique primaire, composé de plaquettes. Adapté de (Du *et al.*, 2023).

⌘ L'hémostase secondaire :

L'agrégat de plaquettes formé à l'issue de l'hémostase primaire reste fragile. L'hémostase secondaire intervient pour solidifier ce bouchon hémostatique, principalement grâce à la formation de fibrine par l'activation de la **voie du facteur tissulaire (voie extrinsèque de la coagulation)**. Ce processus se déroule en plusieurs étapes :

Initiation : le facteur tissulaire, exposé suite à la lésion, forme un complexe avec le facteur VIIa (forme activée du facteur VII circulant). Ce complexe active le facteur X, le transformant en facteur Xa.

Prothrombinoformation : le facteur Xa, en collaboration avec le facteur Va, le calcium et les phospholipides plaquettaire, forme le complexe prothrombinase, qui convertit la prothrombine en thrombine.

Fibrinoformation : la thrombine convertit le fibrinogène en fibrine. Cette fibrine est ensuite stabilisée par le facteur XIII, créant un réseau qui consolide le caillot sanguin.

Bien que la voie extrinsèque soit initialement activée, des acteurs de la voie intrinsèque sont également impliqués dans ce processus pour assurer une coagulation efficace et complète (**Figure 8**).

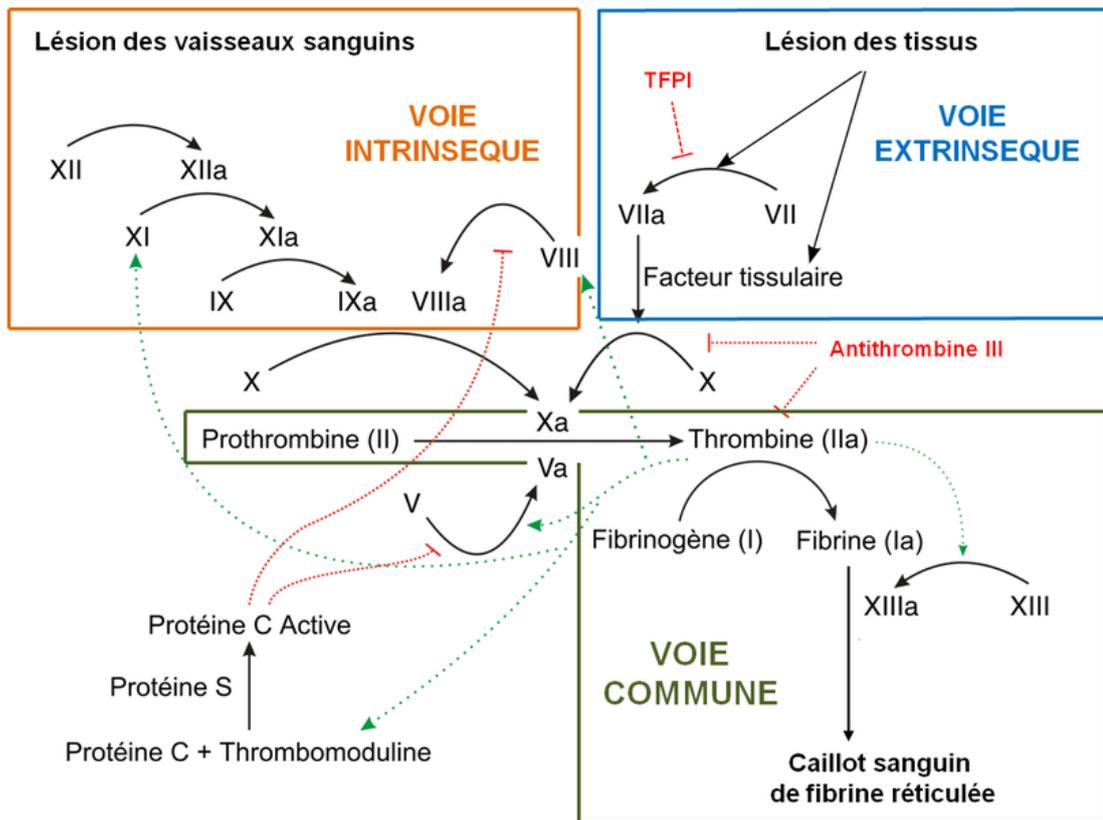


Figure 8 : cascade de la coagulation.

L'hémostase secondaire fait appel aux acteurs de la voie extrinsèque, complétés par ceux de la voie intrinsèque et de la voie commune, pour aboutir à un caillot sanguin stabilisé par la fibrine (N. Poupard, 2017).

⌘ Fibrinolyse

Une fois l'hémorragie contrôlée grâce à l'hémostase primaire et secondaire, il est nécessaire d'arrêter le processus de coagulation pour permettre la recanalisation du vaisseau sanguin concerné. C'est là qu'intervient la **fibrinolyse**, le processus physiologique responsable de la dégradation des caillots sanguins.

Le **plasminogène**, un précurseur inactif présent dans le plasma, joue un rôle clé dans ce mécanisme. Lors de la formation d'un caillot, l'**activateur tissulaire du plasminogène**

(tPA) est sécrété par les cellules endothéliales en réponse à divers stimuli (produits de la coagulation, cytokines, stase veineuse, anoxie, acidose). Le tPA se lie ensuite à la fibrine du caillot, formant un **complexe fibrine-tPA**, ce qui permet une action localisée. Ce complexe déclenche la conversion du plasminogène en plasmine, l'enzyme responsable de la dégradation du caillot.

La **plasmine** est l'agent final de la fibrinolyse. Elle dégrade la fibrine en produits de dégradation, permettant ainsi la dissolution du caillot et le rétablissement du flux sanguin (**Figure 9**).

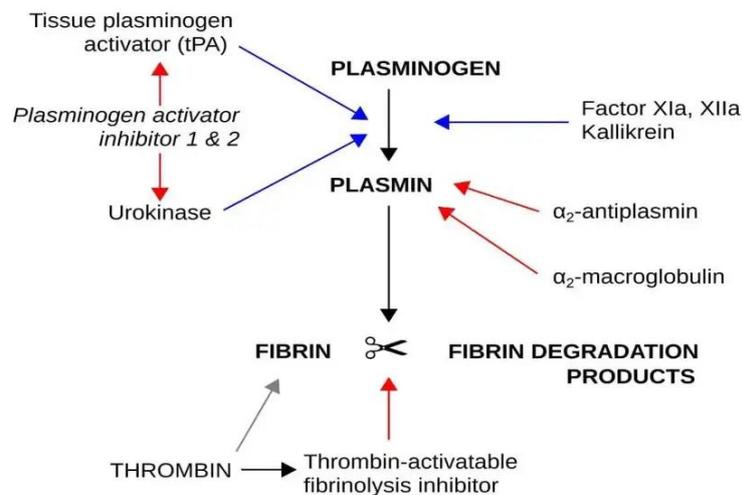


Figure 9 : acteurs de la fibrinolyse.

L'activation du plasminogène par le tPA permet sa conversion en plasmine, qui dégrade la fibrine en produits de dégradation (*Fibrinolysis: Key Players, Process, Disorders & Therapeutics*).

Cet **équilibre** délicat entre la coagulation et la fibrinolyse contribue au maintien de l'**homéostasie** vasculaire (**Figure 10**). Si cet équilibre est perturbé, par exemple en cas d'activité excessive de l'hémostase primaire et secondaire, le thrombus peut croître et devenir vulnérable aux forces mécaniques, notamment dans les artères où la pulsation est importante. Il peut alors se détacher et migrer *via* la circulation sanguine, risquant d'obstruer une artère ou, plus rarement, une veine cérébrale. Ce phénomène est appelé **embolisation**, conduisant à un **AVC thromboembolique**.

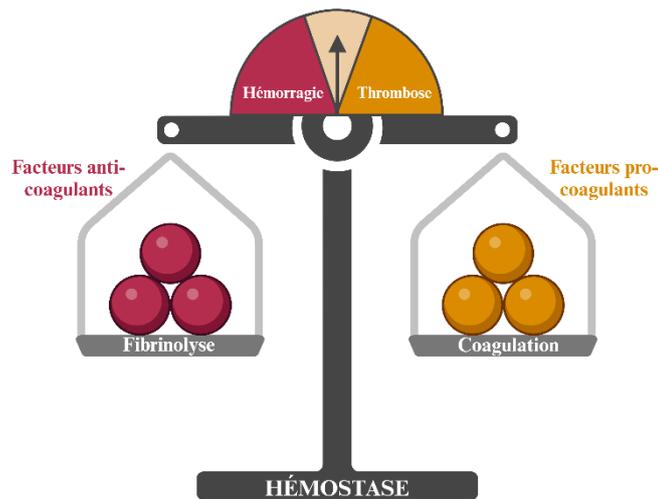


Figure 10 : équilibre fragile de la balance hémostatique.

L'équilibre hémostatique est maintenu par les **facteurs anti-coagulants** (à gauche) qui empêchent la formation excessive de caillots et favorisent leur dégradation, et les facteurs **pro-coagulants** (à droite), qui favorisent la formation de caillots pour prévenir les hémorragies. Un déséquilibre de cette balance en faveur de l'un ou de l'autre facteur, peut entraîner une hémorragie ou une thrombose. Réalisé avec *Biorender* (M. Abioui-Mourgues) et inspiré de (Jax *et al.*, 2009).

2.3.5. De l'embolisation à l'impact sur le Débit Sanguin Cérébral (DSC)

Le DSC est défini comme le volume sanguin qui circule par unité de masse et par unité de temps dans le tissu cérébral, exprimé en ml de sang par 100 g de tissu par minute (ml/100g/min).

Lors d'un AVC ischémique, la présence du thrombus entraîne une réduction du calibre de la lumière du vaisseau, pouvant aller jusqu'à son occlusion complète. Cette réduction de la lumière vasculaire provoque une diminution du DSC dans la région cérébrale concernée. Chez un adulte en bonne santé, le DSC moyen est d'environ 50 ml/100g/min, avec des valeurs plus élevées dans la substance grise (~80 ml/100g/min) et plus faibles dans la substance blanche (~20 ml/100g/min) (Sergio Fantini *et al.*, 2016). Une réduction du DSC en-dessous de ces valeurs déclenche des mécanismes compensatoires.

2.3.5.1. Phénomènes compensatoires

⌘ **Circulation collatérale** : la circulation collatérale consiste en un réseau de vaisseaux sanguins capables de compenser une baisse du DSC en étant recrutés pour assurer un apport sanguin alternatif. Les structures anatomiques de ce système peuvent être classées en systèmes collatéraux primaires et secondaires. Les

collatérales primaires se réfèrent au polygone de Willis, un réseau d'anastomoses situé à la base du crâne, qui connecte les circulations postérieures (artères cérébrales, tronc basilaire) et antérieures (artères carotides internes). Ce réseau peut compenser une diminution de la perfusion dans l'une des circulations, par la vasodilatation de l'autre. Les **collatérales secondaires** incluent les artères leptoméningées, qui anastomosent les segments distaux de l'ACA et de l'ACM, et entre ceux de l'ACP et l'ACM (Hung *et al.*, 2022), permettant ainsi une suppléance temporaire des apports en substrat énergétique dans la région cérébrale ischémisée (Figure 11).

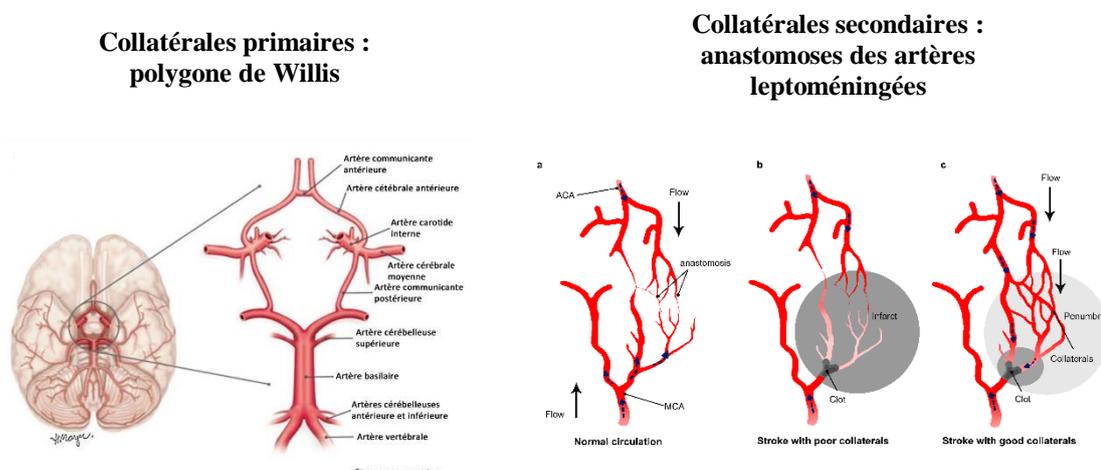


Figure 11 : circulation collatérale primaire et secondaire.

La circulation collatérale primaire comporte le polygone de Willis situé sur la face ventrale du cerveau, à la base du crâne, et permet de compenser un manque d'apport sanguin dans une des branches du polygone. La circulation collatérale secondaire est composée des anastomoses entre l'ACM et l'ACA (a). En cas d'AVC avec un réseau collatéral secondaire insuffisant, les collatérales ne parviennent pas à se remplir suffisamment et ne compensent pas efficacement la réduction du flux sanguin après l'occlusion artérielle (b). Chez les patients disposant d'un bon réseau collatéral secondaire, une amélioration du flux est observée. Le flux change de direction, permettant au sang d'irriguer la zone ischémisée par plusieurs côtés (c) (El Amki et Wegener, 2017).

La richesse de la circulation collatérale varie d'un individu à l'autre (Figure 12) (par exemple, en fonction de l'intégrité du polygone de Willis et du nombre de collatérales secondaires), ce qui peut avoir un impact sur le pronostic post-AVC, notamment en facilitant une meilleure recanalisation et reperfusion chez les patients disposant d'une circulation collatérale robuste (Mangiardi *et al.*, 2023).

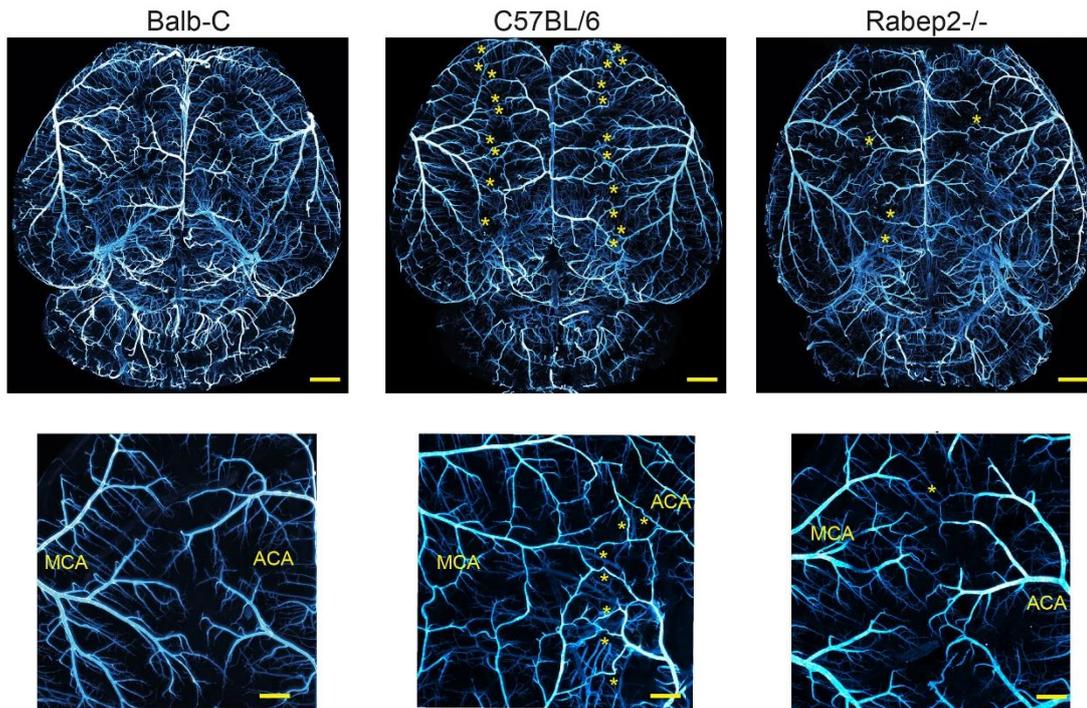


Figure 12 : anastomoses leptoméningées chez trois souches de souris.

Les souris Balb-c (à gauche) ne présentent pas d'anastomoses visibles entre l'ACM et l'ACA, contrairement aux souris C57/BL/6 (au centre) qui possèdent un réseau anastomotique riche. La souche Rabep2-/- présente quelques anastomoses visibles. Les cerveaux ont été prélevés et clarifiés par iDISCO, puis colorés avec un anticorps anti-SMA-Cy3. Barre d'échelle = 1 mm (Felizitas Binder *et al.*, 2024).

- ⌘ **Modification du taux d'extraction d'oxygène :** en plus de la circulation collatérale, l'augmentation de la fraction d'extraction d'oxygène sanguin par le cerveau contribue à limiter l'ischémie. En condition physiologique, le cerveau extrait entre 30 % et 55 % de l'oxygène disponible dans le sang artériel qui le perfuse (Ito *et al.*, 2004). En situation d'ischémie, ce taux d'extraction peut augmenter, permettant ainsi de mieux répondre aux besoins métaboliques des cellules cérébrales malgré la réduction du DSC.
- ⌘ **Autorégulation cérébrale :** ce mécanisme permet de maintenir un DSC constant malgré les variations de la pression artérielle moyenne (PAM) systémique (Cipolla, 2009). Lors d'un AVC ischémique, ce processus peut inclure la vasodilatation locale des artères afin d'augmenter le flux sanguin vers la région affectée, en réponse à la baisse de la pression de perfusion dans les capillaires cérébraux. Le deuxième mécanisme pouvant entrer en jeu est l'augmentation de la pression artérielle systémique par l'activation du système nerveux sympathique. Ces deux

mécanismes permettent ainsi de recruter la circulation collatérale (Nogueira *et al.*, 2021).

2.3.5.2. Limite des phénomènes compensatoires

Les signes cliniques d'une ischémie ne se manifestent pas tant que la diminution de la perfusion n'excède pas la capacité du cerveau à extraire l'oxygène nécessaire pour répondre aux besoins métaboliques. Cependant, lorsque les mécanismes compensatoires sont dépassés, un **déséquilibre** survient entre les besoins en substrats énergétiques et les apports, entraînant l'**ischémie**.

2.3.5.3. Seuil d'ischémie cérébrale et vulnérabilité cellulaire

Le **seuil d'ischémie cérébrale** (dépendant à la fois de la sévérité de la réduction du DSC résiduel et de la durée de cette réduction) (Astrup, 1981), ainsi que le type cellulaire concerné, déterminent le temps écoulé entre l'occlusion artérielle et la mort cellulaire. Par exemple, les neurones, en raison de leur haute demande métabolique, sont particulièrement vulnérables à l'ischémie, tandis que les astrocytes et les cellules endothéliales peuvent résister plus longtemps (Rajput *et al.*, 2024). Les différents types cellulaires du SNC sont présentés dans la **Figure 13**.

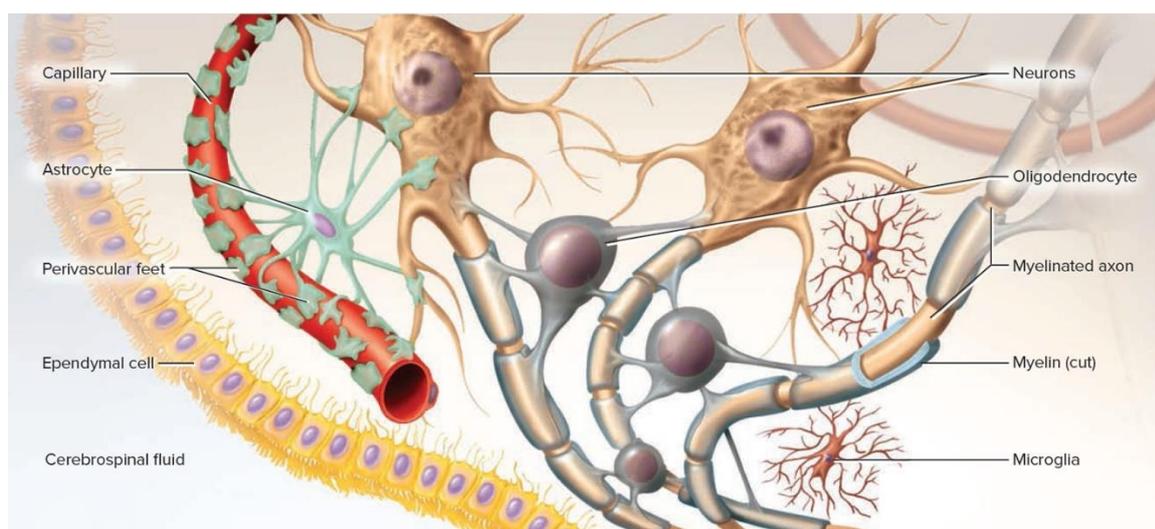


Figure 13 : système nerveux central (SNC).

Le SNC est constitué de **neurones** et de cellules gliales. Les neurones, qui assurent la transmission de l'information, sont entourés par la névroglie : les **oligodendrocytes** étendent leurs prolongements pour s'enrouler autour des fibres nerveuses, formant ainsi la **gaine de myéline** qui accélère la conduction des signaux nerveux. Les **cellules microgliales** sont des macrophages qui assurent la surveillance immunitaire.

Elles phagocytent les débris et participent au remodelage synaptique. Les **astrocytes** quant à eux, fournissent un soutien structurel, établissent des connexions entre les neurones et la circulation sanguine, et forment un joint étanche autour des **capillaires** sanguins, contribuant à la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE). Ils veillent également à l'apport de nutriments aux neurones (Jade, 2017).

2.3.5.4. Excitotoxicité

2.3.5.4.1. Le système glutamatergique

Le glutamate, ou acide glutamique est le principal **neurotransmetteur excitateur** du Système Nerveux Central (SNC). Environ 40 % des neurones du SNC sont glutamatergiques, et 90 % des neurones possèdent des récepteurs au glutamate (Gasiorowska *et al.*, 2021).

Contrairement à d'autres molécules, le glutamate ne peut pas traverser la BHE. Par conséquent, il doit être synthétisé localement par les neurones à partir de précurseurs présents dans le cerveau, principalement la glutamine (Bradford, 1978). Une fois synthétisé dans le cytoplasme présynaptique, le glutamate est stocké dans les vésicules synaptiques grâce à l'action de transporteurs spécifiques, les VGLUTs (« *Vesicular Glutamate Transporters* »).

Lors de la transmission synaptique, le glutamate est libéré dans la fente synaptique où il se lie à ses récepteurs ionotropes spécifiques situés à la surface des neurones postsynaptiques, tenant leurs noms des agonistes qui les activent : les **récepteurs NMDA** (N-méthyl-D-aspartate), **AMPA** (acide alpha amino 3 hydroxy-5méthyl-4-isoxanole-propionique), et **kaïnate** (acide kaïnique). Ces récepteurs sont des canaux laissant passer les cations (sodium Na⁺, potassium K⁺, calcium Ca²⁺) de manière non sélective, et leur activation entraîne des **réponses post-synaptiques excitatrices**, essentielles à la communication neuronale (Popoli *et al.*, 2012) (**Figure 14**).

Après avoir rempli sa fonction de neurotransmission, le glutamate est rapidement éliminé dans la fente synaptique pour prévenir toute **excitotoxicité** due à un excès de stimulation.

Cette élimination est assurée par des transporteurs à haute affinité appelés EAATs (« *Excitatory Amino Acid Transporters* »), présents sur les neurones et, surtout, sur les cellules gliales, notamment les astrocytes (Parpura *et al.*, 1994). Ces cellules gliales jouent un rôle crucial dans la régulation du glutamate : une fois capté, le glutamate est converti en **glutamine**, une forme non excitatrice, qui est ensuite restituée aux neurones.

Ce processus, connu sous le nom de **cycle glutamate-glutamine**, illustre la coopération dynamique entre les cellules gliales et les terminaisons synaptiques pour assurer un approvisionnement adéquat en neurotransmetteurs.

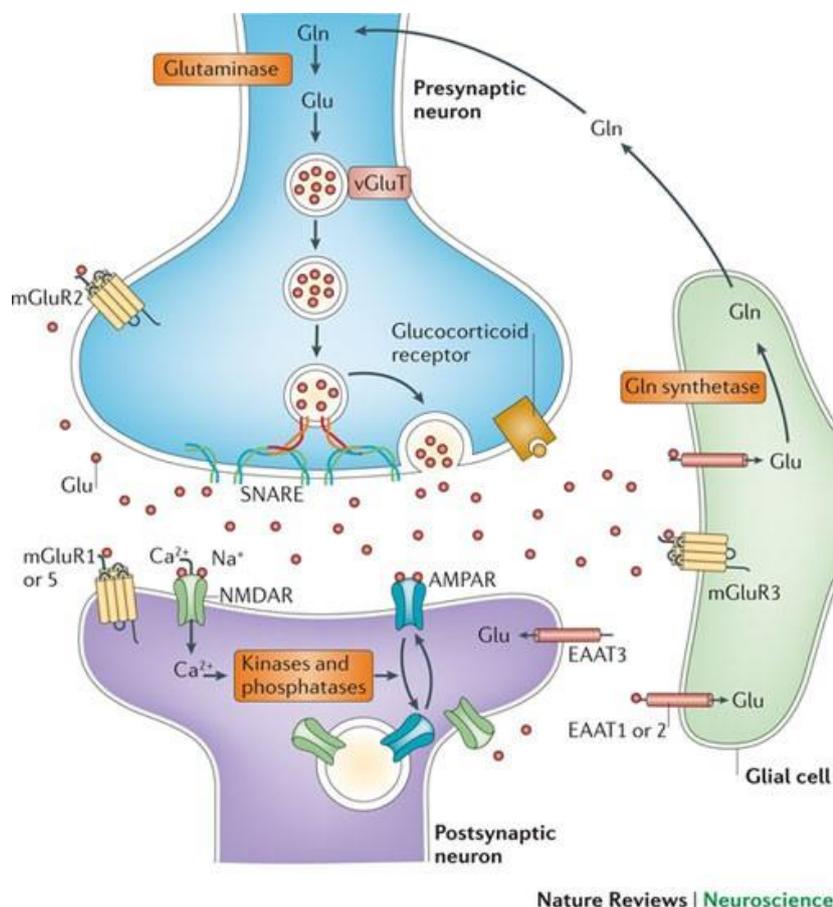


Figure 14 : la synapse glutamatergique.

Le glutamate neuronal (**Glu**) est synthétisé à partir de glucose et de glutamine (**Gln**) apportés par les cellules gliales. Il est ensuite stocké dans des vésicules synaptiques *via* un transporteur spécifique (**vGluT**). L'interaction et la fusion des vésicules avec la membrane synaptique se font par l'intermédiaire de complexes solubles, les **SNARE** (« *N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor* »). Le glutamate est ainsi libéré dans l'espace extracellulaire. Il va alors interagir avec les récepteurs **NMDA**, **AMPA** et métabotropiques (**mGluR**) présents sur les membranes des neurones pré et post-synaptiques et des cellules gliales. Ces interactions vont initier de nombreuses réponses, comme la dépolarisation membranaire, l'activation de cascades de signalisation, la modulation de la synthèse de protéines et l'expression de certains gènes. La clairance du glutamate dans la synapse se fait au travers de transporteurs des acides aminés excitateurs (« *excitatory amino acid transporter* », **EAATs**), principalement dans les cellules gliales, où le glutamate va être converti en glutamine, qui est ensuite réacheminée vers les neurones (Popoli *et al.*, 2012).

2.3.5.4.2. Les récepteurs au *N*-Méthyl-D-Aspartate (NMDA)

Les récepteurs NMDA jouent un rôle crucial dans le contexte de l'AVC ischémique, en raison de leurs propriétés qui influencent la survie neuronale. Ces récepteurs sont des **canaux ioniques** qui permettent le passage du Ca²⁺, du Na⁺ et du K⁺. L'entrée de calcium

via ces récepteurs déclenche des cascades de signalisation intracellulaire, où le Ca^{2+} agit comme un second messager, modulant divers processus cellulaires.

Une caractéristique distinctive des récepteurs NMDA est leur interaction avec le magnésium (Mg^{2+}) extracellulaire. À des potentiels de repos (-65 mV), le Mg^{2+} bloque le canal NMDA, empêchant ainsi le passage des ions. Cependant, lors de la dépolarisation de la membrane neuronale (-30 mV), ce blocage est levé : le Mg^{2+} est expulsé du canal, permettant alors au Ca^{2+} et aux autres cations de pénétrer dans la cellule. Ce mécanisme dépendant du voltage est essentiel pour la régulation de l'activité synaptique et pour les phénomènes de plasticité neuronale.

Pour s'activer, les récepteurs NMDA nécessitent non seulement la liaison du glutamate, mais aussi celle d'un co-agoniste tel que la glycine ou la D-sérine. Cette exigence d'un co-agoniste ajoute une régulation supplémentaire à la fonction des récepteurs NMDA. Ces récepteurs sont structurés en tétramères, composés de quatre sous-unités : deux GluN1, et deux autres sous-unités GluN2 et/ou GluN3, selon leur localisation dans le SNC (Mori et Mishina, 1995 ; Paoletti, 2011). La composition en sous-unités des récepteurs NMDA influence leurs propriétés fonctionnelles, notamment leur sensibilité au Mg^{2+} et leur cinétique de réponse.

Principalement localisés à la **surface des neurones**, tant au niveau **présynaptique** que **postsynaptique**, les récepteurs NMDA jouent un rôle central dans la **transmission synaptique excitatrice** et la **plasticité synaptique**, des processus essentiels pour l'apprentissage et la mémoire. Ils sont également présents sur les astrocytes (Krebs *et al.*, 2003), contribuant à des fonctions neurogliales. Ils sont enfin aussi présents sur les oligodendrocytes (Káradóttir *et al.*, 2005), les lymphocytes (Tuneva, Bychkova et Boldyrev, 2003), et les cellules endothéliales cérébrales (András *et al.*, 2007).

2.3.5.4.3. *Excitotoxicité induite par la suractivation glutamatergique*

⌘ **Phase d'induction, dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale par déplétion d'ATP** : dans les premières minutes suivant l'occlusion artérielle, la chaîne respiratoire mitochondriale est perturbée par le manque d'apport en oxygène, ce qui diminue la production d'ATP. Cette déplétion en ATP altère le fonctionnement des pompes Na^+/K^+ -ATPase à la surface des cellules, essentielles au maintien du potentiel membranaire et de l'homéostasie

ionique. Le dysfonctionnement de ces pompes entraîne un afflux massif de sodium (Na^+) et de calcium (Ca^{2+}) dans la cellule (Li et Yang, 2017).

⌘ **Phase d'amplification et conséquences de l'excès de glutamate extracellulaire :**

la perte du potentiel membranaire, causée par l'entrée des cations, déclenche une dépolarisation et la libération excessive de glutamate, conjointement à l'altération de sa recapture par les astrocytes. Ce cercle vicieux d'excitation neuronale incontrôlée peut étendre les lésions au-delà de la région cérébrale initialement affectée par le phénomène de **dépolarisations péri-infarcts** (Dohmen *et al.*, 2008) : le glutamate en excès dans le territoire ischémique va activer les neurones avoisinants, créant ainsi une chaîne de dépolarisations envahissantes. Ce phénomène contribue à la formation de l'**œdème cytotoxique** (Dreier et Reiffurth, 2017).

⌘ **Phase d'expression et conséquences de l'entrée massive de calcium intracellulaire :**

l'augmentation rapide du calcium intracellulaire modifie l'osmolarité du cytoplasme, provoquant une entrée d'eau par osmose et entraînant ainsi un **œdème cytoplasmique**, premier signe visible des dommages cellulaires. Le calcium intracellulaire active plusieurs enzymes dépendantes du calcium, telles que les protéases (calpaines), les phospholipases et les endonucléases, qui dégradent les protéines, les lipides membranaires et l'ADN, compromettant l'intégrité cellulaire. Simultanément, l'accumulation de calcium dépolarise la membrane mitochondriale, ce qui peut entraîner sa rupture. La synthèse d'ATP est alors gravement perturbée, et des radicaux libres oxygénés (ROS) sont produits, contribuant au **stress oxydatif**. Par ailleurs, la rupture mitochondriale libère du cytochrome C dans le cytoplasme, déclenchant le mécanisme **d'apoptose**. L'augmentation de calcium active également l'oxyde nitrique synthase neuronal (nNOS), augmentant la production de monoxyde d'azote (NO), qui participe au stress oxydatif et **nitrosatif**, exacerbant ainsi les lésions neuronales. De plus, la stimulation des récepteurs NMDA par le glutamate conduit à l'activation de la protéine RhoA, laquelle joue un rôle crucial dans la mort neuronale en activant des kinases spécifiques du stress excitotoxique (Kitaoka *et al.*, 2004).

Ce processus révèle l'**excitotoxicité** comme un déclencheur majeur des lésions tissulaires dans l'ischémie cérébrale, soulignant l'importance du calcium intracellulaire dans les premiers événements induits par l'ischémie cérébrale.

2.3.5.4.4. Réaction inflammatoire : activation microgliale et infiltration leucocytaire

Selon le dictionnaire médical de l'Académie de Médecine, l'inflammation est un « ensemble de manifestations (...) se produisant dans l'organisme en **réponse à des agressions variées** (...) dans le cadre des **processus réactionnels** indispensables au **maintien de l'intégrité du soi** ». Dans le contexte de l'ischémie cérébrale, l'inflammation joue un rôle dans l'évolution des lésions cérébrales (Iadecola et Anrather, 2011), avec des effets potentiellement délétères ou réparateurs selon sa phase.

- ⌘ **Phase aiguë** : dès les premières heures suivant l'ischémie, la production d'acteurs de l'inflammation (les ROS – « *Reactive Oxygen Species* », les DAMP – « *Damage-Associated Molecular Patterns* », et la HMGB1 – « *High Mobility Group Box 1* ») activent les cellules microgliales, les macrophages résidents du cerveau. Ces cellules libèrent dans la circulation sanguine des cytokines pro-inflammatoires, telles que telles que l'IL-1 β , le TNF α , et l'IL-6. Ces cytokines activent les cellules endothéliales, qui recrutent d'autres cellules immunitaires, principalement des leucocytes, dans la zone ischémique. L'infiltration de ces leucocytes, facilitée par la perte d'intégrité de la BHE, aggrave les lésions tissulaires en libérant des médiateurs inflammatoires, des enzymes protéolytiques et des radicaux libres, contribuant à l'**excitotoxicité** et à la **destruction cellulaire** (Drieu *et al.*, 2018).
- ⌘ **Phase subaiguë** : dans les jours suivant l'AVC, les cellules phagocytaires, comme la microglie et les macrophages, continuent d'éliminer les débris cellulaires. Parallèlement, les cytokines pro-inflammatoires persistent, stimulant le recrutement de monocytes et macrophages ainsi que de lymphocytes T, ce qui prolonge l'infiltration des cellules immunitaires dans le cerveau.
- ⌘ **Phase tardive** : à mesure que l'inflammation diminue, la phase tardive se caractérise par la réparation des tissus et la restauration de leur intégrité. Ce processus inclut le remodelage de la matrice extracellulaire, la neurogénèse, la croissance des axones, la formation de nouvelles dendrites (dendritogénèse), la myélinisation (oligodendrogenèse). La **gliose réactive** s'installe, les astrocytes et les microglies formant une **cicatrice gliale** autour de la lésion. Cette cicatrice limite la propagation de l'inflammation et stabilise les tissus endommagés, mais elle peut

aussi entraver la régénération axonale et compromettre la récupération fonctionnelle dans les phases chroniques (Jurcau et Simion, 2022).

L'inflammation post-AVC a donc un **rôle ambivalent** : elle contribue à la fois à l'aggravation des lésions par la libération de médiateurs pro-inflammatoires et à l'entrave de la régénération cellulaire par la cicatrice gliale, tout en ayant des effets bénéfiques grâce à l'élimination des débris, au remodelage tissulaire et à la production de facteurs de croissance (Figure 15).

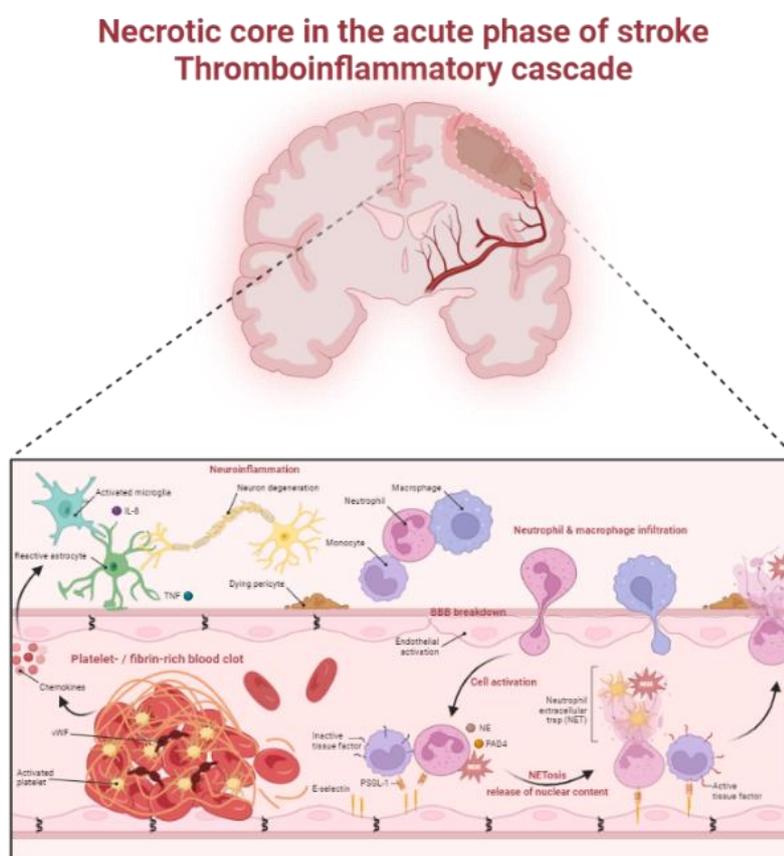


Figure 15 : inflammation cérébrale en condition d'ischémie.

La formation du caillot active la production de chimiokines et entraîne l'infiltration de cellules immunitaires, telles que les neutrophiles et les macrophages. En parallèle, la rupture de la BHE et l'activation des astrocytes et microglies favorisent la neuroinflammation, contribuant à la dégénérescence neuronale et à la libération de facteurs pro-inflammatoires comme le TNF (« *Tumor Necrosis Factor* »). Avec la contribution de C. Seillier.

2.3.5.4.5. Mort cellulaire : nécrose, apoptose et autophagie

La **nécrose**, conséquence de l'épuisement énergétique et des dommages cellulaires massifs, se caractérise par une lyse cellulaire incontrôlée qui déclenche une inflammation secondaire (Jayaraj et al., 2019).

L'**apoptose**, ou mort cellulaire programmée, est un processus ordonné activé par la signalisation calcique, le stress oxydatif, et l'activation des caspases. Ce mécanisme nécessite un apport d'énergie, d'où la prédominance de l'apoptose dans les territoires où un DSC résiduel subsiste. Une ischémie modérée entraîne donc préférentiellement une mort cellulaire apoptotique, alors qu'une atteinte plus sévère entraîne une mort nécrotique (Bonfoco *et al.*, 1995 ; Nicotera et Lipton, 1999).

Enfin, bien que l'**autophagie** soit généralement un mécanisme de survie cellulaire, sa dysrégulation dans le contexte ischémique peut conduire à une dégradation excessive des composants cellulaires et, finalement, à la mort cellulaire (Yu *et al.*, 2004).

Les différents processus délétères conduisant à la mort cellulaire sont présentés dans la **Figure 16**.

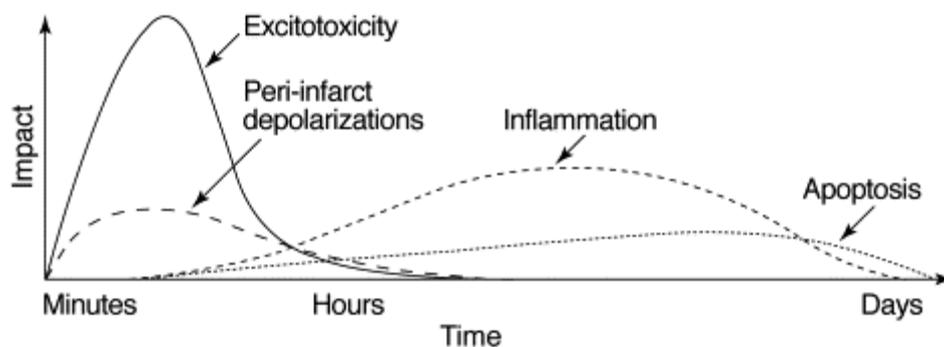


Figure 16 : cascade des événements délétères lors de l'ischémie cérébrale focale.

Peu après l'apparition d'un déficit de perfusion localisé, des mécanismes excitotoxiques peuvent causer des dommages irréversibles aux neurones et à la glie. De plus, cette excitotoxicité déclenche une série de processus qui aggravent encore la détérioration des tissus. Parmi ces processus, on trouve les dépolarisations péri-infarctus ainsi que des mécanismes plus tardifs tels que l'inflammation et l'apoptose (Dirnagl *et al.*, 1999).

2.3.5.5. L'hétérogénéité du DSC et les territoires ischémiques

Les dommages cellulaires à la suite de l'ischémie ne sont pas uniformes, car ils dépendent de la réduction du DSC, qui elle-même est hétérogène. Trois zones distinctes peuvent être identifiées dans le territoire ischémique, chacune ayant des caractéristiques et des implications cliniques différentes :

2.3.5.5.1. *Le foyer ischémique*

Cette zone centrale est directement dépendante du vaisseau occlus, et présente un DSC inférieur à 12 ml/100g/min. Les cellules ont perdu leur potentiel membranaire de manière **irréversible** en raison du déficit sévère en oxygène et nutriments. La mort cellulaire y survient rapidement, principalement par **nécrose**, entraînant la formation d'une **lésion cérébrale permanente**.

2.3.5.5.2. *La pénombre ischémique*

La zone de pénombre se situe en périphérie du foyer ischémique, et présente un DSC compris entre 12 et 22 ml/100g/min. Bien que la perfusion dans cette zone soit réduite, elle reste suffisante pour maintenir la viabilité cellulaire à court terme, grâce à l'apport sanguin persistant *via* les collatérales artérielles. Cette zone est **critique** car elle est **potentiellement récupérable** si une reperfusion rapide est obtenue.

2.3.5.5.3. *L'oligémie bénigne*

Cette zone constitue la périphérie du territoire ischémique, où le DSC diminue légèrement entre 22 et 35 ml/100g/min, mais pas suffisamment pour entraîner un dysfonctionnement du métabolisme cellulaire.

Dès le début du déficit de perfusion locale, ces zones ne sont pas statiques et peuvent évoluer dans l'espace et le temps. Si le DSC normal n'est pas rétabli rapidement, le volume du foyer et de la pénombre ischémique peut s'étendre, aggravant les lésions cérébrales (**Figure 17**) (Simon Jung *et al.*, 2017).

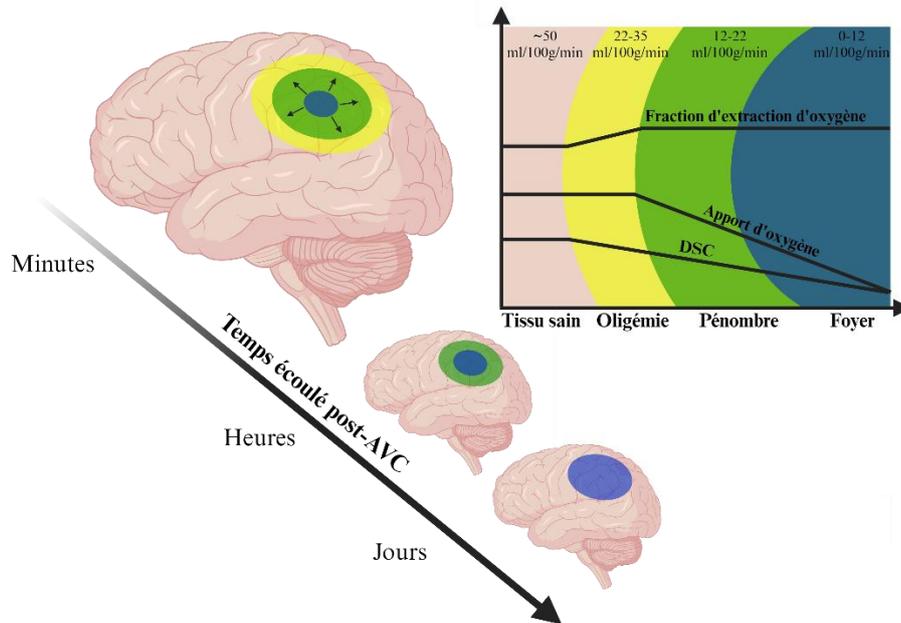


Figure 17 : territoires ischémiques.

Le foyer ischémique correspond à la zone où la diminution excessive du DSC entraîne des dommages tissulaires irréversibles. La pénombre ischémique, représente la région encore récupérable, mais à haut risque si la perfusion cérébrale n'est pas rétablie rapidement. L'oligémie, désigne les tissus où la baisse du DSC peut encore être compensée grâce à l'augmentation de l'extraction d'oxygène. La progression de la lésion ischémique en l'absence de reperfusion est illustrée à gauche, sous forme d'une échelle temporelle. Réalisé avec *Biorender* (M. Abioui-Mourgues) et adapté de (Jung *et al.*, 2017 ; Baron *et al.*, 2018).

3. Concept d'unité neurovasculaire

L'AVC, par ses effets sur le système vasculaire, déclenche une cascade de processus délétères qui affectent l'ensemble du tissu cérébral. Pour comprendre pleinement l'impact des altérations vasculaires sur les fonctions neuronales, il est nécessaire de considérer le concept d'**unité neuro-vasculaire** (NVU) (Grotta, 2013). Ce concept souligne la relation symbiotique entre les cellules cérébrales (neurones, astrocytes, microglies), et les vaisseaux sanguins, qui fonctionnent de manière étroitement liée pour maintenir l'homéostasie cérébrale.

Le cerveau est un organe avec de **faibles réserves énergétiques**, dépendant d'un apport constant en substrats énergétiques tels que l'oxygène et le glucose, fournis par le flux sanguin. Cet apport doit être précisément **régulé** pour répondre aux besoins spécifiques des différentes régions cérébrales en fonction de leur activité. En d'autres termes, le cerveau nécessite un **approvisionnement sanguin ajusté en temps réel** pour fournir les nutriments « *au bon endroit, au bon moment, et dans la bonne quantité* » (Iadecola, 2017).

3.1. Structure et fonctionnement de l'UNV

L'unité neurovasculaire est composée de neurones, d'astrocytes, de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses (SMCs), de péricytes, et de la matrice extracellulaire. Ces composants interagissent de manière coordonnée pour réguler le flux sanguin cérébral, assurant ainsi un apport optimal d'oxygène et de nutriments en fonction de l'activité cérébrale.

La connexion entre les neurones et les vaisseaux varie selon les différentes parties du réseau cérébrovasculaire : les artères cérébrales naissent du polygone de Willis, situé à la base du cerveau. Les grandes artères, appelées artères piales, parcourent la surface du cerveau avant de se ramifier en artérioles et en capillaires au sein du parenchyme (**Figure 18**).

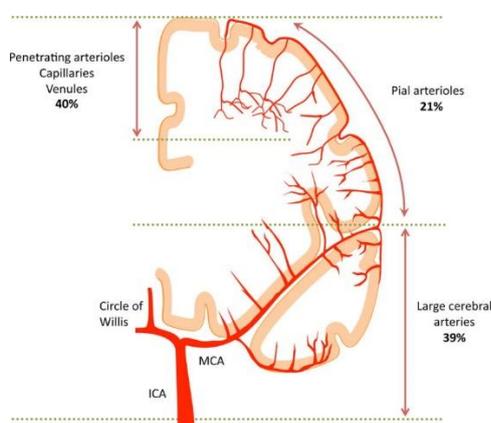


Figure 18 : réseau cérébrovasculaire.

Les artères piales parcourent la surface du cerveau, et s'enfoncent dans le parenchyme en se divisant en artères pénétrantes, capillaires, et vénules (Iadecola, 2017).

Les artères piales sont constituées d'une couche interne de cellules endothéliales formant la lumière du vaisseau, de plusieurs couches de cellules musculaires lisses (SMC), et d'une couche externe appelée adventice.

À la surface du cerveau, les artères sont séparées du parenchyme par les espaces de Virchow-Robin, des espaces périvasculaires remplis de liquide interstitiel. Ces espaces jouent un rôle dans la circulation des fluides et le drainage des substances immunitaires ainsi que des déchets du SNC (Jones, 1970 ; Zhang *et al.*, 1990).

En s'enfonçant dans le tissu cérébral, la structure des vaisseaux change. Les espaces périvasculaires se rétrécissent, et les couches de SMCs diminuent progressivement pour

laisser place aux péricytes autour des capillaires. À ce niveau, les cellules endothéliales sont en contact direct avec les pieds astrocytaires, participant à la formation de la BHE.

Les SMCs sont les principaux effecteurs du tonus vasculaire, modulant la **contraction** et la **dilatation** des vaisseaux en réponse à divers stimuli, notamment par la libération d'oxyde nitrique (NO) par les cellules endothéliales et les astrocytes. Le rôle des péricytes dans la régulation de la contractilité des capillaires est parfois discuté (Hill *et al.*, 2015), bien que leur implication soit fortement supposée (Attwell *et al.*, 2016) (Figure 19).

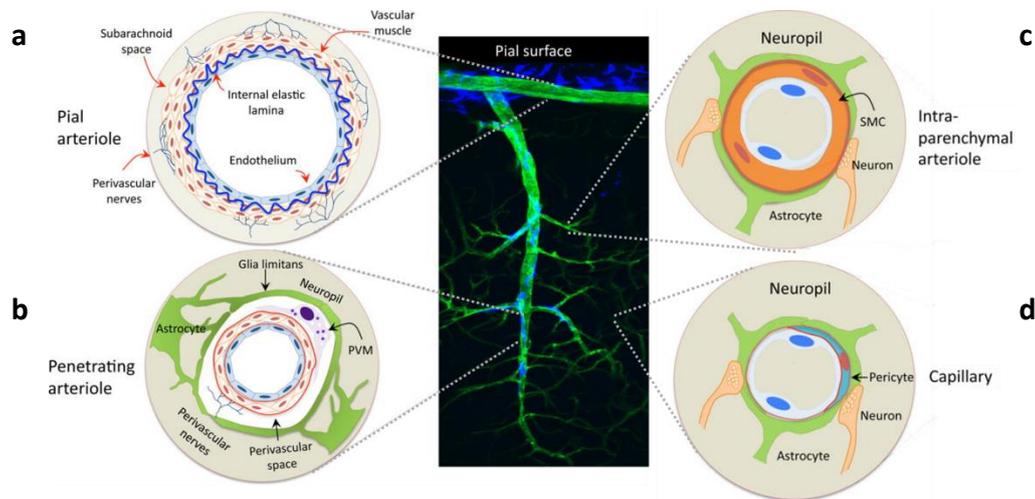


Figure 19 : association neurovasculaire le long de l'arbre cérébrovasculaire : des artères piales et pénétrantes, aux artérioles et capillaires intraparenchymateux.

L'artère piale (a) sur la surface corticale donne naissance à une artériole pénétrante (b). Les artères piales ont une épaisse couche de SMC, et sont entourées par l'espace sous arachnoïdien. Les artérioles pénétrantes s'enfoncent dans le parenchyme cérébral et sont entourées d'un espace périsvasculaire où résident les Macrophages Périsvasculaires (PVM – « PeriVascular Macrophages »). Au fur et à mesure que les artérioles pénètrent plus profondément au sein du cerveau (c), l'espace périsvasculaire disparaît et les vaisseaux sont enfermés dans des pieds terminaux astrocytaires, et une seule couche de SMC. Les capillaires (d) sont dépourvus de SMC, mais sont entourés de péricytes, entièrement enfermés par la membrane basale de l'endothélium. La vascularisation (en vert) est mise en évidence par coloration lipophile DiO injectée dans la circulation. Les PVM et les macrophages méningés (en bleu) sont visualisés par immunohistochimie CD206 (Iadecola, 2017).

3.2. Historique du couplage neurovasculaire

L'idée que l'activité cérébrale pouvait influencer le flux sanguin local remonte à la fin du XIX^{ème} siècle, où, en réponse à une activité cérébrale, des variations du volume cérébral et de la température de l'aire concernée étaient mesurées chez l'humain et l'animal (Angelo Mosso, 1880 ; Roy et Sherrington, 1890), suggérant ainsi un lien entre activité cérébrale et perfusion sanguine. Cette hypothèse a été négligée puis oubliée, jusqu'à la fin

des années 1930, lorsqu'une étude a démontré qu'une stimulation visuelle (éclairage de l'œil) chez le chat augmentait la température du cortex visuel, un indicateur indirect de la perfusion cérébrale (Schmidt et Hendrix, 1938). En 1945, il a été constaté que l'augmentation de l'activité neuronale s'accompagnait d'une augmentation de la densité vasculaire locale (Craigie, 1945), renforçant l'idée que l'activité neuronale modifie directement l'architecture vasculaire pour répondre aux besoins métaboliques.

Ces premières observations ont abouti aux bases du concept de **couplage neurovasculaire**, selon lequel les changements vasculaires induits par l'activité neuronale sont nécessaires pour satisfaire les besoins énergétiques des régions cérébrales actives.

Les premières mesures quantitatives du DSC chez l'humain ont été réalisées en 1948 grâce à l'utilisation du protoxyde d'azote comme traceur (Kety et Schmidt, 1950). Entre les années 1960 et 1970, des avancées significatives ont été réalisées avec l'utilisation de traceurs radioactifs, permettant de visualiser les changements locaux du DSC en réponse à une activité neuronale (Lassen et Ingvar, 1961). Ces travaux ont contribué à l'émergence de l'**imagerie fonctionnelle**.

3.3. Fonctionnement du couplage neurovasculaire

Le couplage neurovasculaire est le processus par lequel l'activité neuronale influence directement le flux sanguin local pour répondre aux besoins énergétiques des régions cérébrales actives. Ce mécanisme repose sur une communication entre les neurones, les astrocytes, et les composants vasculaires.

L'activité des neurones libère des neurotransmetteurs, comme le glutamate, dans l'espace synaptique. Le glutamate active ses récepteurs spécifiques à la surface des neurones post-synaptiques et des astrocytes voisins. En réponse, des voies de signalisation spécifiques sont déclenchées, conduisant à la libération de substances vasoactives (l'oxyde nitrique – « NO », l'acide arachidique – « AA », les prostaglandines – « PG », et les époxyeicosatriénoïdes – « EET ») par les astrocytes et les neurones situés près des vaisseaux sanguins (Figure 20).

Ces substances vasoactives agissent sur les SMCs des artérioles pour ajuster leur contraction ou leur dilatation. Parallèlement, les péricytes présents autour des capillaires

participent à la régulation du flux sanguin, modulant ainsi la distribution fine du sang au sein des tissus cérébraux (Benarroch, 2023).

La réponse vasculaire finale à ces voies de signalisation est principalement une **vasodilatation**, qui augmente le flux sanguin local pour répondre aux besoins métaboliques des régions cérébrales actives. Cette dilatation est induite par la relaxation des SMCs des artérioles, permettant un apport d'oxygène et de glucose. À l'inverse, en cas de diminution des besoins métaboliques, des signaux peuvent induire une vasoconstriction pour réduire le flux sanguin. Ce mécanisme adaptatif permet une régulation fine de la circulation sanguine cérébrale, assurant ainsi une distribution optimale des ressources en fonction de l'activité neuronale (Attwell *et al.*, 2010).

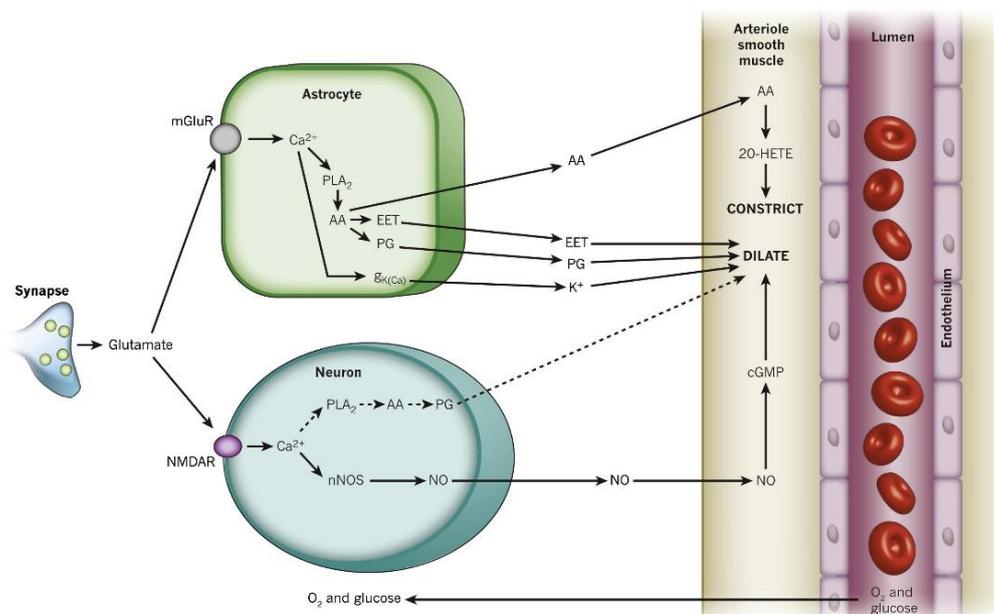


Figure 20 : principaux mécanismes par lesquels le glutamate régule le flux sanguin cérébral.

Les voies provenant des astrocytes (A) et des neurones (B) à gauche régulent le flux sanguin en envoyant des messagers (indiqués par des flèches), influençant les cellules musculaires lisses (SMCs) autour des artérioles, lesquelles apportent de l'oxygène et du glucose aux cellules (à droite, représentées par la lumière du vaisseau entourée de cellules endothéliales et de muscles lisses).

(A) Signalisation astrocytaire : dans les astrocytes, le **Glutamate** augmente la concentration en calcium (Ca^{2+}), en activant les récepteurs métabotropiques du glutamate (**mGluR**). Cela conduit à la production d'acide arachidonique (**AA**) *via* la phospholipase A_2 (**PLA₂**) et de trois types de métabolites : les **EET** et les prostaglandines (**PG**) qui dilatent les vaisseaux, ainsi que le **20-HETE** dans les SMCs, qui provoque une contraction des vaisseaux. Par ailleurs, l'élévation de la concentration du calcium dans les pieds astrocytaires peut activer les canaux potassiques régulés par le calcium (**$\text{g}_{\text{K}(\text{Ca})}$**), libérant ainsi du potassium (**K^+**), ce qui contribue également à la dilatation des vaisseaux.

(B) Signalisation neuronale : le **Glutamate** libéré lors de la transmission synaptique agit sur les récepteurs NMDA (**NMDAR**), augmentant la concentration intracellulaire de calcium (Ca^{2+}). Cette augmentation engendre la production d'acide arachidonique (**AA**) *via* la phospholipase A_2 (**PLA₂**). L'oxyde nitrique est ensuite converti en prostaglandines (**PG**) ayant un effet vasodilatateur. L'augmentation de calcium (Ca^{2+}) peut également provoquer la libération d'oxyde nitrique (**NO**) par la synthèse de l'oxyde nitrique neuronal (**nNOS**). L'oxyde nitrique active ensuite la guanylate cyclase dans les SMCs, générant du **cGMP**, ayant un effet vasodilatateur (Attwell *et al.*, 2010).

3.4. De l'impact de l'ischémie au découplage neurovasculaire

Lors d'une ischémie, le dysfonctionnement de l'unité neuro-vasculaire se manifeste par des altérations des interactions à plusieurs niveaux.

L'œdème des astrocytes provoque leur hypertrophie qui comprime les capillaires et perturbe la libération des médiateurs vasoactifs (NO et prostaglandines), essentiels à la

vasodilatation (Sato *et al.*, 2022). La perméabilisation de la BHE laisse passer de l'eau et des ions en excès, perturbant les systèmes de transport du glucose (O'Donnell, 2014).

L'ischémie entraîne une augmentation du calcium intracellulaire dans les péricytes (Zhou *et al.*, 2022), causant leur contraction prolongée par manque d'ATP pour restaurer des niveaux normaux de calcium. Cela réduit le diamètre des capillaires et entraîne une perfusion insuffisante, même après la reperméabilisation artérielle (Yemisci *et al.*, 2009), un phénomène connu sous le nom de « *no-reflow* » (Ames *et al.*, 1968).

Le stress oxydatif et nitrosatif inhibe également la production des messagers vasodilatateurs tels que les EETs et le NO, ce qui empêche les SMCs des artérioles de se dilater correctement pour ajuster le flux sanguin aux besoins métaboliques des régions ischémisées (Sato *et al.*, 2022).

Ces dysfonctionnements mènent à un **découplage neurovasculaire**, où le flux sanguin ne parvient plus à s'adapter aux besoins des neurones et des cellules gliales. Cette inadéquation entre l'activité neuronale et l'apport sanguin contribue à l'aggravation des lésions ischémiques et perturbe la régulation locale, entraînant des déficits fonctionnels cliniquement observables.

4. Plasticité cérébrale et récupération post-AVC

Lors d'un AVC ischémique, les dégâts structurels surviennent dès les deux premières minutes suivant le début de l'ischémie (Murphy *et al.*, 2008), et les cascades de nécrose et d'apoptose provoquent des altérations **sensitives** et **motrices** (Hossmann, 2006 ; Zhang et Murphy, 2007). Chez les patients, une récupération spontanée est observée grâce à la **plasticité synaptique** et au **réaménagement des réseaux neuronaux**. Cette récupération peut être amplifiée par des thérapies spécifiques (Biernaskie *et al.*, 2004).

De manière intéressante, les processus de plasticité intervenant pendant le développement du SNC et à la suite d'un AVC sont intimement liés (Carmichael *et al.*, 2005 ; Cheatwood *et al.*, 2008a ; Ploughman *et al.*, 2009). Il est toutefois difficile de distinguer si la récupération fonctionnelle après un AVC est due à une véritable **restauration des fonctions sensori-motrices**, à une **compensation**, ou à une combinaison des deux. Par exemple, chez le rat après une occlusion de l'ACM, des ajustements posturaux permettent de retrouver des performances motrices proches de celles avant

l'AVC (Whishaw, 2000). Chez les patients, des mesures par électromyogramme ont également mis en évidence ces phénomènes de compensation (Levin *et al.*, 2002, 2009).

4.1. Plasticité neuronale et connectivité diffuse

Les mécanismes qui sous-tendent la récupération après un AVC reposent sur des modifications **structurelles** et **fonctionnelles** du cerveau (Murphy et Corbett, 2009a). Dans le SNC, la connectivité synaptique est bien définie et organisée de manière **somatotopique** (c'est-à-dire en fonction des parties du corps concernées) (Figure 21) dès le développement, puis est façonnée par l'activité (Nudo *et al.*, 1996). Cependant, les neurones qui contribuent aux fonctions complexes, comme la mémoire, sont répartis dans tout le cortex cérébral (Monfils *et al.*, 2005).

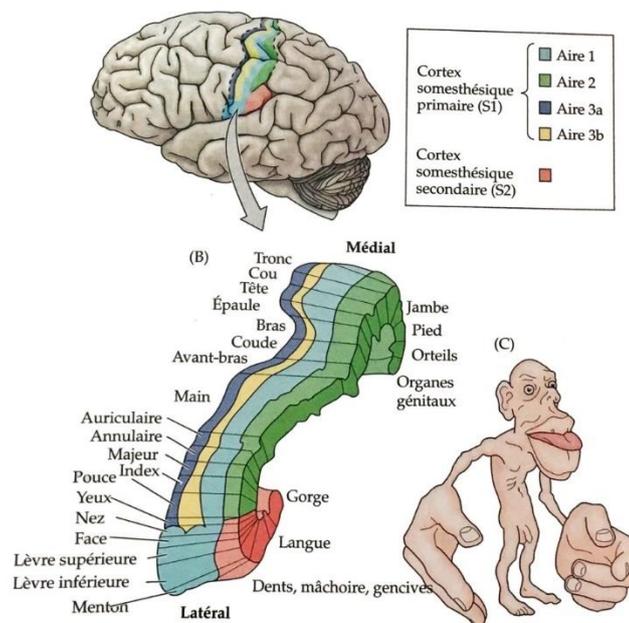


Figure 21 : organisation somatotopique et homoncule sensoriel.

Dans le cortex somatosensoriel et moteur, les différentes parties du corps sont représentées de manière ordonnée, où chaque proportion de l'espace cortical correspond à la sensibilité ou à la finesse de contrôle nécessaire. L'homoncule représente une image du corps humain indiquant les proportions corticales allouées à chaque partie du corps (E. Nadeau *et al.*, 2004).

Malgré sa structure en circuits définis, le cerveau peut acheminer les signaux *via* plusieurs voies, chacune capable de s'adapter aux changements dans la transmission de l'information. Cette **connectivité diffuse**, associée à la **redondance des traitements neuronaux**, pourrait faciliter la récupération post-AVC.

4.2. Mécanismes de compensation sensorielle et motrice

Un autre mécanisme pour limiter les dommages post-AVC réside dans le fait que les signaux sensoriels peuvent être acheminés sur de **longues distances** au sein d'un même hémisphère. Par exemple, les stimuli somatosensoriels provenant d'une partie spécifique du corps sont généralement acheminés *via* le thalamus vers les aires sensorielles primaires (S1) qui leur sont dédiées (Jones, 2000).

Chez les souris, l'imagerie par colorants sensibles au voltage a révélé une connectivité intra corticale étendue entre différentes régions du cortex. Par exemple, une stimulation des vibrisses peut entraîner une activité dans des parties du cortex sensoriel qui traitent les signaux provenant des membres (T *et al.*, 2007 ; Ferezou *et al.*, 2007 ; Brown *et al.*, 2009). Une autre étude a montré que des signaux induits par la stimulation des membres antérieurs pouvaient être retenus dans des régions du cortex traitement les signaux des membres postérieurs, même après un infarctus touchant les aires sensorielles primaires des membres antérieurs (Sigler *et al.*, 2009).

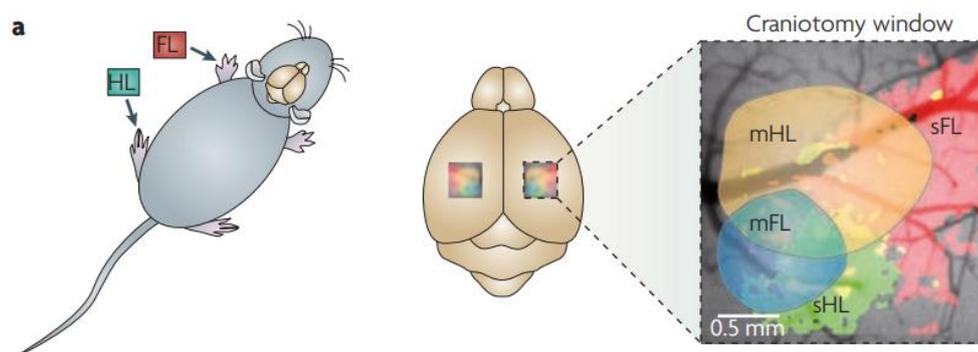


Figure 22 : cortex sensorimoteur de la souris.

Les voies sensorielles sont généralement contralatérales, de sorte à ce que les signaux provenant des membres gauches vont au cortex droit. L'emplacement du cortex somatosensoriel des membres antérieurs (**sFL** – « Forelimb ») et postérieurs (**sHL** – « hindlimb ») sont adjacentes au cortex moteur (**mHL** et **mFL**) (Murphy et Corbett, 2009b).

Bien que le traitement sensoriel et moteur d'un côté du corps soit généralement contrôlé par l'hémisphère cérébral opposé (Figure 22), des **voies ipsilatérales** existent également (Gonzalez *et al.*, 2004 ; Brus-Ramer *et al.*, 2009). Ainsi, certains réseaux neuronaux peuvent impliquer des régions cérébrales controlésionnelles, c'est-à-dire intactes du côté opposé à la lésion.

Cependant, l'activation de fonctions bilatérales chez les patients ayant subi un AVC ne semble pas toujours mener à une meilleure récupération que celle observée chez les patients avec des schémas d'activation sensorielle latéralisée (Ward *et al.*, 2003 ; Cramer, 2008). L'activation bilatérale pourrait indiquer une incapacité des mécanismes compensatoires à restaurer une activité sensorielle normale et latéralisée.

4.3. Localisation et compétition des territoires corticaux

La localisation des lésions ischémiques joue un rôle important dans la récupération cellulaire, en particulier la zone de **pénombre ischémique**, où les dendrites peuvent récupérer leur structure lors de la reperfusion. Les neurones survivants subissent ensuite un **remodelage structurel et fonctionnel**, jetant ainsi les bases de la récupération (Figure 23).

La localisation des lésions influence également la **compétition** pour les territoires corticaux disponibles (Nudo *et al.*, 1996). Par exemple, lorsqu'un doigt est retiré chez un animal adulte (désafférentation), le territoire cortical qui lui est dédié se réorganise rapidement pour représenter les doigts restants (Merzenich *et al.*, 1983). Cela démontre que même chez les animaux adultes, il existe une forte compétition pour le territoire cortical disponible.

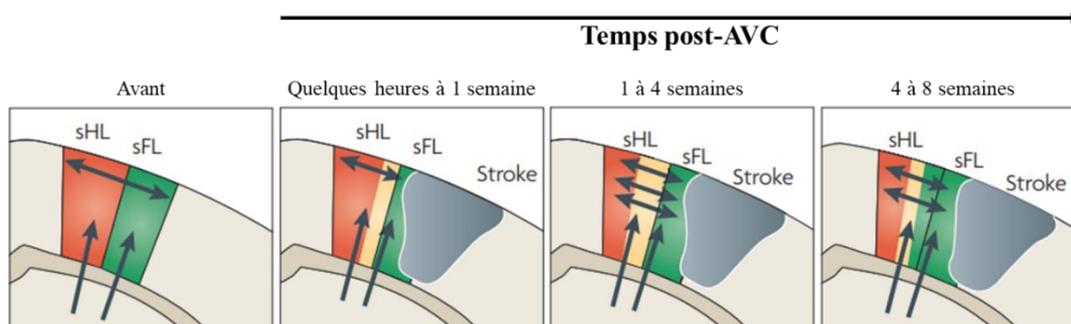


Figure 23 : plasticité de la zone péri-infarctus post-AVC chez le rongeur.

Les zones fonctionnelles du cortex somatosensoriel des membres antérieurs (sFL) et postérieurs (sHL) sont représentées avec les projections thalamiques (↑↑) et intracorticales (↔). Avant l'infarctus, les entrées sensorielles génèrent des potentiels d'action peu fréquents dans les neurones somatosensoriels. Au cours des premières heures, les neurones dans le **foyer ischémique** meurent, tandis que ceux de la **zone péri-infarctus** perdent leurs épines dendritiques. 1 à 4 semaines après l'AVC, de nouvelles projections axonales corticales se forment. Le renouvellement des épines dendritiques ainsi que la synaptogenèse augmentent. Les neurones deviennent plus excitables, et perdent leur spécificité sensorielle native. Jusqu'à 4 à 8 semaines, un raffinement des connexions synaptiques se produit, avec une plus grande spécificité dans les réponses sensorielles. Les neurones sHL ont modelé leurs connexions pour traiter des informations auparavant médiées par les neurones sFL affectés par l'infarctus. Adapté de (Murphy et Corbett, 2009b).

Après un AVC, les régions péri-infarctus qui sont en cours de récupération et qui présentent des circuits compromis sont en compétition avec les tissus adjacents sains. Dans le cas d'AVC relativement petits (affectant 5 à 10 % de l'hémisphère), la récupération repose principalement sur le tissu péri-infarctus ayant une **fonction similaire** (Brown *et al.*, 2009). En revanche, après un AVC massif, le tissu fonctionnel similaire peut se trouver uniquement dans des régions plus éloignées, telles que l'hémisphère controlatéral (Biernaskie *et al.*, 2005).

4.4. Remaniement des circuits et récupération fonctionnelle

Les observations sur des modélisations d'AVC chez la souris montrent qu'après un AVC dans le cortex sensoriel des membres antérieurs, la partie survivante de ce territoire relaye les signaux vers le cortex moteur, huit semaines après l'AVC. Les réponses remaniées chez les animaux ayant récupéré après un AVC durent plus longtemps que chez les animaux sains, et montrent également une propagation du cortex moteur vers des régions corticales éloignées (Brown *et al.*, 2009). La récupération sensorimotrice post-AVC implique donc des modifications de la propagation **temporelle** et **spatiale** du traitement de l'information sensorielle entre des sites locaux et distants.

4.5. Facteurs favorisant le remodelage neuronal

Le remodelage neuronal post-AVC est également influencé par la présence de certains facteurs dans la région **péri-infarctus**. Ces facteurs peuvent favoriser les circuits touchés par l'AVC au détriment des tissus sains. Parmi eux figurent les thrombospondines 1 et 2 d'origine gliale (facteurs synaptogéniques), ainsi que des protéines favorisant les processus de croissance, telles que GAP43, mARCKS, CAP23, et d'autres facteurs de croissance (Comelli *et al.*, 1993 ; Stroemer *et al.*, 1995 ; Carmichael *et al.*, 2005). Ces facteurs peuvent encourager la **germination de nouveaux axones** (Carmichael et Chesselet, 2002) et favoriser l'élaboration des **dendrites** (Jones et Schallert, 1994 ; Brown *et al.*, 2007). Leur expression précède celle de facteurs inhibiteurs, tels que Nogo (inhibiteur de la matrice extracellulaire) (Cheatwood *et al.*, 2008b), le protéoglycane de sulfate de chondroïtine (Hobohm *et al.*, 2005), l'éphrine A5, la sémaphorine 3A, et la neuropiline 1 (Carmichael *et al.*, 2005). Ces facteurs inhibiteurs pourraient exister pour limiter la réorganisation, et éviter ainsi la formation de connexions aberrantes.

La récupération fonctionnelle après un AVC ischémique repose donc sur des mécanismes de **plasticité cérébrale**, incluant la **réorganisation des circuits neuronaux**, la **compétition pour les territoires corticaux**, et la formation de **nouvelles connexions synaptiques**. Ces processus sont influencés par des facteurs intrinsèques favorisant la croissance ou limitant la réorganisation. La localisation des lésions et le moment d'intervention de la réhabilitation sont des paramètres importants pour maximiser la plasticité et favoriser une récupération optimale.

PARTIE II : diagnostic de l'AVC ischémique

5. Evaluation clinique en phase aiguë

La réduction du DSC local, qui crée un territoire ischémique hétérogène où tous les acteurs de l'UNV sont impactés, permet d'interpréter les manifestations cliniques chez le patient. Le déficit neurologique aigu est directement lié au territoire vasculaire occlus, avec une relation étroite avec la localisation de la lésion cérébrale et les symptômes observés.

Cette **corrélation anatomoclinique** permet de prédire le type et l'étendue des déficits neurologiques en fonction du vaisseau obstrué.

En 1989, un outil de diagnostic et de scorage de la gravité des AVC, le **NIHSS** (« *National Institutes of Health Stroke Scale* ») a été développé. (Brott *et al.*, 1989) Cet outil propose une évaluation standardisée reposant sur l'analyse de 15 items neurologiques cliniques, permettant une évaluation précise et rapide des **déficits** observés.

Chaque item est noté sur une échelle de 0 (aucun déficit) à 4 (déficit sévère). Le score total ainsi obtenu permet de déterminer la gravité de l'AVC (**Tableau 2**), et est étroitement corrélé au pronostic du patient (L. Zhang *et al.*, 2024). De plus, le NIHSS permet de suivre l'évolution clinique des patients au fil du temps, facilitant ainsi les décisions thérapeutiques et le suivi médical.

Score obtenu à l'issue du test	Gravité de l'AVC
1-4	Mineure
5-15	Modérée
15-20	Sévère
>20	Grave

Tableau 2 : échelle NIHSS de gravité de l'AVC.

La gravité d'un AVC est déterminée par le score total obtenu à partir de l'évaluation des 15 items cliniques neurologiques de l'échelle NIHSS. Chaque item est noté individuellement, et la somme des scores reflète l'ampleur des déficits neurologiques observés.

6. Suivi clinique à long terme

L'**échelle de Rankin (RS)** a été créée en 1957 par John Rankin, puis modifiée en 1980. Tout comme le NIHSS, elle repose sur un principe similaire d'évaluation des séquelles d'un AVC. Aujourd'hui, le score de Rankin modifié (mRS) est l'outil le plus couramment utilisé en clinique pour évaluer le degré de **handicap** ou de dépendance des patients après un AVC, en se concentrant sur leur capacité à réaliser les activités quotidiennes (**Tableau 3**).

Score	Handicap observé	Conséquences sur la vie quotidienne
0	Aucun symptôme	
1	Symptômes mineurs, aucun handicap significatif	Aucune conséquence sur la vie courante
2	Handicap léger	Quelques limitations sur les activités quotidiennes, mais patient autonome
3	Handicap modéré	Nécessité d'une aide partielle, mais patient capable de marcher sans assistance
4	Handicap modérément sévère	Incapable de marcher ni ne subvenir à ses besoins corporels sans aide
5	Handicap grave	Patient alité, incontinent et nécessitant de soins constants
6	Décès	

Tableau 3 : échelle de Rankin d'évaluation du handicap post-AVC.

Les conséquences d'un AVC sur le long terme ou la récupération du patient sont évaluables grâce aux 6 items donnés (excluant le décès).

7. Imagerie cérébrale

L'imagerie médicale est indispensable pour le diagnostic et la prise en charge des AVC. En complément de l'évaluation clinique, elle permet de confirmer la nature et l'étendue de l'AVC, orientant ainsi les décisions thérapeutiques.

L'évaluation des AVC par imagerie repose sur les quatre « **P** » (« **Parenchyma, Pipes, Perfusion, Penumbra** ») (Rowley, 2001) (**Tableau 4**). Cette approche permet de détecter les hémorragies intracrâniennes, de différencier les tissus infarcis des tissus encore récupérables, d'identifier les thrombi intravasculaires, et ainsi choisir la thérapie la plus appropriée tout en prédisant au mieux l'issue clinique.

Paramètre à évaluer	Information obtenue
Parenchyme	Évaluer les signes précoces de l'AVC aigu, exclure les hémorragies
Vaisseaux	Évaluer la circulation extracrânienne (artères carotides et vertébrales du cou) et la circulation intracrânienne pour détecter la présence de thrombi intravasculaires
Perfusion	Évaluer le volume sanguin cérébral, le flux sanguin cérébral, et le temps de transit moyen
Pénombre	Évaluer les tissus à risque de nécrose et d'apoptose si l'ischémie persiste sans recanalisation du thrombus intravasculaire

Tableau 4 : imagerie de l'AVC aigu.

L'évaluation de chacun des paramètres permet une caractérisation exhaustive de l'AVC. D'après (Srinivasan *et al.*, 2006).

La **tomodensitométrie (scanner)** et l'**Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)** sont les techniques de référence en neuro-imagerie multimodale d'urgence, permettant une évaluation complète des quatre paramètres physiopathologiques de l'AVC (Smith *et Hill*, 2018).

7.1. Tomodensitométrie (TDM) cérébrale

La tomodensitométrie (TDM) par rayons X, également connue sous le nom de scanner ou CT-scan, est une technique d'imagerie médicale qui produit des images détaillées des structures internes du corps.

Les rayons X traversent le corps du patient et sont atténués différemment selon la densité et la composition des tissus. Les rayons X reçus par les détecteurs sont ensuite traités par un ordinateur pour des images en 2D et 3D grâce à des algorithmes de reconstruction, fournissant ainsi une visualisation précise des structures internes.

7.1.1. TDM non rehaussée

La TDM sans agent de contraste est généralement utilisée en urgence pour diagnostiquer rapidement l'AVC. Elle permet de différencier un AVC ischémique (hypodensités) d'un AVC hémorragique (hyperdensités), et d'exclure d'autres causes de symptômes neurologiques aigus, comme une tumeur cérébrale ou une infection (**Figure**

24). Sa limite principale est cependant sa sensibilité réduite dans le cadre aigu de l'AVC ischémique.

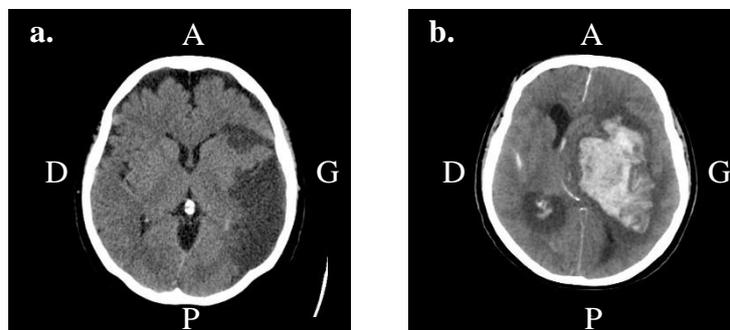


Figure 24: TDM axiale sans rehaussement.

Photo **a.** : infarctus cérébral sur le territoire de l'ACM gauche (contribution **D. Cuete**). Photo **b.** : hémorragie intracérébrale gauche (contribution : **M. Rodrigues**). Source : *Radiopaedia*

7.1.2. TDM angiographique

La TDM angiographique permet de visualiser les vaisseaux sanguins grâce à l'injection d'un agent de contraste iodé (**Figure 25**). Cela permet d'identifier la localisation et la nature de l'occlusion. Cette technique est particulièrement utile pour évaluer les patients présentant un AVC ischémique afin de déterminer leur éligibilité aux différents traitements possibles.

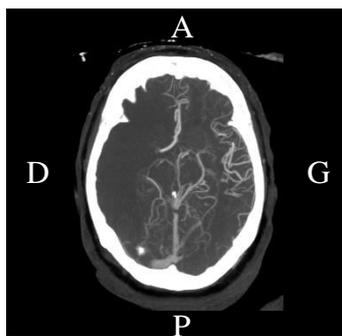


Figure 25: angio-TDM axiale.

L'ACI et l'ACM droite apparaissent complètement occluses (contribution **B. Botz**)
Source : *Radiopaedia*.

7.1.3. TDM de perfusion

Cette modalité permet de mesurer divers paramètres hémodynamiques cérébraux par l'injection d'un agent de contraste iodé (**Figure 26**). L'évaluation de son passage dans

le tissu cérébral et la quantification de l'augmentation du contraste permet de discriminer les différents compartiments caractéristiques de l'ischémie : le foyer ischémique, la pénombre ischémique et l'oligémie. Les données obtenues complètent les informations fournies par la TDM et l'angio-TDM pour optimiser la stratégie thérapeutique.

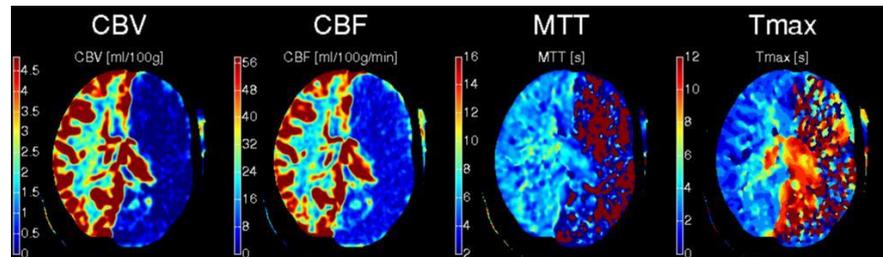


Figure 26 : CT de perfusion axiale.

Suite une occlusion importante de l'ACM gauche, une réduction visible des différents paramètres hémodynamiques peut être observée (contribution *RMH Core Conditions*) Source : *Radiopaedia*.

7.2. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

L'IRM utilise des champs magnétiques puissants et des ondes radiofréquentes pour aligner les protons des molécules d'eau du corps. Lorsque ces protons reviennent à leur état d'équilibre, ils libèrent de l'énergie sous forme de signaux radio (relaxation) (**Figure 27**). Ces signaux varient en fonction de la nature du tissu et peuvent être influencés par le fer, notamment dans l'hémoglobine. Cela permet de détecter des accumulations de sang, comme dans le cas d'un AVC hémorragique. Après détection et analyse des signaux, les images sont reconstruites en 2D ou 3D, offrant ainsi des détails précis sur les structures internes et les tissus mous.

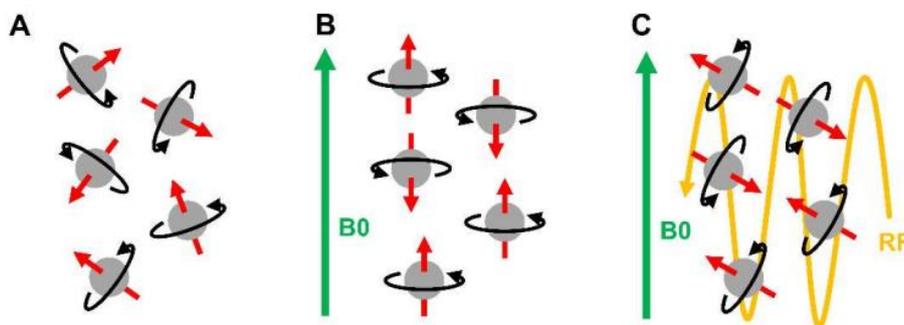


Figure 27 : principe de la résonance magnétique nucléaire utilisée en IRM.

Dans la matière organique, les **spins** (flèches rouges) ne sont normalement pas alignés (A). Mais lorsqu'un champ magnétique intense **B0** est appliqué, les spins vont s'aligner selon les lignes de champ (B). Dans cet état, les spins peuvent être basculés par l'application d'une **radiofréquence (RF)** (C). Si la RF est interrompue, les spins se réalignent sur **B0**. D'après A. Chagnot.

Le protocole clinique standard comporte quatre modalités d'IRM permettant de caractériser l'AVC avec précision.

7.2.1. IRM pondérée en diffusion (DWI)

Cette séquence permet d'identifier les zones d'infarctus aigu grâce à sa sensibilité aux modifications de la diffusion d'eau dans les tissus. Dès les premières minutes suivant une ischémie, la suppression de l'apport énergétique perturbe le fonctionnement des pompes ioniques neuronales. La perte du gradient entraîne une accumulation intracellulaire d'eau, et sa diminution dans le milieu extracellulaire. L'œdème cellulaire, associé au dérèglement osmotique, perturbe la diffusion de l'eau dans l'espace extracellulaire. La séquence DWI, sensible aux mouvements des protons des molécules d'eau, détecte ces perturbations. À partir des images DWI, le calcul du Coefficient Apparent de Diffusion (ADC) permet d'évaluer la nature des lésions ischémiques.

- ⌘ **Œdème cytotoxique** : réduction des valeurs d'ADC, reflétant l'accumulation intracellulaire d'eau due à la défaillance des pompes ioniques (**Figure 28**).
- ⌘ **Œdème vasogénique** : augmentation des valeurs d'ADC, indiquant une fuite de liquide dans l'espace extracellulaire à cause d'une rupture de la BHE.

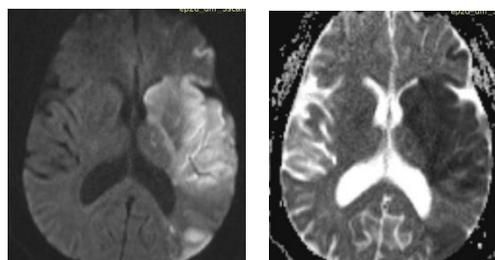


Figure 28 : DWI et carte d'ADC.

Les faibles valeurs d'ADC (à droite) indiquent un AVC ischémique aigu (contribution [A. Bawazeer](#)), source : [Radiopaedia](#).

7.2.2. IRM de perfusion

Tout comme la TDM de perfusion, l'IRM de perfusion permet de quantifier divers paramètres hémodynamiques, généralement par une séquence **DSC** (« *Dynamic Susceptibility Contrast* »), ou la technique **ASL** (« *Arterial Spin Labelling* ») (**Figure 29**). Pour la séquence DSC, un agent de contraste paramagnétique à base de gadolinium est injecté, suivi d'une imagerie rapide lors du premier passage du contraste dans les tissus cérébraux. L'atténuation du signal est proportionnelle à la quantité de contraste dans la microcirculation, permettant ainsi d'évaluer et de cartographier la perfusion tissulaire.

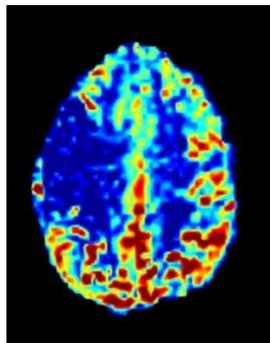


Figure 29 : carte de perfusion cérébrale (ASL).

L'image ASL montre une perte de perfusion dans le territoire de l'ACM droite (Bokkers *et al.*, 2012).

La comparaison entre la zone hypoperfusée en IRM de perfusion et la zone d'œdème observée en DWI (IRM de diffusion) permet d'identifier la **pénombre ischémique** (*mismatch*), c'est-à-dire la zone cérébrale à risque mais potentiellement récupérable, contrairement à la région de l'œdème irréversible visible en DWI.

7.2.3. IRM d'Inversion-Récupération FLAIR

Cette séquence, sensible aux protons des molécules d'eau, est utilisée pour **dater les lésions ischémiques**. Le Liquide Céphalo-Rachidien (LCR) est atténué pour apparaître en **hyposignal**, évitant ainsi qu'il ne masque d'éventuelles lésions adjacentes qui apparaissent en hypersignal dans le cadre d'un AVC ischémique, généralement 6 heures environ après l'occlusion. Les différences entre les signaux visibles en IRM de diffusion (DWI) et en IRM d'inversion-récupération (FLAIR) permettent d'estimer le temps écoulé depuis l'occlusion (**Figure 30**), et d'évaluer l'hétérogénéité du territoire ischémique.

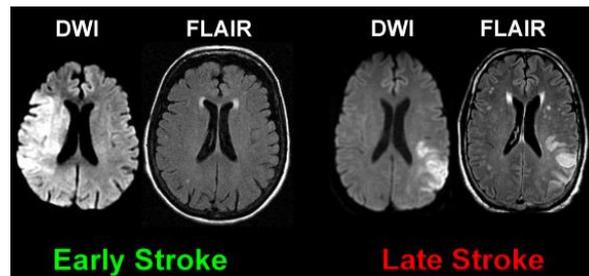


Figure 30 : comparaison du signal DWI et FLAIR après un AVC ischémique aigu ou tardif.

Chez le patient de gauche, un hypersignal massif est visible en DWI, et pas en FLAIR, suggérant un AVC ischémique aigu. Chez le patient de droite, un hypersignal est visible aussi bien en DWI qu'en FLAIR, suggérant un AVC ischémique plus ancien. Source : *Clinical Computational Neuroimaging Group*.

7.2.4. Angiographie par Résonance Magnétique (MRA)

Cette technique permet de visualiser la vascularisation cérébrale et détecter la présence d'une occlusion, d'une sténose ou d'une dissection des vaisseaux (**Figure 31**). Elle peut être réalisée avec ou sans agent de contraste.

- ⌘ **MRA avec contraste** : l'injection d'un agent à base de gadolinium améliore le contraste entre les vaisseaux sanguins et les tissus environnants, offrant une meilleure résolution, utile pour observer les petits vaisseaux et les structures complexes.
- ⌘ **Time-Of-Flight MRA (TOF MRA)** : cette technique repose sur la direction et la vitesse du flux sanguin pour obtenir des images des vaisseaux cérébraux. Elle est plus rapide et accessible, mais ne permet pas de visualiser les artères dont le flux est très réduit, pouvant entraîner de faux diagnostics d'occlusion. Les artefacts causés par les mouvements ou les flux turbulents peuvent également affecter la qualité de l'image.

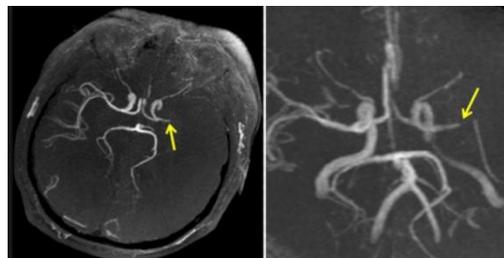


Figure 31 : angiographie par résonance magnétique.

L'angiogramme met en évidence une sténose de l'ACM gauche (Al-Hussain *et al.*, 2021).

En cas d'AVC, la MRA avec contraste est généralement privilégiée pour évaluer la circulation cérébrale. Par ailleurs, l'échelle **TICI** (« *Thrombolysis In Cerebral Infarction* ») est utilisée pour standardiser l'évaluation de la recanalisation des vaisseaux après une intervention de revascularisation (Higashida et Furlan, 2003).

7.3. Imagerie ultrasonore

Une autre modalité d'imagerie pour le diagnostic de l'AVC est l'utilisation de l'imagerie ultrasonore. Cette technique repose sur les principes physiques des ondes sonores et de leur interaction avec les tissus corporels.

L'échographe possède un transducteur qui génère des ondes sonores à haute fréquence, produites par la vibration des éléments piézoélectriques soumis à une contrainte électrique. Lors de leur propagation dans les tissus corporels, une partie de ces ondes rencontre une interface entre deux tissus de densités différentes, et est réfléchiée vers une sonde, tandis que l'autre partie continue de se propager. Les interfaces entre différents types de tissus reflètent les ondes de manière distincte. Le transducteur capte les ondes réfléchies et les reconverti en signaux électriques, permettant, par traitement informatique, une représentation imagée des milieux traversés. Le délai de retour des ondes réfléchies, ainsi que la profondeur et l'intensité des échos, déterminent la localisation et l'apparence des structures sur l'image.

La modalité la plus utilisée en imagerie ultrasons est le **B-mode** (« *Brightness mode* ») pour l'imagerie **anatomique**, et qui est employée en clinique pour la détection d'anormalités, de lésions, kystes ou tumeurs, pour visualiser des fonctions cardiaques ou encore guider des procédures chirurgicales telles que des biopsies.

Une autre modalité existante est le **mode Doppler**, utilisée pour l'imagerie des **flux** sanguins. Grâce à l'effet Doppler, qui repose sur le changement de fréquence des ondes sonores réfléchies en fonction de la direction et de la vitesse de l'interface (comme les globules rouges), il est possible de mesurer le la **vélocité** et la **direction** du flux sanguin (Hingot, 2019) (Figure 32).

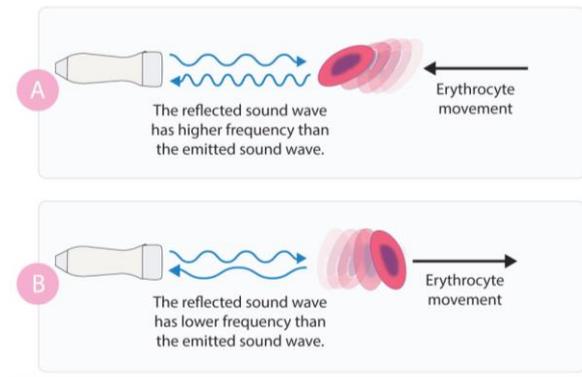


Figure 32 : imagerie Doppler des érythrocytes.

L'effet Doppler se produit lorsque l'interface s'éloigne ou se rapproche du transducteur. Les objets s'en rapprochant compressent les ondes sonores et les réfléchissent à plus haute fréquence, alors que les objets s'en éloignant les réfléchissent à une fréquence plus basse (Source : *Doppler effect and Doppler echocardiography*).

Cette technique est principalement appliquée au polygone de Willis, par des **fenêtres crâniennes** naturelles (**Tableau 5** et **Figure 33**), l'os du crâne étant l'obstacle principal à la propagation des ultrasons.

Fenêtre	Artère
Transtemporale (A)	Artère Cérébrale Moyenne (ACM)
	Artère Cérébrale Antérieure (ACA)
	Artère Carotide Interne terminale (ACIt)
	Artère Cérébrale Postérieure (ACP)
Transorbitale (B)	Artère Ophtalmique (AO)
	Artère Carotide Interne (ACI) Siphon
Sous-occipitale (C)	Artère Vertébrale (AV)
	Artère Basilaire (AB)
Sous mandibulaire (D)	Artère Carotide Interne (ACI)

Tableau 5 : Doppler transcrânien des territoires vasculaires cérébraux.

L'imagerie est possible par les fenêtres naturelles du crâne chez l'adulte. Source : *eRADIMAGING*.

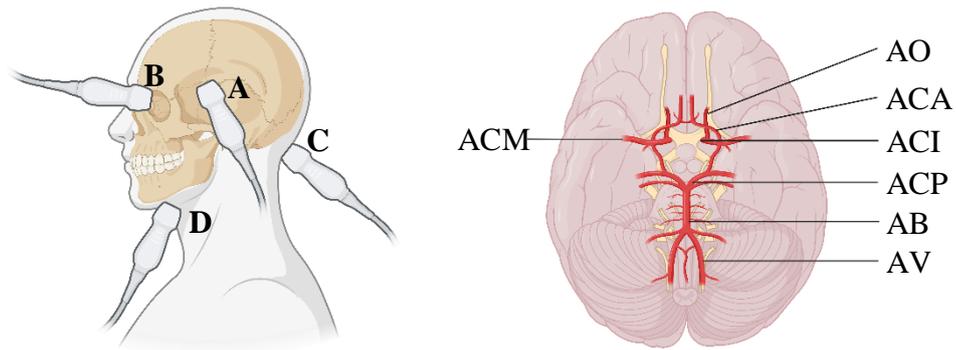


Figure 33 : fenêtres crâniennes et territoires vasculaires.

L'imagerie ultrasonore en Doppler transcrânien permet la caractérisation des territoires artériels principaux du polygone de Willis.

Le signal Doppler peut néanmoins être amélioré grâce aux avancées techniques, comme le développement du **Doppler ultrasensible**, qui augmente la sensibilité de détection du flux sanguin d'un facteur 30 par rapport à l'imagerie Doppler conventionnelle (*Bercoff et al., 2011 ; Mace et al., 2013*). L'utilisation d'agents de contraste, constitués de **microbulles de gaz** injectées par voie intraveineuse, contribue également à l'amélioration du signal ultrasonore réfléchi, le rendant supérieur à celui des tissus environnants (**Figure 34**).

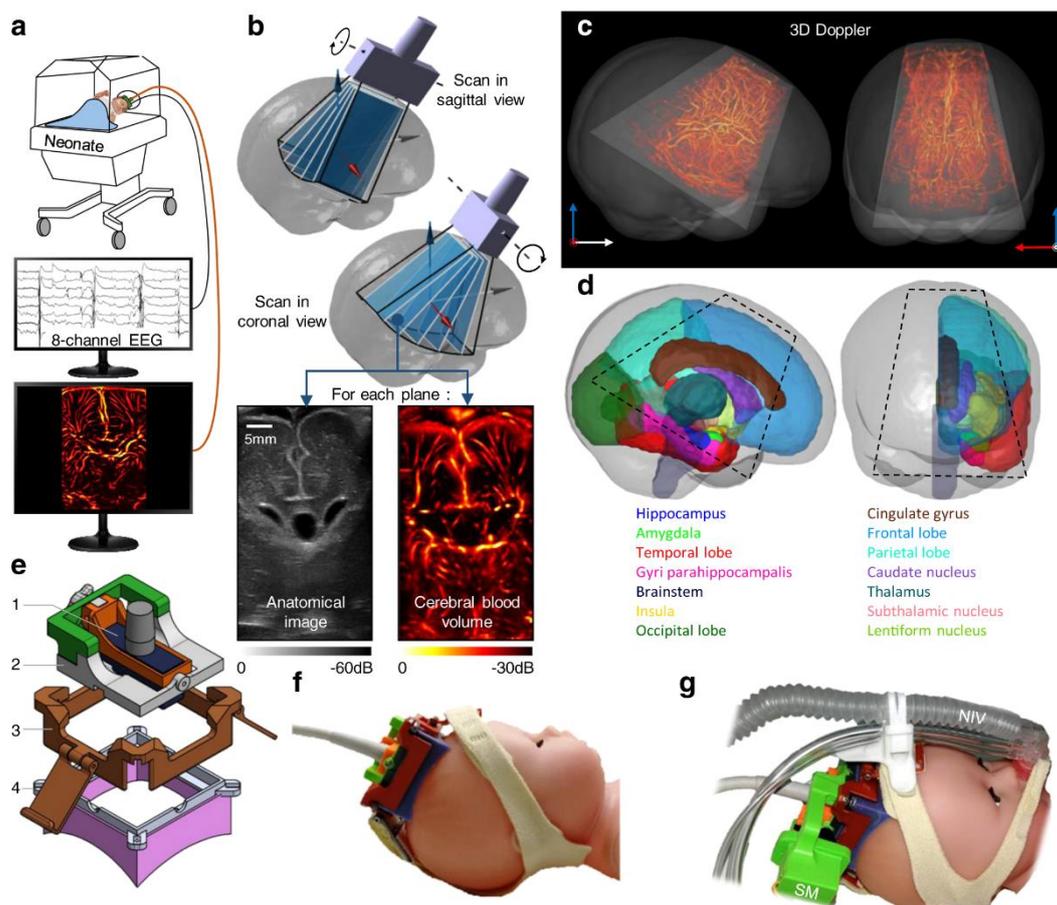


Figure 34 : Doppler transcrânien chez le nouveau-né.

L'imagerie cérébrale du nourrisson est réalisable en passant par la fontanelle, et le suivi peut être réalisé grâce à un casque adapté (a, e, f, g). Pour chaque plan, l'image anatomique en *b-mode* et l'image Doppler sont acquises (b), et une image 3D de la vascularisation cérébrale est reconstituée (c) (Baranger *et al.*, 2021).

Cette intensité de signal permet de **localiser** précisément les microbulles et de suivre leur **vélocité** dans la circulation sanguine, ce qui permet de reconstituer une image détaillée de chaque vaisseau sanguin (Figure 35). Cette technique est appelée **ULM** (« *Ultrasound Localization Microscopy* ») (Couture *et al.*, 2011 ; Siepmann *et al.*, 2011 ; Desailly *et al.*, 2013 ; Christensen-Jeffries *et al.*, 2015 ; Errico *et al.*, 2015), et serait un outil prometteur pour le diagnostic de l'AVC, un essai clinique étant actuellement en cours au CHU de Caen, et fait l'objet d'une collaboration entre le laboratoire et la société *Resolve Stroke*.

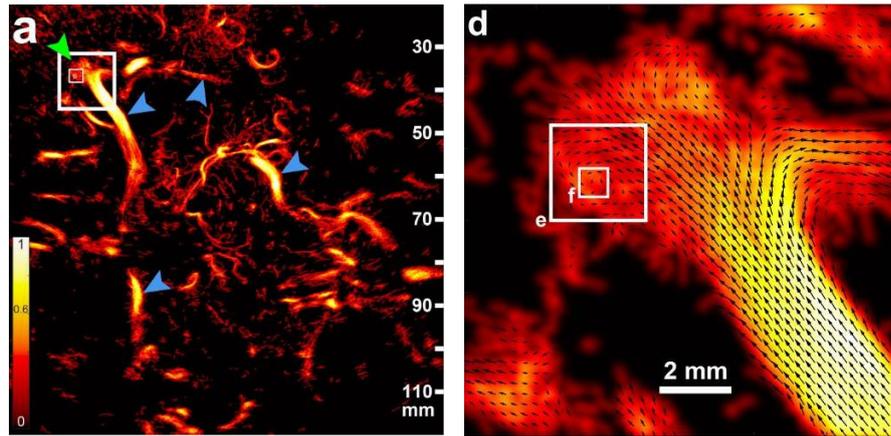


Figure 35 : ULM transcrânienne d'un anévrisme profond chez l'adulte.
L'anévrisme est situé au niveau de l'ACM (▼) (a), et le champ vectoriel du flux local est caractérisé par le suivi des microbulles (d) (Demené *et al.*, 2021).

Bien que l'IRM et la TDM soient des outils essentiels pour le diagnostic de l'AVC ischémique, leur **accessibilité** reste limitée dans certaines régions en raison du manque d'infrastructures, des **coûts** élevés, et de la nécessité d'un personnel qualifié pour leur utilisation. Pour pallier ces contraintes, des stratégies portables telles que les unités neuro-vasculaires mobiles, ont été développées afin de rendre l'imagerie accessible directement sur le terrain. Parmi ces alternatives, l'**imagerie par ultrasons** pourrait être une solution pour permettre l'imagerie d'urgence de l'AVC, grâce à sa portabilité, et à son coût relativement faible.

Pour illustrer ces propos, la France possède un parc d'environ **12 000 échographes** (2010, source : [contrôle qualité en échographie avec élaboration d'un travail pratique](#)), contre un parc de **960 IRM** (2019, source : [Écosystème de la radiologie : un paradoxe à la française](#)) (**Figure 36**).

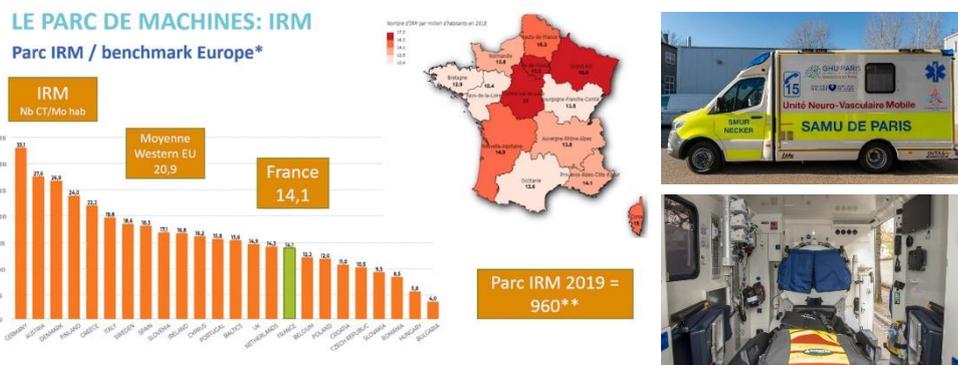


Figure 36 : parc IRM et Unité Neuro-Vasculaire Mobile.

La France possède 960 IRM, ce qui représente 14 imageurs par million d'habitants. Une Unité Neuro-Vasculaire Mobile est à disposition du GHU de Paris et de l'AP-HP afin d'améliorer la prise en charge des patients victimes d'AVC.

PARTIE III : traitements aigus de l'AVC ischémique

Une fois le diagnostic de l'AVC ischémique confirmé, il est essentiel d'entreprendre un traitement de recanalisation le plus rapidement possible. En effet, on estime que **chaque minute** sans traitement entraîne la mort de **1,9 million** de neurones (Saver, 2006). Restaurer la circulation sanguine rapidement permet d'augmenter les chances de reperfusion, de limiter l'étendue des lésions cérébrales, de minimiser les séquelles fonctionnelles et ainsi augmenter les chances de récupération.

8. Thrombolyse intraveineuse

8.1. Définition et histoire

La thrombolyse est la dissolution de la fibrine (fibrinolyse), et par extension du caillot. La thrombolyse médicamenteuse précoce permet d'accélérer la recanalisation de l'artère et donc de limiter les lésions ischémiques, en utilisant directement les composants de la cascade fibrinolytique endogène. Elle est le fruit de décennies de recherche scientifique, avec des racines dans les premières études sur la coagulation et les enzymes fibrinolytiques.

En 1893, le terme fibrinolyse a été décrit pour la première fois par Albert Dastre, un médecin biologiste et physiologiste français, après avoir découvert ce processus impliquant la dissolution spontanée de caillots sanguins chez le chien (Brown-Séguard *et al.*, 1893).

En 1933, William S. Tillett et RL Garner ont observé une activité fibrinolytique dans un bouillon de culture de *streptococcus hemolyticus*. Cette enzyme, connue sous le nom de streptokinase (Tillett et Garner, 1933), a marqué une avancée significative car elle a ouvert la voie à l'utilisation d'enzymes bactériennes pour traiter des pathologies liées aux caillots sanguins.

D'autres recherches, menées au milieu du XX^{ème} siècle, ont conduit au développement d'agents thrombolytiques supplémentaires, dont l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). Le tPA a été décrit pour la première fois en 1947 (Astrup et Permin, 1947), et a été purifié et caractérisé en 1979 (Rijken *et al.*, 1979 ; Rijken et Collen, 1981).

La même année, l'activité fibrinolytique de l'urine humaine due à l'urokinase (uPA) a été décrite par RG McFarlane ([Macfarlane et Pilling, 1947](#)).

Ce n'est qu'après une phase de développement de la production du tPA sous sa forme recombinante (rtPA), que son potentiel thérapeutique, sa sécurité et son efficacité ont été démontrés lors de l'essai clinique NINDS, publié en 1995 ([NINDS, 1995](#)). L'utilisation du rtPA sous sa forme d'Altéplase pour le traitement de l'AVC ischémique aigu a été approuvée en 1996 par la FDA, et en 2002 par l'EMA, et reste aujourd'hui le traitement pharmacologique de référence.

8.2. L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et sa forme recombinante (rtPA)

La fibrinolyse, processus par lequel les caillots sanguins sont dégradés, repose sur la conversion du **plasminogène** en **plasmine**, une enzyme qui décompose la fibrine, le composant essentiel du maillage stabilisant le thrombus.

Cette conversion est catalysée par plusieurs activateurs, dont la streptokinase, l'uPA et le tPA. Parmi eux, le tPA se distingue par sa spécificité pour la fibrine. En présence de fibrine, son principal cofacteur, l'efficacité du tPA à convertir le plasminogène en plasmine est multipliée par 100 ([Hoylaerts et al., 1982](#)). Ce complexe tPA-fibrine permet une action ciblée au niveau du thrombus, tout en préservant le plasminogène circulant. La structure ainsi que les fonctions du tPA sont présentées dans la [Figure 37](#) et le [Tableau 6](#).

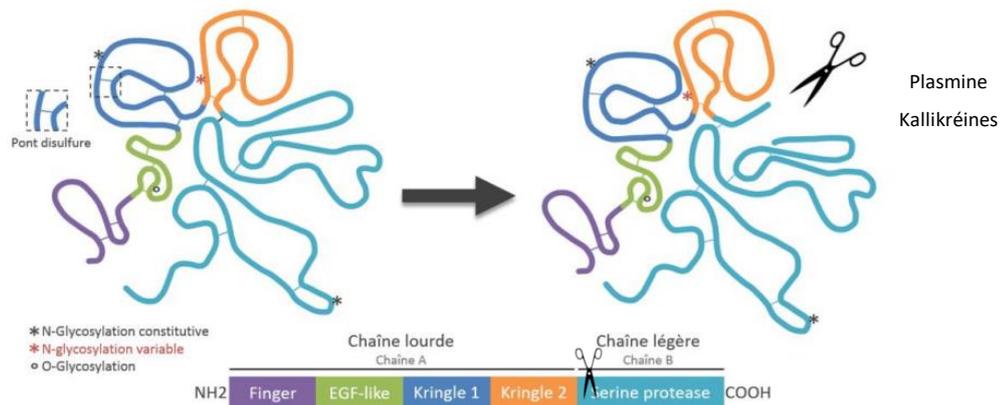


Figure 37 : structure et fonctions du tPA.

Le tPA (simple chaîne à gauche « sc-tPA » et double chaîne à droite « tc-tPA »), possède 5 domaines structuraux répartis sur deux chaînes (A et B), maintenues par 17 ponts disulfures. Chaque domaine lui permet d'interagir avec un partenaire spécifique. Le tPA est sécrété sous forme simple chaîne dite « native », et peut être converti sous forme double chaîne (Rijken et Collen, 1981b) après clivage par la plasmine (Wallen *et al.*, 1982) ou les kallikréines (Ichinose *et al.*, 1984). Ces deux formes ont la particularité d'être actives (Rijken *et al.*, 1982 ; Hoylaerts *et al.*, 1982b), mais avec une activité cinq fois supérieure pour la forme double chaîne en l'absence de fibrine (Rånby *et al.*, 1982).

	Domaine	Fonction
Chaîne lourde A	Finger	<ul style="list-style-type: none"> - Liaison à la fibrine (Bányai <i>et al.</i>, 1983), permettant de former un complexe ternaire avec le plasminogène (Kagitani <i>et al.</i>, 1985) - Interaction avec des récepteurs membranaires (LRP - « <i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein</i> ») et ceux de l'annexine-II (Hajjar <i>et al.</i>, 1994)
	EGF-Like	<ul style="list-style-type: none"> - Activation des récepteurs transmembranaires EGF (« <i>Epidermal Growth Factor</i> ») par le tPA (Hurtado <i>et al.</i>, 2007 ; Correa <i>et al.</i>, 2011) - Participation à la recapture et à la clairance du tPA par le foie (Hajjar et Reynolds, 1994)
	Kringle 1	<ul style="list-style-type: none"> - Permet la recapture et la clairance du tPA par les cellules endothéliales hépatiques par les récepteurs à mannose (Kuiper <i>et al.</i>, 1996) - Aurait un rôle dans l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales (Kim <i>et al.</i>, 2003)
	Kringle 2	<ul style="list-style-type: none"> - Intervention dans les mécanismes aboutissant à l'ouverture de la BHE par l'activation du PDGF CC (« <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> ») (Fredriksson <i>et al.</i>, 2004 ; Fredriksson <i>et al.</i>, 2005) - Favorisation de la neurotoxicité par l'interaction avec la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA (Lopez-Atalaya <i>et al.</i>, 2008a)
Chaîne légère B	Sérine protéase	<ul style="list-style-type: none"> - Domaine catalytique du tPA - Activation du plasminogène en plasmine par la triade catalytique (His³²², Asp³⁷¹, Ser⁴⁷⁸) (Pennica <i>et al.</i>, 1983)

Tableau 6 : fonctions du tPA.

La chaîne lourde A et la chaîne légère B sont composées de domaines définis, permettant des interactions entre le tPA et les facteurs environnants, ainsi que sa recapture et sa clairance par le foie.

Le tPA est principalement sécrété dans le compartiment vasculaire par les cellules endothéliales (Levin et Loskutoff, 1982 ; Anglés-Cano, 1994), mais est également produit, dans une moindre mesure, par les hépatocytes et diverses cellules du parenchyme cérébral (Louessard *et al.*, 2016) (Figure 38).

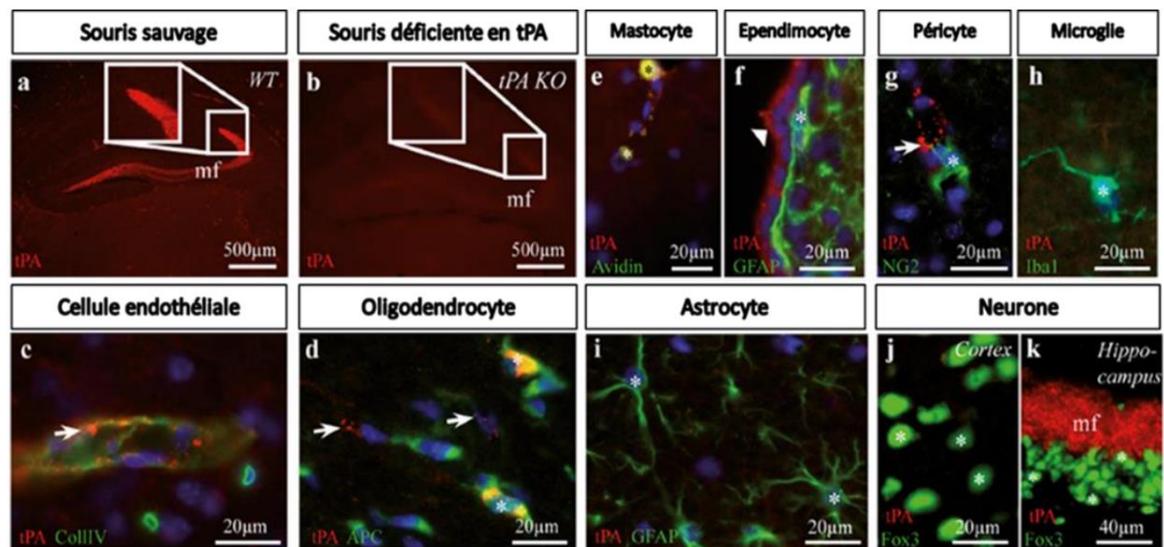


Figure 38 : expression du tPA dans les cellules du Système Nerveux Central chez la souris.

Images acquises après immunohistochimie de coupes de cerveau de souris après injection de colchicine (inhibiteur du transport axonal). Le **tPA** (en rouge), est exprimé par les mastocytes, les épendymocytes, les péricytes, la microglie, les cellules endothéliales, les oligodendrocytes, les astrocytes et les neurones (Louessard *et al.*, 2016).

Grâce à son efficacité fibrinolytique et sa spécificité, le tPA a été sélectionné comme agent thérapeutique pour la thrombolyse. La forme utilisée en clinique, produite par technologie de l'ADN recombinant, est appelée « **rtPA** » (« *recombinant tissue Plasminogen Activator* »), et est produite à partir de cellules ovariennes de hamster chinois (Spellman *et al.*, 1989).

L'essai clinique NINDS a permis de déterminer la posologie du rtPA pour le traitement de l'AVC ischémique aigu, avec une dose de référence de 0,9 mg/kg (NINDS, 1995). Cependant, en raison de sa courte demi-vie d'environ quatre minutes (Tanswell *et al.*, 1989) et de la présence de régulateurs endogènes, les **serpines**, qui inhibent les protéases à sérine, la durée d'action du rtPA est limitée. Quatre serpines sont connues pour inhiber le tPA : **PAI-1**, **PAI-2**, la **neuroserpine (NS)**, et la **protéase nexine-1 (PN-1)** (Sprengers et Kluft, 1987).

PAI-1 est l'inhibiteur principal dans le sang, mais joue également un rôle dans le parenchyme cérébral, en collaboration avec la NS (Miranda et Lomas, 2006). PAI-1 se lie à la majorité du tPA vasculaire, réduisant ainsi son activité (Rijken and Lijnen, 2009) (Figure 39).

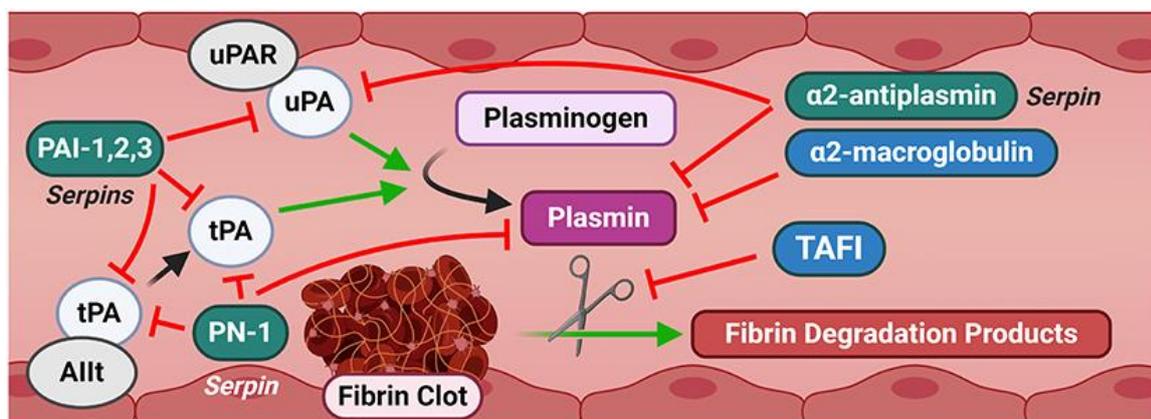


Figure 39 : voies de signalisation de la fibrinolyse.

La plasmine est générée par l'activation du plasminogène par le tPA et l'uPA. Plusieurs serpinines et autres inhibiteurs assurent la régulation de cette cascade. La fibrinolyse est donc effectuée à terme par la plasmine, qui dégrade la fibrine en produits de dégradation.

Pour compenser sa faible demi-vie, l'**Altéplase** (rtPA) doit être administrée par voie intraveineuse, avec un bolus initial de 10 % de la dose sur une minute, suivi d'une infusion continue sur 60 minutes.

8.2.1. Efficacité fibrinolytique du rtPA

Le succès de la thrombolyse au rtPA dépend en grande partie de la **composition des thrombi** (Kim *et al.*, 2006), ainsi que du **temps écoulé depuis l'ischémie**, la composition des caillots évoluant au cours du temps. Tout d'abord, la capacité du tPA à activer le plasminogène repose sur sa capacité à se lier à la fibrine. Cependant, un thrombus riche en plaquettes complique cet accès à la fibrine, le principal cofacteur du tPA. De plus, les plaquettes sécrètent des **serpinines**, telles que PAI-1 (Madoiwa *et al.*, 1999) et PN-1 (Gronke *et al.*, 1989), qui réduisent l'activité locale du tPA et, par extension, celle de la plasmine.

Ainsi, malgré la présence de fibrine, les caillots riches en plaquettes ou présentant une coque plaquettaire sont moins sensibles à la fibrinolyse, et l'efficacité du traitement en est généralement altérée.

8.2.2. Effets physiopathologiques du rtPA

8.2.2.1. Perméabilisation de la Barrière Hémato-Encéphalique

La BHE est une barrière physiologique sélective entourant les vaisseaux du SNC. Elle est composée de cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées, des péricytes, des pieds astrocytaires, et une lame basale principalement constituée de collagène IV, de laminine, et de fibronectine (**Figure 40**). La BHE limite le passage des molécules du sang vers le tissu cérébral, à l'exception de celles nécessaires au bon fonctionnement du SNC. Elle joue également un rôle dans l'élimination des déchets métaboliques et des toxines du cerveau (*Abbott et al., 2006*).

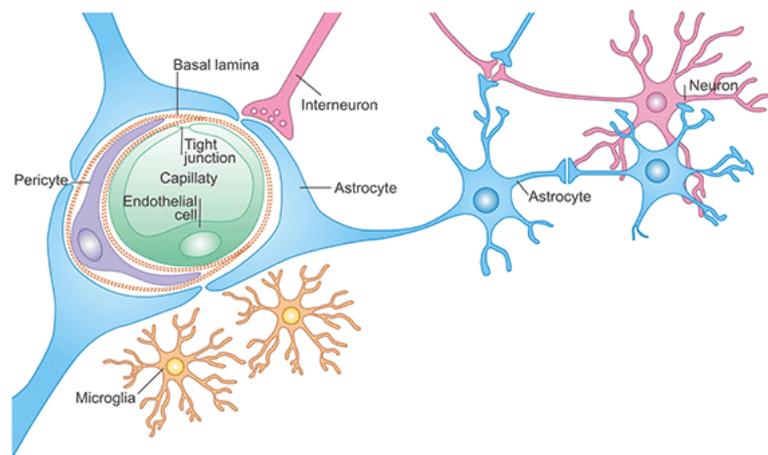


Figure 40 : la Barrière Hémato-Encéphalique.

La BHE est formée par les cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées, une lame basale, les pieds astrocytaires et les péricytes, source : *CusaBIO.com*.

Dans le contexte d'un AVC ischémique, l'administration de rtPA peut compromettre l'intégrité de la BHE par trois mécanismes principaux :

- ⌘ **Interaction avec les récepteurs LRP** (« *Low-density lipoprotein Receptor-related* ») : le tPA interagit avec les récepteurs LRP situés à la surface des cellules endothéliales, entraînant une rétraction des pieds astrocytaires et provoquant l'ouverture de la BHE (*D'Souza et al., 2021*). L'expression accrue de ces récepteurs après une ischémie permet au tPA vasculaire et au sang de fuir vers le parenchyme cérébral (*Yepes et al., 2003*), augmentant ainsi le risque de **transformations hémorragiques**.

- ⌘ **Activation des MMP (Métalloprotéinases Matricielles)** : l'administration de rtPA entraîne l'activation des MMP-2, MMP-3 et MMP-9 (Lijnen, 2001). Ces enzymes dégradent la matrice extracellulaire, affaiblissent les jonctions serrées des cellules endothéliales et altèrent les lames basales de la BHE, favorisant ainsi son ouverture. Des études ont d'ailleurs montré que l'administration intraveineuse de rtPA accompagne l'extravasation de sang dans le parenchyme cérébral d'une surexpression et suractivation des MMP (Wang *et al.*, 2003 ; Suzuki *et al.*, 2016). De plus, les modèles animaux déficients en MMP-9 et MMP-3 présentent une résistance à l'ouverture de la BHE après thrombolyse (Asahi *et al.*, 2000 ; Cheng *et al.*, 2006 ; Suzuki *et al.*, 2007).
- ⌘ **Activation du PDGF (« Platelet-Derived Growth Factor »)** : le tPA peut activer le facteur de croissance PDGF *via* son domaine catalytique et Kringle 2, ce qui stimule les récepteurs PDGF (PDGFR) présents à la surface des péricytes et des astrocytes de la BHE. Cette activation altère la perméabilité de la BHE et accroît le risque d'hémorragie (Fredriksson *et al.*, 2004b ; Su *et al.*, 2008). Des études chez la souris ont montré que la co-injection de rtPA avec un inhibiteur des PDGFR réduit les effets pro-hémorragiques du rtPA (Fang *et al.*, 2007 ; Lewandowski *et al.*, 2016).

De plus, il a été démontré qu'une injection de rtPA dans le liquide céphalo-rachidien en conditions physiologiques suffisait à augmenter la perméabilité vasculaire cérébrale, confirmant ainsi que le tPA est un régulateur naturel du tonus et de la perméabilité vasculaire (Benchenane *et al.*, 2005 ; Fredriksson *et al.*, 2016 ; Mehra *et al.*, 2020).

8.2.2.2. Rôles du tPA dans le Système Nerveux Central

Le tPA joue un rôle clé dans le **développement cérébral** (Gupta *et al.*, 2002 ; Nadarajah *et al.*, 2003 ; van den Aemele *et al.*, 2014), un processus qui nécessite souvent la dégradation de la matrice extracellulaire (Lu *et al.*, 2011). Il intervient également dans la **plasticité synaptique** (Calabresi *et al.*, 2000), en modulant les fonctions d'apprentissage et de mémoire (Pawlak *et al.*, 2002 ; Lochner *et al.*, 2006), et, par extension, dans divers **processus cognitifs**. Le tPA influence ainsi l'anxiété (Matys *et al.*, 2004), la réponse au stress (Pawlak *et al.*, 2003) et les mécanismes liés à la peur.

Dans un contexte post-ischémique, notamment lors de **lésions de la substance blanche**, le tPA est impliqué dans la **remyélinisation** et la **régénération axonale**

(Akassoglou *et al.*, 2000), en réduisant les dépôts de fibrine susceptibles de provoquer des dommages axonaux (Gverić *et al.*, 2003, 2005). Le tPA favorise également la migration et la survie des oligodendrocytes en cas de lésion de la substance blanche (Correa *et al.*, 2011 ; Leonetti *et al.*, 2017).

Par ailleurs, le tPA agit comme un **modulateur de la neurotransmission glutamatergique**. En conditions physiologiques, lors d'une activité neuronale glutamatergique, la libération du glutamate dans la fente synaptique est synchronisée avec l'exocytose du tPA depuis les neurones présynaptiques (Gualandris *et al.*, 1996). Une fois libéré, le tPA module la signalisation du récepteur NMDA en se fixant *via* son domaine Kringle 2 à la sous-unité GluN1 du récepteur (Lopez-Atalaya *et al.*, 2008b), entraînant le clivage du fragment N-terminal de ce récepteur. Seule la forme simple-chaîne du tPA est responsable de ce clivage (Parcq *et al.*, 2012), qui, en présence de glutamate, potentialise l'influx calcique et renforce la transmission nerveuse (Nicole *et al.*, 2001). Certaines études montrent également que la libération de tPA dans la fente synaptique favorise le cycle vésiculaire synaptique, en facilitant l'exocytose du glutamate (Wu *et al.*, 2015), ainsi que sa recapture et son intégration dans les vésicules synaptiques (Yepes *et al.*, 2016).

8.2.2.3. tPA et potentialisation de l'excitotoxicité

Lors de la transmission synaptique, un excès de glutamate extracellulaire peut entraîner la mort neuronale excitotoxique, par la suractivation des récepteurs NMDA, provoquant une entrée massive d'ions dans l'espace intracellulaire, notamment le calcium.

En condition d'ischémie, l'excès de tPA accentue ces effets pro-excitotoxiques du glutamate en modulant la neurotransmission glutamatergique, aggravant ainsi les lésions neuronales (Nicole *et al.*, 2001).

Les premières preuves du rôle neurotoxique du tPA ont été obtenues en 1995. Une étude a montré que des souris déficientes en tPA sont protégées contre la neurotoxicité glutamatergique après suractivation des récepteurs NMDA du cerveau, suite à une injection intra-hippocampique d'un agoniste glutamatergique, le kaïnate (Tsirka *et al.*, 1995).

Des observations similaires ont été faites en 1998 dans un modèle d'ischémie induite par occlusion intraluminale de l'ACM, où les souris déficientes en tPA présentaient un volume de lésion inférieur à celui des souris sauvages. De plus, l'injection de tPA dans la circulation augmentait la taille des lésions (Wang *et al.*, 1998).

Dans le cas de l'ischémie cérébrale induite par un thrombus, bien que le tPA soit bénéfique en permettant la recanalisation par la lyse du thrombus, ses effets délétères, notamment la potentialisation de la mort neuronale excitotoxique, restent observables. Une étude a montré que chez des souris déficientes en tPA, la taille de l'infarctus diminuait. À l'inverse, chez des souris dont l'activité du tPA était augmentée par inhibition de son principal régulateur sanguin, PAI-1, la taille de l'infarctus s'avérait supérieure (Nagai *et al.*, 1999).

Ces données précliniques mettent en lumière l'**ambivalence du tPA**, qui présente d'un côté des **effets vasculaires bénéfiques** liés à la recanalisation et à la restauration du flux sanguin cérébral, et de l'autre, des **effets intraparenchymateux délétères** exacerbant la mort neuronale excitotoxique.

Plusieurs hypothèses mécanistiques ont été avancées pour expliquer l'effet pro-excitotoxique du tPA :

- ⌘ Sa capacité à activer le plasminogène en plasmine (Tsirka *et al.*, 1997).
- ⌘ Son rôle dans l'activation de la microglie (Rogove *et al.*, 1998).
- ⌘ Sa capacité à cliver la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA et à potentialiser l'entrée de calcium dans les neurones (Nicole *et al.*, 2001 ; Parcq *et al.*, 2012).
- ⌘ Sa liaison aux récepteurs LRP, agissant comme co-récepteurs pour renforcer l'activité des récepteurs NMDA (Samson *et al.*, 2008).

8.2.2.4. tPA et inflammation

Le tPA est impliqué dans les processus d'excitotoxicité, d'apoptose et d'inflammation (Mehra *et al.*, 2016). Il peut moduler la réponse inflammatoire en jouant un rôle d'**activateur de la microglie**. Par ailleurs, une diminution de la mort neuronale et de l'activation microgliale a été observée chez des souris déficientes en tPA (Rogove *et al.*, 1999) (**Figure 41**).

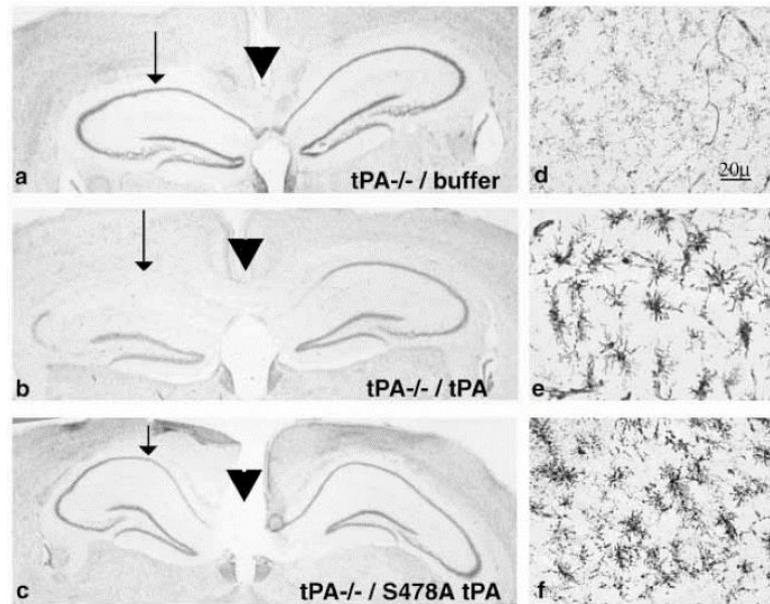


Figure 41 : potentialisation de la mort neuronale et de l'activation microgliale par le tPA.

L'injection intra-hippocampique de kainate n'a pas d'effet sur la mort neuronale chez les souris déficientes en tPA (a), et n'induit pas d'activation microgliale (d). Cependant, lors d'un ajout de rtPA dans les mêmes conditions, une mort neuronale (b) et une activation microgliale (e) sont observées. Si le rtPA administré est remplacé par du tPA inactif (S478A tPA), la mort neuronale n'est plus observée (c), mais l'activation microgliale subsiste (f) (Rogove *et al.*, 1999).

Le tPA favorise l'**infiltration des monocytes dans le parenchyme**. Il a été démontré *in vitro* que les monocytes induisent la libération de tPA par les cellules endothéliales, et que ce tPA contribue à la **diapédèse** (migration des leucocytes du compartiment vasculaire vers les tissus) des monocytes en dégradant les protéines jonctionnelles (Reijerkerk *et al.*, 2008). Par ailleurs, des études ont montré une réduction de l'infiltration de cellules immunitaires à travers la BHE après blocage de l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA (Reijerkerk *et al.*, 2010).

8.2.3. Limites de la thrombolyse et faible inclusion des patients

La principale limite de la thrombolyse par injection intraveineuse réside dans son faible taux de recanalisation, en raison des risques d'effets secondaires. Il est estimé que le taux de recanalisation après une thrombolyse intraveineuse dépasse rarement les 35 % (Bhatia *et al.*, 2010). De plus, des cas de réocclusion peuvent survenir après une thrombolyse partiellement réussie (Alexandrov et Grotta, 2002), en particulier chez les patients présentant une forte agrégabilité plaquettaire (Nordt *et al.*, 1998).

Un autre phénomène à considérer est la recanalisation sans reperfusion, appelée « **no reflow** ». Dans ce cas, malgré une recanalisation artérielle, le DSC n'augmente pas ou

peu, dans la zone ischémisée. Ce phénomène est notamment causé par la fragmentation du caillot principal, dont les débris embolisent les petites artères distales (Mujanovic *et al.*, 2024).

La localisation du thrombus est également un facteur prédictif de l'efficacité de la thrombolyse. Plus un thrombus est **proximal**, moins la thrombolyse est **efficace** (Saqqur *et al.*, 2007). Les patients avec une occlusion distale ont une probabilité de recanalisation deux fois plus élevée (Paciaroni *et al.*, 2012). Cela s'explique par le fait que les thrombi des segments proximaux ont un volume plus important. La sensibilité des thrombi à la thrombolyse étant directement liée à leur taille, les thrombi de moins de 3 mm ont 85 % de chances d'être lysés, contre 50 % pour ceux entre 3 mm et 5 mm, et moins de 3 % pour ceux dépassant 8 mm (Riedel *et al.*, 2011).

D'autres facteurs influencent également la réussite de la thrombolyse et le risque d'effets secondaires, comme le **tabagisme** (qui, bien qu'il triple le risque d'AVC ischémique (Shah et Cole, 2010), semble paradoxalement améliorer la réponse à la thrombolyse (Grines *et al.*, 1995)). L'**hyperglycémie** de stress, qui survient durant la phase aiguë de l'AVC ischémique, peut avoir un effet anti-fibrinolytique en réduisant la sécrétion de tPA endogène et en augmentant la concentration plasmatique de PAI-1 (Ribo *et al.*, 2005). La **pression artérielle** (Tanne *et al.*, 2002), l'**âge** des patients (Engelter *et al.*, 2006), les **dyslipidémies** (Kang *et al.*, 2022), la prise chronique de certains **médicaments**, ainsi que la **sévérité** de l'AVC initial influencent également le succès de la thrombolyse.

Il est ainsi recommandé d'effectuer une thrombolyse chez les patients victimes d'un AVC ischémique aigu entre **4,5 heures** et **9 heures** après l'occlusion (Ma *et al.*, 2019).

9. Stratégies alternatives de recanalisation

9.1. Thrombectomie mécanique endovasculaire

La thrombectomie endovasculaire (EVT – « *Endovascular Thrombectomy* ») consiste à retirer mécaniquement le thrombus en insérant un dispositif par voie endovasculaire. De nombreux types de stents ont été développés pour aspirer ou désagréger le caillot (Figure 42), avec des taux de recanalisation dépassant les 90 % (Gralla *et al.*, 2012). Ces techniques permettent un rétablissement immédiat du flux sanguin, tout en réduisant les risques hémorragiques associés à l'administration d'anticoagulants comme le rtPA.

La thrombectomie est généralement indiquée chez les patients pour lesquels la thrombolyse intraveineuse est inefficace, notamment en cas d'occlusion proximale massive, et elle peut être réalisée **jusqu'à 24 heures** après l'occlusion (Nogueira *et al.*, 2018).

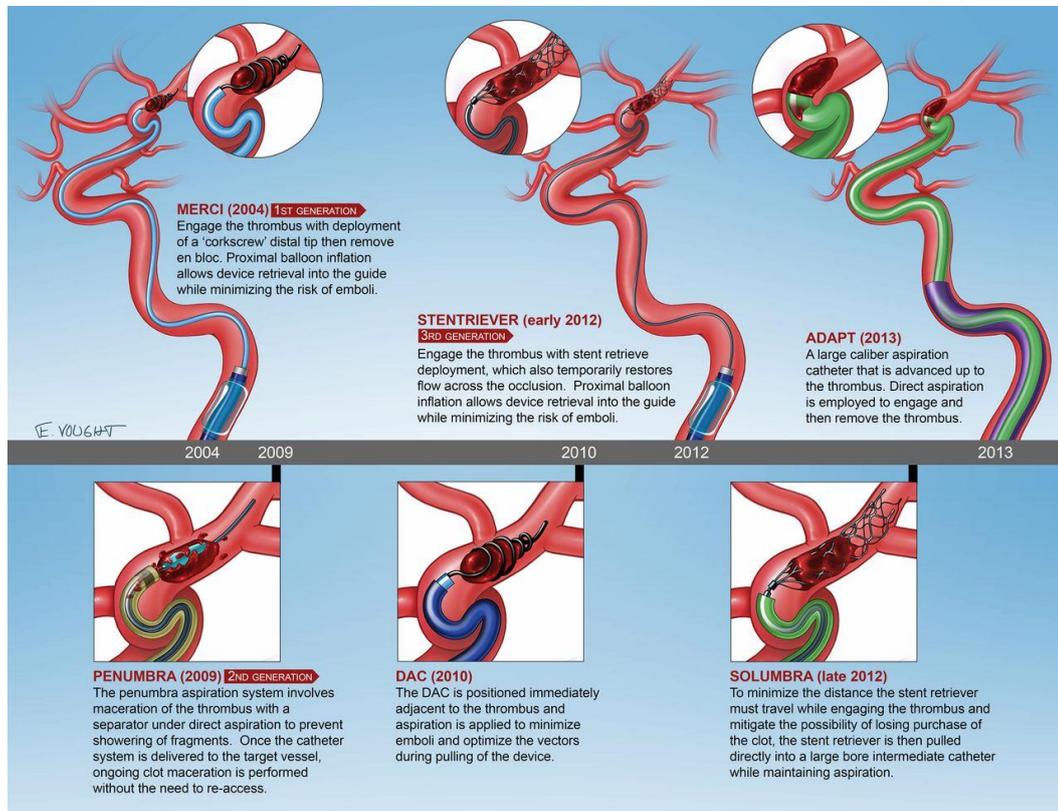


Figure 42 : dispositifs de thrombectomie.

Différentes techniques de recanalisation peuvent être appliquées, notamment par aspiration du caillot ou par son retrait mécanique (Spiotta *et al.*, 2015).

9.2. Association thrombolyse intraveineuse et thrombectomie mécanique

Il a été démontré qu'il est possible de combiner les avantages des approches pharmacologique et mécanique, comme l'a révélé l'essai clinique *MR CLEAN*. La thrombolyse intraveineuse permet de dissoudre rapidement et partiellement le caillot, favorisant ainsi une meilleure perfusion en attendant la thrombectomie (Mazighi *et al.*, 2009 ; Berkhemer *et al.*, 2015). Cette approche offre une recanalisation plus efficace qu'avec l'administration de rtPA seul (Mulder *et al.*, 2018a), améliorant ainsi le pronostic des patients à 90 jours (Goyal *et al.*, 2016). Cependant, cette technique reste souvent inefficace pour les thrombi massifs ou les occlusions proximales.

9.3. Mutants du tPA

La compréhension des fonctions des 5 domaines du tPA, combinée aux avancées en ingénierie des protéines, a conduit au développement de **versions modifiées du rtPA** (**Figure 43**), visant à améliorer son efficacité dans le traitement de l'AVC ischémique. Parmi les principaux mutants étudiés, le Tenecteplase, le Desmoteplase et le Reteplase ont fait l'objet d'essais cliniques, toujours en cours à ce jour.

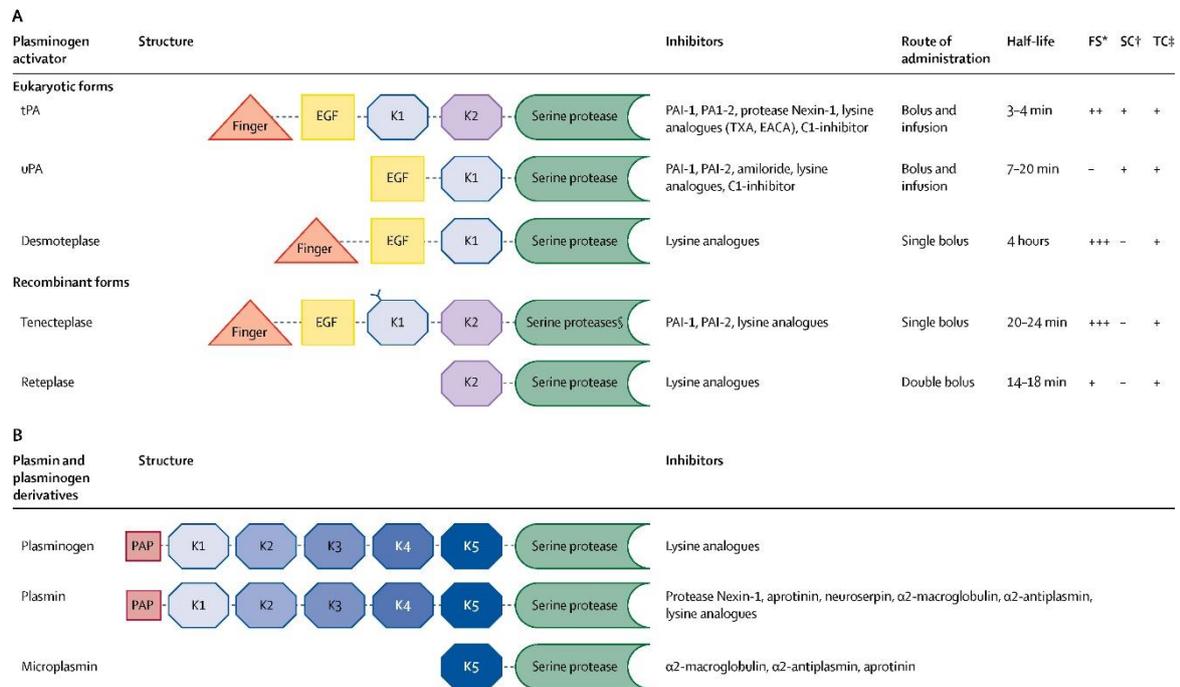


Figure 43 : activateur du plasminogène et dérivés du plasminogène et de la plasmine.

(A) : les activateurs du plasminogène sont classés en forme **eucaryotes** et **recombinantes**. Ils possèdent différents domaines structurels, inhibiteurs, et spécificités envers la fibrine (**FS***). Par conséquent, leur méthode d'administration et leur demi-vie varient. Les activateurs du plasminogène peuvent exister sous forme simple chaîne (**SC†**), double chaîne (**TC‡**), ou les deux. (B) : dérivés de la plasmine ou du plasminogène avant et après clivage par les activateurs du plasminogène. Les activateurs du plasminogène transforment le plasminogène en plasmine active, qui dégrade ensuite la fibrine ([Thiebaut et al., 2018](#)).

Bien que de nombreuses autres stratégies soient également à l'étude tels que les inhibiteurs de la thrombine ou des récepteurs plaquettaires au fibrinogène, la thrombolyse pharmacologique intra-artérielle ou encore la sonothrombolyse ([Alexandrov et al., 2004](#)), le **rtPA** demeure le seul traitement approuvé par la FDA (« *Food and Drug Administration* »), utilisé seul ou en association avec la **thrombectomie** intravasculaire.

10. Récupération post-AVC

L'AVC ischémique peut entraîner des **déficits fonctionnels** à long terme, tels que des troubles moteurs, sensoriels ou cognitifs, conduisant souvent à un **handicap durable**. Les patients sont également à risque de rechute, avec une probabilité de récurrence d'AVC dans les années suivant le premier épisode. Par ailleurs, les séquelles psychologiques, comme la dépression post-AVC, sont fréquentes et peuvent aggraver la récupération fonctionnelle.

Le traitement à long terme inclut une rééducation intensive, souvent basée sur la kinésithérapie, l'ergothérapie et la neuropsychologie, visant à restaurer ou compenser les fonctions altérées.

Des médicaments tels que les anticoagulants, les antihypertenseurs et les antidépresseurs, sont également utilisés pour prévenir les rechutes et traiter les complications, contribuant à améliorer la qualité de vie des patients ([Johnston *et al.*, 1998](#) ; [Chohan *et al.*, 2019](#)).

PARTIE IV : recherche préclinique sur l'AVC

11. Pourquoi utiliser des modèles animaux ?

Réaliser des essais cliniques chez l'humain présente des défis éthiques et réglementaires. Les réglementations strictes et les impératifs éthiques qui encadrent la recherche médicale interdisent toute expérimentation sur l'humain sans une base scientifique solide, ce qui limite la possibilité d'étudier certains phénomènes en détails. Le recours à des modèles animaux en laboratoire constitue donc une solution, permettant de travailler dans des **conditions standardisées**, où la majorité des paramètres peuvent être maîtrisés.

Les animaux, en raison de leur **lien phylogénétique** avec les humains, partagent avec nous de nombreux mécanismes biologiques et physiopathologiques. Historiquement, l'expérimentation animale a joué un rôle central dans les avancées scientifiques, depuis l'Antiquité avec des anatomistes comme Galien, jusqu'à devenir un pilier de la recherche biomédicale moderne.

Aujourd'hui, notre rapport à l'animal a évolué, avec une sensibilité accrue à leur bien-être, et des lois strictes qui encadrent leur utilisation en laboratoire. Néanmoins, l'expérimentation animale reste un outil essentiel voire obligatoire pour explorer la physiopathologie, développer des traitements, et *in fine*, protéger les patients des risques associés à des thérapies non éprouvées.

En Europe, la réglementation qui oblige l'utilisation des essais précliniques avant tout essai clinique est principalement encadrée par le **Règlement (UE) n° 536/2014** relatif aux essais cliniques de médicament à usage humain. En complément, la **Directive 2001/83/CE** exige des données précliniques, y compris des études sur des animaux, pour l'autorisation de mise sur le marché de médicaments. Ces textes assurent que les médicaments passent par une évaluation rigoureuse avant d'être testés sur des humains.

La réglementation qui encadre l'utilisation des animaux à des fins scientifiques en Europe fait l'objet d'une directive (**Directive 2010/63/UE**), qui établit des normes strictes pour l'hébergement, les soins, et l'utilisation des animaux lors d'expérimentations. Son objectif principal est de garantir un certain niveau de bien-être animal tout en permettant le progrès scientifique, et encourage l'adoption du principe des « **3R** » : « **Remplacer** (...

autant que possible les modèles animaux par des méthodes alternatives), **Réduire** (... le nombre d'animaux utilisés), et **Raffiner** (... leur utilisation) ».

Pour assurer la sécurité des patients et l'efficacité des traitements, les essais cliniques ne peuvent donc être initiés sans une solide base scientifique, obtenue notamment par des études précliniques rigoureuses. C'est ici que le concept « **bench to bedside** » (« de la paillasse au lit du patient ») prend toute son importance.

Ce terme est couramment utilisé dans le domaine de la recherche biomédicale pour décrire le processus de traduction des découvertes scientifiques fondamentales, réalisées en laboratoire (« *bench* »), en applications cliniques pratiques pour les patients (« *bedside* »). Ce concept incarne l'idée que les recherches menées en laboratoire doivent aboutir à la création de nouvelles thérapies, diagnostics, ou interventions cliniques bénéfiques pour les patients.

L'aspect « *bench* » englobe plusieurs approches : **modélisations informatiques** (*in silico*), **cultures cellulaires** animales ou humaines (*in vitro*), **organes** ou tissus maintenus en vie hors de l'organisme (*ex vivo*), et, bien souvent, des **modèles animaux** (*in vivo*). Selon l'*American National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging*, un modèle animal est défini comme « un modèle permettant l'étude de données de référence sur la biologie ou le comportement, ou chez lequel on peut étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales ».

Pour garantir que les résultats précliniques puissent être transposés en clinique, il est essentiel que les modèles utilisés reproduisent autant que possible la maladie observée chez l'humain (**Figure 44**). C'est pourquoi le concept de « *bench to bedside* » peut être nuancé par l'idée de « **bedside to bench, and back again** » (« du lit du patient à la paillasse, et vice et versa »).



Figure 44 : questionnement sur l'utilisation de modèles animaux. Réalisé avec *Dall-e, OpenAi*.

12. Étude sur l'AVC chez le petit animal

Dans le cadre de l'AVC ischémique, l'utilisation de modèles animaux est indispensable à ce jour pour obtenir une vision intégrée de cette pathologie, incluant la complexité des phénomènes vasculaires et métaboliques impliqués. L'espèce animale présentant le plus de similitudes avec l'humain est bien entendu le primate non-humain. Cependant, son utilisation à des fins scientifiques est soumise à une réglementation stricte en raison de sa sensibilité, de son coût élevé, et d'une maintenance complexe. En ce sens, l'utilisation des rongeurs (rats et souris) représente le meilleur compromis pour l'étude de l'AVC ischémique. La souris partage environ 90 % de son génome avec l'humain (Mayor, 2002) et permet la réalisation de manipulations génétiques pour générer des souches transgéniques. De plus, ses coups d'achat et d'entretien sont relativement faibles.

En France, en 2022, près de 2 millions d'animaux ont été utilisés à des fins scientifiques, dont 66,4 % étaient des souris (Figure 45), et 0,2 % étaient des primates non-humains.

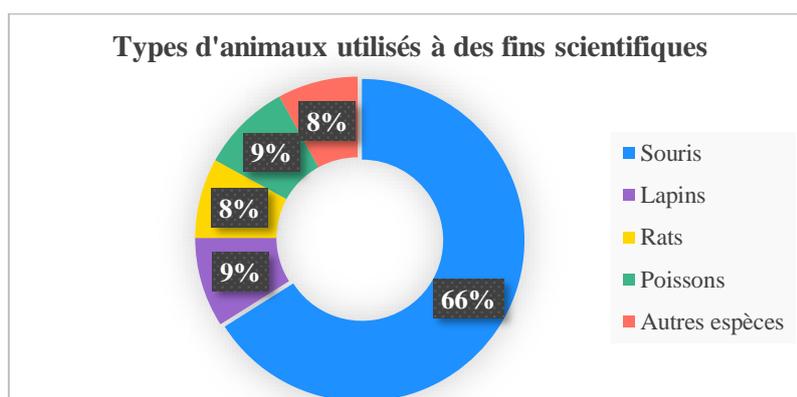


Figure 45 : animaux utilisés à des fins scientifiques en France en 2022.

La souris est l'espèce majoritaire utilisée pour la recherche scientifique (Source : [Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche](#)).

L'induction de la pathologie à étudier chez l'animal doit précéder la phase de recherche fondamentale ou appliquée, en fonction l'hypothèse scientifique émise. En raison du caractère **brutal** et **multifactoriel** de l'AVC ischémique, il est difficile d'en provoquer l'apparition de manière spontanée chez l'animal. L'objectif est donc de reproduire au mieux la physiopathologie de l'AVC, en maximisant les similitudes avec la condition clinique humaine tout en maintenant des paramètres contrôlés et reproductibles.

12.1. Modèles d'induction de l'ischémie cérébrale chez le rongeur

L'occlusion de l'ACM est généralement choisie, car elle correspond au territoire le plus fréquemment affecté chez les patients victimes d'AVC. Plusieurs modèles d'occlusion existent, tous présentant des spécificités à prendre en compte selon la question scientifique posée.

12.1.1. Électrocoagulation de l'ACM

- ⌘ **Principe** : l'ACM est exposée par une craniotomie à travers l'os temporal, avant d'être occluse par électrocoagulation. Ce modèle induit une réduction significative du DSC, et permet d'obtenir des lésions sous-corticales selon le site d'occlusion (en-dessous ou au-dessus de la veine cérébrale inférieure) (Tamura *et al.*, 1981).
- ⌘ **Limites** : ce modèle provoque la perte de pression intracrânienne due à la nécessité d'une craniotomie pour accéder à l'ACM en plus du retrait des méninges, et ne permet pas le rétablissement du flux sanguin cérébral dans cette artère. De plus, il est insensible à la thrombolyse par le rtPA, ce qui limite son utilité pour étudier des traitements fibrinolytiques.

12.1.2. Occlusion mécanique de l'ACM

- ⌘ **Principe** : ce modèle implique la même approche que le précédent. L'ACM est ensuite occluse par un clip ou une suture, permettant une occlusion permanente ou réversible.
- ⌘ **Avantage** : ce modèle offre la flexibilité de contrôler le temps d'occlusion et de réaliser une reperfusion contrôlée.
- ⌘ **Limites** : cette technique nécessite des interventions supplémentaires pour obtenir des résultats reproductibles, tels que la ligature de l'artère carotide commune, l'induction d'une hypotension, ou la réalisation de multiples occlusions. Ce modèle ne génère pas un thrombus, et ne permet donc pas l'étude de traitements fibrinolytiques. Il engendre également la perte de la pression intracrânienne et le retrait des méninges pour accéder à l'ACM.

12.1.3. Infarctus par administration d'endothéline-1

- ⌘ **Principe** : l'endothéline-1, un puissant vasoconstricteur, est administré soit de manière topique au niveau de l'ACM, soit par injection stéréotaxique dans le cerveau pour provoquer une ischémie (Fuxe *et al.*, 1997).

- ⌘ **Avantage** : ce modèle permet de mimer la vasoconstriction ayant lieu lors de l'hémostase primaire.
- ⌘ **Limites** : ce modèle nécessite la réalisation d'une craniotomie, le retrait des méninges, et ne génère pas un thrombus permettant l'étude de la fibrinolyse. La reperfusion par le retour à la normale du diamètre des vaisseaux est spontanée, mais sans être contrôlable par l'expérimentateur.

12.1.4. Injection de thrombine dans l'ACM

- ⌘ **Principe** : ce modèle permet l'induction d'une ischémie par l'injection de thrombine directement dans l'ACM (Orset *et al.*, 2007).
- ⌘ **Avantages** : ce modèle présente une bonne reproductibilité avec peu de variabilité dans la taille des lésions générées, et n'induit généralement pas de mortalité. Le thrombus y est généré grâce à un élément de la cascade de coagulation, ce qui se rapproche des conditions cliniques. L'avantage majeur est sa sensibilité à la thrombolyse par l'administration de rtPA due à la composition du caillot, riche en fibrine.
- ⌘ **Limites** : ce modèle nécessite une craniotomie ainsi que le retrait des méninges pour accéder à l'ACM, induisant une perte de la pression intracrânienne.

12.1.5. Occlusion endoluminale par filament

- ⌘ **Principe** : un filament est inséré dans l'artère carotide interne jusqu'à obstruer le point de départ de l'ACM (Koizumi *et al.*, 1986).
- ⌘ **Avantage** : ce modèle n'exige pas de craniotomie, et peut simuler une occlusion temporaire ou permanente selon la durée à laquelle le filament est laissé en place.
- ⌘ **Limites** : l'occlusion ne se limite pas à l'ACM, mais aussi aux autres vaisseaux naissant de l'artère carotide interne et de l'ACM, ce qui peut engendrer des manifestations liées à l'occlusion de ces vaisseaux, dont des troubles de la régulation de la température. Une occlusion supérieure à 60 minutes peut également engendrer un risque de lésion hémisphérique majeure avec de forts taux de mortalité associés. Enfin, ce modèle ne permet pas d'étudier la thrombolyse par des agents fibrinolytiques, et la reperfusion y est brutale, ce qui ne mime pas la physiopathologie de la reperfusion chez l'humain, qui est progressive.

12.1.6. Modèles photo-induits

- ⌘ **Principe** : ces modèles associent l'injection d'un colorant photosensible (rose Bengale ou érythrosine B) à une irradiation lumineuse à travers la boîte crânienne (Watson *et al.*, 1985). Le contact entre le colorant et la lumière génère des radicaux oxygénés responsables d'une atteinte endothéliale, puis d'une agrégation plaquettaire, générant ainsi des lésions ischémiques.
- ⌘ **Avantages** : ces modèles ne nécessitent pas de craniotomie et sont plus proches des conditions cliniques que d'autres modèles, de par la génération d'un thrombus.
- ⌘ **Limites** : la physiopathologie des lésions obtenues semble éloignée de celle de l'AVC chez l'humain, en se caractérisant par un fort œdème vasogénique. Les lésions générées sont également de petite taille, et donc difficilement évaluables par des tests sensorimoteurs. Ces modèles sont également peu sensibles à la thrombolyse pharmacologique.

12.1.7. Injection de thrombus autologue

- ⌘ **Principe** : la réalisation de ce modèle nécessite le prélèvement de sang d'une souris, puis sa coagulation *ex vivo*, en plusieurs étapes durant 24 heures. Le thrombus est ensuite injecté à cette même souris dans l'artère carotide interne pour induire une ischémie (Krueger et Busch, 2002).
- ⌘ **Avantages** : ce modèle ne nécessite pas de craniotomie, l'induction de déficits neurologiques aisément évaluables, et la formation d'un thrombus permet une réponse à la thrombolyse.
- ⌘ **Limites** : la réalisation de ce modèle est relativement complexe, avec un protocole expérimental lourd. Ensuite, bien qu'il se rapproche des conditions cliniques avec une induction thromboembolique d'un caillot autologue, les conditions de formation du thrombus sont éloignées de celles prévalant chez l'humain. Les conditions locales de formation du thrombus en sont éloignées, comme le recrutement des différents acteurs de la coagulation *in situ*, ou les contraintes de cisaillement liées au flux artériel. Ces paramètres influent sur la composition du thrombus, et donc sur sa susceptibilité à la fibrinolyse naturelle ou pharmacologique. Ce modèle présente enfin un fort taux de mortalité, avec 50 % de décès au bout d'une période d'occlusion de 45 minutes.

12.1.8. Infarctus induit par chlorure de fer ou d'aluminium

- ⌘ **Principe** : un papier filtre imbibé d'une solution de chlorure de fer (concentration entre 4 % et 20 %) est appliqué au-dessus du tronc de l'ACM distale à travers une fenêtre crânienne, pendant quelques minutes (Karatas *et al.*, 2011).
- ⌘ **Avantage** : ce modèle présente un faible taux de mortalité et permet l'étude de l'embolisation par microscopie intravitale.
- ⌘ **Limites** : les thrombi générés répondent peu à la fibrinolyse au rtPA, probablement en raison de leur composition riche en plaquettes, ce qui limite l'utilisation de ce modèle pour tester des traitements fibrinolytiques. De plus, sa caractérisation par IRM est restreinte à cause des propriétés magnétiques, qui provoquent des artefacts. Cependant, l'utilisation du chlorure d'aluminium à la place du chlorure de fer permet de faciliter le suivi par IRM.

12.1.9. Infarctus cérébral par embolisation de microsphères

- ⌘ **Principe** : des microsphères, généralement entre 30 μm et 50 μm de diamètre, sont injectées dans l'artère carotide interne pour obstruer mécaniquement les vaisseaux cérébraux distaux, provoquant une ischémie dans les zones irriguées par ces vaisseaux (Takagi et Takeo, 2003).
- ⌘ **Avantages** : ce modèle permet de reproduire un phénomène d'embolisation, tout en préservant l'intégrité des méninges et de la pression intracrânienne.
- ⌘ **Limites** : ce modèle ne génère pas de thrombi comparables à ceux observés chez l'humain, ce qui limite son utilisation pour évaluer des techniques de recanalisation. De plus, il est difficile de cibler précisément un territoire vasculaire. Cependant, des améliorations ont été apportées pour orienter des nanoparticules magnétiques à travers le crâne à l'aide d'un aimant (Jia *et al.*, 2017).

Les principaux modèles d'induction de l'ischémie chez le rongeur sont présentés dans la **Figure 46**.

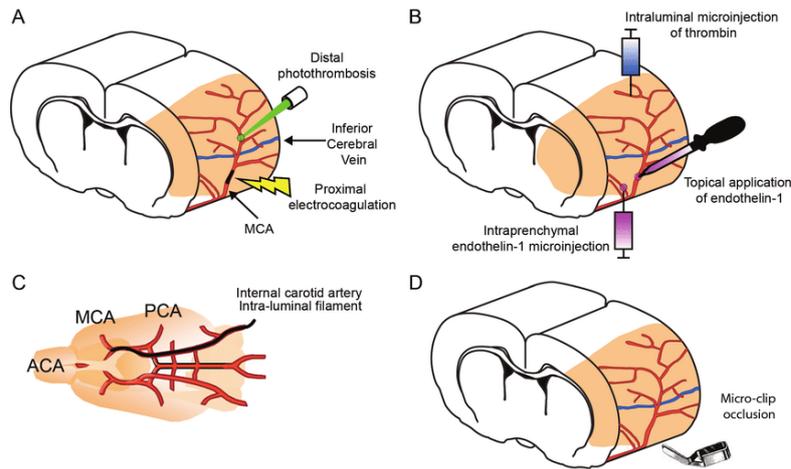


Figure 46 : principaux modèles d'ischémie du territoire de l'ACM.

L'aire colorée en orange correspond à la zone théoriquement infarctée pour chaque modèle, avec toutefois des variabilités possibles selon la gravité de l'ischémie induite, pouvant induire ou non des lésions sous-corticales. Source : C. Brunner, inspiré de (Macrae, 2011).

12.2. Limite des modèles animaux

La principale limite de la modélisation d'une pathologie chez l'animal réside dans l'utilisation de l'animal lui-même. Bien que les modèles murins présentent des similitudes avec la physiopathologie humaine, notamment dans les mécanismes d'inflammation et la réponse neuronale à l'ischémie, des différences intrinsèques et spécifiques à chaque espèce limitent la pertinence clinique des résultats.

12.2.1. Similitudes inter-spécifiques :

12.2.1.1. Mécanismes de base de la mort cellulaire

Les processus biologiques fondamentaux, tels que la survie et la mort cellulaire, sont conservés à travers l'évolution. Les mécanismes moléculaires de la mort cellulaire ischémique sont très similaires chez les souris, les rats et les humains. Des mécanismes comme l'apoptose sont même observés chez les invertébrés, tels que les nématodes (Danial et Korsmeyer, 2004). Ces similitudes permettent l'utilisation de modèles murins pour étudier la mort neuronale et tester des interventions thérapeutiques contre l'apoptose.

12.2.1.2. Mécanismes fondamentaux de l'ischémie

Les mécanismes fondamentaux de l'ischémie, tels que la privation d'oxygène et de glucose, la dépolarisation neuronale (Binder *et al.*, 2022 ; Dohmen *et al.*, 2008), et le stress oxydatif (Chan, 1994 ; Pawluk *et al.*, 2022), sont présents chez les souris et les humains.

Ces similarités justifient l'utilisation de modèles murins pour tester des traitements visant à stabiliser les membranes neuronales ou moduler la signalisation calcique.

12.2.1.3. Neuroanatomie

Les aires primaires, telles que les régions sensorimotrices, sont conservées à travers tous les mammifères, suggérant leur présence chez un ancêtre commun (Kaas, 2011 ; Krubitzer, 2007) (Figure 47). Ces régions sont impliquées dans les fonctions de base, comme la perception sensorielle et le contrôle moteur, et montrent des structures comparables chez les souris et les humains, justifiant l'étude des mécanismes neurologiques de base et des troubles sensorimoteurs. Dans le contexte de l'AVC, les modèles murins permettent de reproduire des lésions ischémiques dans les régions comparables à celles touchées chez l'humain, comme les aires motrices et somatosensorielles.

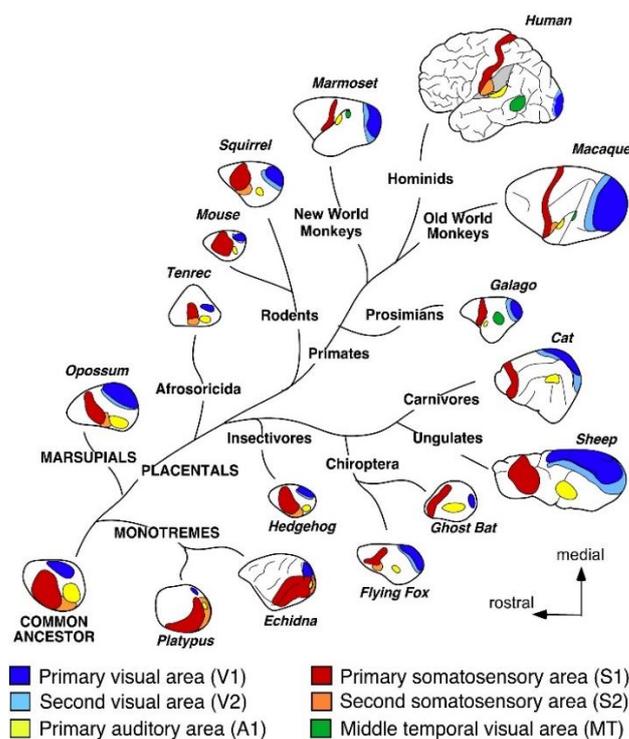


Figure 47 : relation phylogénétique entre les principaux groupes de mammifères.

Des champs corticaux communs ont été identifiés chez toutes les espèces présentées, impliquant la transmission de gènes impliqués dans la spécification de ces zones au cours du développement, hérité d'un ancêtre commun à tous les mammifères (Krubitzer, 2007b).

12.2.1.4. Plasticité et récupération fonctionnelle

Les mécanismes de plasticité neuronale post-AVC, comme la réorganisation des connexions synaptiques, sont observés chez les souris et les humains (Murphy et Corbett,

2009b). Ainsi, les stratégies de réhabilitation et de stimulation cérébrale développées chez la souris sont souvent transposables chez l'humain (Hummel et Cohen, 2005).

12.2.2. Spécificités physiopathologiques

12.2.2.1. Anatomie cérébrale

Les rats et les souris possèdent très peu de substance blanche comparativement aux humains. Chez l'humain, la substance blanche représente environ 60 % du volume cérébral, contre 15 % chez le rat et 10 % chez la souris (Krafft *et al.*, 2012). Les études sur la neuroprotection se concentrent majoritairement sur les répercussions sur la matière grise (Hoyte *et al.*, 2004), alors que les lésions ischémiques de la substance blanche jouent un rôle important dans le pronostic post-AVC, et constituent la principale cause d'hémiplégie (Ahmad *et al.*, 2015).

La substance grise des souris ne présente pas de **gyri**, ces structures corticales plissées qui augmentent la surface du cortex et permettent une plus grande capacité cognitive (Figure 48). La gyrencéphalie est caractéristique des grands mammifères dont font partie les humains ainsi que certaines espèces de mammifères supérieurs, ce qui explique les différences importantes dans les capacités cognitives entre les espèces.

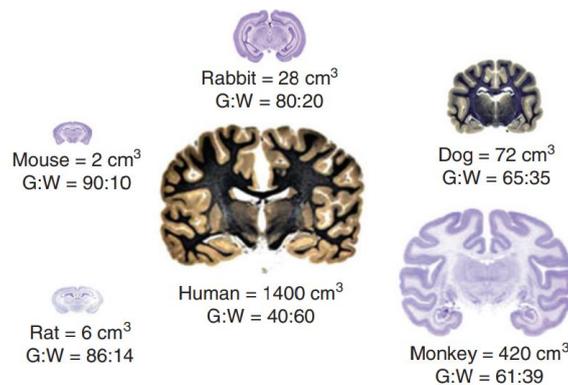


Figure 48 : volumes cérébraux et ratios substance grise.

Les différentes espèces présentées comportent des ratios de substance blanche (G : W) différentes du cerveau humain (Krafft *et al.*, 2012).

12.2.2.2. Système immunitaire et réponse inflammatoire

Les rongeurs et les humains présentent des différences marquées dans la composition de leur système immunitaire. Par exemple, les souris ont une proportion de neutrophiles plus faible (10 % à 20 %) comparé aux humains (50 % à 70 %), tandis que les

lymphocytes représentent 50 % à 100 % des cellules immunitaires chez les rongeurs contre 20 % à 40 % chez l'humain (Haley, 2003). De plus, les sous-réseaux de chimiokines et cytokines diffèrent entre les cellules cérébrales humaines et murines après une ischémie *in vitro* (Du *et al.*, 2017), et des divergences importantes existent également entre la microglie des rongeurs et celle des humains (Smith et Dragunow, 2014). Même de légères différences immunitaires entre deux espèces proches peuvent entraîner des réponses inflammatoires très divergentes. Par exemple, lors de l'essai clinique de 2006 du Theralizumab® (TGN1412), un anticorps superagoniste CD28, six volontaires en bonne santé ont développé des réactions inflammatoires sévères, avec défaillances multi-organes, des effets qui n'avaient pas été anticipés par les études précliniques sur les modèles animaux, y compris chez le macaque cynomolgus (Eastwood *et al.*, 2010).

12.2.2.3. Anatomie vasculaire et hémodynamique

Bien qu'un plan d'organisation vasculaire soit présent dans tous les cerveaux de mammifères, il existe un large spectre de variations entre les espèces et les souches concernant le nombre et le diamètre des collatérales dans les arbres artériels (Binder *et al.*, 2022), influençant la capacité de remodelage après un infarctus. Par exemple, le flux sanguin cérébral chez la souris est 2 à 3 fois plus élevé que chez l'humain (Maeda *et al.*, 2000). En revanche, le flux collatéral est très limité chez les rongeurs, ce qui entraîne une ischémie sévère lors de l'utilisation de modèles d'occlusion proximale. Certaines souches de rongeurs peuvent présenter des anomalies du polygone de Willis. C'est le cas des souris de souche C57/Bl6J, dont seulement 10 % possèdent un polygone de Willis complet (McColl *et al.*, 2004). Cela peut expliquer la variabilité des tailles d'infarctus chez une même espèce, ou chez une même souche après l'occlusion d'une artère.

12.2.2.4. Barrière Hémato-Encéphalique

La perméabilité de la BHE varie entre les souris et les humains, avec des différences marquées dans l'extravasation des protéines et l'affection des compartiments vasculaires (Song *et al.*, 2020). Ces différences modifient la pharmacodynamie des traitements administrés, affectant leur efficacité et leur sécurité dans les essais cliniques (Kido *et al.*, 2022).

12.2.2.5. Spécificités génétiques et épigénétiques

L'expression génique dans différents tissus est plus uniforme au sein d'une même espèce, qu'entre deux espèces différentes. Par exemple, la régulation épigénétique du gène NOS2 (qui code pour l'enzyme NO synthase inductible) diffère entre les souris et les humains, affectant la réponse inflammatoire (Gross *et al.*, 2014). Les modèles murins peuvent donc ne pas refléter fidèlement les réactions humaines aux stimuli inflammatoires, limitant la pertinence des résultats obtenus.

12.3. Améliorer la transposition des résultats précliniques

La prise en compte des similitudes et des différences entre les souris et les humains est essentielle pour interpréter correctement les résultats précliniques et ajuster les modèles murins afin d'optimiser leur pertinence. Il est nécessaire de reconnaître les limitations de ces modèles et d'intégrer des approches complémentaires, comme l'utilisation de biomarqueurs humains spécifiques (protéines, métabolites, signatures génétiques observées chez les patients victimes d'un AVC), et l'incorporation de données cliniques dans les études précliniques.

Cette compréhension des similitudes et des divergences entre les cerveaux à différents niveaux d'organisation est essentielle en neurosciences fondamentales et translationnelles.

En **neurosciences fondamentales**, elle permet de transposer des résultats obtenus chez l'animal, souvent impossibles à acquérir directement chez l'humain, pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents des pathologies (Barron *et al.*, 2020).

En **neurosciences translationnelles**, elle aide à définir les limites des modèles animaux, en identifiant les aspects du cerveau humain qui échappent à la compréhension par le biais d'espèces modèles (Liu *et al.*, 2021). À l'inverse, elle valide les recherches sur les domaines où les similitudes sont suffisantes pour rendre les résultats transposables (Mandino *et al.*, 2022). En outre, la disponibilité de plusieurs souches animales distinctes, chacune capturant un aspect unique d'un syndrome clinique multidimensionnel, offre la possibilité d'étudier les manifestations variées de certains troubles pathologiques (Ellegood *et al.*, 2015).

Cette approche relie efficacement les découvertes issues de la recherche animale aux applications cliniques humaines, tout en soulignant les domaines où des précautions ou des ajustements sont nécessaires pour des études plus fiables (Beauchamp *et al.*, 2022).

Ainsi, en optimisant les aspects qui vont au-delà du modèle animal lui-même, il est possible de renforcer la transposabilité des résultats précliniques vers la clinique.

Une marge de progrès est même identifiable. Par exemple, en 2006, une méta-analyse rapporte que sur 1 026 stratégies testées chez l'animal pour leur potentiel neuroprotecteur, 70 % avaient montré une efficacité. Or, aucune de ces stratégies n'a réussi à démontrer des résultats positifs lors de la translation clinique, chez l'humain (O'Collins *et al.*, 2006 ; Schmidt-Pogoda *et al.*, 2020).

La conclusion de cette étude comparative ne portait pas sur l'utilisation de l'animal en tant que tel, mais plutôt sur la sélection des bons médicaments à utiliser pour les essais cliniques, la manière dont sont réalisées les études précliniques (paramètres observés, moment d'administration du médicament, disparité des modèles d'ischémie utilisés), les biais de publication, ainsi que le manque d'évaluation fonctionnelle et comportementale en préclinique.

Pourtant, des chercheurs académiques et industriels membres du *STAIR* (« *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable* ») avaient auparavant organisé une table ronde en 1999 afin d'identifier la cause de ce défaut de translation, et d'émettre des critères de qualité devant être suivis pour la recherche expérimentale (Fisher *et al.*, 2009) (Tableau 7).

Problématique soulignée	Recommandations STAIR
Manque de rigueur méthodologique : absence de randomisation, d'aveuglement	Mettre en place des études rigoureuses avec randomisation, aveuglement et groupes contrôles appropriés
Problème de reproductibilité et absence de tests multicentriques : résultats difficiles à reproduire dans d'autres laboratoires, dû à l'absence de standardisation des protocoles, de la variabilité des modèles, et des conditions expérimentales	Encourager les études multicentriques dans différents environnements expérimentaux (minimum 2 laboratoires) pour tester la robustesse des résultats, standardiser les méthodes pour tester la reproductibilité
Utilisation de modèles animaux inappropriés : notamment par l'utilisation excessive d'animaux jeunes, tout en ignorant les facteurs de risque cliniques comme l'âge, le sexe, et les comorbidités	Utiliser des modèles animaux plus pertinents incluant divers facteurs comme l'âge, le sexe et les comorbidités. L'efficacité d'une molécule doit être démontrée chez deux espèces différentes
Endpoints non pertinents cliniquement : les critères de jugement manquaient de pertinence comparativement à l'évaluation clinique, comme l'évaluation seule de la taille des lésions cérébrales, sans évaluer suffisamment les impacts fonctionnels ou les effets à long terme	Utiliser des critères de jugement pertinents et mesurables, axés sur les résultats fonctionnels
Biais de publication et rapport sélectif des résultats : les résultats négatifs ou neutres étaient rarement publiés, créant un biais de publication en faveur des études	Publier les résultats négatifs ou non concluants pour améliorer la transparence et réduire le biais de publication

positives et faussait la perception de l'efficacité des interventions	
Doses et délais de traitement non réalistes : doses souvent irréalistes par rapport à ce qui pouvait être administré aux patients, et administré dans des délais trop courts après l'induction de la pathologie	Tester plusieurs doses et évaluer l'impact des délais de traitement pour refléter les conditions cliniques. Respecter la voie d'administration
Insuffisance des analyses statistiques : études trop souvent de petite taille, avec une puissance statistique insuffisante, augmentant le risque de résultats faussement positifs ou négatifs	Utiliser des tailles d'échantillon suffisantes avec des analyses statistiques appropriées pour une meilleure fiabilité
Manque de transparence et de détails dans les publications : notamment sur les méthodes utilisées, compliquant la reproduction des études. Les données brutes étaient rarement partagées, limitant l'évaluation critique par d'autres chercheurs	Fournir une liste exhaustive des détails méthodologiques et partager les données brutes pour faciliter la reproductibilité

Tableau 7 : recommandations STAIR.

Des propositions sont apportées à chaque problématique identifiée au niveau de la recherche préclinique.

En complément des recommandations *STAIR*, qui visent à réduire les biais et à rendre les résultats plus fiables et cliniquement pertinents pour les recherches sur l'AVC, les recommandations *ARRIVE* (« *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* ») ont été développées en 2010 pour renforcer la transparence, la rigueur et la reproductibilité des études précliniques utilisant des animaux (Kilkenny *et al.*, 2010 ; Percie du Sert *et al.*, 2020).

Les recommandations *ARRIVE* ont été créées en réponse à un constat préoccupant : la faible qualité des publications d'études précliniques, où 59 % ne précisent pas leur objectif principal, 87 % n'indiquent pas de randomisation, et 86 % ne mentionnent pas l'utilisation de l'aveuglement. Inspirées des critères *CONSORT* (« *Consolidated Standards Of Reporting Trials* ») (Begg *et al.*, 1996 ; Hopewell *et al.*, 2022), elles visent à standardiser le rapport des expérimentations en proposant des recommandations réparties en plusieurs catégories (**Tableau 8**).

Catégories	Recommandations ARRIVE
Informations générales	Fournir un titre et un résumé précis, reflétant le contenu de l'étude, incluant les objectifs et la justification du travail
Méthodologie	Décrire le design de l'étude, les critères d'inclusion et d'exclusion, les animaux utilisés, les interventions et les mesures des résultats
Transparence et reproductibilité	Rapporter les méthodes de manière transparente et détaillée, publier les données brutes et fournir les protocoles pour faciliter la reproductibilité
Contrôle des biais	Utiliser la randomisation, l'aveuglement et inclure des groupes contrôles appropriés pour minimiser les biais dans les résultats

Rapport des résultats	Présenter tous les résultats, y compris les résultats négatifs, avec des analyses statistiques appropriées et des discussions sur les limitations
Considérations éthiques	Justifier l'utilisation des animaux, respecter les principes des 3R (<i>Remplacer, Réduire, Raffiner</i>), et minimiser la souffrance animale

Tableau 8 : recommandations ARRIVE.

Les recommandations à appliquer en recherche préclinique sont listées selon diverses catégories.

En plus des mises à jour régulières des grilles de recommandations, de nouvelles approches continuent d'émerger pour améliorer la translation de la recherche expérimentale vers la clinique, comme le développement de protocoles expérimentaux qui reproduisent les phases de la recherche clinique (Bath *et al.*, 2009) pour l'élaboration de nouvelles thérapies. La première phase correspondrait à l'étude des mécanismes d'action des agents thérapeutiques (Phase I). La phase II serait l'équivalent d'un essai clinique, mené sur un modèle préclinique par une équipe au sein d'un laboratoire. Enfin, la dernière étape du développement de la stratégie thérapeutique consisterait en un essai multicentrique international, randomisé et en aveugle sur un modèle préclinique (Dirnagl et Fisher, 2012).

12.3.1. L'anesthésie utilisée en recherche préclinique

Le recours à l'anesthésie est une pratique courante et commune dans la grande majorité des essais précliniques sur l'AVC chez l'animal. L'induction de l'AVC étant généralement réalisée par voie chirurgicale, l'anesthésie générale (Figure 49) accompagnée d'une analgésie appropriée est nécessaire pour minimiser la douleur et le stress des animaux, conformément aux principes des 3R (Directive 2010/63/EU). Cette gestion du stress est nécessaire non seulement pour le respect des normes éthiques en matière de bien-être animal, mais également pour limiter les réponses physiologiques susceptibles de perturber les résultats expérimentaux (Bailey, 2018).

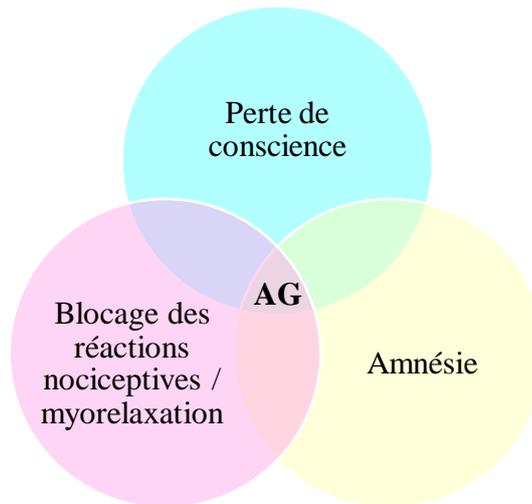


Figure 49 : les trois piliers de l'anesthésie générale.

Une anesthésie générale bien réalisée doit prendre en compte la perte de conscience du sujet, l'amnésie, ainsi que la myorelaxation et le blocage des réactions nociceptives.

Cependant, l'utilisation d'anesthésiques introduit une divergence importante entre les modèles expérimentaux et la réalité clinique de l'AVC chez l'humain. Les anesthésiques ont des effets spécifiques qui varient en fonction de l'agent utilisé et de la dose, influençant les paramètres physiologiques, métaboliques et fonctionnels, ainsi que les mécanismes impliqués dans le développement de la lésion ischémique (Young *et al.*, 2007) (Figure 50).

	Pre-clinical models	Human stroke
Biological diversity (genetic)	+	+++++
Gender	No	Yes
Age	No	Yes
Risk factors	+	++++
Control of physiological parameters	++++	No
Anesthesia	++++	No
<u>Type of Ischemia</u>		
Permanent ischemia (electrocoagulation)	+++++	No
Transient ischemia (mechanical)	++++	No
Thromboembolic ischemia	+	++
Thrombotic ischemia	No	+++++
<u>Evaluation of brain damage</u>		
Histology / Mitochondrial activity	+++++	No
MRI (DWI/PWI)	+++	+++++
Neurological score	++	+++++
<u>Neuro/Brain protection</u>		
Anti-excitotoxic	+++++	No positive results
Radical scavengers	+++	No positive results
Thrombolytics	+	Yes (5% of patients)
Brain protection (White matter, glia)	+	+

Figure 50 : divergences entre les facteurs impliqués dans l'AVC expérimental et clinique.

L'importance de chaque variable telle qu'évaluée par les scientifiques et les cliniciens est illustrée, mettant en évidence les écarts entre les deux conditions.

En préclinique, l'anesthésie chez la souris est généralement induite par voie gazeuse, notamment par l'inhalation d'isoflurane, ou par injection intrapéritonéale de kétamine et de xylazine, qui sont les méthodes de référence pour l'exploration cérébrale (Ahmadi-Noorbakhsh *et al.*, 2022). Pour l'anesthésie gazeuse, un gaz vecteur tel que l'oxygène est nécessaire pour véhiculer l'agent anesthésique volatil. Ce gaz peut être utilisé seul ou combiné au protoxyde d'azote, qui potentialise les effets analgésiques de l'isoflurane. Ces gaz vecteurs ne sont pas neutres et peuvent avoir des effets physiologiques supplémentaires.

12.3.1.1. Influence sur les paramètres physiologiques, métaboliques et fonctionnels

L'**isoflurane** influence directement la physiologie vasculaire chez plusieurs espèces en provoquant une vasodilatation (Iida *et al.*, 1998), ce qui augmente le DSC de manière dose-dépendante dans certaines régions cérébrales (Cucchiara *et al.*, 1974 ; Li *et al.*, 2013) (Sullender *et al.*, 2022) (**Figure 51**), et élève la pression intracrânienne (Ganjoo et Kapoor, 2017).

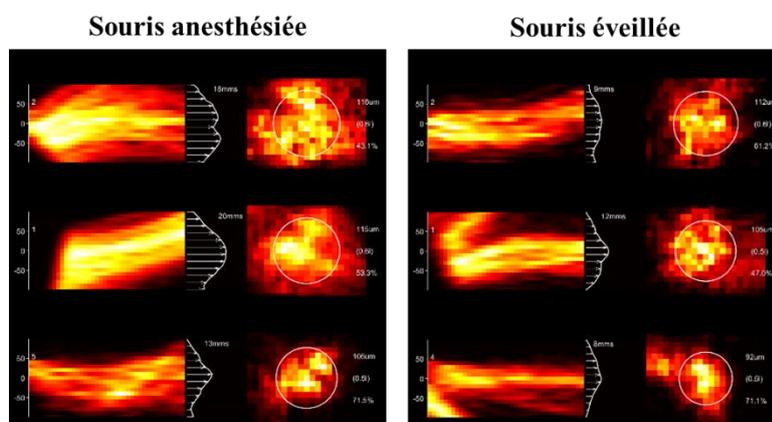


Figure 51 : effets de l'isoflurane sur la physiologie vasculaire cérébrale.

Des acquisitions en ULM ont été réalisées chez une souris anesthésiée et éveillée. L'isoflurane augmente la vitesse des flux ainsi que le diamètre vasculaire (G. Chabouh et M. Abioui-Mourgues).

De plus, l'isoflurane inhibe la conductance de certains canaux potassiques, stabilisant ainsi les membranes neuronales (Buljubasic *et al.*, 1992), et réduit l'activité des récepteurs NMDA (Dickinson *et al.*, 2007), la signalisation synaptique et, par conséquent, le métabolisme cérébral (Berndt *et al.*, 2021). Il module également la connectivité

fonctionnelle en augmentant certaines connexions entre régions cérébrales, et en réduisant d'autres (Stenroos *et al.*, 2021).

Le **protoxyde d'azote** augmente le DSC, diminue la connectivité fonctionnelle et altère les réseaux neuronaux (Reinstrup *et al.*, 1994). Ce gaz est également un antagoniste des récepteurs NMDA (Jevtović-Todorović *et al.*, 1998), réduit la fraction d'extraction d'oxygène dans un mélange gazeux enrichi en oxygène, et possède un effet vasodilatateur (Dashdorj *et al.*, 2013).

Concernant l'enrichissement en **oxygène** du gaz vecteur utilisé, une hyperoxie prolongée augmente la production de ROS (Dean *et al.*, 2004 ; D'Agostino *et al.*, 2007), réduit la neurotransmission (Bickford *et al.*, 1999), et diminue la sensibilité neuronale aux stimuli sensoriels (Shibata et Blatteis, 1991) de manière dose-dépendante. Contrairement à l'hypoxie, l'hyperoxie a peu d'effet sur le DSC (Xu *et al.*, 2012), d'où la nécessité de surveiller la proportion d'oxygène dans les mélanges gazeux pendant l'anesthésie pour les explorations cérébrales.

La **kétamine**, quant à elle, a un effet mineur sur la vasodilatation cérébrale (Kohrs et Durieux, 1998 ; Brown *et al.*, 2011), mais agit comme un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA, affectant donc à la fois les neurones excitateurs et inhibiteurs (Le *et al.*, 2024).

Bien que cette liste ne soit pas exhaustive, elle présente les anesthésiques les plus couramment utilisés en recherche préclinique, et illustre la diversité de leurs effets sur la physiologie, le métabolisme et les fonctions cérébrales. Chaque anesthésique modifie ces paramètres différemment par rapport à l'état d'éveil, soulignant l'absence d'une anesthésie « parfaite », et la nécessité d'un compromis entre efficacité et perturbation physiologique.

12.3.1.2. Influence dans le cadre de l'AVC ischémique

L'**anesthésie gazeuse** à l'isoflurane (ou au sévoflurane) est largement utilisée en recherche préclinique sur l'AVC en raison de sa facilité d'administration, du contrôle aisé de la profondeur de l'anesthésie, et du réveil spontané et rapide des animaux (Archer *et al.*, 2017). Des études sur l'occlusion de l'ACM chez le rat montrent des effets **neuroprotecteurs** de ces anesthésiques, avec des améliorations neurologiques et histologiques significatives chez les animaux anesthésiés par rapport aux sujets éveillés (Sakai *et al.*, 2007). D'autres études confirment ces propriétés neuroprotectrices chez des modèles d'ischémie cérébrale, en démontrant une réduction des volumes lésionnels et des

déficits neurologiques par rapport aux groupes non anesthésiés (Kimbro *et al.*, 2000 ; Y. Li *et al.*, 2013 ; Seto *et al.*, 2014 ; Jiang *et al.*, 2017 ; Neag *et al.*, 2020).

Pour le **protoxyde d'azote**, des réductions de la mort neuronale et de l'influx calcique induits par le NMDA ont été observées (David *et al.*, 2003), ainsi qu'une diminution du volume de l'infarctus et des déficits neurologiques chez le rat (Haelewyn *et al.*, 2008). Toutefois, ces résultats peuvent être nuancés par le constat d'une absence d'effet significatifs du protoxyde d'azote sur l'issue post-AVC ischémique (Reasoner *et al.*, 1990 ; Yokoo *et al.*, 2004).

Les **anesthésiques injectables**, comme la kétamine associée à la xylazine améliorent les déficits neurologiques (Hoffman *et al.*, 1992 ; Reeker *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2020), réduisent les volumes de lésion (Chang *et al.*, 2002), diminuent l'apoptose (Engelhard *et al.*, 2003), et optimisent l'efficacité de la thrombolyse au rtPA (Gakuba *et al.*, 2011).

Les effets neuroprotecteurs des anesthésiques sont aussi liés à la diminution de la neurotransmission, réduisant la consommation d'ATP et économisant le substrat énergétique en cas d'ischémie (Fukuda et Warner, 2007) (**Figure 52**).

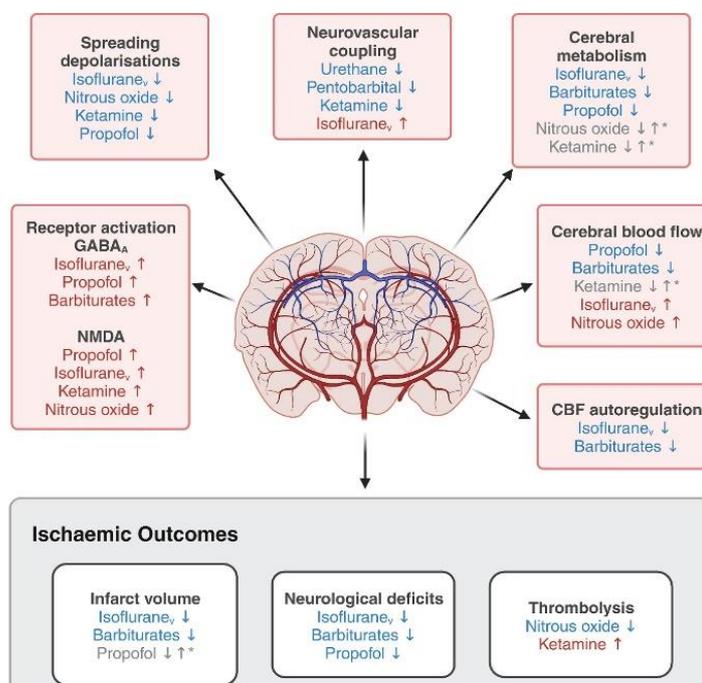


Figure 52 : interactions des anesthésiques avec les événements post-AVC.

Les anesthésiques peuvent **accentuer** certains phénomènes post-AVC (rouge), les **diminuer** (bleu), ou avoir des **effets variés** (gris) (Mosneag *et al.*, 2024).

Dans ce contexte où les effets des anesthésiques sont étudiés sur de nombreux paramètres essentiels à la compréhension de l'évolution des lésions ischémiques, à l'efficacité des stratégies thérapeutiques ainsi qu'à l'évaluation fonctionnelle, les recherches sur les modèles d'AVC chez l'**animal éveillé** se multiplient. Conformément aux critères précliniques *STAIR*, l'étude de l'AVC en état vigile améliore la validité des modèles, puisque la majorité des AVC humains surviennent en état d'éveil. Par conséquent, l'induction préclinique de l'AVC chez l'animal éveillé pourrait représenter une étape clé pour éviter les effets neuroprotecteurs confondants de l'anesthésie dans le développement de nouveaux traitements (Mosneag *et al.*, 2024).

12.3.2. L'imagerie en recherche préclinique

L'intégration de techniques d'imagerie comparables à celles utilisées en clinique constitue une stratégie supplémentaire permettant d'améliorer la pertinence préclinique des modèles d'AVC. Traditionnellement, les évaluations post-AVC se faisaient principalement par des analyses histologiques et immunohistochimiques, qui fournissent des détails précis sur les dommages ischémiques, mais ne permettent pas un suivi longitudinal. Cela limite l'observation à un instant donné, sans capturer la dynamique spatio-temporelle des lésions (Canazza *et al.*, 2014). L'imagerie moderne permet de surmonter ces limitations en offrant la possibilité d'une vision continue de l'évolution des lésions et des réponses thérapeutiques.

12.3.2.1. L'imagerie anatomique et hémodynamique du petit animal

12.3.2.1.1. IRM

L'IRM est la méthode d'imagerie *in vivo* la plus polyvalente. Son utilisation pour la neuroimagerie du petit animal permet de caractériser l'AVC à travers diverses modalités, similaires à celles employées chez l'humain. En clinique, cet examen est réalisé en urgence pour orienter rapidement le patient vers un traitement approprié. En recherche préclinique, l'IRM permet d'explorer en détail les lésions cérébrales en fonction des hypothèses formulées, en choisissant la modalité la plus adaptée au temps écoulé depuis la modélisation de l'AVC. Elle offre ainsi des informations *in vivo* sur l'étendue des lésions cérébrales et leur évolution dans le temps, de manière non invasive, permettant un suivi longitudinal et multiparamétrique.

⌘ **IRM en phase ischémique aiguë (moins de 12 heures) (Figure 53)** : l'IRM de **diffusion** (DWI) permet de détecter rapidement les zones du tissu cérébral affectées par l'ischémie, en identifiant l'œdème cytotoxique avant que des changements anatomiques n'apparaissent (Moseley *et al.*, 1990 ; Xue *et al.*, 2001). Les informations issues du DWI peuvent être croisées avec celles de l'IRM de **perfusion** (PWI) pour réaliser le *mismatch* DWI/PWI (Meng *et al.*, 2004 ; Bardutzky *et al.*, 2007). Cependant, ce rapport est moins étudié chez l'animal que chez l'humain. L'**angiographie** par résonance magnétique (MRA) permet également de visualiser les vaisseaux cérébraux occlus, bien que cette technique soit limitée aux plus gros vaisseaux chez les petits animaux, en l'absence d'agent de contraste (Beckmann *et al.*, 1999).

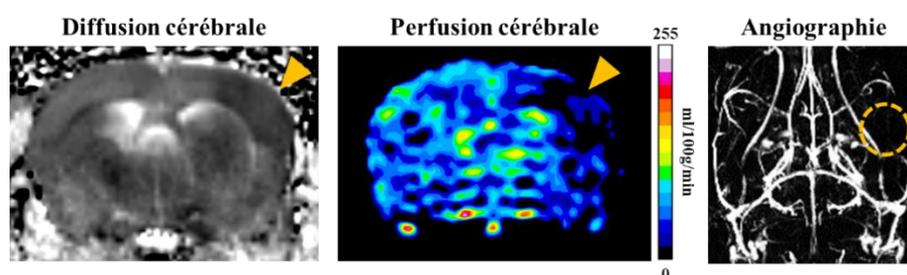


Figure 53 : IRM cérébrale aiguë chez la souris

L'œdème cytotoxique est visible en hyposignal une heure après l'AVC sur la carte d'ADC (à gauche), ainsi que la zone d'hypoperfusion sur la carte de perfusion (au milieu). Le défaut de flux sanguin de l'ACM est également observé sur l'angiographie (à droite). Source : M. Abioui-Mourgues et A. Picot.

⌘ **IRM en phase ischémique subaiguë (premiers jours) (Figure 54)** : l'imagerie pondérée en **T2** (T2W) et l'imagerie pondérée en **densité de protons** (PDW) permettent de caractériser l'évolution des lésions, en montrant une hyperintensité liée à l'augmentation de la teneur en eau (PDW), ou à sa mobilité (T2W) (Carano *et al.*, 2000). L'imagerie T2W, sensible à l'œdème vasogénique, est souvent utilisée en recherche préclinique pour quantifier les lésions dans les jours suivant l'induction de l'ischémie (Jacobs *et al.*, 2000). D'autres modalités comme l'imagerie pondérée en **T1** (T1W) sont également employées, bien que moins sensibles aux lésions (Sen et Anand, 2020). L'imagerie **FLAIR-T2W**, qui supprime le signal du liquide céphalo-rachidien, offre des informations similaires au T2W. Enfin, l'imagerie **T2*** peut être utilisée pour détecter les événements hémorragiques post-AVC (Henning *et al.*, 2008 ; Correa-Paz *et al.*, 2024).

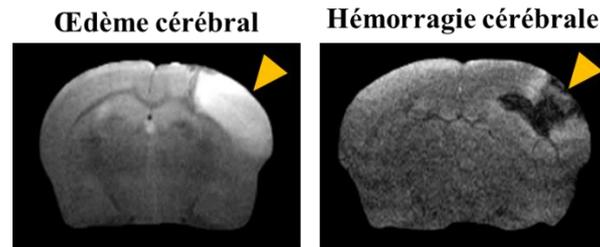


Figure 54 : IRM cérébrale subaiguë chez la souris.

L'œdème cérébral 24 heures après l'AVC est visible en T2w (à gauche), ainsi qu'un événement hémorragique en T2*. Source : M. Abioui-Mourgues.

⌘ **IRM en phase chronique (Figure 55) :** l'imagerie par **tenseur de diffusion (DTI)** fournit des informations sur la dégénérescence, la démyélinisation, et la régénération post-AVC. Cette technique repose sur la diffusion de l'eau, qui ne diffuse pas de manière anarchique dans toutes les directions à travers le parenchyme cérébral, mais se propage le long des fibres nerveuses (Basser *et al.*, 1994a ; Basser *et al.*, 1994b ; O'Donnell et Westin, 2011). Des modifications observées en DTI sont liées à la récupération fonctionnelle après une occlusion de l'ACM chez la souris (Granziera *et al.*, 2007), notamment dans la substance blanche (Sotak, 2002), ainsi que dans les zones périphériques du noyau ischémique chez le rat (van der Zijden *et al.*, 2008a), et sont corrélées avec les déficits fonctionnels observés (van Meer *et al.*, 2012). L'injection de manganèse (MEMRI) et le suivi de son cheminement le long des axones révèle l'architecture des circuits neuronaux, en mettant en évidence la neurodégénérescence (Saar *et al.*, 2015), la connectivité neuroanatomique (Soria *et al.*, 2008), la plasticité cérébrale (van der Zijden *et al.*, 2008b), ou encore la gliose (Kawai *et al.*, 2010). Les altérations de la BHE peuvent être visualisées après injection de **chélates de gadolinium**, leur extravasation rendant visible les zones où la perméabilité est compromise (Liebner *et al.*, 2018 ; Candelario-Jalil *et al.*, 2022). De plus, l'**imagerie moléculaire** permet d'utiliser des agents de contraste ciblés, tels que les microparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques comme les *MPIO* (« *MicroParticles of Iron Oxide* ») (McAteer *et al.*, 2007 ; Gauberti *et al.*, 2014), couplés à des anticorps spécifiques. Par exemple, l'imagerie de l'inflammation post-AVC est possible grâce à des anticorps dirigés contre des cytokines pro-inflammatoires exprimées par les cellules endothéliales, comme la VCAM1 (Hoyte *et al.*, 2010 ; Gauberti *et al.*, 2018), ou la

p-sélectine (Quenault *et al.*, 2017). Ce type d'imagerie pourrait fournir des indications sur la sévérité de l'AVC et servir d'outil pronostic (Fournier *et al.*, 2024).

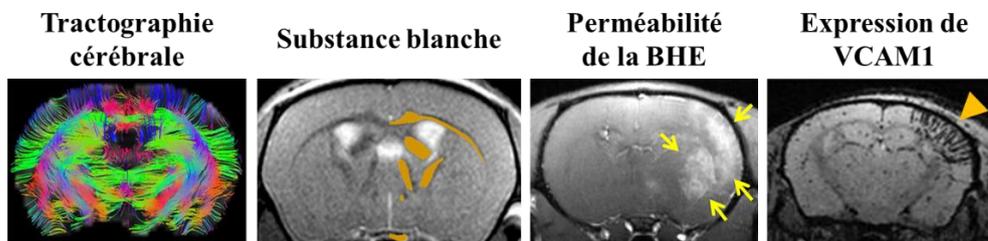


Figure 55 : modalités d'IRM en phase chronique de l'AVC chez la souris.

L'imagerie par tenseur de diffusion permet la coloration des neurofilaments après traitement d'image (Pervolaraki *et al.*, 2019), l'injection de manganèse permet de mettre en évidence en hyposignal les structures de la substance blanche (en **ocre**) (adapté de Watanabe *et al.*, 2010), le suivi de l'extravasation de micelles de gadolinium permet de mettre en évidence les défauts de perméabilité de la BHE (Shiraishi *et al.*, 2017), et l'injection de MPIOs anti-VCAM1 permet de mettre en évidence les sites d'activation endothéliale suite à une inflammation (Gauberti *et al.*, 2013).

12.3.2.1.2. Tomographie par Émission de Positons (TEP) et de Photons Uniques (SPECT)

La **TEP** permet de visualiser le métabolisme et la fonction cérébrale. Elle repose sur l'injection d'un traceur radioactif marqué avec un isotope émetteur de positons (β^+) à haute énergie, mais à demi-vie courte (de quelques minutes à quelques heures). Elle permet la production d'images tomographiques et la possibilité d'obtenir des mesures quantitatives précises de molécules *in vivo*.

Cependant, les études sur petits animaux rencontrent des limitations telles qu'une disponibilité réduite, un coût élevé, et une résolution spatiale inférieure à celle de l'IRM. La TEP a tout de même contribué aux connaissances sur les altérations métaboliques liées à l'AVC (Temma *et al.*, 2006), avec entre-autres l'identification de la pénombre ischémique (Kläsner *et al.*, 2007) et de la neuroinflammation (Chaney *et al.*, 2018), avec la possibilité de superposer des images acquises en TEP, et en IRM (Barca *et al.*, 2022). Ces systèmes hybrides TEP/IRM sont de plus en plus utilisés en recherche et en clinique pour obtenir des détails anatomiques précis.

La **SPECT** est une autre technique d'imagerie nucléaire, qui permet de suivre en temps réel les modifications fonctionnelles et métaboliques du cerveau, grâce à l'injection de radio-isotopes émettant des rayons gamma (γ), utilisés pour marquer une activité

fonctionnelle *in vivo* (Apostolova *et al.*, 2012). Ceux-ci ont une énergie plus faible et une demi-vie plus longue (de quelques heures à quelques jours) comparé aux traceurs utilisés en TEP. Les principaux avantages de la SPECT sont le suivi longitudinal des cellules marquées, la possibilité d'utiliser simultanément deux radio-isotopes, et l'absence du besoin d'un cyclotron sur place pour produire les traceurs, rendant la technique plus accessible et moins coûteuse que la TEP. Malgré une résolution et une sensibilité inférieure, les caméras microSPECT (Beekman *et al.*, 2005) de nouvelle génération réduisent ces écarts avec la TEP.

12.3.2.1.3. Débitmétrie laser doppler et imagerie de contraste à granularité laser

La Débitmétrie par Laser Doppler (DLD) est une technique couramment utilisée dans la recherche sur l'ischémie cérébrale pour estimer avec précision les variations de débit sanguin **microcirculatoire** dans de petits échantillons de tissu. Cette méthode est souvent employée pour vérifier l'occlusion peropératoire lors de l'induction d'une ischémie cérébrale focale chez le petit animal, par la mesure des variations de DSC régional dans un vaisseau spécifique (Dijkhuizen *et al.*, 1998).

L'imagerie de contraste à granularité laser (« *Laser Speckle Contrast Imaging* »- LSCI) permet de visualiser en temps réel et en haute résolution la **perfusion sanguine tissulaire**, et est régulièrement utilisée en recherche préclinique chez le petit animal pour imager la surface du cortex à travers le crâne. Cette technique fonctionne en éclairant le tissu avec un laser, créant un motif de granularité qui change en fonction du mouvement des particules dans le sang. L'analyse de ces variations permet de mesurer la perfusion sanguine en temps réel (Dunn *et al.*, 2001) (Figure 56).

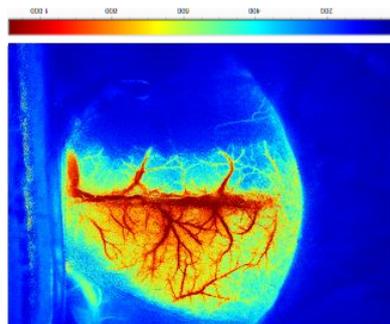


Figure 56 : imagerie de contraste à granularité laser chez la souris.
La zone d'hypoperfusion dans le territoire de l'ACM est visible dès les premières minutes suivant l'AVC. Contribution : L. Fosset.

12.3.2.1.4. Imagerie photoacoustique

L'imagerie photoacoustique est une technique récente combinant l'utilisation de la lumière (généralement un laser) et des ultrasons pour visualiser les structures cérébrales et les processus physiopathologiques. Un faisceau laser est dirigé vers le cerveau, où il est absorbé par des chromophores naturels tels que l'hémoglobine. Cette absorption provoque une légère expansion thermique, générant des ondes ultrasonores détectées par des capteurs acoustiques (Xu et Wang, 2006 ; Wang et Yao, 2016 ; Menozzi *et al.*, 2022). Les signaux sont ensuite convertis en images montrant l'état du DSC et de l'oxygénation des tissus (Zhang *et al.*, 2006 ; Tzoumas *et al.*, 2016) (Figure 57). La technique PAT (« PhotoAcoustic Tomography ») permet une imagerie en profondeur, tandis que l'OPA (« Optical-resolution PhotoAcoustic Microscopy ») est utilisée pour l'imagerie de surface (Chen *et al.*, 2021).

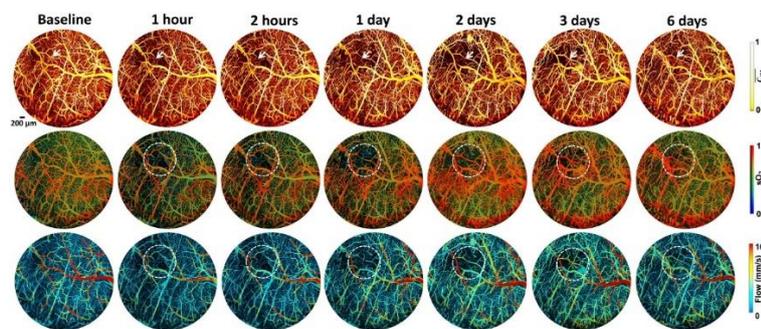


Figure 57 : imagerie photoacoustique chez la souris.

La concentration d'hémoglobine (C_{Hb}), l'oxygénation du sang (sO_2) et le DSC (**Flow**) ont été caractérisés à différents temps après l'induction d'un AVC par photo thrombose (Yang *et al.*, 2021).

12.3.2.1.5. Imagerie ultrasonore

L'imagerie ultrasonore, déjà utilisée en clinique pour l'évaluation du flux sanguin, repose pour cette application sur l'effet Doppler qui permet de détecter les mouvements des globules rouges dans les vaisseaux (Evans *et al.*, 2000 ; Mace *et al.*, 2013).

En clinique, l'échographie Doppler est la méthode la plus couramment utilisée pour étudier la circulation sanguine dans le cœur, les artères, les membres, les reins et le foie, ainsi que pour l'imagerie transcrânienne, à travers les fenêtres naturelles chez l'adulte et *via fontanelle* chez le nouveau-né (LaRovere, 2015).

Chez le petit animal, l'imagerie transcrânienne sans amincissement du crâne chez les jeunes animaux est devenue possible grâce à des avancées technologiques telles que l'échographie ultrarapide et l'utilisation d'ondes planes, qui subissent moins d'atténuation

et de diffraction que les ondes focalisées, souvent dispersées ou déformées par les irrégularités osseuses (Deffieux *et al.*, 2018). Grâce à des scanners capables d'acquérir des images à haute fréquence (~20 kHz), l'échographie ultrarapide améliore la qualité des images en augmentant la sensibilité du signal, sans nécessiter l'utilisation d'agents de contraste. Le développement préclinique de cette technologie en fait une modalité de choix pour la caractérisation des changements hémodynamiques chez le petit animal dans le cadre de la recherche sur l'AVC. L'utilisation de l'ULM est également appliquée aux études précliniques, permettant une caractérisation fine du système vasculaire chez le petit animal (Hingot *et al.*, 2020a) (Figure 58).

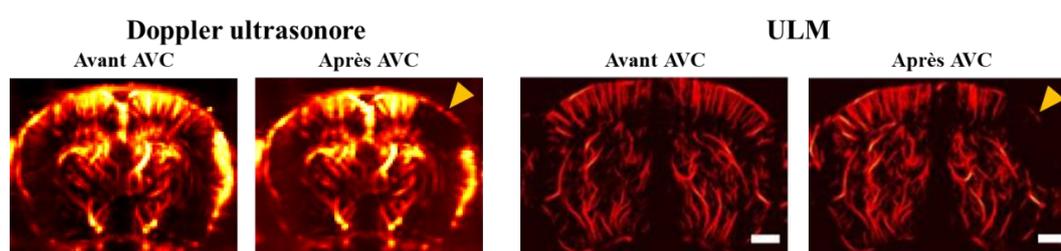


Figure 58 : imagerie Doppler et ULM de l'AVC chez la souris.

L'intensité du volume sanguin cérébral peut être évaluée par imagerie Doppler, permettant d'identifier la zone hypoperfusée (M. Abioui-Mourgues). Le signal peut être rehaussé par l'injection de microbulles pour caractériser avec finesse la vasculature cérébrale (adapté de Hingot *et al.*, 2020).

D'autres méthodes d'imagerie optique, telles que l'**imagerie par fluorescence proche infrarouge (NIRF)** (Hong *et al.*, 2012), et la **microscopie bi photonique** (Sakadžić *et al.*, 2010), permettent également d'obtenir des images de la structure cérébrovasculaire de surface avec une haute résolution.

12.3.2.2. Imagerie fonctionnelle chez le petit animal

Les changements hémodynamiques observés chez le petit animal ne reflètent pas seulement la perfusion sanguine, mais également l'**activité neuronale** via l'unité neurovasculaire. Il est ainsi possible de réaliser de l'imagerie fonctionnelle en associant une stimulation ou une tâche cognitive à l'activité neuronale d'une région cérébrale spécifique. Cette activité est mise en évidence par une **hyperémie fonctionnelle**, une augmentation de l'**oxygénation locale**, ou un **signal calcique** (Tong *et al.*, 2019).

Cette imagerie permet de caractériser les altérations des fonctions cérébrales et leur récupération au fil du temps. En clinique, les évaluations fonctionnelles reposent souvent

sur des tests comportementaux et cognitifs adaptés aux humains, comme l'évaluation de la mémoire, du langage ou des capacités motrices. Cependant, ces approches ne sont pas directement transposables aux petits animaux en raison des différences majeures de cognition entre les espèces.

De plus, les réponses comportementales chez les petits animaux peuvent être influencées par des facteurs non spécifiques tels que le stress ou l'environnement expérimental, rendant l'évaluation précise des déficits fonctionnels difficile. Dans ce contexte, l'imagerie fonctionnelle devient un outil précieux, permettant de contourner ces biais et d'obtenir des mesures de l'activité cérébrale *in vivo*. Elle permet de suivre les altérations hémodynamiques et métaboliques post-ischémiques, ainsi que la réorganisation fonctionnelle des circuits neuronaux après un AVC.

12.3.2.2.1. IRM fonctionnelle (IRMf)

L'IRM est une des principales techniques utilisées pour étudier le fonctionnement global du cerveau humain (Ogawa *et al.*, 1990), en s'appuyant sur l'effet BOLD. Les changements locaux de l'activité neuronale nécessitent un apport dynamique en oxygène et en glucose, fourni par un système vasculaire dense.

Ce couplage neurovasculaire assure l'ajustement des besoins énergétiques (Raichle *et Mintun*, 2006), et les variations du rapport entre l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée aux propriétés magnétiques distinctes, produisent le signal BOLD (Figure 59). Ces variations peuvent être observées lors de tâches cognitives ou à l'état de repos (Biswal *et al.*, 1995). Cette technique a également été adaptée pour des modèles de rongeurs, permettant de cartographier les réseaux neuronaux (Jonckers *et al.*, 2011), qui présentent des similitudes avec ceux observés chez l'humain (Bertero *et al.*, 2018 ; Grandjean *et al.*, 2020).

Toutefois, l'IRMf présente certaines limites, comme l'utilisation fréquente de l'anesthésie générale (Paasonen *et al.*, 2018) et la difficulté de faire réaliser des tâches fonctionnelles à l'animal durant une session d'IRMf.

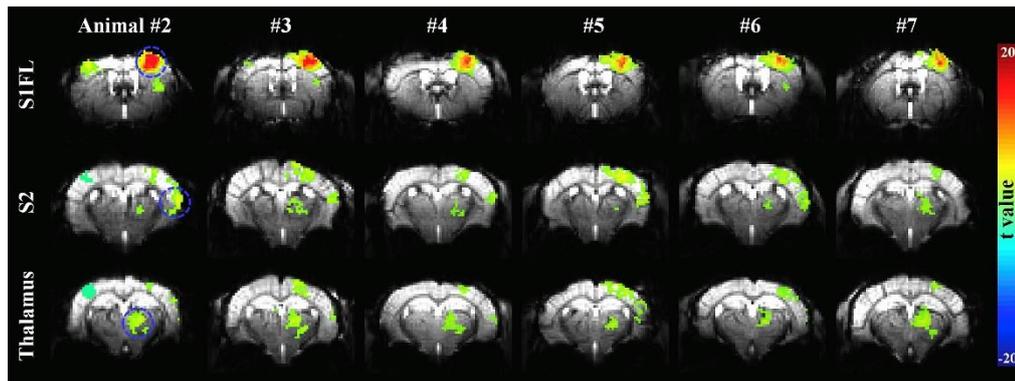


Figure 59 : IRM fonctionnelle chez la souris.

Les cartes IRMf ont été obtenues chez 6 animaux, pour lesquels des activités fonctionnelles ont été détectées dans l'aire somatosensorielle primaire du membre antérieur (**S1FL**), l'aire somatosensorielle secondaire (**S2**), et le **thalamus** de l'hémisphère droit, en réponse à une stimulation de la patte avant gauche (Jung *et al.*, 2019).

12.3.2.2.2. Imagerie fonctionnelle par ultrasons (fUS) (Figure 60)

Les scanners actuels sont suffisamment sensibles pour cartographier les changements de flux sanguin dans de petites artérioles (jusqu'à 1 mm/sec) en réponse à de légères variations transitoires de l'activité neuronale. La première application de l'imagerie fUS en neurosciences a démontré l'activation du cortex somatosensoriel (« *barrel cortex* ») suite à une stimulation des vibrisses chez le rat (Macé *et al.*, 2011).

Depuis, cette technique a été utilisée pour étudier la connectivité au repos chez le rat (Osmanski *et al.*, 2014), et chez la souris éveillée en mouvement libre (Tiran *et al.*, 2017).

L'imagerie fUS se rapproche des applications de l'IRMf, avec l'avantage de pouvoir être réalisée chez des animaux éveillés et actifs, notamment lors de tâches sensorielles. Cette technique combine des acquisitions sur l'ensemble du cerveau avec une résolution spatiale relativement élevée (100 μm \times 100 μm \times 300 μm), une résolution temporelle améliorée, et des coûts d'exploitation et de maintenance plus faibles.

Bien que le crâne reste un obstacle à la propagation des ondes ultrasonores en imagerie fUS, l'utilisation d'agents de contraste (on parle alors de « *fULM* ») (Errico *et al.*, 2016 ; Renaudin *et al.*, 2022), l'amincissement du crâne ou une craniotomie peuvent compenser cette limitation. Néanmoins, ce type d'imagerie représente des perspectives prometteuses par son accessibilité, la multimodalité des techniques, et un excellent compromis entre résolution spatiale et temporelle.

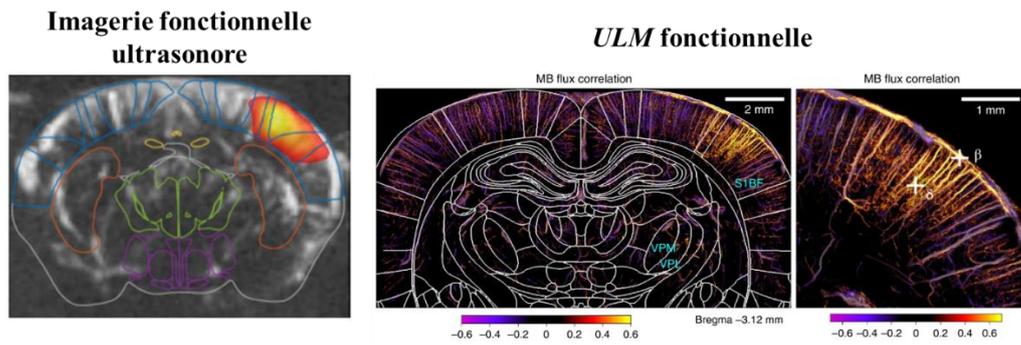


Figure 60 : imagerie fonctionnelle ultrasonore chez la souris et le rat.

L'hyperémie fonctionnelle est visible dans le cortex somatosensoriel primaire suite à une stimulation des vibrisses en imagerie doppler chez la souris (M. Abioui-Mourgues), et en combinaison avec l'injection de microbulles échogènes chez le rat afin d'effectuer une imagerie fULM (Renaudin *et al.*, 2022).

PARTIE V : défis dans la recherche et le traitement de l'AVC

Malgré les avancées dans la compréhension des mécanismes sous-jacents à l'AVC, plusieurs défis doivent encore être relevés pour améliorer la prise en charge des patients. Ces défis incluent la **pertinence des modèles précliniques**, l'**accessibilité des techniques diagnostiques**, et l'**optimisation des stratégies thérapeutiques**. Cette thèse aborde chacun de ces trois enjeux majeurs, en proposant des approches innovantes et en tentant de répondre aux problématiques actuelles identifiées.

13. Défi 1 : la pertinence et la translation des essais précliniques

La première thématique identifiée est l'importance d'une bonne transposition des résultats des essais précliniques vers la pratique clinique. De nombreux traitements prometteurs échouent lors des essais cliniques, en partie en raison d'une mauvaise représentativité des modèles précliniques par rapport aux conditions humaines. Pour répondre à cette problématique, nous avons développé un modèle d'AVC chez la souris éveillée, intégrant l'IRM pour se rapprocher des outils de diagnostic clinique, ainsi que l'imagerie fonctionnelle pour évaluer plus précisément la réponse à la thrombolyse par rtPA, avec la valeur ajoutée d'une évaluation fonctionnelle quantitative et reproductible.

Ce projet principal constitue la majeure partie de mon travail de thèse et fait l'objet d'un article scientifique en cours de préparation, et présenté sous forme de prépublication dans la partie « **Article 1 : Improving Stroke Prognosis Through Early Ultrasound Imaging of Functional Midline Shift in Awake Mice** ».

14. Défi 2 : diagnostic et accessibilité aux techniques d'imagerie avancée

Dans une situation où chaque seconde compte en cas d'ischémie, il est essentiel de disposer d'un diagnostic rapide et précis de l'AVC. Cependant, l'accès aux techniques avancées, comme l'IRM ou la TDM, demeure limité en raison de leur coût élevé et de leur disponibilité restreinte. Pour pallier ce problème, nous avons exploré l'utilisation de l'ULM cérébrale en 3D chez la souris éveillée. Les premiers essais cliniques de cette technique montrent son potentiel pour suivre les patients, et des étapes de recherche préclinique fondamentale et translationnelle seront encore nécessaires.

Cette collaboration avec le Laboratoire d'Imagerie Biomédicale (LIB) a permis d'adapter la technique d'imagerie en conditions éveillées, développées à l'issue de l'**Article 1**.

Pour garantir une accessibilité aux avancées scientifiques et une meilleure reproductibilité, l'ensemble des codes utilisés pour l'acquisition des données et le traitement du signal a été joint aux résultats de l'étude.

Ce travail fait l'objet d'une brève communication scientifique, actuellement en cours de soumission, et est présentée sous forme de prépublication dans la partie « **Brève communication : An open-source platform for 3D transcranial Ultrasound Localization Microscopy in awake mice.** ».

15. Défi 3 : optimisation des stratégies thérapeutiques et inclusion des patients

L'inclusion rapide des patients pour une intervention thrombolytique efficace est nécessaire, et est corrélée au pronostic des patients. Le rtPA reste actuellement le seul traitement approuvé pour la thrombolyse en phase aiguë de l'AVC ischémique, mais son utilisation est limitée par le risque hémorragique et les contre-indications cliniques. Pour améliorer l'innocuité et l'efficacité du traitement, le LVTS a développé un agent de thrombolyse ciblée permettant de réduire la dose nécessaire de rtPA par un facteur 10. Ce nouvel agent cible directement le thrombus, limitant ainsi les potentiels effets secondaires systémiques, et avec un potentiel théranostique.

Cette partie du projet provient de la mise en commun du travail de thèse de Louise Fournier pour la partie du développement de cet agent thrombolytique, et mon travail de thèse pour la partie d'application de cet agent *in vivo*, dans un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article scientifique publié dans *Biomaterials*, et présenté dans la partie « **Article 2 : rtPA fucoidan polymer microbubbles for the targeted treatment of stroke** ».

Ces trois défis mettent en lumière les limitations actuelles de la recherche et de la prise en charge des AVC, qu'il s'agisse de la transposition des essais précliniques, de l'accessibilité aux outils de diagnostic, ou de l'optimisation des traitements disponibles.

Grâce aux approches innovantes abordées dans cette thèse et enrichies par des collaborations scientifiques, nous proposons des solutions qui, nous l'espérons, contribueront à améliorer à terme la prise en charge des AVC.

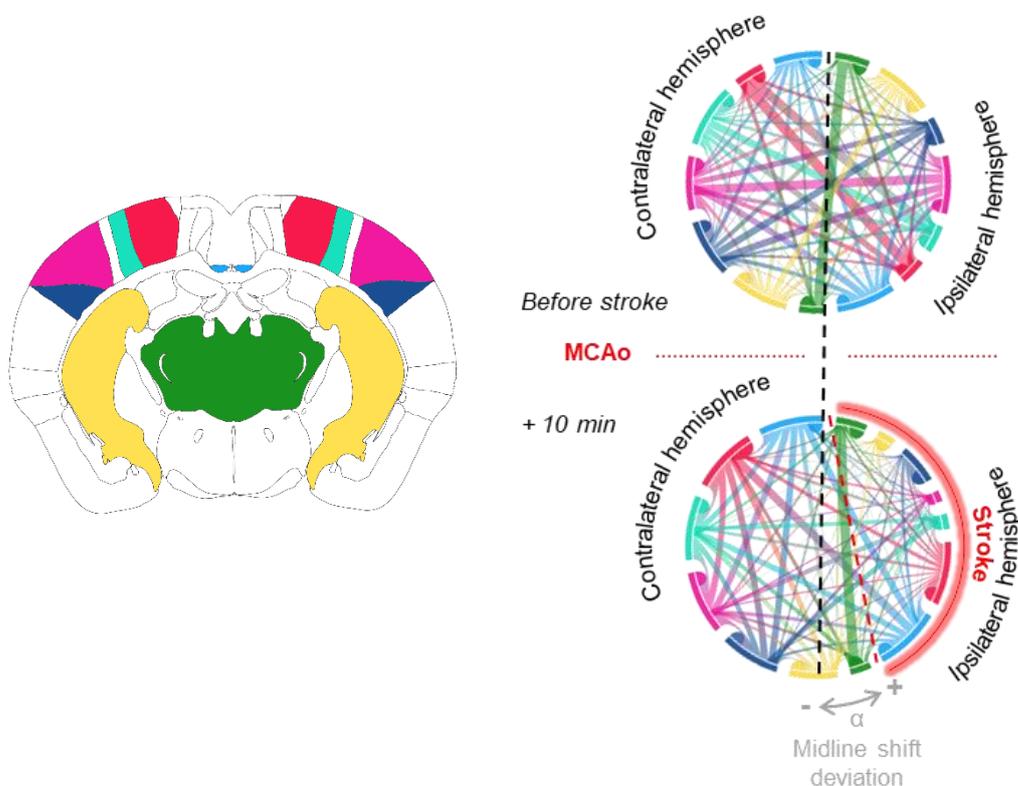
PARTIE VII : Résultats

16. Article 1 :

Improving Stroke Prognosis Through Early Ultrasound Imaging of Functional Midline Shift in Awake Mice

Myriam ABIQUI-MOURGUES, Amandine BONNET, Canelle LEPILLIER, Camille BRODIN, Thomas DEFFIEUX, Denis VIVIEN, et Cyrille ORSET.

En cours de préparation



16.1. Contexte de l'étude :

L'AVC fait **une victime toutes les deux secondes** dans le monde (Lindsay *et al.*, 2014), et constitue la **troisième cause de handicap** acquis chez l'adulte (Pacheco-Barrios *et al.*, 2022). Il s'agit d'un problème majeur, tant sur le plan de la **santé publique** que sur le **plan humain**, avec des répercussions sur la qualité de vie des patients ainsi qu'une **charge économique** importante pour les systèmes de santé (Rochmah *et al.*, 2021). De plus, le taux d'incidence de l'AVC est prévu d'augmenter d'ici 2030 (Pu *et al.*, 2023).

Actuellement, les options thérapeutiques disponibles pour l'AVC ischémique se limitent à la **fibrinolyse** par le rtPA et à la **thrombectomie** mécanique (Mosconi et Paciaroni, 2022).

Malheureusement, ces traitements ne peuvent être administrés qu'à une faible proportion de patients (entre 2,6 % et 11 % pour la thrombolyse intraveineuse (Cumbler, 2015), et moins de 5 % pour la thrombectomie mécanique (Saini *et al.*, 2021)), en raison des risques d'effets secondaires graves, tels que les hémorragies associées au rtPA, et des contraintes d'accès aux techniques endovasculaires.

Ces limitations soulignent l'importance de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques qui soient non seulement plus **accessibles**, mais aussi plus **sûres**.

Cependant, la recherche biomédicale dans le domaine de l'AVC se heurte à de nombreux obstacles. Bien que plus de 1 000 molécules neuroprotectrices aient montré des résultats prometteurs dans des études animales, aucune d'entre elles n'a démontré une efficacité clinique chez l'humain parmi les 114 essais cliniques réalisés (O'Collins *et al.*, 2006).

Ces échecs peuvent être partiellement expliqués par des **biais méthodologiques** présents dans les études précliniques. Plusieurs facteurs contribuent à la difficulté de transposer les résultats des études animales aux essais cliniques, notamment par le manque de diversité génétique des animaux utilisés, leur jeune âge, l'absence de comorbidité, ainsi que l'absence de facteurs de risque couramment rencontrés chez les patients, tels que l'hypertension, le diabète, ou le tabagisme.

Ces différences limitent la représentativité des modèles animaux par rapport aux conditions cliniques réelles. De plus, une autre source importante de biais est l'utilisation généralisée de l'**anesthésie**, pour l'induction de l'infarctus, les traitements, et l'imagerie (Young *et al.*, 2007).

Les anesthésiques couramment utilisés en laboratoire, tels que l'isoflurane ou la Kétamine associée à la Xylazine, modifient les paramètres **métaboliques** et **hémodynamiques**, influençant ainsi la progression des lésions post-AVC et pouvant interagir avec les molécules pharmacologiques testées.

Par ailleurs, il existe un manque de mesures et d'évaluation de la **récupération fonctionnelle** post-AVC. Contrairement aux patients humains, dont les fonctions neurologiques sont évaluées à l'aide de tests cliniques et neuropsychologiques, les évaluations comportementales disponibles chez l'animal sont souvent indirectes et sujettes à divers **biais**, tels que l'effet de l'expérimentateur, les variations de l'environnement, ou encore le stress. Ces approches ne capturent pas toujours la complexité des déficits neurologiques et de la récupération fonctionnelle, limitant ainsi la capacité à évaluer finement l'efficacité des interventions thérapeutiques.

16.2. Objectifs de l'étude :

L'objectif de cette étude est d'apporter des éléments contribuant à améliorer la **translation des résultats cliniques vers la clinique** en développant un modèle d'AVC chez la **souris éveillée**, permettant de minimiser les biais liés à l'anesthésie et offrant une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'AVC.

Un second objectif est de tirer parti de ce modèle pour réaliser une **caractérisation aiguë de l'AVC**, tant sur le plan physiopathologique que fonctionnel, en introduisant une nouvelle mesure de la récupération fonctionnelle.

16.3. Principales méthodes utilisées :

Nous avons choisi de développer ce modèle chez la **souris**, l'espèce animale la plus couramment utilisée pour la recherche fondamentale et translationnelle sur l'AVC. Le choix s'est porté sur la souche Swiss, connue pour son caractère **docile** et calme, ce qui est un atout pour les expérimentations sans anesthésie.

Pour l'induction de l'ischémie, nous avons sélectionné le modèle d'infarctus répondant le mieux au traitement thrombolitique de référence, le rtPA, afin de valider la

faisabilité du modèle et sa **compatibilité** avec l'évaluation de **stratégies thrombolytiques ou neuroprotectrices**.

Parmi les différents modèles d'infarctus existant chez la souris, le modèle d'injection de **thrombine** dans l'**ACM** a été jugé le plus pertinent. Ce modèle cible le territoire le plus fréquemment touché par l'AVC ischémique chez l'humain et induit un thrombus riche en **fibrine**, répondant ainsi à la **fibrinolyse**.

Pour caractériser l'ischémie induite, nous avons utilisé l'**IRM** avec des modalités habituellement employées chez les patients, notamment l'imagerie pondérée en T2, T2*, ainsi que la perfusion par ASL, à la fois dans les phases **précoces** et plus **tardives** de l'ischémie.

Nous avons également intégré une évaluation **très précoce** des **phénomènes vasculaires** survenant dans les premières minutes suivant l'ischémie, un paramètre difficile à évaluer en présence d'anesthésiques. Pour cela, nous avons utilisé l'**imagerie ultrasonore** en modalité Doppler, qui permet de visualiser le flux sanguin cérébral tout en offrant un excellent compromis entre la **résolution spatiale** et **temporelle** (**Figure 61**).

Enfin, nous avons eu recours à l'imagerie **fUS** pour évaluer le déficit fonctionnel post-AVC, tant au **repos** qu'en réponse à une **stimulation sensorielle** des vibrisses, dont l'aire cérébrale correspondante est celle impactée par l'infarctus.

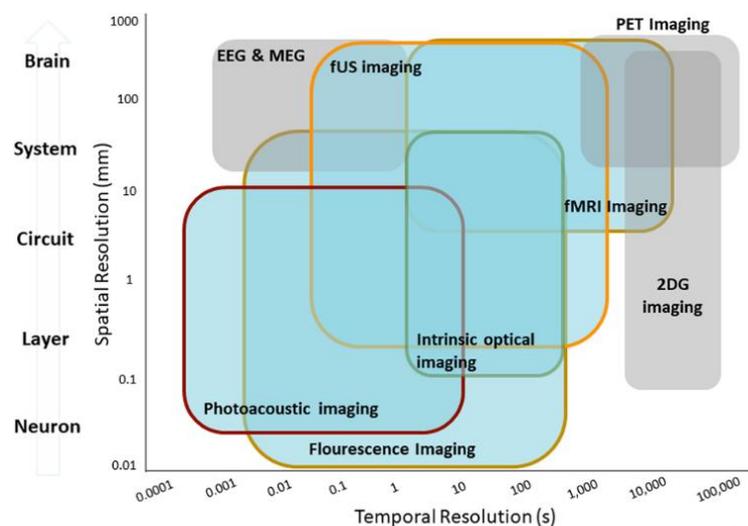


Figure 61 : techniques d'imagerie cérébrale chez le rongeur.

L'imagerie ultrasonore présente un excellent compromis entre résolution spatiale et temporelle pour l'imagerie du cerveau entier chez le rongeur, avec la possibilité de réaliser une imagerie fonctionnelle (Markicevic *et al.*, 2021).

16.4. Principaux résultats

- ✓ L'AVC a été induit chez des animaux éveillés, en prenant compte la gestion de la **douleur** éventuelle, et du **stress** par mesure du taux de **corticostérone** sérique.
- ✓ Le modèle d'AVC chez l'animal éveillé a montré une **réponse positive** au traitement par **fibrinolyse** avec le **rtPA**.
- ✓ L'**IRM de perfusion** (ASL) s'est avérée être un bon indicateur **prédictif** de l'évolution des **lésions** ischémiques chez les animaux traités par **rtPA**.
- ✓ L'évaluation du **flux sanguin** a pu être réalisée immédiatement après l'induction de l'AVC grâce à l'imagerie **Doppler ultrasonore**, fournissant également une **valeur prédictive** du devenir des **lésions** ischémiques.
- ✓ Le nouvel outil d'évaluation, appelé « *functional Midline Shift* », a permis d'évaluer la **connectivité inter-hémisphérique**, qui s'est trouvée **améliorée** par l'administration de **rtPA**.
- ✓ Les **effets bénéfiques du rtPA** sur la récupération du **cortex somatosensoriel primaire** ont été mis en évidence grâce à un paradigme de stimulation des vibrisses.

Improving Stroke Prognosis Through Early Ultrasound Imaging of Functional Midline Shift in Awake Mice

Myriam ABIOUI-MOURGUES¹, Amandine BONNET², Canelle LEPILLIER¹, Camille BRODIN¹, Thomas DEFFIEUX², Denis VIVIEN^{1,3*}, Cyrille ORSET^{1*}.

¹ Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, GIP Cyceron, Institute Blood and Brain @ Caen-Normandie, UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Caen, FRANCE.

² Physics for Medicine Paris, INSERM, ESPCI Paris, CNRS, PSL Research University, Paris 70015, France

³ Department of Clinical Research, Caen-Normandie University Hospital, CHU Caen, Avenue de la Cote de Nacre, Caen, France

*: These co-authors have equally contributed.

Abstract

Preclinical trials are essential for testing new therapeutic strategies and understanding disease mechanisms. However, in stroke research, despite promising results in animal models, nearly all newly validated molecules have failed in clinical trials, leaving the reasons of this discrepancy unclear. We hypothesize that anesthetics commonly used in preclinical studies may significantly affect this translational roadblock. Indeed, anesthetic drugs can influence the development and progression of stroke lesions, potentially masking the true effects of pharmacological interventions. To address this issue, we developed an innovative fully awake animal model for ischemic stroke, allowing stroke induction and comprehensive follow-up using advanced imaging techniques including Magnetic Resonance Imaging (MRI), Doppler UltraSound (US) imaging and functional ultrasound imaging (fUS). In our study, we used recombinant tissue-type Plasminogen Activator (rtPA), the gold standard treatment for ischemic stroke, in awake mice. This approach demonstrated that thromboembolic stroke could be induced and effectively treated with rtPA without the influence of anesthesia, closely mimicking the clinical settings. Notably, by using fUS imaging, we introduced innovative readouts for assessing stroke outcomes, including a measure of brain functional Midline Shift (fMLS). This novel approach offers the potential to more accurately reveal therapeutic effects in preclinical studies, ultimately enhancing the success rate of clinical trials.

Introduction

Epidemiological data show that one in six people will have a stroke in their lifetime. Today, therapeutic strategies aim to restore Cerebral Blood Flow (CBF) as quickly and efficiently as possible, with a strong correlation between recanalization rates and functional outcomes (FO) (Rubin *et al.*, 2000 ; Aracki-Trenkic *et al.*, 2020). The overall acute recanalization rate after Intravenous Thrombolysis (IVT) with rtPA treatment is below 35% (Bhatia *et al.*, 2010 ; Coutinho *et al.*, 2017). This low efficacy of recanalization improves when combined with mechanical EndoVascular Thrombectomy (EVT) (Mulder *et al.*, 2018b), resulting in better patient outcomes at 90 days (Berkhemer Olvert A. *et al.*, 2015 ; Goyal *et al.*, 2016 ; Faizy *et al.*, 2023). However, access to these treatments remains limited to only 20% of patients for thrombolysis (Mikulik *et al.*, 2021) and less than 10% when combined with EVT (Goyal *et al.*, 2016). These new approaches have extended the therapeutic window to 4.5 hours for IVT (potentially up to 9 hours) (Psychogios *et al.*, 2020) and up to 24 hours for EVT (Nogueira Raul G. *et al.*, 2018), opening avenues for developing new strategies to protect or repair the brain.

Despite numerous experimental therapies identified in animal models of stroke (targeting thrombolysis, neuronal damage, spreading depolarization, and/or inflammation), all have failed in clinical translation (O'Collins *et al.*, 2006). Disappointed, pharmaceutical companies have dramatically reduced their interest in treating this disease, despite its major societal burden. We hypothesize that part of this failure is due to preclinical models of stroke, including surgery and brain imaging procedures, using anesthetics. Anesthetics significantly influence neurotransmitter receptor signaling (e.g., glutamate, GABA) (Atabak Najafi *et al.*, 1970), which drives neuronal survival (Schifilliti *et al.*, 2010) and affects neurovascular coupling (Masamoto et Kanno, 2012). They also impact heart rate, blood pressure, brain-body temperatures and CBF parameters known to influence brain outcomes and interfere with therapeutic strategies (Hoffmann *et al.*, 2016).

The main clinical imaging approaches to reveal CBF are Positron Emission Tomography (PET), Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT), dynamic Perfusion Computed Tomography (PCT), Magnetic Resonance Imaging (MRI): Dynamic Susceptibility Contrast (DSC), Arterial Spin Labeling (ASL), Perfusion-Weighted Imaging (PWI), and Transcranial Doppler ultrasonography (TCD) (Sadegh Moradi *et al.*, 2022). The recent developments of US Power Doppler imaging in one hand and related functional

UltraSound (fUS) imaging in another hand provide new opportunities for the future of stroke diagnosis and prognosis, allowing transcranial imaging in adult patients, with or without microbubbles as a contrast agent (Sonovue®). Additionally, US machines are portable and cheaper technology compared to other modalities, enabling imaging even in ambulances and continuous follow-up of patients from arrival at the emergency unit, during, and after treatments.

In the present study, we first developed and characterized an innovative experimental model of thromboembolic stroke in awake mice subjected to rtPA treatment. Using this model and a set of *in vivo* imaging modalities (MRI: T2, T2*, ASL); US Power Doppler imaging: Cerebral Blood Volume (CBV) monitoring, and fUS imaging (resting state functional connectivity, neurovascular coupling) also performed on awake animals, we evaluated early events following stroke onset and treatments. Briefly, our study introduces a fully awake animal model for ischemic stroke, allowing stroke induction and follow-up imaging without anesthesia, thereby better mimicking human clinical conditions. By utilizing functional ultrasound to measure brain fMLS, we propose an approach aiming to more accurately assess therapeutic effects in preclinical studies, potentially improving the success rate of subsequent clinical trials.

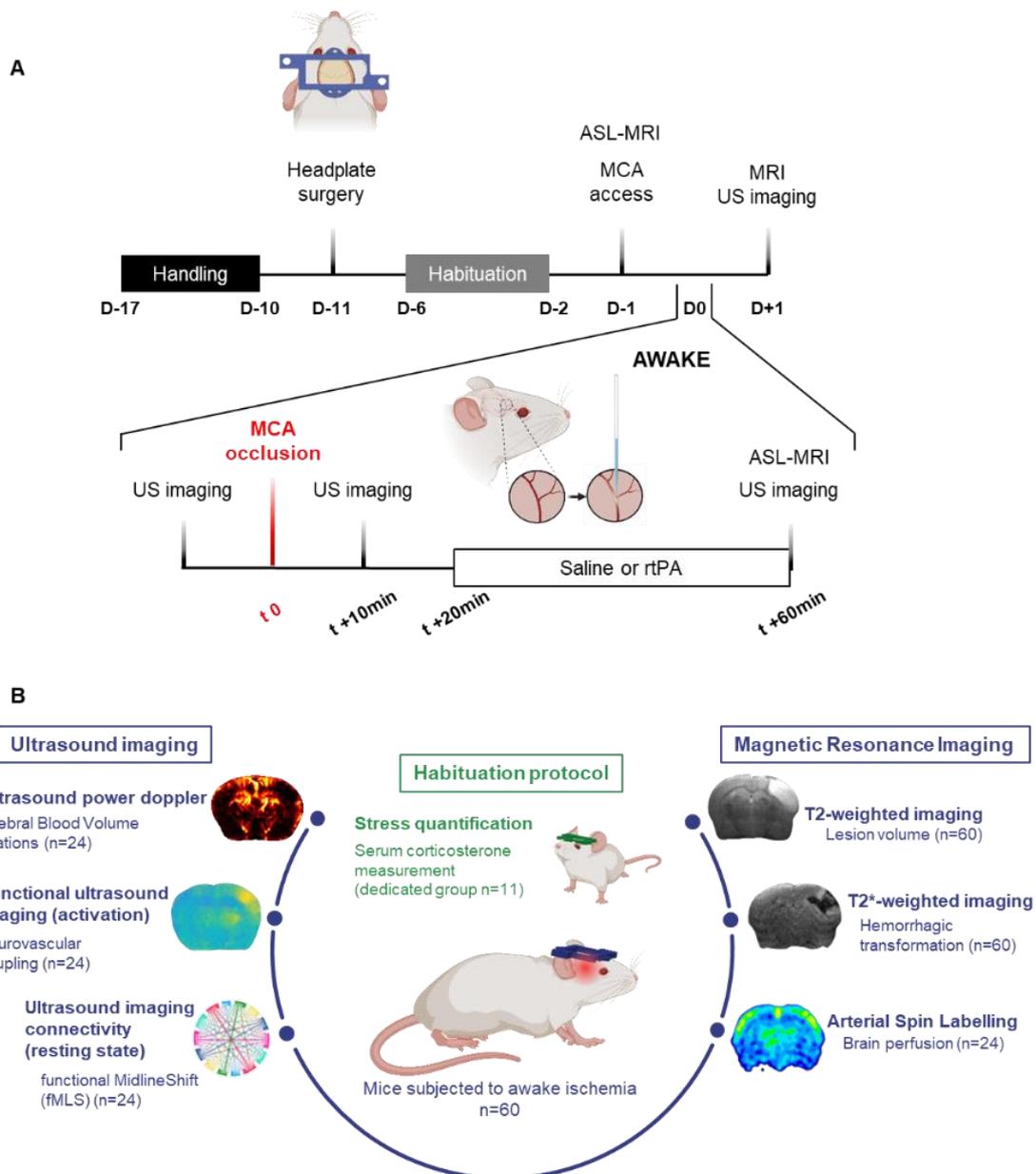


Figure 1: Thromboembolic stroke model in awake mice to bypass the translational roadblock to clinic: **A-** Schematic representation of the experimental procedures used in this study. The timeline illustrates the key steps, including mouse handling, head plate surgery, habituation to restraint and MRI noise, Middle Cerebral Artery (MCA) occlusion, and subsequent brain imaging sessions. **B** – Summary of animal allocation into different experimental conditions. One group (n=11) was dedicated to assess stress during habituation to awake procedures. A second group (n=60) underwent awake ischemia, followed by a comprehensive stroke characterization using MRI and ultrasound imaging.

Methods

Animals and Ethics: All experiments were conducted in compliance with French ethical law (Decrees 2013-118 and 2020-274) and the European Communities Council guidelines (2010/63/EU). The protocols were approved by the local ethics committee of Normandie (CENOMEXA), under the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS numbers #13412 and #35158). All *in vivo* studies were performed on male Swiss mice aged 6 to 8 weeks, weighing between 30 and 40 g (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). The animals were housed under a 12-hours light/12-hours dark cycle with free access to food and water, and a daily monitoring of their welfare was conducted. They were kept in cages with a minimal enrichment in accordance with ethics guidelines, with three mice per cage. Before the start of the protocol, each mouse was given one week to acclimate to the animal facility and the experimenter.

3D restraint system: The 3D restraint system comprises a head plate permanently attached to the mouse's skull, a restraint bar, and a harness. The head plate has a window (22 mm x 9 mm) designed for stroke induction surgery and ultrasound imaging. Two fixation areas on the lateral ends enable the head plate to be secured to the restraint bar using nylon screws and nuts (ref. TC02/008NYL and ECRHU02PA66, Cergy-Vis France). The restraint bar can be attached to the habituation device, the stereotaxic frame for surgery, the ultrasound imaging system, and the MRI cradle for imaging. Both the head plate and restraint bar are designed using Tinkercad (Autodesk) and 3D printed with the 3D UltiMaker3 printer in a non-magnetic and durable material (PLA). The harness (120 mm x 100 mm) is made from elastic fabric (Lycra) to restrict the animal's movements while remaining comfortable and easy to clean (Figure 2A, B).

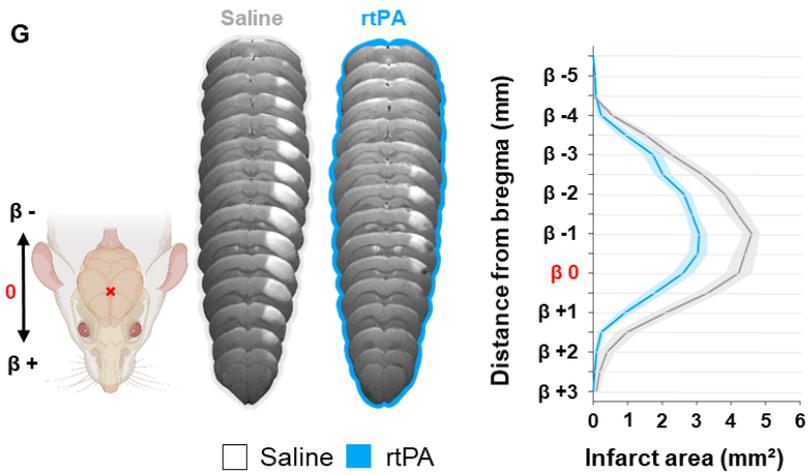
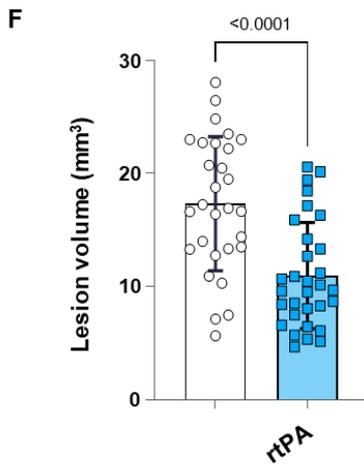
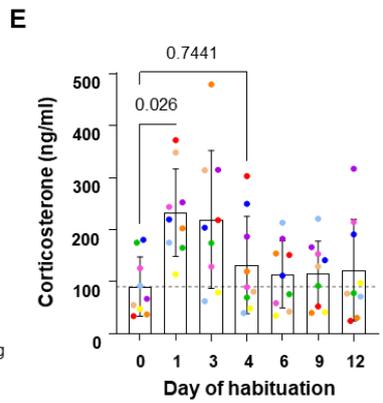
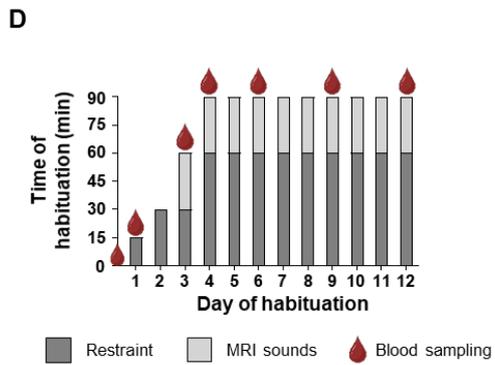
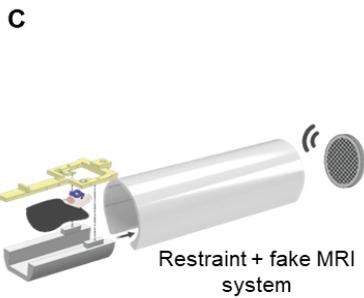
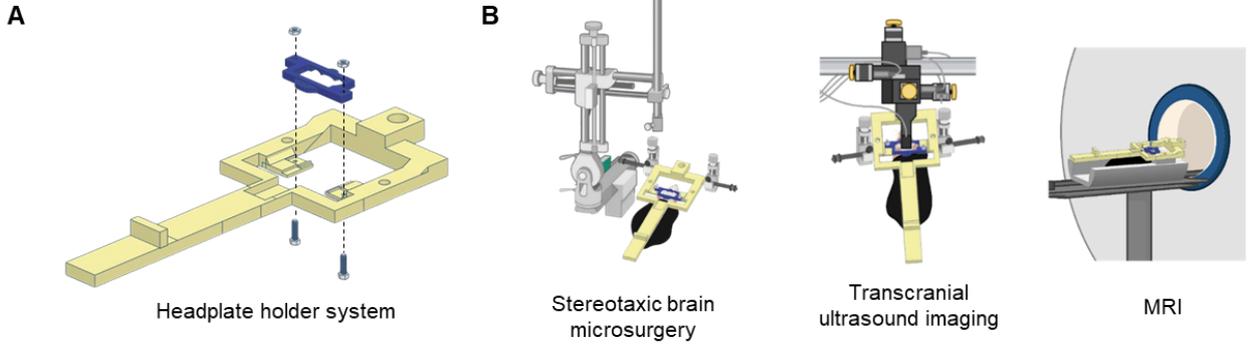


Figure 2: Awake MRI following a habituation protocol enables assessment of lesion progression and its reduction with the gold standard thrombolytic treatment rtPA: **A-** 3D-printed restraint device, consisting of a headplate fixed to the skull of the mouse and a restraint bar. **B-** The device facilitates awake surgery on a stereotaxic frame, as well as ultrasound imaging and MRI. **C-** Habituation setup designed to minimize stress during awake procedures. **D-** Timeline of the habituation protocol: Mice (n=11) were gradually habituated (Day 1: 15 min of restraint; Day 2: 30 min of restraint; Day 3: 30 min of restraint then 30 min in the factice MRI; Day 4-12: 60 min of restraint then 30 min in the factice MRI). Blood samples were collected on Days 0, 1, 3, 4, 6, 9, and 12 to measure serum corticosterone (CRH) levels. **E-** CRH levels measured at different days of habituation (n=9, one color per animal. Repeated measure one-way ANOVA, followed by a Dunnett. Data are presented as mean \pm SD). **F-** Final ischemic lesions at 24 h showed reduced lesion volume in animals treated with rtPA (saline, n=29; rtPA, n=31, two-tailed unpaired t-test). **G-** Posterior-to-anterior lesion distribution show a maximal lesion area at β -1 mm (saline, n=29; rtPA, n=31).

Headplate placement surgery: Mice were anesthetized with isoflurane (induction at 5%, maintenance between 1.5% and 2%) in a gas mixture of N₂O/O₂ (70%/30%), while receiving analgesic coverage with buprenorphine (0.1 mg/kg, subcutaneous). They were then placed in a stereotaxic device, with their temperature maintained at 37°C using a retro-controlled heating pad. Following aseptic preparation and local anesthesia (Xylocaine 5%, subcutaneous), a rostral-caudal skin incision was made on the head to fit the shape of the head plate. The skull surface was prepared for the head plate fixation applying hydrogen peroxide and then 70% ethanol. The head plate was cleaned with 70% ethanol, the primers from the dental cement kit were applied either on the head plate and the skull, and then rinsed with saline before fixing the head plate using dental cement, according to the manufacturer's instructions (Super-Bond Universal Kit – Sun Medical). Each animal was given a 3-day rest period between this surgery and the subsequent stages of the protocol.

Habituation protocol: A group of mice (n=11) was dedicated for stress assessment in order to validate the habituation process by measuring the blood corticosterone level (Figure 2D, E). The mice were gently handled for 1 minute in the palm of the hand over a span of 5 days to minimize experimenter-induced stress. During the habituation, mice were placed in the restraint system by attaching the head plate to the restraint bar with screws and nuts. The tail was gently secured with adhesive tape on the restraint bar, and the harness was placed around the mice and the restraint bar to restrict limb movements. The bar was then fixed to the mock MRI cradle. The mice remained in this system for 15 minutes on the 1st day and 30 minutes on the 2nd day. On the 3rd day, they stayed in the system for 30 minutes and were then placed in the mock MRI tunnel with the pre-recorded sequence soundtrack played at 90 dB (Figure 2C). From the 4th to the 12th day, mice were placed in the restraint system for 1 hour, followed by 30 minutes in the mock MRI with the sequence soundtracks.

Corticosterone assessment: Serum Corticosterone-Releasing Hormon (CRH) concentration was assayed 40 minutes after the end of restraint (n=9 mice due to 2 exclusions; days 0, 1, 3, 4, 6, 9, and 12 of habituation) using an ELISA kit (ADI-900-097, Enzo Life Science, Farmingdale, NY). Blood sampling was conducted before 6:00 PM to avoid the physiological peak of corticosterone. Blood was collected by snipping the tip of the tail under local anesthesia (Xylocaine 5%). The serum was obtained after 30 minutes of coagulation at room temperature, followed by two successive centrifugations at 1500 G for 15 minutes at 20°C, with gradual acceleration and deceleration. The collected serum was then stored at -80°C pending assay. After thawing at room temperature, serum samples were diluted 1:50 with the kit buffer and analyzed in duplicates. Absorbance was measured at 405 nm with a correction at 570 nm using a microplate reader (Asys UVM 340, Biochrom Ltd., Cambourne, England). The concentration for each sample was determined as the percentage bound from a standard curve with a detection range between 32 and 20 000 pg/ml.

Awake stroke: The preparation for awake stroke induction involves handling the mice for 5 days, followed by head plate fixation surgery, and then allowing 3 days of recovery and the first 4 days of habituation, as described previously. One day before stroke onset, mice were anesthetized with isoflurane (induction at 5% and maintenance between 1.5% and 2%) in a gas mixture of N₂O/O₂ (70%/30%) while receiving analgesic coverage with buprenorphine (0.1 mg/kg, subcutaneous) and placed in the 3D-printed restraint device, on a stereotaxic frame. Body-temperature was maintained at 37 °C using a retro-controlled heating pad. A catheter was then placed in the tail vein and secured using adhesive tape to allow awake treatment the following day. The Middle Cerebral Artery (MCA) approach was performed as described by Orset *et al.*, (2007, 2016): the masseter muscle was retracted, and a local craniotomy was performed on the temporal side of the skull to expose the MCA. The meninges were locally removed for future MCA occlusion. Subsequently, the craniotomy and the skull were protected by applying a silicone plaster (Kwik-Cast, World Precision Instruments). On Day 0, mice were placed in the awake restraint device on a stereotaxic frame without any anesthesia while receiving analgesic coverage with buprenorphine (0.1 mg/kg, subcutaneous). The silicone plaster was removed to expose the MCA. A precise pneumatic injection of 1 µL of murine thrombin (1 IU, Stago BNL) was carried out using elongated glass capillaries into the MCA lumen to induce *in situ* fibrin-rich thrombus formation. The fibrinolytic or the control vehicle (200 µl Actilyse® 10 mg/kg or saline solution, 10% bolus, 90% infusion, for 40 minutes) were injected 20 minutes after MCA occlusion through the catheter placed in the tail vein the day before.

Magnetic Resonance Imaging - Acquisitions: MRI studies were performed before (n=24), 1 hour (n=24) and 24 hour (n=60) after the stroke onset on a 7 Tesla/12 cm magnet (Bruker, Germany). Mice were placed in the restraint device adapted to the MRI cradle, and a 10 mm surface coil (Bruker, Germany) was placed on their head. T2-weighted images were acquired 24 hours after stroke onset using a 18 slices multiecho sequence (TE/TR 39.99 ms/3,500 ms, 4 averages) for ischemic lesion visualization (n=60). T2*-weighted images were acquired to control if animals underwent hemorrhage events using a 18 slices multiecho sequence (TE/TR 8.7064 ms/500 ms, 3 averages), 24 hours after the stroke onset (n=60). Arterial Spin Labelling (ASL) sequence was performed to measure brain perfusion on one slice at bregma -1 mm (TE/TR 79 ms/10224.65 ms, 1 average), before, 1 hour, and 24 hours after stroke onset (n=24). **Image treatment and analyses:** Lesion volumes were quantified from T2-weighted sequences by outlining the hyperintensity area characteristic of the lesion on each slice (0.5 cm thickness). The severity of potential hemorrhagic events was assessed on ImageJ using a scoring system. « 0 »: No hemorrhage on any slice. « 1 »: small hemorrhages in the parenchyma on at least one slice. « 2 »: massive hemorrhage in the parenchyma on at least one slice. A quantitative mapping of brain tissue perfusion was generated from the ASL sequences using Paravision (Bruker, Germany) and ImageJ with the plugin MRI File Manager (Bruker, Germany). Brain tissue perfusion average maps were generated using ImageJ with the plug-in TurboReg. For individual ASL brain perfusion values, a mask of the lesion observed in T2-weighted imaging was generated on the same slice of the ASL at the different time points. This mask was applied to the individual brain perfusion maps for each mouse, and the cerebral perfusion within the affected area was averaged.

Ultrasound Imaging - Acquisitions: All ultrasound imaging acquisitions were performed on one slice at bregma -1 mm before, 10 minutes after, 1 hour after and 24 hours after the stroke onset (n=24; rtPA-treated, n=12; controls, n=12) on an ultrafast scanner (Iconeus One), with the Icoscan acquisition software and an ultrasound probe (Iconeus IcoPrime, 15 MHz, 128 elements). Mice were placed in the restraint system on a stereotaxic frame. After removing the silicone plaster and cleaning the skull with saline, centrifuged ultrasound gel (2,500 G; 5 min) was applied before immersing the probe. **CBV monitoring:** A 5-minutes acquisition was performed on awake mice (n=24; rtPA-treated, n=12; control, n=12) to monitor variations in CBV. **Resting state connectivity:** A 5-minutes acquisition was performed on awake mice (n=24; rtPA-treated, n=12; control, n=12) without any stimulation. **Functional Ultrasound Imaging assessment:** Two 4.5 minutes acquisitions were performed on awake mice (n=24; rtPA-treated, n=12; control, n=12), during which the right and then left whisker were stimulated. The whisker were carefully trimmed to the same length before performing the stimulations (1 cm-long). Four 30-seconds stimulations were conducted using a cotton swab at a frequency of 4 Hz, with a 30-seconds rest period between each

stimulation. **Image treatment and analyses:** Artifact filtering to account for facial muscle contractions was applied to all acquisitions using Matlab. **CBV variations:** Three ROIs were defined to monitor cerebral perfusion: the ipsilateral cortex, which tracks vascular events in the entire cortex; the lesion area, which monitors vascular events in the ischemic tissue; and the non-infarcted cortex area, which tracks vascular events in the salvaged brain tissue. A lesion area mask was created on the corresponding slice from the T2-weighted MRI images at +24 hours and transferred onto the ultrasound acquisitions to accurately define the lesion area. The non-infarcted cortex area was obtained by subtracting the lesion area from the ipsilateral cortex area. The average CBV in each area was calculated over each 5-minute acquisitions, and the variation in CBV was obtained by expressing the mean CBV at each time point relative to the baseline CBV. **Resting state connectivity:** 14 ROIs were defined using the mouse brain Atlas included in the Icostudio software (anterior cingulate area, thalamus, caudoputamen, nose, barrel field, upper limb, and lower limb, both ipsilateral and contralateral). Connectivity matrices were generated by specifying the Pearson coefficient between CBV variations of each pair of ROIs using the same software. The coefficient values were retrieved to generate chord diagrams using Python3 with the libraries: pandas, numPy, OpenChord, SciPy, seaborn, matplotlib, and the modules glob and os. In the chord diagram, each ROI is represented by a segment of a circle, with its size proportional to the sum of its connections. These entities are connected by links whose width is proportional to the strength of the connection they represent. For each diagram of each mouse, the CBF-connectivity MidLine (ML) between the ROIs of the contralateral and ipsilateral hemispheres was drawn. The difference in connectivity is observed this MidLine Shift (MLS), expressed as an angle (positive for a loss of CBV correlations in the ipsilateral hemisphere in favor of the contralateral hemisphere, and negative in the opposite direction). **Functional ultrasound imaging:** The CBV response to whisker stimulation was monitored in the primary somatosensory cortex (barrel field) using the mouse brain Atlas included in the Icostudio software. For each animal at each time point, the four stimulation phases were averaged, as well as the four resting states, to obtain representative values of activation and resting state. The difference between the mean activation phase and the mean resting phase was then calculated. Z-score maps were generated using Matlab and subsequently averaged using ImageJ.

Statistical analysis: All values are expressed as mean \pm SD. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Initially, the distribution of all samples was assessed. A repeated measure one-way ANOVA followed by a Dunnett test was conducted (Fig. 2E), where each mean was compared to D0 as the control (n=9). A two-tailed unpaired t-test was used to compare the means between the Saline (n=29) and the rtPA-treated (n=31) groups (Fig. 2F). A repeated measures one-way ANOVA was performed to analyze the

differences in CBF across the baseline, +1 hour, and +24 hours (n=12 at each time) (Fig. 3B and C), the CBV variations compared to the baseline across +10 minutes, +60 minutes, and +24 hours (n=12 at each time) (Fig. 4D, E, F, G, and H), and the CBV variations in response to left and right whisker stimulation across the baseline, +10 minutes, +60 minutes, and +24 hours (n=12 at each time) (Fig. 7C, D, E, and F). Simple linear regression analysis was conducted to assess the relationship between the lesion volume observed in T2-weighted MRI at +24 hours and the CBF observed at +1 hour and +24 hours in both the ipsilateral infarct area and hemisphere in the Saline (n=12) and the rtPA-treated groups (n=12) (Fig. 3D, E, F, and G). The same test was used to evaluate the relationship between the area of lesion observed in T2-weighted MRI at +24 hours and the hypoperfused area seen on ultrasound Doppler imaging at +10 minutes and +60 minutes in the Saline (n=12) and the rtPA-treated groups (n=12) (Fig. 5B and C). Additionally, this analysis assessed the relationship between the CBV response to left whisker stimulation at +24 hours and the lesion volume measured on T2-weighted imaging at +24 hours in the Saline (n=12) and the rtPA-treated (n=12) groups (Suppl. 3C and D). The goodness of fit was evaluated using the coefficient of determination (R^2), and the significance regression was tested using an F-test. A Friedman test with multiple comparisons was performed to assess the difference in CBV variations from the baseline across +10 minutes, +60 minutes, and +24 hours in the Saline group (n=12) (Fig. 4C). Finally, a two-way ANOVA was performed to evaluate the interaction and main effects of time (+10 minutes, +60 minutes, and +24 hours) and treatment (Saline n=12, or rtPA n=12) on the MidLine Shift deviation from the baseline (Fig. 6C). Post hoc comparisons were conducted using Tukey's multiple comparisons test to identify specific differences between groups. Differences were considered statistically significant for a probability value $p < 0.05$.

Results

A Thromboembolic Stroke Model, Performed in Awake Conditions, Responsive to the Gold Standard Treatment rtPA. To proceed with an awake stroke model in mice and associated *in vivo* brain imaging, we first developed a new device allowing the placement of a mouse in a stereotaxic frame for surgery performed while awake. This system is also compatible with maintaining awake animals in our *in vivo* setups for MRI and US imaging (Power Doppler and fUS) (Fig. 2B). Briefly, a two-piece 3D-printed system was created, including a head plate permanently fixed to the skull of the mice, which is then attached to a complementary restraint device (Fig. 2A).

Prior to all procedures, mice were subjected to a habituation protocol in an environment consistent with the rest of the study (surgery room, MRI, and US imaging). They were also exposed to noises made by the machines, especially the MRI (Fig. 2C). To validate the habituation procedure, serum corticosterone (CRH) concentrations were assayed each day 40 minutes after the end of restraint (Fig. 2D and E). As expected, although at the beginning of the habituation protocol, mice showed

increased levels of serum CRH compared to baseline, these levels returned to baseline after 4 days of the protocol (90.57 ng/ml \pm 57.23 at Baseline, 232.8 ng/ml \pm 83.91 at Day 1, and 132.1 ng/ml \pm 93.49 at Day 4, $p=0.026$ Baseline vs Day 1, and $p=0.7441$ Baseline vs Day 4. $F=4.003$, $DF=6$, $n=9$, $p=0.015^*$).

Under these conditions, a thromboembolic stroke was induced using local infusion of thrombin in the MCA, as previously reported by Orset *et al.* (2007, 2016), but with stroke onset occurring in awake mice (see methods for details) (Fig. 1A). rtPA treatment was administered (Alteplase®, 10 mg/kg, 10% bolus and 90% infusion) intravenously 20 minutes after stroke onset. Ischemia-induced brain lesions were characterized in all animals ($n=60$; control, $n=29$; rtPA, $n=31$) by T2-weighted MRI 24 hours after stroke induction. Mice treated with the gold standard rtPA thrombolysis 20 minutes after stroke onset showed smaller lesion volumes (-36.7%, $p<0.0001^{****}$, $n=31$) compared to those receiving saline solution (control: $17.33 \text{ mm}^3 \pm 5.92 \text{ mm}^3$, $n=29$; rtPA= $10.97 \text{ mm}^3 \pm 4.7 \text{ mm}^3$. $t=4.624$, $DF=58$, $n=60$) (Fig. 2F).

In a control experiment, we compared lesion volumes between awake mice subjected to thromboembolic stroke and anesthetized animals (Suppl. 1A). The results reveal smaller ischemic lesion volumes in awake animals versus anesthetized animals (-26.95%; anesthetized $21.92 \text{ mm}^3 \pm 10.13 \text{ mm}^3$, $n=30$; awake $16.01 \text{ mm}^3 \pm 9.79 \text{ mm}^3$, $n=26$, $P=0.03^*$). The gold standard thrombolytic treatment for ischemic stroke was also tested. We revealed a reduction in lesion volumes in the rtPA groups for both anesthetized and awake animals (anesthetized: -52.49%, anes-Saline $20.69 \text{ mm}^3 \pm 10.8$; anes-rtPA $9.83 \text{ mm}^3 \pm 7.13$, $p=0.013^*$; awake: -56.6%, awake-Saline $16.13 \text{ mm}^3 \pm 10.54$; awake-rtPA $7.00 \text{ mm}^3 \pm 5.37$, $p=0.025^*$), with no difference between anesthetized and awake groups (saline or rtPA) (Suppl. 1B and C).

Awake Brain Imaging Following Thromboembolic Stroke and rtPA Treatment. We then performed awake multimodal brain imaging following ischemic stroke and treatment, including MRI (T2 and T2* at +24 hours, ASL before stroke onset, 1 hour, and 24 hours post-stroke), and US imaging (Power Doppler and fUS imaging before stroke onset, 10 minutes, 60 minutes, and 24 hours post-stroke (Fig. 1A and B). Because the distribution of the ischemic lesion reveals a maximum lesion area 1 mm posterior to the bregma (Fig. 2G), this section was selected to characterize cerebral perfusion using ASL MRI ($n=24$; control, $n=12$; rtPA-treated, $n=12$) to ensure observation of an ischemia-affected zone in all animals.

Average maps of cerebral perfusion were constructed to illustrate changes in Cerebral Blood Flow (CBF) before stroke onset, 1 hour post-stroke following the completion of rtPA infusion, and 24 hours post-stroke ($n=12$ per map) (Fig. 3A). Reductions in CBF were observed 1 hour after stroke onset in the infarct area of mice treated with either saline infusion or rtPA (-66.53%, 29.31

ml/100g/min \pm 9.895 ml/100g/min for control group and -49.03%, 46.48 ml/100g/min \pm 36.55 ml/100g/min for the rtPA-treated group at 1 hour. Control group: $F=48.63$, $DF=2$, $n=12$, $p<0.0001$ ****. rtPA-treated group: $F=11.67$, $DF=2$, $n=12$, $p=0.0024$ **). Conversely, hyperperfusions in the ischemic region were observed 24 hours post-stroke in mice receiving either saline or rtPA treatment (Fig. 3 B and C) (+51.22%, 132.8 ml/100g/min \pm 45.08 ml/100g/min for control group and +47.49%, 134.5 ml/100g/min \pm 82.9 ml/100g/min for the rtPA-treated group at 24 hours).

The correlations between final lesion volumes and CBF levels measured early (1 hour post-stroke) or late (24 hours post-stroke) were then investigated (Fig. 3 D, E, F, and G). Although, no correlation between lesion volumes and CBF was observed in the control ischemic group, regardless of the time of CBF measurement (Fig. 3 D, E, F, and G), a negative correlation was noted between the lesion volume observed 24 hours post-stroke, and the CBF measured 1 hour post-stroke in both the lesion area and the whole ipsilateral hemisphere, in animals undergoing rtPA treatment ($p=0.0285$ * $R^2=0.3953$, $n=12$, and $p=0.003$ ** $R^2=0.6014$, $n=12$ respectively). No correlation with the lesion volumes measured at 24 hours was observed for the two groups when CBF was measured at 24 hours (Fig. 3 F and G).

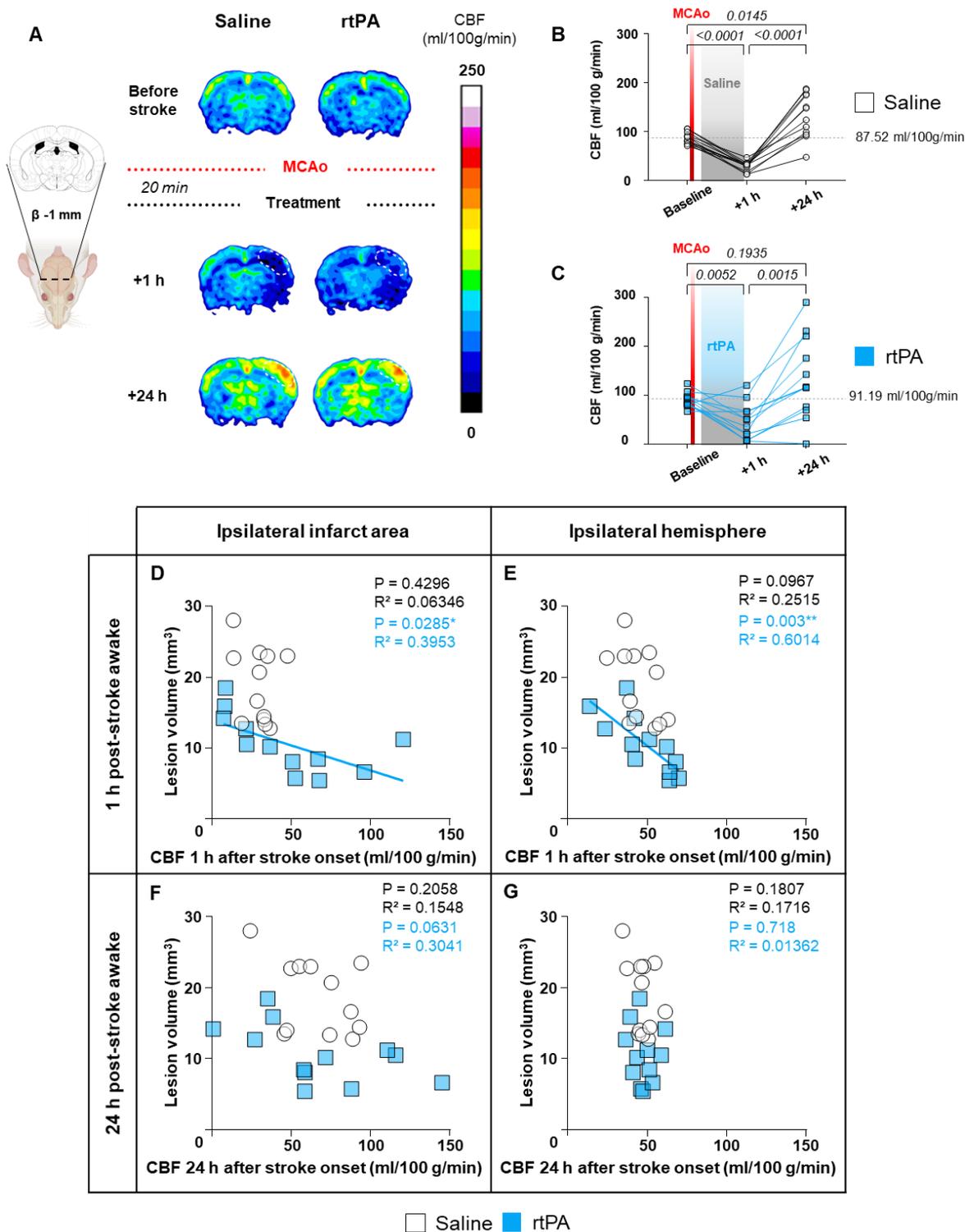


Figure 3: Brain perfusion MRI early after stroke is a predictive factor for lesion volume outcome:

A- Average brain perfusion maps in both control and rtPA-treated mice (n=12 per map). **B, C-** CBF evolution in the infarct area. 1 h after stroke, both control and rtPA-treated mice exhibited hypoperfusion. At 24 h, only control mice showed significant hyperperfusion compared to baseline (baseline: 87.52 ml/100g/min in control mice; 91.19 ml/100g/min in rtPA treated mice. n=12 animals per group, repeated measures one way ANOVA. Data are presented as individual values for clarity). **D, E, F, G-** Lesion volume at 24 h showed a negative correlation with the early brain perfusion in rtPA treated animals only (n=12 animals per group, simple linear regression).

These data reveal that the measurement of ASL early after stroke onset could be predictive of stroke outcome (lesion volume at 24 hours), but only in animals subjected to thrombolysis and when performed early after treatment and stroke onset (i.e. 1 hour).

Early Ultrasound Imaging of Cerebral Blood Volumes as a Predictor of Stroke Outcome and Response to Thrombolytic Treatment.

Using Power Doppler US imaging, we evaluated CBV variations before and following stroke onset at several time points: 10 minutes, 1 hour, and 24 hours in both the control group and the rtPA-treated group (Fig. 4). Our data revealed an early drop in CBV 10 minutes after stroke onset in the future lesion area (control group: -59.23%, 40.77% from baseline \pm 12.92%, n=12; rtPA-treated group: -61.83%, 38.17% from baseline \pm 17.56%, n=12). This drop in CBV was partially reversed only in the rtPA-treated group at 1 hour of treatment (starting 20 minutes after stroke onset, with a 10% bolus and 90% infusion over an additional 40 minutes) (+87.27%, 71.48% from baseline \pm 30.61%, p=0.0165*, n=12 for the rtPA-treated group, versus +31.4%, 53.57% from baseline \pm 14.62%, p=0.0506, n=12 for the control saline group). Interestingly, hyperemia was observed 24 hours after stroke onset in both the control and rtPA-treated groups (+222.54%, 131.5% from baseline \pm 64.56%, p=0.0018**, n=12 in the control group, versus +347.21%, 170.7% from baseline \pm 56.86%, p<0.0001****, n=12 in the rtPA-treated group) (control saline group: F=20.35, DF=2, n=12, p=0.0006***; rtPA-treated group: F=58.24, DF=2, n=12, p<0.0001****) (Fig. 4 E and F), consistent with the ASL-MRI data presented above (Fig. 3). This hyperemia was observed throughout the entire ipsilateral cortex, including both lesioned and non-lesioned areas (Fig. 4 C, D, E, F, G and H).

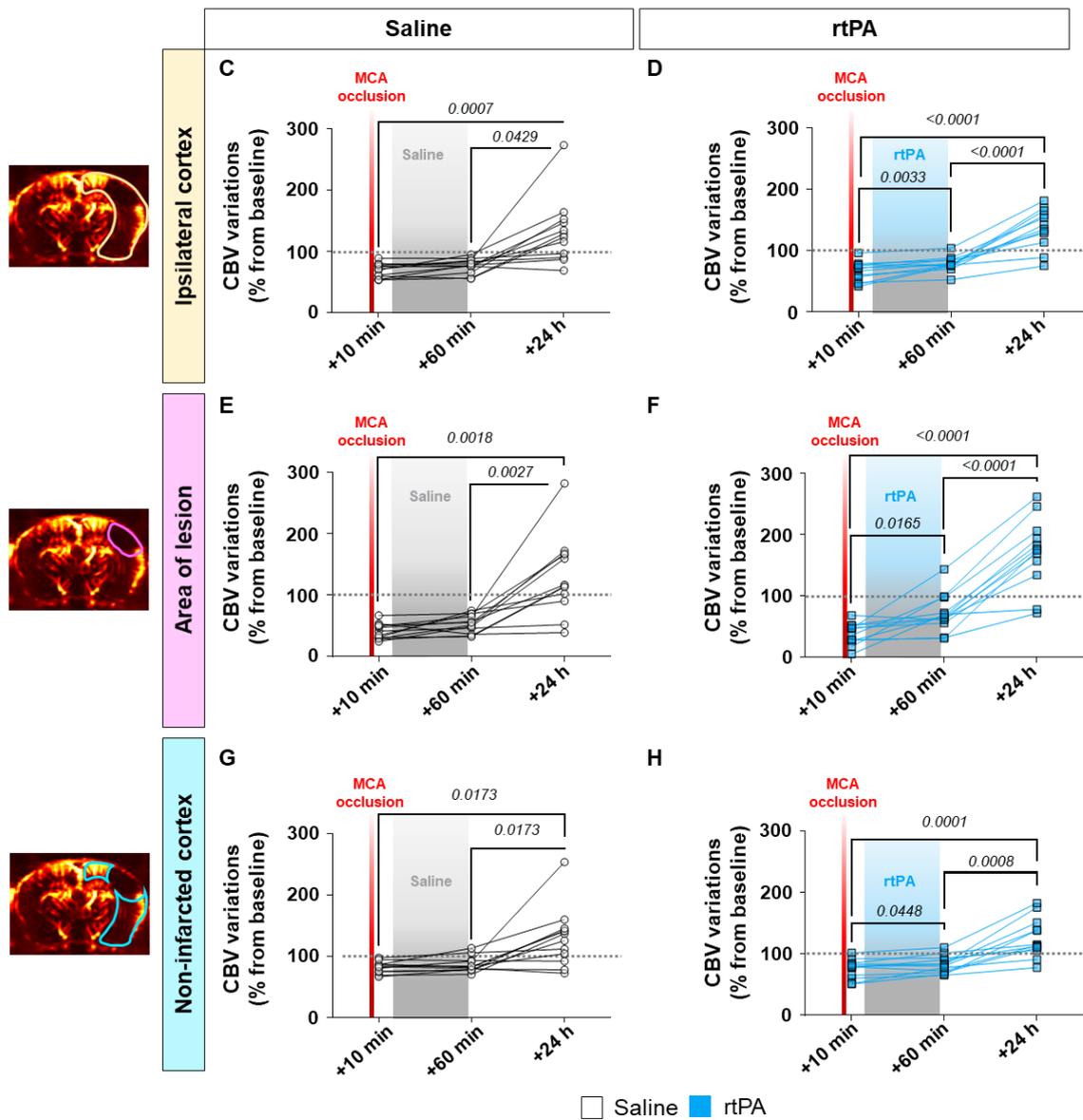
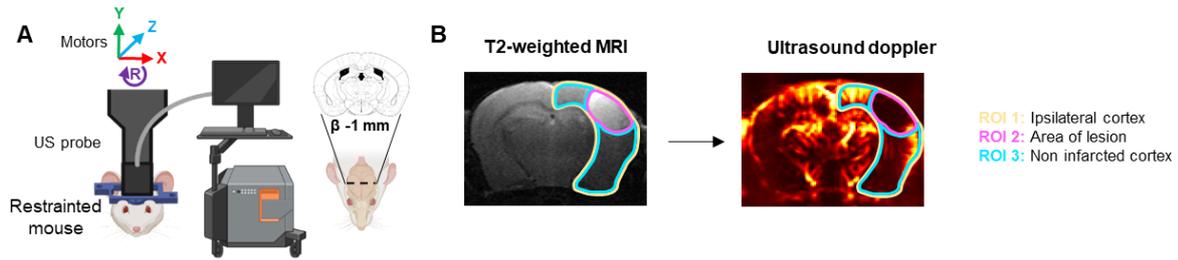


Figure 4: Awake doppler imaging enables CBV monitoring in 3 strategic brain areas: **A-** Experimental setup for ultrasound acquisitions. Awake mice are restrained in the device on a stereotaxic frame. An ultrasound probe connected to the system (Iconeus One) and mounted on a 4-axis motor enables monitoring of the brain perfusion. **B** – Method for defining ROIs (Regions Of Interest) for CBV monitoring: ROIs are delineated on +24 h T2-weighted MRI scans and then transferred onto the ultrasound acquisition for each animal (covering the whole ipsilateral cortex, lesion site, and non-infarcted cortex). **C, D, E, F, G, H-** Evolution of brain perfusion after stroke in both control and treated mice. CBV evolution showed no reperfusion in control mice at 1 h, in contrast to those treated with rtPA. However, all mice experienced hyperperfusion 24 h after stroke onset (n=12 animals per group, parametric or non-parametric repeated measures one-way ANOVA. Datas are presented as individual values for clarity).

We then plotted the lesion areas measured at 24 hours by MRI against the hypoperfused areas measured by US Power Doppler at either 10 minutes or 1 hour after stroke onset (Fig. 5). At +10 minutes, i.e., before any treatments, a significant correlation was observed between the hypoperfused area revealed by US Power Doppler, with the final lesion areas for both control and rtPA-treated groups (control: $R^2=0.6465$, $p=0.0016^{**}$, $n=12$; rtPA: $R^2=0.6261$, $p=0.0022^{**}$, $n=12$) (Fig. 5 B). Interestingly, this correlation is still observed at 1 hour after stroke onset in the control saline group (Saline: $R^2=0.4713$, $p=0.0137^*$, $n=12$) (Fig. 5 C), but not observed when hypoperfused area was estimated in the rtPA-treated group (rtPA: $R^2=0.01$, $p=0.7607$, $n=12$) (Fig. 5 C).

These data reveal that the measurement of CBV early after stroke onset (+10 minutes and +1 hour) using US imaging could be predictive of stroke outcome (lesion volume at +24 hours), but only in animals not subjected to a thrombolytic treatment. These data also suggest that in animals subjected to rtPA treatment, the restoration of CBV by rtPA is not the sole contributor to the final lesion volume.

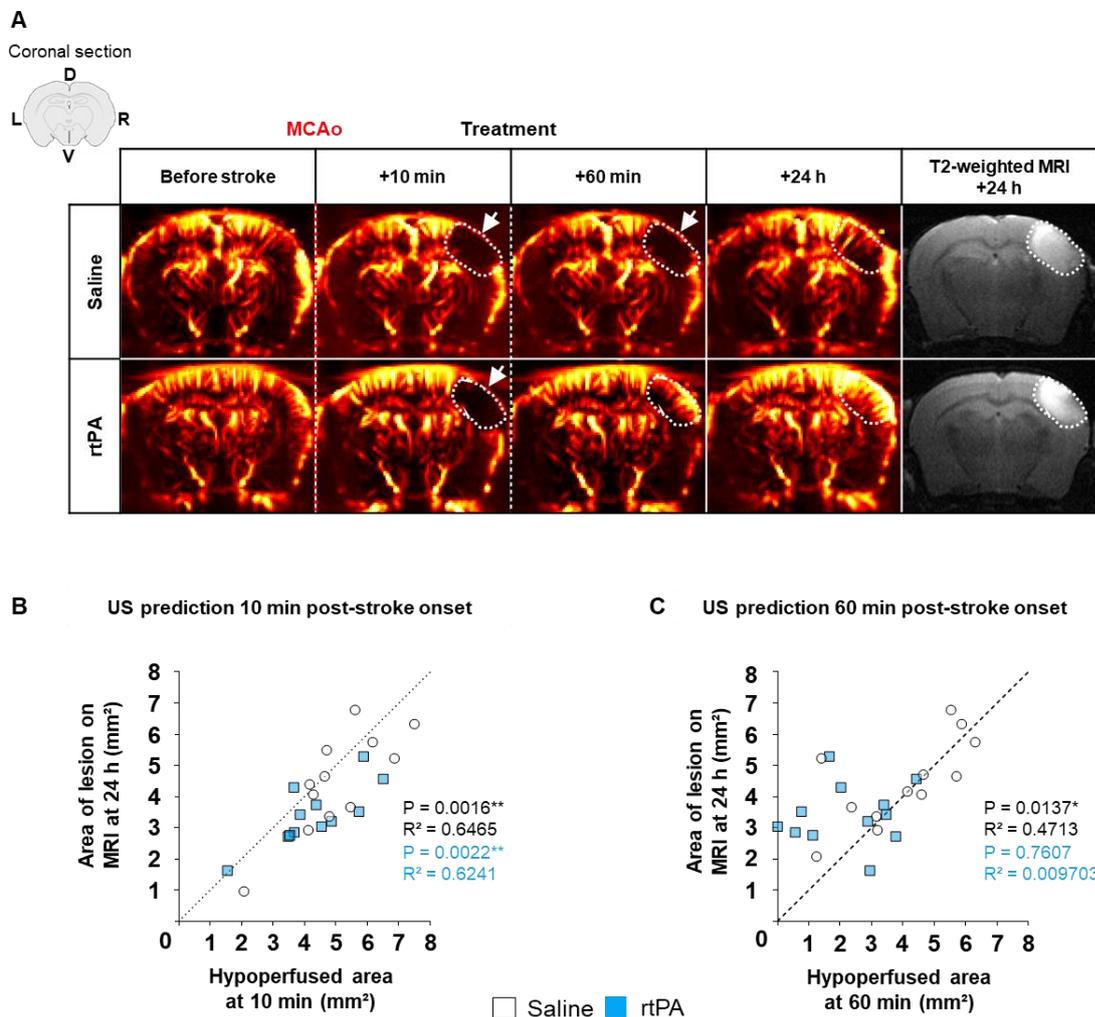


Figure 5: Awake UltraSound (US) Power Doppler imaging allows for MCAo control, and as a predictive modality for ischemic lesion outcomes: A- US Power Doppler imaging of brain perfusion before and after MCAo, and the corresponding area of lesion 24 h after stroke onset on T2-w MRI. US Power Doppler imaging reveals hypoperfusion in the cortices subjected to MCAo, reperfusion from 60 min in rtPA-treated mice, and partial reperfusion at 24 h in control mice, as well as the relationship between the early hypoperfused area and the lesion area at 24 h. **B-** Prediction of the lesion area by US Power Doppler imaging 10 min after MCAo. The hypoperfused area in US Power Doppler imaging is predictive of the final infarcted territory in both control and rtPA-treated mice (n=12 animals per group, simple linear regression). **C-** Following rtPA treatment, the hypoperfused area decreased, but not the final infarct territory, suggesting the involvement of additional mechanisms (n=12 animals per group, simple linear regression).

Functional Ultrasound Imaging to Predict Stroke Outcomes. We evaluated two paradigms of functional *in vivo* brain imaging using ultrasound modality on awake mice from 10 minutes to 24 hours after stroke onset and rtPA treatment (Fig. 1). Firstly, we conducted intra- and interhemispheric resting state connectivity mapping between seven brain areas involved in motor functions (Fig. A). Based on this mapping, we determined a functional Midline (fML) for each animal at 10 minutes, 1 hour, and 24 hours after stroke onset and treatment, compared to their baseline fML before stroke (Fig. 6 B and C). The data revealed an initial fML Shift (fMLS) affecting the ipsilateral brain areas ($12.63^\circ \pm 18.73^\circ$ in the saline control group, and $11.38^\circ \pm 9.71^\circ$ in the rtPA-treated group) at 10 minutes post-stroke, with a trend towards recovery at 1 hour in the rtPA-treated group ($3.625^\circ \pm 12.5^\circ$ for the rtPA-treated group compared to $14.75^\circ \pm 9.389$ for the saline group) (Fig. 6 C, D, E, F, and G) and a significant recovery at 24 hours compared to 10 minutes post-stroke only in rtPA-treated animals ($-1^\circ \pm 8.631$ for the rtPA-treated group, $p=0.029^*$, compared to $5.25^\circ \pm 9.75^\circ$ for the Saline group, $p=0.4218$. $F=5.256$, $DF=2$, $n=24$, $p=0.0118^*$) (Fig. 6 C, D, H, and I).

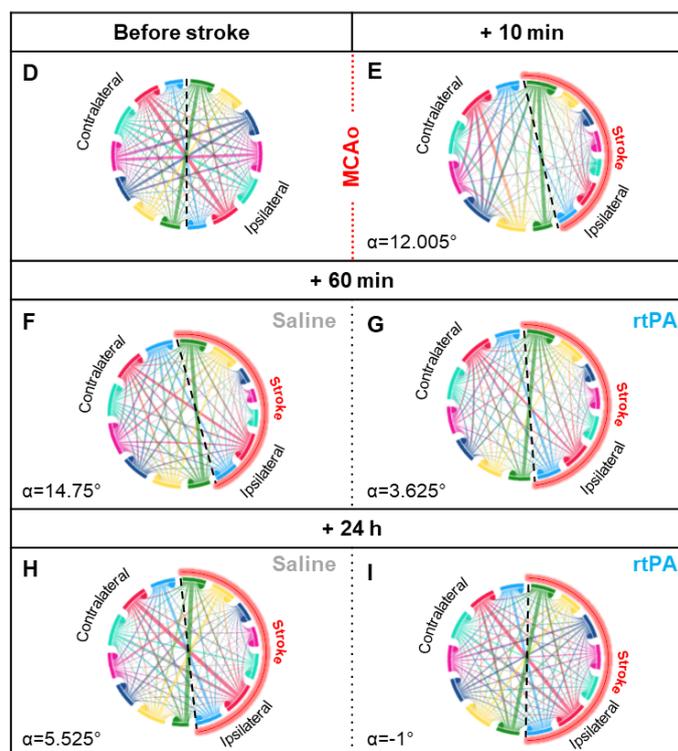
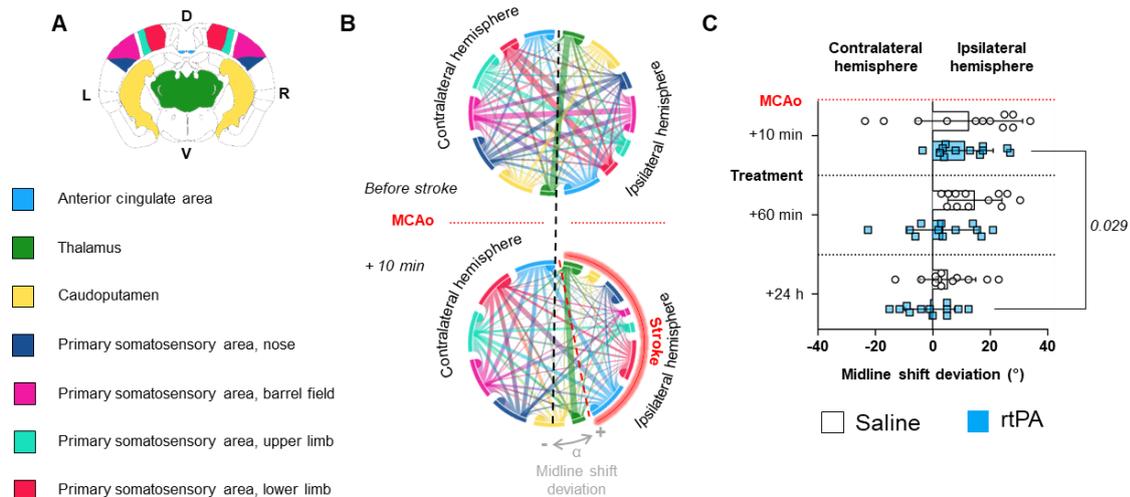


Figure 6: CBV variations reflect neuronal activity, enabling the correlation of the functioning of two brain areas: **A-** Mapping of 7 brain areas involved in motor functions for the assessment of the resting state connectivity. **B-** Functional Middle Line Shift (fMLS) on a representative mouse after MCAo. The positive angle α indicates a loss of function of the ipsilateral hemisphere. **C-** fMLS at different times after stroke in both control and rtPA-treated animals. The gold standard rtPA thrombolysis restored the fMLS position 24 h after stroke onset (n=12 animals per group, repeated two-ways ANOVA. Data are represented as mean \pm SD). **D, E-** Average connectivity diagrams before and after MCAo. The fMLS deviated at the expense of the ipsilateral hemisphere 10 min after MCAo (n=24 animals per diagram). **F, G-** Immediately after the treatment, the fMLS in rtPA-treated mice has recentered (n=12 animals per diagram). **H, I-** 24 h after stroke, the fMLS recentered in both control and treated animals (n=12 per diagram).

Secondly, we employed a paradigm of neurovascular coupling induced by whisker stimulation and measured the induced local hyperemia using US imaging in awake mice from 10 minutes to 24 hours after stroke onset. Stimulation of left and right whisker allowed comparison of the activation of lesioned and non-lesioned somatosensory cortices (Fig. 7 A and B). Stroke induced a severe reduction in the neurovascular response in the ipsilateral somatosensory cortex, with no significant recovery in the control saline group (-100.46%, -0.04306% CBV increase \pm 3.296% at 10 minutes, $p=0.0038^{**}$; -83.44%, 1.549% CBV increase \pm 3.316% at 1 hour, $p=0.0059^{**}$; and -88.53%, 1.073% CBV increase \pm 1.984% at 24 hours, $p=0.0004^{***}$ - i.e. significantly different when compared to baselines before stroke. $F=16.24$, $DF=3$, $n=12$, $p<0.0001^{****}$) (Fig. 7 C). In contrast, the rtPA-treated group showed functional recovery at 24 hours after stroke onset (-78.99%, 1.936% CBV increase \pm 5.947% at 10 minutes, $p=0.0773$; -82.47%, 1.615% CBV increase \pm 2.634% at 1 hour, $p=0.004^{**}$; and -63.13%, 3.397% CBV increase \pm 4.265% at 24 hours, $p=0.0932$ - i.e. not different when compared to baseline before stroke. $F=7.224$, $DF=3$, $n=12$, $p=0.0058^{**}$) (Fig. 7 D). No significant changes were observed in the contralateral hemisphere for all groups (Fig. 7E and F). Interestingly, in the rtPA-treated group, hyperemia induced by whisker stimulation at 24 hours is negatively correlated with the final lesion volume measured at 24 hours ($R^2=0.3346$, $p=0.0488^*$, $n=12$) (Suppl. 3 D), in contrast to the saline-control group ($R^2=0.0008115$, $p=0.93$, $n=12$) (Suppl. 3 C).

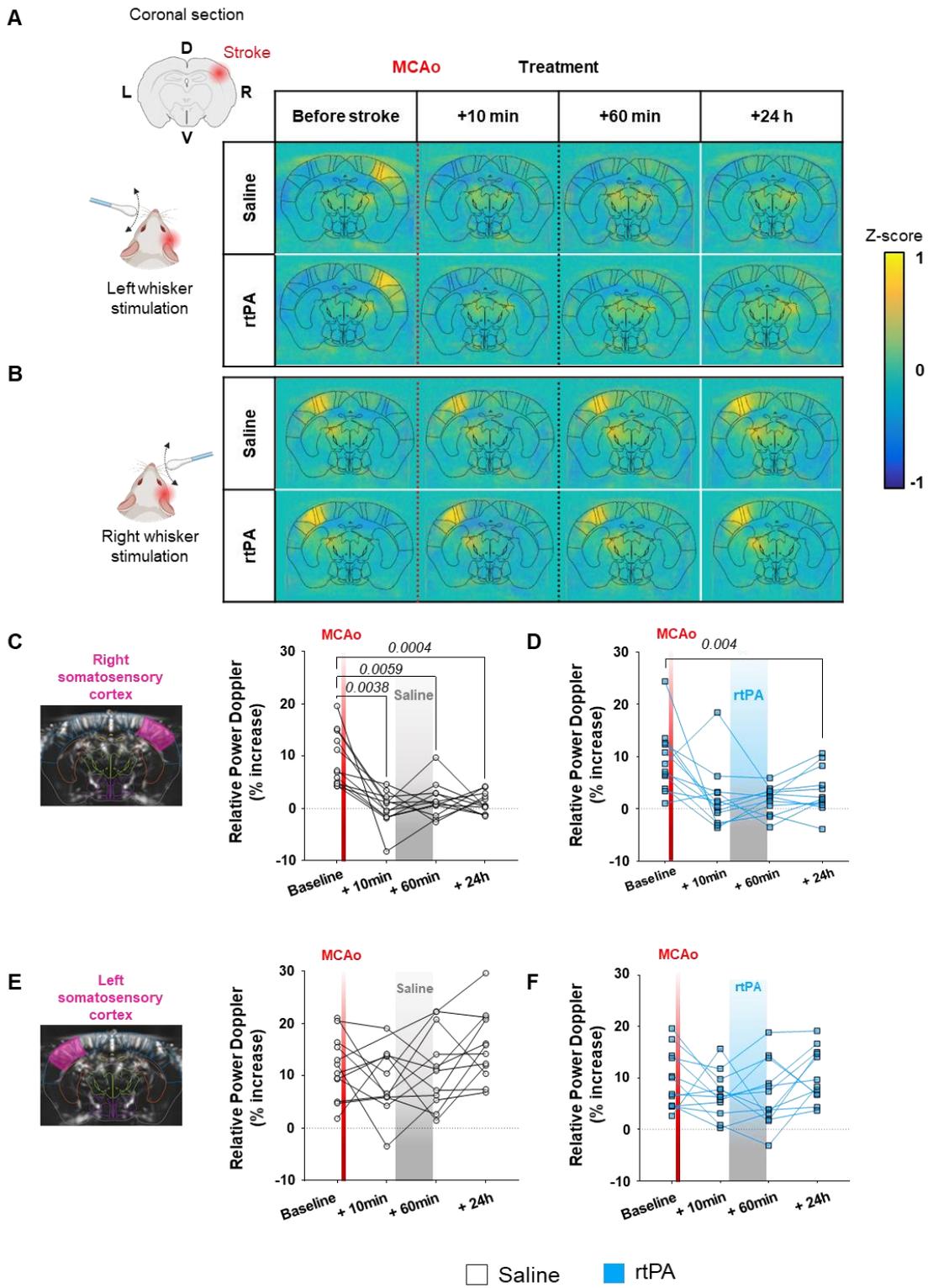


Figure 7: Neurovascular response to a sensory task is impacted after a stroke in the affected brain area. A, B- Average z-score maps of neurovascular activation in the corresponding somatosensory cortex in response to whisker stimulation. Only the right somatosensory cortex showed a loss of function after MCAo, while the function of the left one appears to stay intact (n=12 animals per map). **C, D, E, F-** Vascular response in the corresponding primary somatosensory cortex to left (**C** and **D**) and right (**E** and **F**) whisker stimulation, before and after stroke in both control and rtPA-treated animals (n=12 animals per group, repeated measures one-way ANOVA. Data are represented as individual values for clarity). **C-** Control animals exhibited a reduction of the neurovascular response in the ipsilateral somatosensory cortex, with no recovery. **D-** rtPA-treated animals showed no difference between the neurovascular activation before, and 24 h after stroke onset. **E, F-** The neurovascular integrity in the contralateral somatosensory cortex was preserved in both control and treated animals after stroke onset.

These data reveal that the measurement of fMLS (resting-state brain connectivity) or hyperemia induced by whisker stimulation (neurovascular coupling) using fUS imaging early after stroke onset (10 minutes and 1 hour) could be highly predictive of stroke outcome (lesion volume at 24 hours), even after a thrombolytic treatment. Thus, using awake stroke model and awake imaging procedures are mandatory to perform such relevant functional imaging readouts.

Discussion

Up to now, the only FDA-approved pharmacological treatment for ischemic stroke remains thrombolytic therapy, using recombinant tissue plasminogen activator (rtPA, Actilyse®) (Nagaraja et Adams, 2014). In clinical practice, its efficacy is dramatically enhanced when combined with endovascular thrombectomy (EVT) (Mulder *et al.*, 2018b). To improve recovery from ischemic stroke, successful cerebral arterial recanalization and tissue reperfusion are critical prognostic factors for favorable functional outcomes (Aracki-Trenkic *et al.*, 2020 ; Rubin *et al.*, 2000). Accordingly, preclinical investigations evaluating new treatments for ischemic stroke should use models in which deficits in tissue recanalization and/or reperfusion correlate with final lesion volumes and functional outcomes to mimic clinical situations.

Despite positive preclinical evaluations, all new therapeutics for ischemic stroke have failed in clinical trials (O'Collins *et al.*, 2006). One limitation among others of current preclinical models is that they are performed on anesthetized animals, at the time of stroke onset, treatment, and functional readouts, especially when using *in vivo* brain imaging (Planas, 2010). To improve the translation of findings to clinical settings, we postulate that preclinical evaluations should be performed on awake animals, including during stroke onset, treatment and functional readouts. Additionally, there is a need for more relevant functional readouts in preclinical models for diagnosis and prognosis of ischemic stroke.

We previously generated and characterized a model of focal thromboembolic cerebral ischemia in mice, initiated by the generation of a fibrin-rich clot formed *in situ* (Orset *et al.*, 2007). Using this

model, we demonstrated that that gold standard thrombolytic therapy, rtPA, when infused early after stroke onset (within the 90-minute therapeutic window), led to beneficial effects on lesion volumes and on some neuroscores (Orset *et al.*, 2016). We also demonstrated the sensibility of the model to the newly approved thrombolytic treatment, Tenecteplase (TNK), inducing beneficial effect on lesion volume (Correa-Paz *et al.*, 2024).

Anesthetics are well known to directly or indirectly modulate numerous pathways involved during stroke including excitotoxicity, inflammation, brain metabolism, cerebral blood flow thus influencing functional outcomes (Archer *et al.*, 2017). Interestingly, our present model of thromboembolic stroke performed awake, exhibits most clinical features, allowing reperfusion with rtPA and functional brain imaging. Indeed, this model is compatible with several modalities of awake *in vivo* brain imaging, such as MRI and ultrasound imaging. Especially, our data using ultrasound imaging revealed that early measurement of either resting state brain connectivity or measuring hyperemia induced by whisker stimulation could predict stroke severity and outcomes. Using ultrasound imaging, we thus demonstrated the relevance of using functional *in vivo* brain imaging paradigms to evaluate treatment efficacy. Indeed, we show here that resting-state connectivity mapping can be used very early after stroke treatment (up to 10 minutes) to evaluate stroke severity and treatment efficacy using a novel index called functional Midline Shift (fMLS). We also demonstrated the use of neurovascular coupling induced by whisker stimulation to reveal functional recovery 24 hours after stroke onset, including responsiveness to rtPA treatment.

Interestingly, in clinical practice, anatomical Midline Shift (MLS) is observed on MRI or CT scans as the displacement of brain structures from their normal midline due to edema or hemorrhage. In cases of ischemic stroke, an MLS greater than 3 mm is associated with poor outcomes (McKeown *et al.*, 2022) and serves as a predictor of clinical prognosis in patients undergoing emergency endovascular treatment (Xu *et al.*, 2023) or surgical decompression (Tu *et al.*, 2012). However, anatomical MLS reflects physical displacement without providing insight into the functional impact on brain activity or cognition. This limitation highlights the need for complementary functional assessments to better understand brain connectivity and overall neurological status. We therefore propose fMLS as a new cognitive assessment tool that supplements existing evaluation methods.

Performing stroke in non-anesthetized mice has long been a goal in stroke research to eliminate the confounding neuroprotective impact of anesthetics, improving the translational relevance of our models. With our present model, we have achieved this goal. Our present experimental approach combines a reproducible animal model of stroke induced by *in situ* thrombin injection, which generates a thrombin-rich clot (Orset *et al.*, 2007), with a method that eliminates the effects of anesthetics. Additionally, it could be adapted to a model induced by the local application of FeCl₃, resulting in platelet-rich clot formation (Karatas *et al.*, 2011). This opens up possibilities for

preclinical research to test new therapeutic strategies across different stroke etiologies in patients. One remaining limitation is the surgical approach involving a small craniectomy to induce *in situ* clot formation. The recently proposed tMPS model by the group of C. Iadecola could address this issue if combined with our *in vivo* brain imaging procedures, including functional readouts (Marks *et al.*, 2024).

Conclusion

In summary, we present a model of thrombotic stroke in the distal middle cerebral artery territory that leads to reproducible cortical infarcts, can be performed in awake mice, responds to rtPA reperfusion, and is compatible with *in vivo* brain imaging and neurofunctional recovery evaluations. We hope this model and associated innovative readouts (including functional Midline Shift (fMLS)) will help bridge some gaps in modeling human stroke in preclinical settings.

Author contributions: M.A-M., A.B., C.B., T.D., M.T., C.O. and D.V. designed the experiments, analyzed and interpreted the data, created the figures and wrote the manuscript. M.A., A.B., C.B. C.O. and C. L. performed the experiments.

Sources of Funding: This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under Marie Skłodowska-Curie grant agreement number 813294 (ENTRAIN). This work was also supported by grants from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and INSERM (French National Institute for Health and Medical Research; HCERES U1237- 2017/2022), Throne (ANR-22-CE14-002), Eranet-Neuron MeniPSYs (ANR-22-NEU2-0005), and NEUROATLANTIC (EAPA_791/2018).

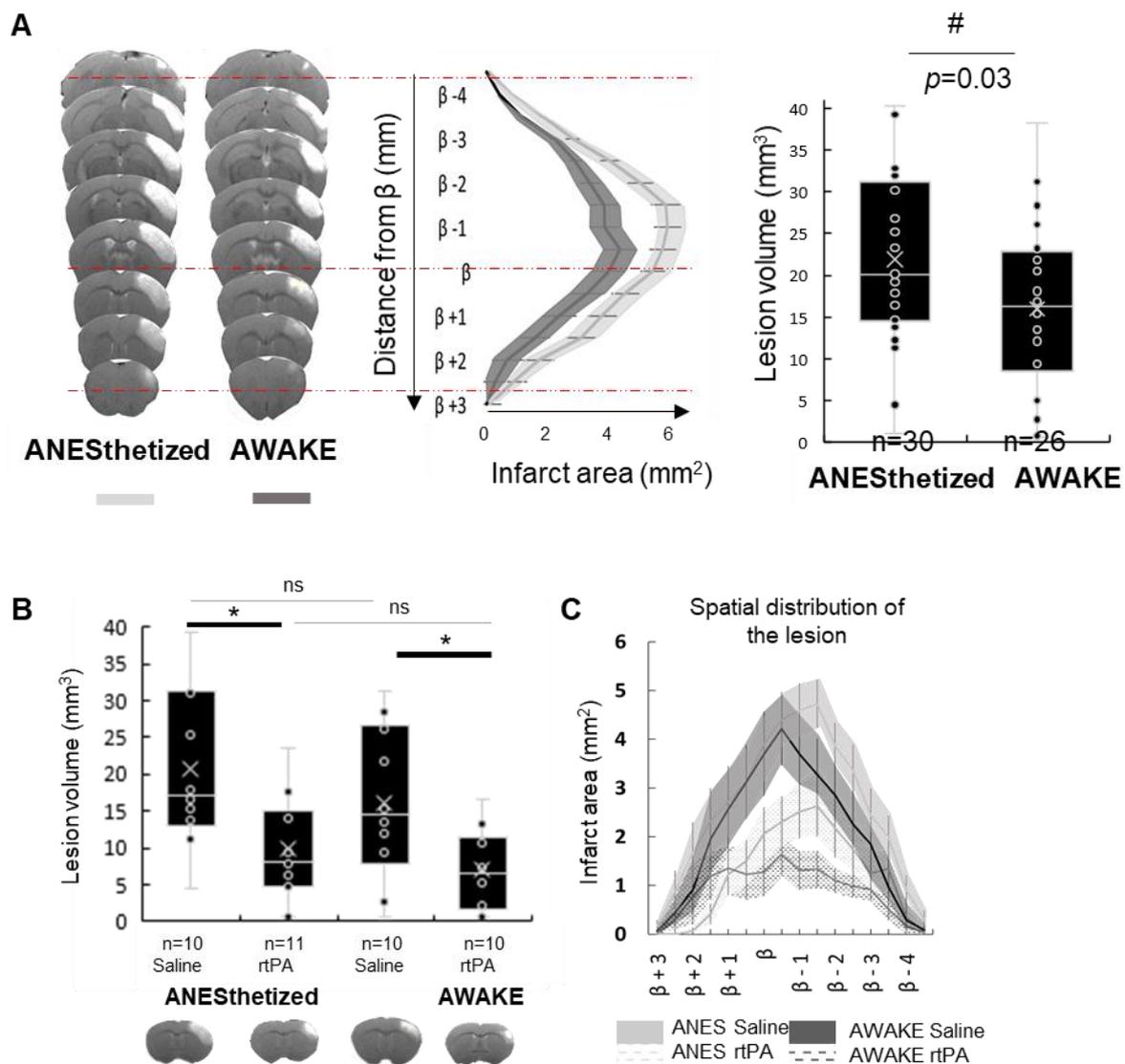
Conflict(s)-of-Interest/Disclosure(s): The authors declare no conflict of interests.

References

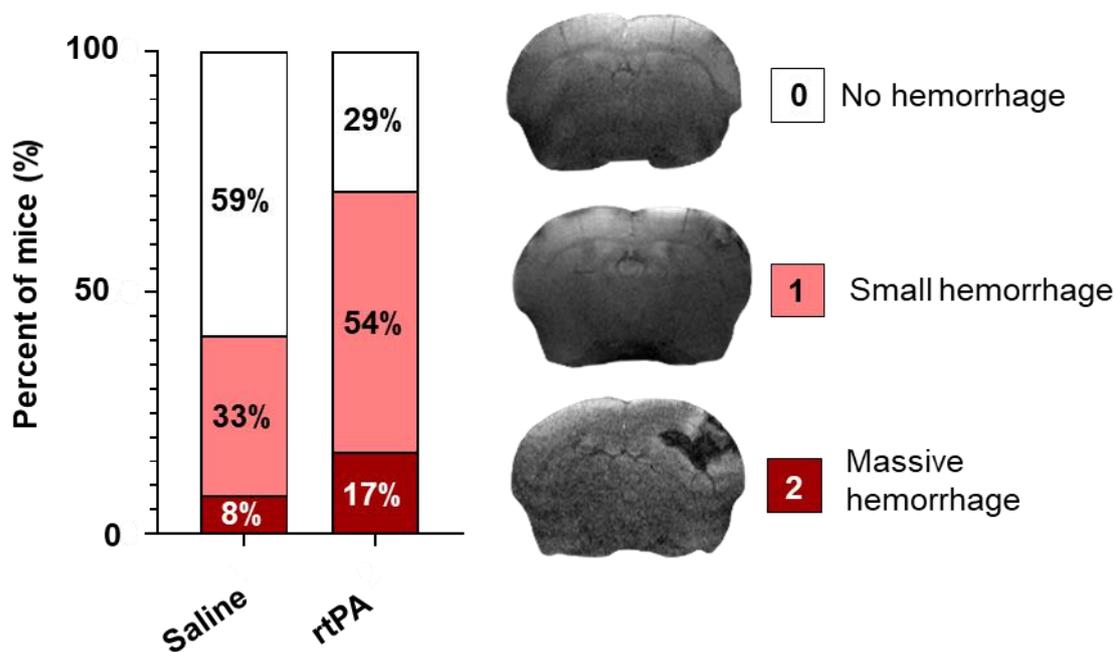
1. Rubin, G., Firlik, A. D., Levy, E. I., Pindzola, R. R. & Yonas, H. Relationship between Cerebral Blood Flow and Clinical Outcome in Acute Stroke. *Cerebrovascular Diseases* 10, 298–306 (2000).
2. Aracki-Trenkic, A. et al. ASL perfusion in acute ischemic stroke: The value of CBF in outcome prediction. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 194, 105908 (2020).
3. Bhatia, R. et al. Low Rates of Acute Recanalization With Intravenous Recombinant Tissue Plasminogen Activator in Ischemic Stroke. *Stroke* 41, 2254–2258 (2010).

4. Coutinho, J. M. et al. Combined Intravenous Thrombolysis and Thrombectomy vs Thrombectomy Alone for Acute Ischemic Stroke: A Pooled Analysis of the SWIFT and STAR Studies. *JAMA Neurology* 74, 268–274 (2017).
5. Mulder, M. J. H. L. et al. Time to Endovascular Treatment and Outcome in Acute Ischemic Stroke. *Circulation* 138, 232–240 (2018).
6. Goyal, M. et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *The Lancet* 387, 1723–1731 (2016).
7. Faizy, T. D. et al. Association Between Intravenous Thrombolysis and Clinical Outcomes Among Patients With Ischemic Stroke and Unsuccessful Mechanical Reperfusion. *JAMA Network Open* 6, e2310213–e2310213 (2023).
8. Berkhemer Olvert A. et al. A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke. *New England Journal of Medicine* 372, 11–20.
9. Psychogios, K. et al. Eligibility for intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke patients presenting in the 4.5–9 h window. *Neuroradiology* 62, 733–739 (2020).
10. Nogueira Raul G. et al. Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *New England Journal of Medicine* 378, 11–21 (2018).
11. O’Collins, V. E. et al. 1,026 Experimental treatments in acute stroke. *Annals of Neurology* 59, 467–477 (2006).
12. Atabak Najafi, Farhad Etezadi, Reza Shariat Moharari, Pejman Pourfakhr, & Mohammad Reza Khajavi. The Role of Neurotransmitters in Anesthesia. *Arch Anesth & Crit Care* 3, (1970).
13. Schifilliti, D., Grasso, G., Conti, A. & Fodale, V. Anaesthetic-Related Neuroprotection. *CNS Drugs* 24, 893–907 (2010).
14. Masamoto, K. & Kanno, I. Anesthesia and the Quantitative Evaluation of Neurovascular Coupling. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 1233–1247 (2012).
15. Hoffmann, U., Sheng, H., Ayata, C. & Warner, D. S. Anesthesia in Experimental Stroke Research. *Translational Stroke Research* 7, 358–367 (2016).
16. Sadegh Moradi, Hany Ferdinando, Aleksandra Zienkiewicz, Mariella Särestöniemi, & Teemu Myllylä. Measurement of Cerebral Circulation in Human. in *Cerebral Circulation* (eds. Alba Scerrati, Luca Ricciardi, & Flavia Dones) Ch. 4 (IntechOpen, Rijeka, 2022). doi:10.5772/intechopen.102383.

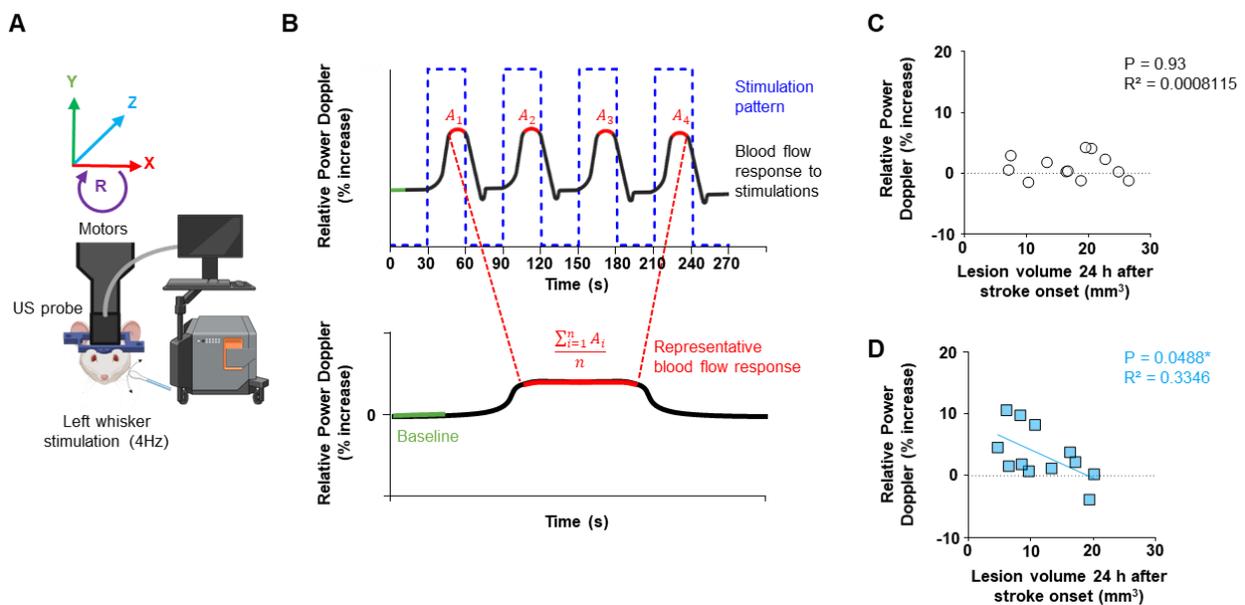
17. null null. Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *New England Journal of Medicine* 333, 1581–1588.
18. Nagaraja, N. & Adams, H. P. Alteplase in Acute Ischemic Stroke: Putting the Guidelines into Practice. *CNS Drugs* 28, 1035–1045 (2014).
19. Planas, A. M. Noninvasive Brain Imaging in Small Animal Stroke Models: MRI and PET. in *Rodent Models of Stroke* (ed. Dirnagl, U.) 139–165 (Humana Press, Totowa, NJ, 2010). doi:10.1007/978-1-60761-750-1_11.
20. Orset, C. et al. Mouse Model of In Situ Thromboembolic Stroke and Reperfusion. *Stroke* 38, 2771–2778 (2007).
21. Orset, C. et al. Efficacy of Alteplase in a Mouse Model of Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 47, 1312–1318 (2016).
22. Correa-Paz, C. et al. Pharmacological preclinical comparison of tenecteplase and alteplase for the treatment of acute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 44, 1306–1318 (2024).
23. Archer, D. P., Walker, A. M., McCann, S. K., Moser, J. J. & Appireddy, R. M. Anesthetic Neuroprotection in Experimental Stroke in Rodents: A Systematic Review and Meta-analysis. *Anesthesiology* 126, 653–665 (2017).
24. McKeown, M. E. et al. Midline Shift Greater than 3 mm Independently Predicts Outcome After Ischemic Stroke. *Neurocritical Care* 36, 46–51 (2022).
25. Xu, X.-M., Zhang, H. & Meng, R.-L. Cranial midline shift is a predictor of the clinical prognosis of acute cerebral infarction patients undergoing emergency endovascular treatment. *Scientific Reports* 13, 21037 (2023).
26. Tu, P.-H. et al. Postoperative midline shift as secondary screening for the long-term outcomes of surgical decompression of malignant middle cerebral artery infarcts. *Journal of Clinical Neuroscience* 19, 661–664 (2012).
27. Karatas, H. et al. Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl₃ application: A novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 1452–1460 (2011).
28. Marks, K. et al. A minimally invasive thrombotic stroke model to study circadian rhythm in awake mice. *bioRxiv* 2024.06.10.598243 (2024) doi:10.1101/2024.06.10.598243.



Supplementary 1: Thromboembolic stroke model in awake animals displays reduced lesion volumes, and is sensitive to rtPA thrombolysis **A-** From left to right: Representative T2-weighted images (7T MRI) 24 hours after MCAo. Spatial distribution of the ischemic lesion slice-by-slice (ANESThetized (light gray) and AWAKE (dark gray) groups). Box plots presenting the quantification of the lesion volumes ($21.92 \text{ mm}^3 \pm 10.13$ vs $16.01 \text{ mm}^3 \pm 9.79$, Student t-tests independent by groups, $p=0.03^*$). **B-** Box plots presenting the quantification of the lesion volumes (ANES-Saline vs ANES-rtPA $p=.01$; AWAKE-Saline versus AWAKE-rtPA $p=0.025^*$; ANES-Saline vs AWAKE-Saline $p=0.35$ (due to our criteria of exclusion for which animals displaying partial or total recanalization before rtPA treatment were excluded); ANES-rtPA vs AWAKE-rtPA $p=0.32$). Below the graph, representative T2-weighted images (7T MRI) 24 hours after MCAo. **C-** Spatial distribution of the ischemic lesion slice-by-slice (ANESThetized saline group (light gray), ANESThetized rtPA group (lightest gray), AWAKE saline group (black), AWAKE rtPA group (dark gray)) β : bregma.



Supplementary 2: Hemorrhagic transformation prevalence is increased in animals that underwent rtPA-thrombolysis: Estimated hemorrhagic scoring 24 h after stroke onset (« 0 »: no hemorrhage, « 1 »: small hemorrhage, « 2 »: massive hemorrhage. Saline, n=29; rtPA, n=31).



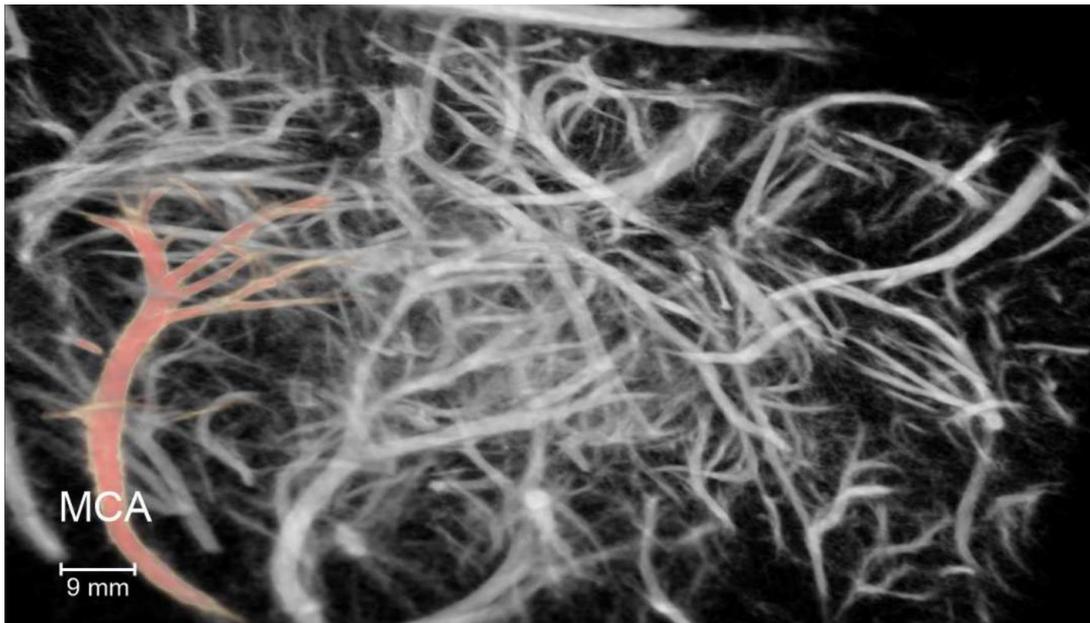
Supplementary 3: Neurovascular response 24 h after stroke onset is linked to the final ischemic lesion in animals that underwent rtPA thrombolysis: **A-** Experimental setup for ultrasound acquisitions. Awake mice are restrained the same way as the CBV monitoring. Whisker were stimulated at 4Hz using a cotton swab. **B-** Method for averaging CBV increases in response to whisker stimulation. Each activation phase was averaged to obtain a representative activation value per animal, from which the basal level during the resting state was subtracted. **C, D-** Relationship between the final lesion volume and the vascular response to whisker stimulation, 24 h after stroke onset. Only rtPA-treated mice with smaller lesion volumes showed improved vascular response to whisker stimulation (n=12 animals per group, simple linear regression analysis).

17. Brève communication :

An open-source platform for 3D transcranial Ultrasound Localization Microscopy in awake mice

Georges Chabouh#, Louise Denis#, Myriam Abioui-Mourgues, Jean-Baptiste Deloges,
Jacques Battaglia, Arthur Chavignon, Baptiste Heiles, Basile Pradier, Sylvain Bodard,
Denis Vivien, Cyrille Orset, et Olivier Couture

En cours de soumission



17.1. Contexte de l'étude :

Une compréhension approfondie de la microcirculation cérébrale peut être nécessaire pour évaluer les mécanismes de la perfusion, de l'angiogenèse, les altérations vasculaires et la réponse aux traitements. De nombreuses pathologies peuvent provoquer des modifications du système circulatoire, comme les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Gama Sosa *et al.*, 2010) et la maladie de Parkinson (Guan *et al.*, 2013), ainsi que des pathologies directement liées à aux vaisseaux comme les thromboses. Un autre exemple de pathologie vasculaire importante est la maladie des petits vaisseaux cérébraux, qui est la principale cause de déficience cognitive vasculaire (Joutel, 2020).

Disposer d'outils permettant une évaluation précise de la microcirculation est par conséquent une nécessité pour la recherche sur les maladies vasculaires (Kolinko *et al.*, 2015).

En neurosciences, les techniques d'imagerie actuelles, telles que la microscopie biphotonique ou l'angiographie par résonance magnétique, présentent certaines limitations, notamment en termes de profondeur d'imagerie et de résolution spatiale.

L'ULM est une technique qui permet de surmonter ces contraintes. Elle offre une résolution vasculaire proche du niveau capillaire permettant de cartographier des vaisseaux de moins de 10 μm de diamètre (Hingot *et al.*, 2019) ainsi qu'une acquisition à travers l'ensemble du cerveau du petit animal.

17.2. Objectifs de l'étude :

L'objectif principal de cette étude est de démontrer la faisabilité de l'ULM 3D pour l'imagerie cérébrale chez des souris éveillées, afin de cartographier le réseau vasculaire cérébral à travers divers paramètres. Nous avons également pour objectif de rendre librement accessibles les techniques d'acquisition et de traitement des images obtenues, dans une démarche de science ouverte, afin de faciliter leur adoption par la communauté scientifique. En fournissant une méthode peu invasive et sans recours à l'anesthésie, cette étude vise à offrir une alternative aux techniques existantes.

17.3. Principales méthodes utilisées :

Pour mener cette étude, nous avons collaboré avec le Laboratoire d'Imagerie Biomédicale (LIB), notamment grâce aux travaux du Dr. Olivier Couture et du Dr. Georges Chabouh. Cette collaboration nous a permis de combiner l'expertise du LIB en imagerie ultrasonore 3D par ULM, avec notre connaissance des modèles animaux en neurosciences.

Nous avons repris et adapté le protocole de préparation pour l'imagerie chez les souris éveillées, préalablement développé, concrétisant ainsi possible son application.

17.4. Principaux résultats

- ✓ L'acquisition par **ULM 3D** chez la **souris éveillée** a été réalisée avec succès et s'est avérée reproductible.
- ✓ **Aucune exclusion** n'a été nécessaire en raison de la qualité des images ou du stress des animaux.
- ✓ Plusieurs paramètres ont été mesurés, notamment le **diamètre** des vaisseaux, la **vélocité** du flux sanguin, la **direction** du flux, ainsi que la distinction entre **veines** et **artères**.
- ✓ Les paramètres d'acquisition ont été rendus **accessibles** *via* la plateforme **Open-3DULM**.

An open-source platform for 3D transcranial Ultrasound Localization Microscopy in awake mice

Georges Chabouh^{1,*,#}, Louise Denis^{1,#}, Myriam Abioui-Mourgues², Jean-Baptiste Deloges¹, Jacques Battaglia¹, Arthur Chavignon¹, Baptiste Heiles³, Basile Pradier¹, Sylvain Bodard^{1,5}, Denis Vivien^{2,4}, Cyrille Orset², and Olivier Couture^{1,*}

¹ Sorbonne Université, UMR 7371 CNRS, Inserm U1146, Laboratoire d'Imagerie Biomedicale, 15 Rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France

² UNICAEN, Caen Normandie Université, Inserm UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PHIND), GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), Normandie University, Caen, France

³ Division of Chemistry and Chemical Engineering, California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA

⁴ Department of Clinical Research, Caen-Normandie University Hospital, CHU Caen, Avenue de la Côte de Nacre, Caen, France

⁵ AP-HP, Hôpital Necker Enfants Malades, Service d'Imagerie Adulte, Paris, France

These authors have contributed equally

* georges.chabouh@sorbonne-universite.fr, olivier.couture@sorbonne-universite.fr

ABSTRACT

We present an open-source code for 3D super-resolution ultrasound imaging. Open-3DULM was applied to transcranial imaging in habituated awake mice. Comparative analysis reveals that isoflurane anesthesia induces significant vasodilation and higher cerebral blood flow compared to the awake state. This method could serve as a reference for developing new types of 3D vascular quantifications, particularly emphasizing the importance of awake and 3D imaging for accurate cerebral blood flow measurement in neuroscience research.

Ultrasound localization microscopy (ULM) is the leading technique for super-resolution ultrasound imaging¹⁻⁵ because it excels in visualizing capillary-scale vessels within a variety of organs, including the human brain⁶, heart⁷, and kidneys⁸⁻¹⁰. ULM is mostly implemented in 2D which represents various limitations such as user dependency, out of plane motion and imprecise quantification¹¹. Volumetric ULM, or 3D ULM¹²⁻¹⁴, allows appropriate quantification of microbubbles¹⁵ and tissue motion, along with organ-wide acquisitions within the time of a single contrast agent's bolus (minutes).

To prevent pain, stress, and motion artifacts in animal imaging, animals are routinely scanned with various imaging modalities, including ULM, under anesthesia, such as isoflurane. This anesthetic causes vasodilation, increasing blood vessel size and altering flows¹⁶. Natural physiology, stress response, and neuronal plasticity are altered with anesthesia, hindering the translation of functional imaging. Consequently, the range of relevant biomarkers that could be faithfully extracted from ULM is reduced. To address this need, we introduce 3D transcranial ULM on habituated, awake mice under stress-free conditions, eliminating the need for anesthesia before imaging¹⁷. We compare the results of awake ULM to those obtained from the same mice under isoflurane anesthesia.

Moreover, we also report on Open-3DULM, an openly available algorithm for a full 3D ULM reconstruction from beamformed 3D ultrasound data. Previously, an open-source reconstruction algorithm of 2D ULM has been developed and exploited by several laboratories (PALA¹⁸). To extend in the third dimension and adapt to the new challenges linked to data size, 3D localization, and 3D tracking, we propose a Python algorithmic pipeline accessible to a wide range of users. Additionally, we provide beamformed data from brain acquisitions and results to help the users compare to their home-built 3DULM pipeline. Open-3DULM was also optimized for data processing speed through CPU parallelization.

We performed in-vivo 3D transcranial ULM of the mice brain in awake and anesthetized states (N=5 per group). Supplementary Fig.4a shows the schematic of the experimental setup (the detailed awake protocol can be found in the Methods section). Habituation was performed during four consecutive days before the 3D ULM experiment to ensure a stress-free environment for awake imaging. The mice are first placed in a housing, and a 3D-printed mounting plate was attached to the skull with adhesive, allowing it to be securely fastened into the stereotaxic frame, which ensures no head motion for subsequent imaging. As highlighted in a previous study¹⁹, a 4-day habituation period was enough to ensure that the mice return

to a stress-free state and they are then ready for imaging experiments. Once the head was mounted on the stereotaxic frame, mice first undergo 3D ULM acquisition in an entire awake state for 5 continuous minutes at a volume rate of 250 Hz. This acquisition was followed by another 3D ULM acquisition in an isoflurane-anesthetized state for 5 minutes. The Open-3DULM was applied on 3D ultrasound data that were acquired and beamformed into Brightness mode (B-mode) with a delay and sum algorithm²⁰, i.e. pixel size of [98.5, 150, 150] micrometers. Beyond the dataset shared with this article (section Code and Data availability), the shared algorithmic pipeline consists of several steps that can be applied to any 3D ultrasound data acquired in-silico, in-vitro, and in-vivo with microbubble injection. First, each volume sequence undergoes filtering to eliminate global tissue motion and skull signals and enhance microbubble signals. Tissue clutter removal was achieved by removing the first 12 among 200 singular vectors using singular value decomposition (SVD) on beamformed 3D data^{1,21}. Following the extraction of local maxima, sub-wavelength localization of the microbubbles was performed through radial symmetry algorithm¹⁸. Finally, the tracking step uses an open-source classical particle tracking algorithm 'simpletracker'²² adapted to Open-3DULM. After generating the tracks of individual microbubbles, 3D density i.e. count of microbubbles per pixel and mean velocity maps are created for visualization and quantification purposes. These maps enable the measurement of various 3D ULM metrics, which can be used to assess a range of physiological and pathological biomarkers.

Fig. 1a and b show the 3D ULM density rendering of the brain microvasculature in awake (left) and isoflurane (right) states with the same track number and a zoom on the right upper cortex in Fig. 1c and d. Skeletonization of the vessels was also performed to facilitate the measurements of their diameter. As shown in Fig. 1e (awake) and f (isoflurane), most vessels in the whole brain are enlarged under anesthesia, as already highlighted in previous studies^{16,23}. Finally, 3D ULM velocity maps were also projected on the vessel skeletons. Faster blood velocities were observed in the isoflurane state (Fig. 1h) compared to awake (Fig. 1g). Overall, the increase in vessel diameter and blood velocity indicates an overall elevation in cerebral blood flow (CBF) consistent with previous findings using 2D ULM¹⁷.

For quantification, the vessel area was defined as the number of voxels occupied by a detectable vessel. This metric showed significant differences between the two groups (p-value \ll 0.01), i.e. a lower vessel area for awake 3DULM (Fig. 2a-c). Vessel segmentation was achieved thanks to the identification of key vascular structures by two radiologists. Thanks to the Open-3DULM capabilities (Fig. 3), selecting a major vessel automatically included all connected branching vessels irrespective of their spatial conformation. Fig. 2 highlights various regions of interest (ROIs), including arteries and veins identification. For each ROI, we present the Open-3DULM density map alongside the skeletonized data, detailing the diameter and velocity of each branch. Additionally, two boxplots are generated per vessels region to compare the average branch diameter and velocity between the awake and isoflurane-anesthetized states. The results reveal that all selected veins exhibit significantly reduction in vessel size and velocity in the awake state (purple) compared to under isoflurane (blue) (Region 1, 3 and 5 upward). Interestingly, unlike the 2D ULM study¹⁷, which found no significant changes in arterial measurements, our 3D analysis shows that some arteries also experienced reductions (region 3). Finally, supplementary Fig. 5 demonstrates the robustness of our findings, showing consistent results for vessel size (Fig. 5a) and average velocity (Fig. 5b) across five different mice.

Overall, experiments on awake habituated animals showed drastic differences in blood flow patterns in the animal brain concerning their anesthetized counterpart. These differences were effectively captured using Open-3DULM, which optimizes quantification in the preclinical setting. The Open-3DULM could become the standard platform to convert any 3D ultrasound acquisition with contrast agents into an in-vivo super-resolution microscope.

Online content

Data Availability

370 blocks of B-mode 3D cine-loop for awake state was shared with this publication. Due to the large size of the dataset (2.5 Tb), the remaining data will be shared upon request.

Code Availability

(at publication) All codes are available under the Open-3DULM pipeline presented on GitHub.

References

1. Errico, C. *et al.* Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature* **527**, 499–502 (2015).
2. Christensen-Jeffries, K. *et al.* Super-resolution ultrasound imaging. *Ultrasound medicine & biology* **46**, 865–891 (2020).
3. Couture, O., Hingot, V., Heiles, B., Muleki-Seya, P. & Tanter, M. Ultrasound localization microscopy and super-resolution: A state of the art. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, frequency control* **65**, 1304–1320 (2018).

4. Song, P., Rubin, J. M. & Lowerison, M. R. Super-resolution ultrasound microvascular imaging: Is it ready for clinical use? *Zeitschrift für Medizinische Physik* (2023).
5. Dencks, S. & Schmitz, G. Ultrasound localization microscopy. *Zeitschrift für Medizinische Physik* (2023).
6. Demené, C. *et al.* Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients. *Nat. biomedical engineering* **5**, 219–228 (2021).
7. Yan, J. *et al.* Transthoracic ultrasound localization microscopy of myocardial vasculature in patients. *Nat. Biomed. Eng.* 1–12 (2024).
8. Bodard, S. *et al.* Ultrasound localization microscopy of the human kidney allograft on a clinical ultrasound scanner. *Kidney Int.* **103**, 930–935 (2023).
9. Denis, L. *et al.* Sensing ultrasound localization microscopy for the visualization of glomeruli in living rats and humans. *EBioMedicine* **91** (2023).
10. Bodard, S. *et al.* Visualization of renal glomeruli in human native kidneys with sensing ultrasound localization microscopy. *Investig. Radiol.* **59**, 561–568 (2024).
11. Naji, M. A., Taghavi, I., Thomsen, E. V., Larsen, N. B. & Jensen, J. A. Underestimation of flow velocity in 2-d super-resolution ultrasound imaging. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, frequency control* (2024).
12. Heiles, B. *et al.* Volumetric ultrasound localization microscopy of the whole rat brain microvasculature. *IEEE Open J. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control.* **2**, 261–282 (2022).
13. Chavignon, A. *et al.* 3d transcranial ultrasound localization microscopy in the rat brain with a multiplexed matrix probe. *IEEE Transactions on Biomed. Eng.* **69**, 2132–2142 (2021).
14. Chabouh, G. *et al.* Whole organ volumetric sensing ultrasound localization microscopy for characterization of kidney structure. *IEEE Transactions on Med. Imaging* (2024).
15. Chavignon, A. *et al.* Deep and complex vascular anatomy in the rat brain described with ultrasound localization microscopy in 3d. *IEEE Open J. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control.* **3**, 203–209 (2023).
16. Sullender, C. T., Richards, L. M., He, F., Luan, L. & Dunn, A. K. Dynamics of isoflurane-induced vasodilation and blood flow of cerebral vasculature revealed by multi-exposure speckle imaging. *J. neuroscience methods* **366**, 109434 (2022).
17. Wang, Y. *et al.* Longitudinal awake imaging of deep mouse brain microvasculature with super-resolution ultrasound localization microscopy. *bioRxiv* 2023–09 (2023).
18. Heiles, B. *et al.* Performance benchmarking of microbubble-localization algorithms for ultrasound localization microscopy. *Nat. Biomed. Eng.* **6**, 605–616 (2022).
19. Tsurugizawa, T. *et al.* Awake functional mri detects neural circuit dysfunction in a mouse model of autism. *Sci. advances* **6**, eaav4520 (2020).
20. Perrot, V., Polichetti, M., Varray, F. & Garcia, D. So you think you can das? a viewpoint on delay-and-sum beamforming. *Ultrasonics* **111**, 106309 (2021).
21. Desailly, Y. *et al.* Contrast enhanced ultrasound by real-time spatiotemporal filtering of ultrafast images. *Phys. Medicine & Biol.* **62**, 31 (2016).
22. Tinevez, J.-Y. *et al.* Trackmate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* **115**, 80–90 (2017).
23. Slupe, A. M. & Kirsch, J. R. Effects of anesthesia on cerebral blood flow, metabolism, and neuroprotection. *J. Cereb. Blood Flow & Metab.* **38**, 2192–2208 (2018).
24. Demeulenaere, O. *et al.* Coronary flow assessment using 3-dimensional ultrafast ultrasound localization microscopy. *Cardiovasc. Imaging* **15**, 1193–1208 (2022).

Methods

Animals

All experiments were performed in compliance with the European Community Council Directive of September 22, 2010 (010/63/UE) with ARRIVE guidelines and approved by the protocol APAFIS #35158 validated by the French ethics committee “Comité d’éthique Normandie en matière d’expérimentation animale”. Accordingly, the number of animals in our study was kept to the minimum following the 3Rs (reduce, refine, and replace) guidelines. Experiments were performed on N = 5 male (aged 5–7 weeks) Swiss mice (Janvier Labs), weighing 30–40 g at the beginning of the experiments. Animals (housed two per

age) arrived in the laboratory one week before the start of the experiment. They were maintained under controlled conditions (21 °C, 50-60 % relative humidity, 12/12h light/dark cycle, food and water ad libitum). All animals included in this study were untreated and were used randomly in the various experiments.

Awake protocol condition

Skull cap fixation

Mice were first anesthetized with isoflurane (induction at 5%, maintenance between 1.5% and 2%) in a gas mixture of N₂O/O₂ (70%/30%) and given buprenorphine (0.1 mg/kg, subcutaneous) for pain relief. The animals were then placed in a stereotaxic frame, keeping their temperature constant at 37°C using a temperature-controlled heating pad. After cleaning and locally anesthetizing the area with Xylocaine (subcutaneous), an incision was made to expose the skull for the attachment of the skull cap (Fig. 4a). The skull cap, a 3D-printed PLA structure with an imaging window of 2 cm × 1.5 cm, was then affixed. The skull surface was treated with hydrogen peroxide and 70% ethanol, followed by a primer which was rinsed with saline. The skull cap was secured in place using dental cement¹⁹.

Habituation

After a 3-day recovery period, a 4-day habituation protocol was implemented to ensure the mice remained still during the ultrasound imaging sessions. Each day, the mice were placed in the housing for progressively longer duration to acclimate them to the restraint conditions. We selected a 4-day habituation period based on prior research involving functional magnetic resonance imaging (fMRI) in mice¹⁹. In this study, they demonstrated that after 4 days, mice exhibited normalized heart rates, respiratory rates, and corticosterone levels, indicating a return to a stress-free state.

Catheter placement

To avoid the effects of isoflurane anesthesia on ultrasound imaging, the catheter was placed a day in advance. The day before ultrasound imaging, the mice were anesthetized with isoflurane (5% induction, 1.5%-2% maintenance) in a gas mixture of N₂O/O₂ (70%/30%). They were given buprenorphine (0.05 mg/kg, subcutaneous) for pain relief and then positioned in a stereotaxic frame within their housing. A regulated heating pad kept their body temperature stable at 37°C. A catheter was then inserted into the tail vein and secured with adhesive tape to enable intravenous (IV) injections of microbubbles.

Preparation for imaging

The animals were secured in a small animal stereotaxic frame (David Kopf stereotaxic instrument, Tujunga, CA, USA). Imaging was first performed on awake animals, followed by applying an anesthesia mask delivering a mixture of isoflurane (2%) and nitrous oxide. Heart and respiratory rates were continuously monitored to maintain stable anesthesia (Labchart, AD Instruments). Two milliliters of saline were gently applied to the brain, preserving the dura mater's integrity, and followed by ultrasound gel (Neo Jelly US, France). The ultrasonic probe was then precisely positioned using the stereotaxic electrode manipulator (0.1 mm resolution, David Kopf stereotaxic instrument) fitted with a custom 3D-printed probe holder.

Microbubble contrast agent injections

During the 5-minute imaging period, 25 µL of SonoVue microbubbles, prepared using the standardized clinical protocol, were injected into the tail vein catheter every minute, resulting in a total volume of 150 µL. To prevent the microbubbles from floating to the top of the syringe, gentle agitation was achieved using two magnets, one placed inside the syringe and one outside. If the microbubbles solution became clear, the syringe was replaced at least once during the imaging session.

3D ultrasound imaging

Ultrasound data was acquired using a single Verasonics 256-channel research scanner (Kirkland, USA) coupled with a 1024-elements matrix probe from Vermon (Tours, France) with a central frequency of 7.8 MHz and 56% bandwidth at -6 dB. The probe connected to the Vantage 256 system through a Verasonics UTA 1024-MUX adapter. The imaging protocol employed an ultrafast sequence of five plane waves, oriented at ±5° in both elevation and lateral directions, with a maximum pulse repetition frequency (PRF) of 16 kHz. Each pulse was a 2-cycle emission at 67% duty cycle, driven at 10 volts, producing a Peak Negative Pressure (PNP) of 298 kPa and a mechanical index (MI) of 0.1. The probe was divided into four 256-element panels, and during transmission, each panel received signals from its neighboring panels, requiring ten emissions per angle¹³. Five hundred sequences, each containing two hundred continuous volumes at 250 Hz, were recorded over approximately four minutes, resulting in about 250 GB of data. Each block required approximately 0.5 seconds to be saved continuously. The acquired volumes were sampled with a 50% bandwidth.

3D beamforming

The data were then reconstructed with a classical delay and sum beamforming²⁰ on a [98.5, 150, 150] µm grid, before reaching the final 3D ULM resolution of [9.85, 9.85, 9.85] µm.

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted to compare brain regions between awake and isoflurane-anesthetized states, utilizing a non-parametric Mann-Whitney test in GraphPad Prism 9 software. The significance levels of the findings are reported as follows: $ns = P \geq 0.05$, $* = P \leq 0.05$, $** = P \leq 0.01$, $*** = P \leq 0.001$, $**** = P \leq 0.0001$.

Open 3DULM: Algorithm

Clutter filter

After obtaining a 3D ultrasound data and beamformed into Brightness mode (B-mode) volumes, the first step of the Open 3DULM algorithm is to remove the tissue signal, tissue motion as well as the skull signal to enhance microbubbles signal. Clutter filtering was performed using the Singular Value Decomposition (SVD) technique^{1,21}. The user could specify the number of singular vectors to remove. In this study, we removed 12 out of 200. This threshold was empirically determined and applied uniformly across all animals.

Localization

The second step in the Open-3DULM algorithm was the localization of the Point Spread Function (PSF) of the microbubbles. We specified the number of microbubbles (*'number_of_particles'*) present in one volume at a specific frame. In this work, we set this parameter to 900. The 3D full-width-half-maximum (*'fwhm'*) of the PSF for the microbubbles was defined as $fwhm = [5 \times 5 \times 5]$ as data was beamformed at half of a wavelength in all directions. We used $fwhm = [5 \times 5 \times 5]$. After selecting the number of microbubbles per frame and the PSF size, the algorithm localized the regional maxima of the filtered data (3D+time) by applying the *'maximumFilter'* function from *'scipy.ndimage'*, arranging the pixels from the highest intensity value to the lowest. To ensure that the high-intensity pixels were likely to be microbubbles, the algorithm computed the local Signal-to-Noise Ratio (SNR) within a user-defined patch size (*'patch_size'*). In this work, the patch size was set to $[7 \times 7 \times 7]$ to consider an area larger than the microbubble spot (fwhm). We also specified the minimum SNR (*'min_snr'*) for an accepted microbubble PSF and the number of local maxima within the chosen patch (*'nb_local_max'*). The algorithm selects the (*'number_of_particles'*) meeting the minimum SNR and (*'nb_local_max'*) conditions, starting with the localized microbubbles with the highest SNR.

Sub-wavelength localization

For each localized PSF within the patches, 3D radial symmetry¹² was employed to pinpoint the microbubble's position with sub-wavelength precision. A *'localization'* matrix was then generated, containing five columns: the local SNR of the microbubble, the z, x, and y positions, and the frame number.

3D tracking

Once the subwavelength localization step was completed, the *'localization'* matrix was sent to the 3D tracking final step in the Open-3DULM algorithm. The 3D tracking algorithm is a library Python-adapted (*'PeasyTracker'*) version of the open-source *'SimpleTracker'*²². It uses the Hungarian algorithm to minimize the Euclidean distance between points in consecutive frames. Table 1 summarizes the localization and tracking parameters, their explanations, and the values used in this work. The interpolation step was done using the *'interp'* function from the *Numpy* library with an interpolation factor of 1 over the resolution factor *'res'* that should be defined by the user. Here, we used a factor of 10 ($res = 10$). Finally, the *'tracks'* structure was then computed with all the tracks, i.e. the raw and the interpolated ones.

Open 3DULM: Image analysis

Once the tracks are generated, they were used to create a 3DULM density rendering (*output_density*), which was a 3D matrix where each voxel's value represents the number of times a track passed through that voxel. Additionally, the tracks were used to create 3DULM velocity maps, including the norm of the 3D velocity (*output_velocity*) and the velocity with directionality (*output_directivity*), indicating upward and downward velocity direction in the axial z direction. Open-3DULM rendering were computed by loading the *output_density* into Amira (Amira 2019 software, FEI) and using the Volume Rendering function for 3DULM density rendering. To skeletonize the vasculature²⁴, a Gaussian filter ($\sigma = [1, 1, 1]$ px) was first applied, followed by the *'auto-skeleton'* function in Amira (Figure 2e and f). For 3D velocity rendering, *output_velocity* was loaded into Amira and used as a colormap on the skeletonized structure (Figure 2g and h).

Acknowledgements

We thank Oscar Demeulenaere for his help regarding skeletonization on AMIRA software.

Table 1. Open-3DULM: 3D localization and tracking parameters to be defined by the user

Open-3DULM parameters	Explanation	Values adopted in this work
SVD filtering ([min_svd_value max_svd_value])	The range of accepted singular values	12-200
Bandpass filter ([left_cutoff_bandpass right_cutoff_bandpass]) and the order (filter_order)	The lower and upper-frequency bounds	not applied in this work
Full-width-half-maximum (fwhm)	The size of the PSF of the microbubbles	$[3 \times 3 \times 3]$
Patch size (patch_size)	The size of the 3D kernel where the local SNR is computed	$[7 \times 7 \times 7]$
Minimum SNR (min_snr)	The minimum SNR value for a microbubble to be accepted	9
Number of local maxima in the patch nb_local_max	The maximum number of allowed microbubbles inside a patch	10
Number of particles (number_of_particles)	The number of microbubbles to be localized in every frame	900
Maximum Velocity (mm/s) (max_velocity)	Maximum velocity in mm/s, which is converted into the maximum linking distance, i.e., the maximum allowed distance travelled by a particle between two frames	30 mm/s
Max Gap Closing (max_gap_closing)	The maximum number of frames that the microbubble is allowed to disappear and reappear	0
Minimum Length (min_length)	The minimum number of frames a microbubble must be tracked for it to be accepted	9
Resolution factor (res)	The hypothetical super-resolution factor	10

Author contributions

G.C. M.A. D.V. C.O. O.C. designed the research. G.C. L.D. M.A. did the experiments. G.C. L.D. A.C. B.H. developed the acquisition sequence, ULM reconstruction, and analysis framework. G.C. L.D. B.P. S.B. O.C. analyzed the processed data. J.B.D. J.B. G.C. L.D. made the code available on Gitlab. G.C. L.D. made the data available on the ZENODO platform. All the authors discussed the results and wrote the paper.

Competing interests

O.C. is the holder of patents concerning super-resolution ultrasound imaging. He is also a co-founder and share-holder in the startup ResolveStroke.

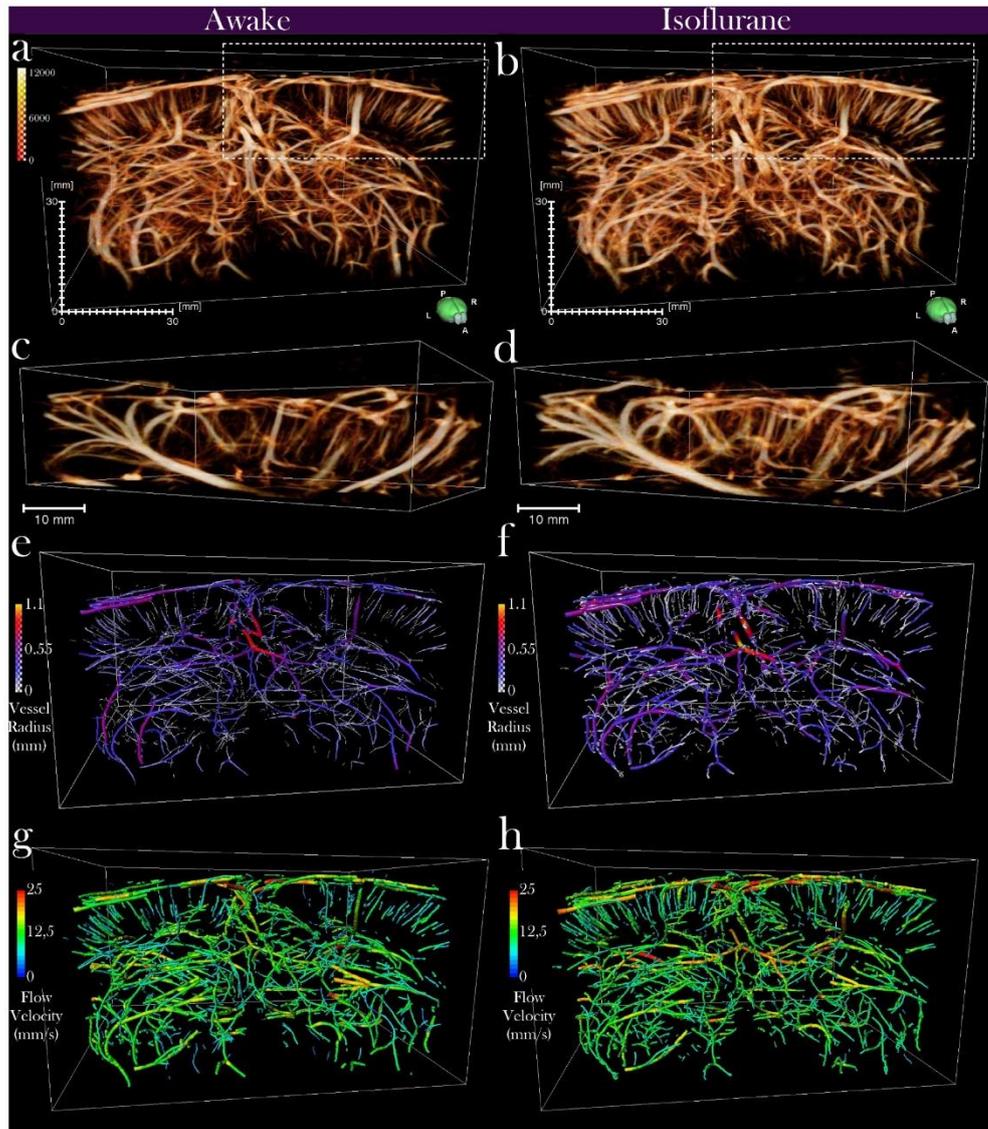


Figure 1. 3D transcranial Ultrasound Localization Microscopy in awake (left) and isoflurane-anesthetized (right) mice. **a,b** 3DULM density map, with a zoom on the cortical area **c** and **d**. Vessel diameter quantification **e** and **f** after skeletonization. 3DULM Velocity maps quantification **g** and **h**.

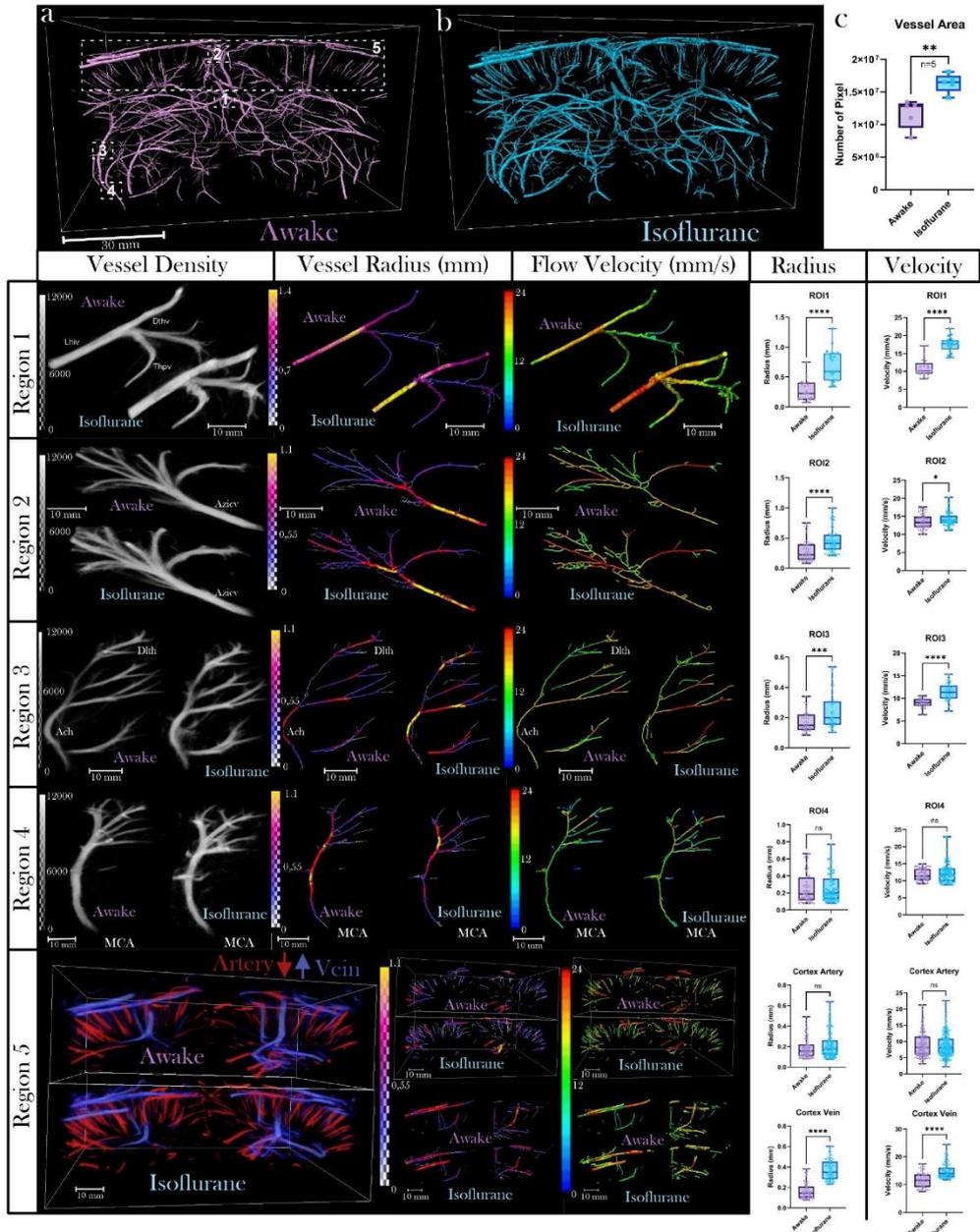


Figure 2. Comparative analysis on a wide range of vessels. **a:** vessel diameter maps with definition of the different regions. **b:** Boxplot of vessel area metric showing greater vessel occupancy in isoflurane state. Five regions of interest include the cortex with arteries (red, downward flow) and veins (blue, upward flow). For each ROI, 3D ULM density maps, vessel diameters, and velocities are displayed. Boxplots for each ROI depict the average radius and velocity of branches, comparing awake (purple) and isoflurane (cyan) states. Lhiv (longitudinal hippocampal vein); Dthv (dorsal thalamus vein); Thpv (thalamoperforating vein); Ach (anterior choroidal artery); Dlh (dorsolateral hypothalamus); MCA (middle cerebral artery)

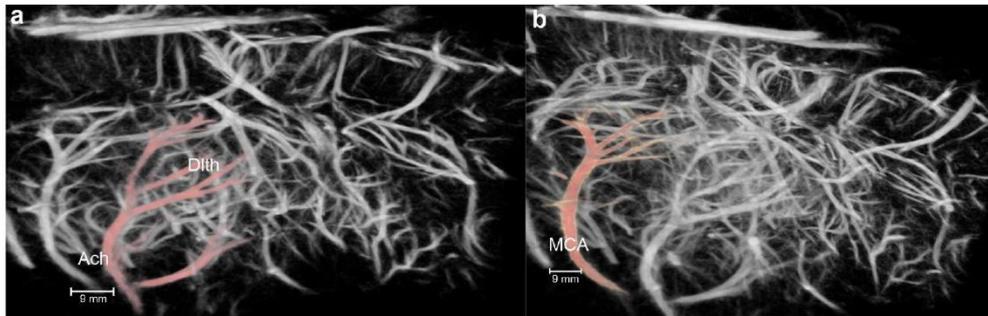


Figure 3. 3D automatic segmentation of vasculature using Open-3DULM and AMIRA (Amira 2019 software, FED): The watershed-like 3D vascular structure of Open-3DULM enables automatic segmentation of vessels, identifying the connections between branches and the main vessel. **a** Region 3 (Ach: anterior choroidal artery); Dlth (dorsolateral hypothalamus) and **b** Region 4 (MCA: middle cerebral artery).

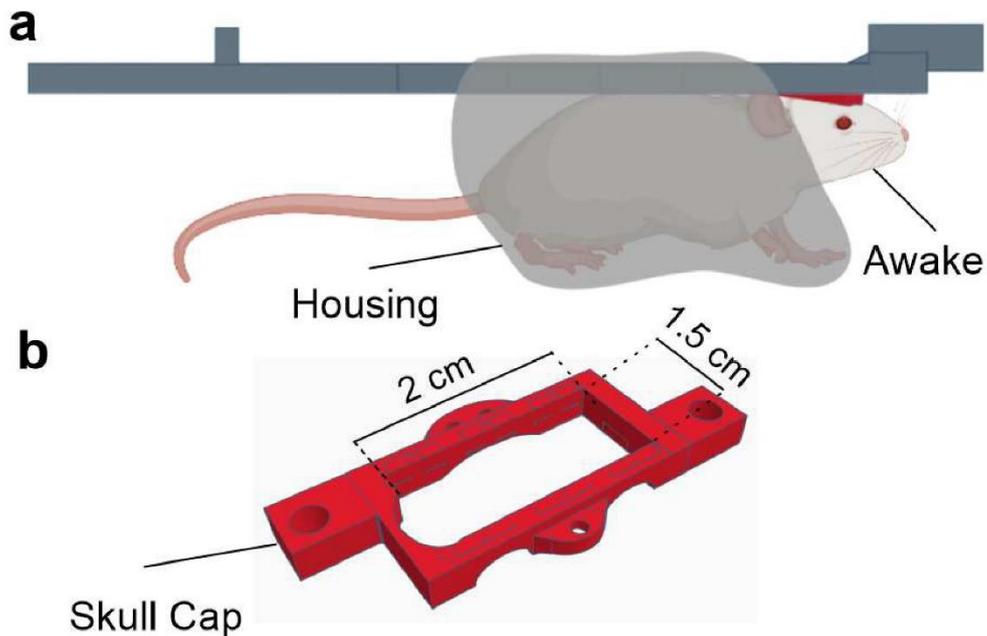


Figure 4. Setup for awake mice ultrasound imaging: **a** 3D printed structure and housing for habituated awake mice, and **b** 3D printed PLA skull cap for secure attachment to the stereotaxic frame during ultrasound imaging.

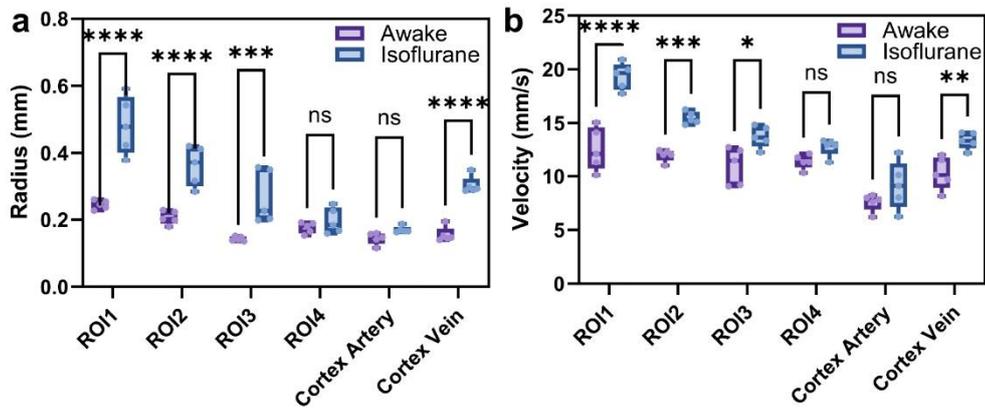


Figure 5. General quantification differentiates the awake from the anaesthetized (isoflurane) groups: Average ROI **a** radius measurement and **b** average velocity measurement in awake versus isoflurane-anesthetized mice (N=5 mice per group)

18. Article 2 :

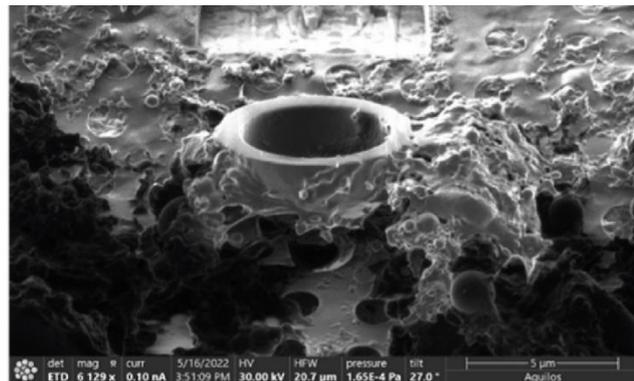
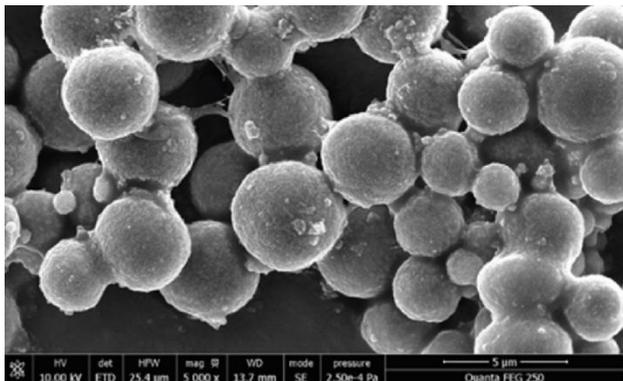
rtPA-loaded fucoidan polymer microbubbles for the targeted treatment of stroke

Louise Fournier, Myriam Abioui-Mourgues, Georges Chabouh, Rachida Aid, Thibault De La Taille, Olivier Couture, Denis Vivien, Cyrille Orset, et Cédric Chauvierre

Publié dans *Biomaterials*



Biomaterials



18.1. Contexte de l'étude :

Malgré les progrès réalisés et l'investissement de la recherche sur l'AVC, un nombre insuffisant de patients ont accès à un traitement après un AVC ischémique aigu.

Actuellement, seule la thrombolyse intraveineuse au rtPA, associée ou non à la thrombectomie, est approuvée par la FDA (Mazighi *et al.*, 2009 ; Berkhemer *et al.*, 2015). Diverses stratégies de recanalisation sont en cours de recherche et développement pour pallier cette limite.

Ces stratégies incluent le développement de mutants du rtPA afin d'augmenter sa demi-vie ou de réduire ses effets secondaires, mais peuvent aussi porter sur l'optimisation de la forme galénique du thrombolytique.

Actuellement, l'Altéplase est administré sous sa forme libre, se diffusant passivement dans la circulation jusqu'à atteindre le thrombus au site d'occlusion. Or, il est envisageable de cibler directement le site d'occlusion grâce à un vecteur nanoparticulaire, permettant une administration plus ciblée.

Avec le progrès de la nanotechnologie, un intérêt s'est développé pour intégrer la nanomédecine à la thérapie thrombolytique afin de traiter les événements thrombotiques aigus. Les approches nanomédicales pour une fibrinolyse ciblée pourraient améliorer les résultats cliniques en optimisant les traitements actuels, notamment lorsque les interventions endovasculaires ne sont pas disponibles ou recommandées, comme dans le cas des occlusions des petits vaisseaux ou de la circulation postérieure.

L'administration localisée de thrombolytiques par nanomédecine pourrait permettre des taux de recanalisation supérieurs tout en réduisant les complications hémorragiques. Dans un contexte de traitement optimal, une combinaison synergique des méthodes endovasculaires et des nanothérapies pourrait représenter une approche plus précise pour la prise en charge des pathologies thrombotiques.

L'encapsulation des fibrinolytiques et leur administration vectorielle offrent plusieurs avantages : protection contre les inhibiteurs circulants (comme PAI-1 pour le tPA), augmentation de la demi-vie sanguine, amélioration de l'efficacité thrombolytique à faible dose, et diminution des effets secondaires. Des études récentes ont montré que des nanotransporteurs tels que les liposomes, les nanoparticules polymériques ou inorganiques, les nanotransporteurs bio-inspirés et les microbulles présentent des avantages pour la thérapie thrombolytique, seuls ou combinés à des techniques comme les ultrasons ou des forces magnétiques. Parmi ces approches, la sonothrombolyse avec des microbulles lipidiques et du rtPA intraveineux fait déjà l'objet d'essais cliniques, montrant des améliorations prometteuses (Nacu *et al.*, 2015).

Pour développer un vecteur optimal pour la délivrance de médicaments, celui-ci devrait présenter des caractéristiques telles que la biocompatibilité pour une translation clinique rapide, la capacité à cibler les thrombi pour une recanalisation efficace, et idéalement une capacité d'imagerie pour créer un outil théranostique combinant diagnostic et thérapie.

Le développement de nouvelles stratégies utilisant des fibrinolytiques, couplées à la nanomédecine pourrait donc représenter une avancée prometteuse dans le traitement des AVC ischémiques.

18.2. Objectifs de l'étude :

Le principal objectif de cette étude est de caractériser une nouvelle stratégie d'encapsulation et de délivrance ciblée d'un médicament thrombolytique pour traiter l'AVC ischémique. Des travaux antérieurs ont démontré l'efficacité de la délivrance ciblée de rtPA *via* des nanoparticules polymériques ou de polysaccharidiques (Ma *et al.*, 2021). Cette étude cherche à ajouter de la valeur à ces vecteurs en utilisant des microbulles visibles en imagerie ultrasonore, pouvant également faciliter la destruction mécanique du caillot par sonothrombolyse.

L'objectif est de développer des microbulles stables et biocompatibles pour encapsuler le rtPA, cibler les thrombi, et ainsi réduire la dose nécessaire de thrombolytique.

18.3. Principales méthodes utilisées :

Le vecteur choisi est constitué de microbulles, déjà utilisées comme agents de contraste en imagerie ultrasonore clinique (Sonovue). Leur développement et production ont été réalisés par le Dr. Louise Fournier durant ses travaux de thèse, sous la supervision du Dr. Cédric Chauvierre, du laboratoire LVTS (Inserm U1148).

Les microbulles sont formées par copolymérisation de cyanoacrylate d'isobutyle (un monomère), et de fucoïdane (un polysaccharide sulfaté), autour d'un gaz biocompatible et échogène : le perfluorobutane. De la rhodamine y a également été incorporée pour suivre la biodistribution des microbulles après administration chez la souris.

Le fucoïdane, en raison de sa similitude avec le ligand naturel (PSGL-1) de la p-sélectine, permet un ciblage efficace du thrombus, cette dernière étant une protéine

d'adhérence exprimée par les plaquettes et l'endothélium activés. Cette propriété fait du fucoïdane un bon agent de ciblage, actuellement en cours d'étude clinique en tant qu'agent de diagnostic de la thrombose (**Fucoïdan-DVT**).

Une fois les microbulles stables obtenues et caractérisées, le rtPA a été incorporé, et son activité a été testée *in vitro*. La capacité de ciblage des microbulles chargées en rtPA a été évaluée par microfluidique, et leur efficacité thrombolytique a été testée *in vivo* chez la souris, utilisant un modèle d'occlusion de l'ACM par injection de thrombine, générant un caillot riche en fibrine, sensible au rtPA.

Les lésions ischémiques, les éventuelles transformations hémorragiques, ainsi que la perméabilité de la BHE ont été évalués par IRM 24 heures après le traitement. La clairance des microbulles a été analysée *post-mortem* par imagerie NIRF (« *Near-Infrared Fluorescence* »).

18.4. Principaux résultats

- ✓ Les microbulles **ciblent** efficacement la **p-sélectine**.
- ✓ Les microbulles chargées en rtPA ont montré une **stabilité** sur plusieurs jours.
- ✓ Le traitement par microbulles chargées en rtPA a permis de **réduire** de plus de **50 %** le volume de la **lésion** par rapport au rtPA libre administré à la **même dose** chez 16 souris.
- ✓ La **dose** de rtPA nécessaire a été **réduite** d'un **facteur 10**, tout en maintenant une efficacité thrombolytique.
- ✓ Aucun effet secondaire, tel que les **hémorragies**, une **rupture de la BHE** ou un **comportement anormal** des animaux n'a été observé.



Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biomaterials

rtPA-loaded fucoidan polymer microbubbles for the targeted treatment of stroke

Louise Fournier^a, Myriam Abioui-Mourgues^b, Georges Chabouh^c, Rachida Aid^{a,d}, Thibault De La Taille^a, Olivier Couture^c, Denis Vivien^{b,e}, Cyrille Orset^b, Cédric Chauvierre^{a,*}^a Université Paris Cité, Université Sorbonne Paris Nord, UMR-S U1148 INSERM, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), F-75018, Paris, France^b Normandie University, UNICAEN, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen Normandie (BB@C), Caen, France^c Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale, Paris, France^d Université Paris Cité, UMS 34, Fédération de Recherche en Imagerie Multi-modalité (FRIM), F-75018, Paris, France^e Department of Clinical Research, Caen-Normandie University Hospital, Caen, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Microbubbles
Fucoidan
Fibrinolytic
Ultrasound
Targeted thrombolysis
Stroke

ABSTRACT

Systemic injection of thrombolytic drugs is the gold standard treatment for non-invasive blood clot resolution. The most serious risks associated with the intravenous injection of tissue plasminogen activator-like proteins are the bleeding complication and the dose related neurotoxicity. Indeed, the drug has to be injected in high concentrations due to its short half-life, the presence of its natural blood inhibitor (PAI-1) and the fast hepatic clearance (0.9 mg/kg in humans, 10 mg/kg in mouse models). Overall, there is a serious need for a dose-reduced targeted treatment to overcome these issues. We present in this article a new acoustic cavitation-based method for polymer MBs synthesis, three times faster than current hydrodynamic-cavitation method. The generated MBs are ultrasound responsive, stable and biocompatible. Their functionalization enabled the efficient and targeted treatment of stroke, without side effects. The stabilizing shell of the MBs is composed of Poly-Isobutyl Cyanoacrylate (PIBCA), copolymerized with fucoidan. Widely studied for its targeting properties, fucoidan exhibit a nanomolar affinity for activated endothelium and activated platelets (P-selectins). Secondly, the thrombolytic agent (rtPA) was loaded onto microbubbles (MBs) with a simple adsorption protocol. Hence, the present study validated the *in vivo* efficiency of rtPA-loaded Fuco MBs to be over 50 % more efficient than regular free rtPA injection for stroke resolution. In addition, the relative injected rtPA grafted onto targeting MBs was 1/10th of the standard effective dose (1 mg/kg in mouse). As a result, no hemorrhagic event, BBB leakage nor unexpected tissue distribution were observed.

1. Introduction

The global burden of cardiovascular diseases (CVD) places them as the leading cause of mortality around the world. Among them, thrombotic diseases including ischemic heart disease and stroke are the most prevalent and described as the main cause of disability [1]. Every year, 15 million new cases of stroke are reported according to the World Health Organization (WHO). The prevalence of stroke increases with age, with the highest rates typically occurring in people over the age of 75. Stroke is also more common in women, and is more prevalent in certain regions of the world, such as Southeast Asia and sub-Saharan Africa, compared to other regions [2]. Overall, the prevalence of

stroke is expected to continue to increase in the coming years due to the aging of global population and the increase of risk factors such as high blood pressure, diabetes, and obesity. In medical terms, ischemic stroke is defined as the obstruction of vasculature in the brain caused by a thrombus. Those blood clots are highly heterogeneous and composed of a variety of cell types [3] including erythrocytes, immune cells and platelets, with the addition of Von Willebrand Factor (VWF) and Neutrophil Extracellular Traps (NETs), tied together by a strong fibrin mesh [4]. Physiologically needed to repair impaired vessel walls, their pathological formation and their circulation in the bloodstream can lead to flow obstruction and distal tissue ischemia if the vessel recanalization is not quickly supported. Patients undergoing stroke events are treated with the gold standard systemic injection of a thrombolytic drug [5] in

* Corresponding author.

E-mail address: cedric.chauvierre@inserm.fr (C. Chauvierre).<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122385>

Received 15 September 2023; Received in revised form 27 October 2023; Accepted 2 November 2023

Available online 8 November 2023

0142-9612/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbreviations			
BBB	Blood Brain Barrier	PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
BCA	Bicinchoninic Acid Assay	PFA	ParaFormAldehyde
CMDex	CarboxyMethyl Dextran	PFB	PerFluoroButane
CVD	CardioVascular Disease	PIBCA	Poly-IsoButyl CyanoAcrylate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	PRF	Pulse Repetition Frequency
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscopy	PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
FIB	Focused Ion Beam	RBC	Red Blood Cell
FTIR	Fourier-Transform InfraRed spectroscopy	ROI	Region Of Interest
GA	Gadoteric Acid	rtPA	recombinant tissue Plasminogen Activator
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell	SD	Standard Deviation
LDH	Lactate DeHydrogenase	TX	Texas Red
MB	Microbubble	US	UltraSound
MCA	Middle Cerebral Artery	VWF	Von Willebrand Factor
MI	Mechanical Index	WB	Working Buffer
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide	WHB	Whole Human Blood
NET	Neutrophil Extracellular Trap	WHO	World Health Organization
		WL	White Light
		3T3	Fibroblasts

order to disassemble the fibrin mesh. There are several different types of “clot busters” used depending on their application (myocardial infarction, pulmonary embolism, stroke ...) but they are mainly plasminogen activators like (Alteplase: rtPA, Reteplase: rPA, Tenecteplase: TNK) [6]. Indeed, this serine protease is naturally present in the body [7] allowing the cleavage of plasminogen into plasmin, responsible for fibrin degradation in homeostatic regulation. This thrombolytic injection can also be associated to mechanical thrombectomy [8] with the limitation of it being an invasive procedure. In addition, the systemic injection of the thrombolytic drug brings several drawbacks like hemorrhagic transformation [9] and neurotoxicity [10] with a recanalization rate below 50 % [11]. To overcome those issues, the strategy to encapsulate rtPA has been explored with different carriers from nanoparticles [6] to microbubbles [12] with the common objective to reduce drug doses and improve the treatment efficiency. Besides drug encapsulation, nanomedicine is also focusing on targeted drug delivery on identified biomarkers. In thrombotic diseases, they are mainly described on activated platelets [13] with P-selectins, GPIIb/IIIa integrins and phosphatidylserines or with circulating molecules like Factor XIII, VWF and fibrin [6]. We focused here on the highly specific interaction between P-selectins expressed on activated platelets or activated endothelium [14] and a sulfated polysaccharide: the fucoidan [15,16]. Indeed, fucoidan has been studied for a few decades because of its structural similarities with PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand 1) [17], natural ligand of P-selectins. Fucoidan nanomolar affinity [17] for P-selectins, makes the fucoidan a very promising targeting agent for thrombotic diseases and already showed its performance *in vivo* [18,19] and is already in clinical trials [20]. The present strategy relies on polymer microbubbles (MBs) for their carrier ability but also their imaging property and treatment enhancement perspectives. Indeed, microbubbles are widely used as clinical contrast agent (Definity®, Sonovue® ...) for US imaging due to their intrinsic echogenic properties [21] and have also been of main interest for the development of sonothrombolysis [22]. Also compared to nanoparticles and smaller systems [23], their micrometric size suggests a similar behavior in the blood compartment as erythrocytes and limits their extravasation [24]. We present in this work, the innovative synthesis of polymer microbubbles via acoustic cavitation recently patented (PCT/FR2022/050309). Indeed, the use of US for MBs generation was only used for protein shelled MBs [25] or as a side step for lipid shell MBs [26]. This new method improved the yield of polymer MBs synthesis and reduce the synthesis time by three compared to standard polymer MBs synthesis with hydrodynamic cavitation.

Functionalized with fucoidan as a targeting agent and rtPA-loaded,

these fully competent MBs were studied for the targeted treatment of stroke (Fig. 1). We characterized these new MBs in terms of stability, biocompatibility, echogenicity, targeting property and thrombolytic activity. Then, in order to validate the efficacy of the treatment, we performed a mouse stroke model and compared gold standard treatment to drug-loaded targeted MBs by measuring the ischemic lesion reduction after 24 h with MRI imaging. Overall, this paper gives interesting perspectives for the use of drug-loaded targeted polymer MBs for the treatment of thrombotic diseases.

2. Materials and methods

Materials: Isobutyl cyanoacrylate (IBCA) monomers were purchased from Afinitica Technologies (Barcelona, Spain). Carboxymethyl dextran 40 (CMDex) was provided from TdB Labs (Uppsala Sweden). Sulfated polysaccharide fucoidan (Mn = 18 kDa Mw = 104 kDa) was obtained from Algues et Mer (Ouessant, France). Surfactant Tween 20 was purchased from Sigma Aldrich as well as the Rhodamine B fluorochrome. Perfluorobutane (PFB) was obtained from F2 Chemicals (Preston, UK).

2.1. Polymer MBs synthesis

Poly-isobutyl cyanoacrylate (PIBCA) microbubbles were obtained from the anionic polymerization of IBCA monomer at the water gas interface. Briefly, 50 ml of an aqueous solution was prepared with HCl 1 M to reach a pH of 2.5. This solution was saturated with perfluorobutane for 10 min and put into a freezer for 15 min to cool it down. Meanwhile, 700 µl of IBCA solution was loaded into a 1 ml syringe and placed onto a syringe pump (AL-300, World Precision Instrument, Florida, USA). The aqueous solution was then placed on ice, under the microtip of the Sonifier (SFX 550, BRANSON Ultrasonic Corp, Danbury, USA) so the tip is centered and half of a centimeter plunged into the aqueous solution. The organic solution and the PFB tank were connected into the aqueous solution with polyethylene catheters (Bioseb Lab Instrument, Salon de Provence, France). Just before the insonation, 500 µl of Tween 20 detergent was added drop by drop into the aqueous phase. The Sonifier was turned on for 20 min at 30 % of amplitude and the IBCA was injected at a controlled speed of 0.45 ml/min. For the MBs containing polysaccharide, 1 g (2 % w/w) was dissolved at the first step of synthesis into the aqueous solution giving fucoidan MBs (Fuco MBs) or carboxymethyl dextran MBs (CMDex MBs) used here as a non-targeting polysaccharide control. Similarly, for the fluorescent MBs, 500 µg of Rhodamine B was added in the first step of the aqueous phase preparation.

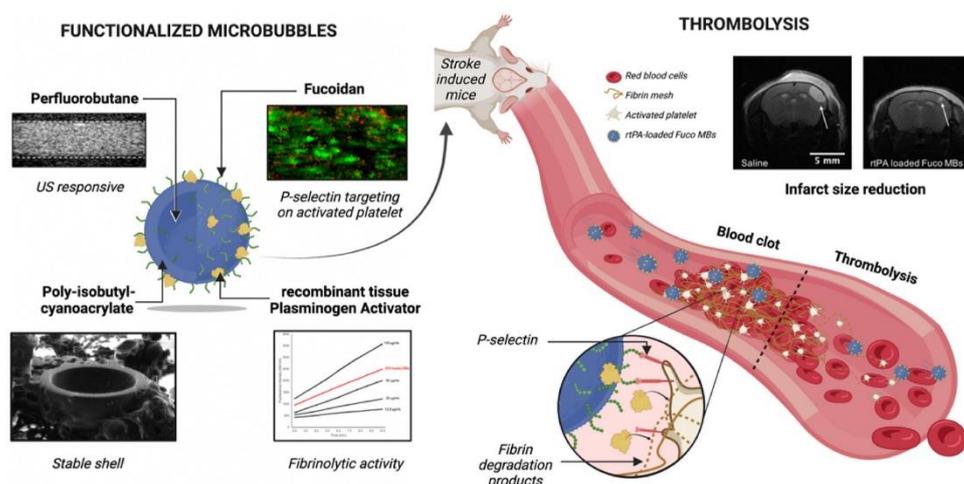


Fig. 1. Graphical abstract of functionalized MBs for the treatment of stroke. MBs are composed of a stable poly-isobutyl cyanoacrylate (PIBCA) shell with a perfluorobutane (PFB) gas core enabling US imaging. Their functionalization was validated for P-selectin targeting with fucoidan and for thrombolytic activity with recombinant tissue Plasminogen Activator (rtPA) loading. After *in vitro* validation, rtPA-loaded targeting MBs were injected in a mouse stroke model to improve thrombolysis recanalization compared to systemic injection of the drug. Fucoidan targeting onto activated platelet P-selectins allowed a specific delivery of rtPA to induce local fibrin degradation. The targeted delivery improved the treatment outcome by reducing the infarcted area after 24 h as observed with MRI imaging.

The obtained foam was centrifuged 3 times at 0.1 g in 50 ml falcon tubes for 20 min, and a solution of 0.02 % Tween 20 was used to resuspend the floating MBs. MBs are then filtered through a 5 μ m sieve using a sieve shaker. The obtained suspension was stored at 5 °C in a 0.02 % Tween 20 solution. For all experiment requiring fluorescence microscopy visualization, MBs were labelled with Rhodamine B.

2.2. MBs concentration, size and zeta potential measurements

MBs concentration is expressed in MBs/ml and measured with image analysis. Briefly, a diluted suspension of MBs was injected into a Malassez cell and imaged with an optical microscope (10 \times objective, Axio Observer, Zeiss). Counting was performed with ImageJ thresholding of MBs signal allowing an evaluation of the mean concentration with count extrapolation. MBs' size was measured with a Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, UK), in water and flow speed of 1500 rpm. For each sample the 10th, 50th and 90th percentile of size in volume (Dv10; Dv50; Dv90) were collected. The measurements were reproduced over the weeks to validate the shelf stability. Zeta potential was measured with electrophoretic light scattering method (Nano ZS, Malvern Instrument, UK). Briefly, MBs were diluted to 1/10 in a KCl 1 mM solution and added to the chamber allowing surface charge measurement, each sample was measured three times and averaged.

2.3. FTIR analysis

Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) spectrums were measured using a Thermo Nicolet AVATAR 370 FTIR spectrometer (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA). The lyophilized samples were blended with KBr (1 % mass) and compressed to obtain a pellet. Transmission spectra were acquired between 4000 cm^{-1} and 400 cm^{-1} .

2.4. Confocal imaging and Scanning Electron Microscopy

Confocal imaging was performed with Zeiss LSM 780 microscope in phase contrast or filtered for Rhodamine B MBs observation. Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM, Philips XL30, ESEM-PEG, Amsterdam, Netherlands) images were performed with the following

parameters: HV 10 kV, WD 13.7 mm, pressure 2.5e^{-4} Pa and magnification from 2500 to 10,000 \times . To evaluate the internal structure of the MBs, Focused Ion Beam (FIB) assisted Scanning Electron Microscopy (SEM, AquilosTM Cryo-FIB, Thermofisher Scientific) was used to cut through the MBs. Samples were deposited onto the SEM grid and dried with paper. The FIB parameters were defined with: HV 30 kV, current 0.10 nA and pressure 1.66e^{-4} Pa.

2.5. Fucoidan quantification with methylene blue dosage

Fucoidan sulfated groups can be recognized by methylene blue colorimetric assay like previously described [27]. On a grade 1 chromatography paper (Whatman[®], GE Healthcare), squares of 1 cm^2 were drawn to delimit the samples. Standard solutions of fucoidan MMW (Algues & Mer, France) were prepared with a serial dilution from 0.5 to 0.3125 mg/ml and the negative control was prepared with a suspension of CMDex MBs. MBs suspension were hydrolyzed with an alkaline solution of NaOH (0.1 M) until no further accumulation at the surface. MBs suspension at a concentration of 1×10^{10} MB/ml and standard samples were successively deposited 5 times 2 μ l with an intermediate drying step at 50 °C for 10min. Once dry, the paper was treated with a solution of Methanol/Acetone (6:4) for 3 min, then treated with the Methylene blue solution of Methanol/Acetone/Water (6:4:15) containing 0.1 % (w/w) methylene blue and 50 mM HCl (1 M) for 10 min. The paper was then washed with several bath of washing solution (Acetic acid/Methanol/Acetone/Water, 5:6:4:75) until the bath remains translucent. To help with the paper manipulation, it was left to dry under the hood. The drawn squares were then cut and placed in 1.5 ml Eppendorf tubes. 500 μ l of 2 % SDS methanol solution was incubated with the cut papers at 50 °C for 15 min. Then, 200 μ l of the tainted solution was then extracted to a 96 well plate and the absorbance was read at 663 nm. Fucoidan final concentration was determined with the linear regression of the standard solution curve.

2.6. US phantom model, US burst model, US imaging in vivo

In vitro echogenic MBs properties were studied through a home-made setup. The US phantom employed was a tissue mimicking Doppler flow

phantom (ATS Laboratories, CIRS) with a wall-less channel of 8 mm in diameter at 20 mm depth. US imaging was conducted using a medical probe, GE-L3-12-D (General Electrics; 256 elements, 0.2 mm pitch size) connected to a research ultrasound scanner, Vantage 256 (Verasonics, Kirkland, USA) and driven at 5 MHz center frequency. The amplitude modulation sequence used here (checkerboard) was programmed with Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA). The *in vitro* acquisition consisted of 3 blocks of 200 images each, using a compounded framerate of 150 Hz and five angles (-4° ; -2° ; 0° ; 2° ; 4°) with a pulse repetition frequency (PRF) of 3 kHz. Prior to the experiments, the emitted pressures of the probe were measured and calibrated using a 0.2 mm needle hydrophone (Precision Acoustic, UK). Flow rate was modulated using butterfly valves to stop the flow. The probe was positioned on top of wall-less phantom and various amplitude of signal (from 8 V to 17 V corresponding to Mechanical Index from 0.23 to 0.60) were evaluated to establish the burst threshold of the MBs, with a constant duty cycle of 67 %. In that manner, MBs suspension flow was stopped to evaluate the signal before and after US insonation. The signal intensity was measured by image analysis with background noise subtraction. *In vivo* US acquisitions were then performed with a 256-channel Verasonics® and an 8 MHz multiplexed matrix probe. Five hundred blocks were acquired, with 200 images per block and a frame rate of 250 Hz; each image being the result of a compounding of 5 plane waves oriented according to $\pm 5^\circ$ (in the elevation axis and in the lateral axis). The sequence was decomposed according to a "light" sequence [28], and lasted for 6 min with an injection of MBs at 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. The data were then reconstructed on a [98.5, 150, 150] μm grid.

2.7. rtPA incorporation onto MBs

An adsorption method was performed by increasing the pH of the MBs suspension to 10 with NaOH 1 M. 2 ml of suspension containing 10^{10} MBs at pH 10 was gently mixed with 500 μg of rtPA (Actilyse®, Boehringer) for 2 h at 5°C . The mix was then placed in a 5 ml syringe with a closing cap and centrifuged for 20 min at 0.1 g. The supernatant was discharged and the mix was rinsed with the storage solution (0.02 % Tween 20 solution at physiological pH), 3 times. The stability of the incorporated drug was measured with the enzyme activity evaluation over 4 days with a washing step between each day.

2.8. Amidolytic activity of incorporated rtPA with PefaFluor® assay

The amidolytic activity of rtPA-loaded MBs was measured by recording the fluorescent signal of the degradation product of Pefa-Fluor® in contact with the serine protease. Briefly, 2.5 μl of the rtPA-loaded MBs were put in contact with 97.5 μl of working buffer (0.1 M HEPES, 0.05 % BSA, 0.9 % NaCl) in a 96 well plate. 10 μl of PefaFluor® (Interchim, France) solution (1 M) was added with a multi pipette and measurement of the fluorescence was performed with monochromatic spectrophotometer (TECAN, Infinite M200 PRO) at $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$ during 70 min. A standard range was obtained by serial dilution of rtPA (Actilyse®, Boehringer) from 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and a negative control was obtained with Tween 0.02 % solution. The kinetics of the fluorescent substrate generation is proportional to the concentration of the enzyme. The leading coefficients of the linear part of the standard curves were then used to establish the linear regression of the concentration.

2.9. rtPA release in vitro

In vitro release was performed by adding 0.3 ml of 10^{10} MB/ml suspension to 2.2 ml of PBS 1X at 37°C for different durations (5, 10, 15, 30, 45, 60 min). The tubes were centrifuged to separate the MBs from unloaded rtPA, 10 min at 0.3 g rtPA was then measured in the supernatant compared to non-centrifuged rtPA-loaded MBs, using the Pefa-Fluor® assay. The release percentage was calculated as followed:

(quantity of rtPA in the supernatant/quantity of rtPA on loaded MBs) * 100. The control group corresponds to the supernatant of centrifuged rtPA-loaded Fuco MBs in 0.02 % Tween 20 storage solution.

2.10. Fibrinolytic activity

rtPA ability to lyse fibrin was evaluated *in vitro*, comparing free rtPA to rtPA-loaded MBs on a fibrin gel model. The gel was prepared by mixing a fibrinogen solution and a thrombin solution. A TRIS buffer (TRIS 0.1 M, NaCl 0.9 %, pH 7.6) was prepared to mix the different component of the solutions. In two separated water baths, 5 ml of the fibrinogen solution (5 mg/ml, from Human plasma, Sigma Aldrich) was heated to 37°C while 5 ml of 3 % low melting agarose (Thermo Scientific) was heated to 65°C . Once agarose has reached its melting temperature, the solution was cooled down to 37°C and 2.5 U of thrombin (from Human plasma, Sigma Aldrich) was added. The two solutions were mixed and quickly poured into a 9 cm Petri dish plate and left to gel 30 min at 5°C . Holes were defined with a 3 mm punch and 5 μl of samples diluted to 1/15 were dropped where the gel was extracted. The set-up was placed at 37°C overnight and fibrin degradation rings were measured with Fiji software.

2.11. In vitro targeting flow experiment on human platelet aggregates

The specific binding of Fuco MBs on P-selectins expressed on activated platelet was evaluated with a microfluidic model [29]. Using the Vena8 Fluoro+ biochip (Cellix Ltd, Ireland). Microchannels were coated overnight with a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ solution of collagen type I at 4°C (equine tendon collagen, Collagen Reagents HORM®, Takeda). Whole Human Blood (WHB) was collected from healthy volunteers in 75 mM PPACK tubes, and platelets were stained with a DIOC6 solution of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ right before injection into the channel. DIOC6 specifically stains mitochondria membranes in living cells [30], excluding erythrocytes staining. For each channel, the following sequence was performed: channel washing with saline solution (NaCl 0.9 %) for 3 min at arterial flow rate (60 $\mu\text{l}/\text{min}$), WHB with DIOC6 injection at arterial flow rate up to 5 min until platelet aggregates start to appear without obstructing the channel; WHB washing with saline solution (NaCl 0.9 %) for 5 min; Rhodamine B stained Fuco MBs injection at venous flow rate (4 $\mu\text{l}/\text{min}$) for 5 min; Washing of Rhodamine B Fuco MBs with saline solution (NaCl 0.9 %) at venous flow rate (4 $\mu\text{l}/\text{min}$) until no more free MBs were circulating. A microscopy image (Axio Observer, Zeiss) was taken between each step to control the platelet aggregates and the targeting properties of the MBs. A negative control was obtained with the injection of CMDex MBs. Quantification was established by measuring the amount of MBs colocalized on platelet aggregates after the final rinsing and normalized to the size of the aggregates using Fiji thresholding analysis.

2.12. Cytotoxicity assays

The evaluation of cytotoxicity was performed with a LDH (Lactate Dehydrogenase) mortality assay and MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] viability assay. Both HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, CRL-1730, ATCC) and BALB/3T3 (mouse embryo fibroblast, clone A31, CCL-163, ATCC) were cultured until confluency, at 37°C in a 5 % CO_2 incubator, with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10 % (v/v) fetal bovine medium, 4 mmol of L-glutamine, 1 % (v/v) of penicillin and 1 % (v/v) of streptomycin. For LDH mortality assay (Cytotoxicity detection kit PLUS, Roche), HUVECs and BALB/3T3 were culture in 96 wells plates. Briefly, after incubation with various concentrations of MBs diluted in cell culture medium (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 and 10^4 MB/ml), supernatants were recovered either after 2, 4 or 6 h. The recovered culture medias were incubated with LDH reaction mix according to the supplier guidelines for 15 min at room temperature. After addition of the stop solution, the absorbance of the samples was read at 492 and 690 nm (control

wavelength). The cell cytotoxicity was then determined by subtracting the control wavelength to the absorbance at 492 nm and normalized to dead cell absorbance: Cell mortality = $[(\text{Abs of the sample} - \text{Abs of culture medium}) / (\text{Abs of 100 \% of dead cells} - \text{Abs of culture medium}) \times 100]$.

For the MTT assay, cells were seeded in 24 well plates. This assay was performed with cell culture insert (Falcon®, 1 μm of mesh diameter) to avoid the sedimentation of MBs residues onto the cells, allowing the focus on the degradation product toxicity rather than cell asphyxia in static conditions. Indeed, due to the experimental conditions, 37 °C for 6 h, we expected MBs burst and consequently MBs residues sedimentation rather than intact MBs floating property. Cell culture medium was discharged and replaced by 300 μl of new medium, inserts were placed in each well and 300 μl of MBs diluted in cell culture medium were added inside the inserts for a final MBs concentration of 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 and 10^4 MB/ml. After 6 h of incubation, cells insert and medium were replaced by 300 μl of MTT solution (0.05 % in PBS 1X) and incubated for 3 h at 37 °C in dark environment. The medium was removed by gentle plate reversal on dry paper and the 300 μl of isopropanol was added to each well. After 1 h at room temperature, absorbance was measured at 490 nm in a TECAN (Infinite M200 PRO) plate reader. The cell viability was measured as: Cell viability = $[(\text{Abs of sample} - \text{Abs of dead cells control}) / (\text{Abs of living cells control} - \text{Abs of dead cells control}) \times 100]$.

2.13. Hemolysis evaluation

Whole Human Blood from healthy volunteers was centrifuged 5 min at 500 g to isolate Red Blood Cells (RBC) in 25 μM PPACK tube to avoid coagulation. Hematocrit and plasma level were labelled on the tube, plasma phase was aspirated and replaced by 0.9 % saline solution twice. Then 0.9 % NaCl was replaced by PBS 1X. The final RBC suspension was diluted to 1/50 in PBS 1X. In a V-bottom 96 well plate, 10 μl of MBs suspension was added at different concentration (from 0.125×10^8 to 10^8 MB/ml). 190 μl of previously prepared RBC suspension was added to the wells and incubated at 37 °C for 1 h on an orbital shaker. Plates were centrifuged to the same conditions to recover the RBC pellet. Supernatant was then transferred into a clean flat bottomed 96-well plate and absorbance was measured at 450 nm with a monochromator (TECAN, Infinite M200 PRO). Positive control was obtained with Triton 10X allowing a complete lysis of the RBCs and negative control was performed with PBS 1X. Percentage of hemolysis was obtained with the following formula: Hemolysis = $[(\text{Abs of sample} - \text{Abs of negative control}) / (\text{Abs of positive control} - \text{Abs of negative control}) \times 100]$.

2.14. In vivo stroke model

Animal studies were performed on 6–8 weeks old (30–40 g) Swiss wild type male (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). All experiment were adapted according to French (Decree 87/848) and European (2010/63/EU) ethical guidelines. The local committee of Normandy (CENOMEXA) approved the fulfilling of the experiments with the reference number APAFIS#44566. Mice were anesthetized with 5 % of isoflurane inhalation and maintained to 2 % during the entire procedure. As analgesic, they subcutaneously received buprenorphine (0.1 mg/kg) and ear local anesthesia with lidocaine spray. Mice heads were stabilized in a stereotaxic platform and a catheter was placed in the tail vein for the treatment injection. After a local craniotomy on top of the Middle Cerebral Artery (MCA), the dura mater was excised to expose the MCA bifurcation. Precise pneumatical injection of 1 μl of murine thrombin (1 IU, Stago BNL) was carried out by elongated glass capillaries in the MCA to induce fibrin rich thrombus formation [31]. The treatment procedures were performed intravenously, 30 min after thrombin injection with either, free rtPA (Actilyse®, Boehringer) at 1 mg/kg in infusion (300 μl , 10 % bolus + 90 % infusion for 40 min, N = 20); rtPA-loaded Fuco MBs at 1 mg/kg equivalence in bolus (300 μl , 3×10^9 MBs, N = 18); Fuco MBs in bolus (300 μl , 3×10^9 MBs, N = 18) or saline in

infusion (300 μl , 10 % bolus + 90 % infusion for 40 min, N = 19).

2.15. Speckle imaging

Monitoring of the *in vivo* brain perfusion was obtained with Laser Speckle Contrast Imager (MOOR FLPI-2, Moor Instruments), allowing the visualization of blood figurative elements. Speckle images were taken before and after the stroke induction as well as before and after the treatment to control the occlusion. The quantification of the flow mean was generated by comparing stroke Region of Interest (ROI) to the same region on the contralateral hemisphere, before and after treatment. In case of no ischemic lesion, mice with pre-stroke contrast difference in both hemisphere and mice with complete reperfusion right after treatment were excluded from the study. For the first scenario, it was not possible to define if the clot was ever obtained. For the second scenario, it was not possible to attest if the clot was not formed correctly or completely dissolved by the treatment.

2.16. Magnetic resonance imaging and BBB permeability

24 h after treatment, mice brains were imaged with MRI to measure the size of the infarcted areas. Briefly, mice were anesthetized with 5 % of isoflurane inhalation and maintained to 2 % during the acquisitions. All acquisitions were obtained with a Pharmascan 7 T (Bruker Biospin, France), T2 sequence (echo time 39.9 ms, repetition time 3500 ms, 2 averages) were used for ischemic lesion visualization and T2 Star sequence (echo time 8.7 ms, repetition time 500 ms, 2 averages) were used for hemorrhagic lesion visualization. Lesion volumes were quantified with image analysis of the hyper signal cut off area on all the brain slices (0.5 mm thickness) with the formula: Ischemic lesion volume = $(\sum \text{ischemic areas}) \times 0.5$.

For the evaluation of Blood Brain Barrier (BBB) permeability, Gadoteric Acid (GA, Clariscan Gé, GE Healthcare) was injected intravenously in the tail vein (200 μl at 0.75 mmol/kg). After 15 min, three dimensional T1 Flash acquisition (echo time 4.4 ms, repetition time 15 ms, 3 averages) was recorded and white hyper signal volume was quantified as BBB leakage of GA compared to acquisition before injection, using Fiji software using the same formula as for ischemic lesion volume.

2.17. In vivo fluorescence imaging

The observation of fluorescent Fuco MBs targeting was performed using a modular stereo microscope (Leica Microsystems MZ10 F). As previously described, ischemic stroke was induced by thrombin injection in the right MCA under the stereo-microscope. Centrifuged ultrasound gel and a microscope slide were applied onto the MCA to facilitate imaging. Acquisitions were performed using both white light (WL) and a Texas Red (TX) filter, 30 min after the stroke, before and after Fuco MBs injection (300 μl , 3×10^9 MBs, N = 1).

2.18. Ex vivo fluorescence biodistribution on complete or sectioned organs

Organs from previously described procedures were harvested 2 h (Fuco MBs: N = 3), 8 h (Fuco MBs: N = 3) or 24 h (Fuco MBs: N = 7, rtPA-loaded Fuco MBs: N = 5) after treatment. Biodistribution of the Fuco MBs was imaged by near-infrared fluorescence imaging (IVIS® Lumina III, PerkinElmer, USA). The imaging of complete organs was performed on brain, liver, lungs, bladder, spleen, intestines and kidney right after euthanasia without PFA fixation. The quantification of fluorescence intensities ($\lambda_{\text{Ex}} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 620 \text{ nm}$) in regions of interest (ROIs) were analyzed using Living Image® software. For histology analysis, mice received buprenorphine (0.1 mg/kg) and were deeply anesthetized with 5 % of isoflurane inhalation before procedure. After a thoracotomy, a cannula was inserted into the left ventricle, and the right atrium was incised to rinse the circulatory system. Transcardiac

perfusion was then performed with 50 ml of heparinized saline (0.5 ml/L) followed by 30 ml of 4 % paraformaldehyde (PFA) at a constant speed of 14 ml/min. Organs were post-fixed in 4 % PFA overnight at 4 °C then plunged in cryoprotective solution (20 % sucrose in PBS 1X) overnight before to be stored at -80 °C. Organs were subsequently sliced with a cryostat at a 10 µm thickness. Slices were stained with DAPI mounting medium (ABCAM) for nucleus recognition and with rat anti-mouse CD68 primary antibody (Biolegend) followed by a FITC secondary antibody (Biolegend) to highlight tissue macrophages.

2.19. Statistical analysis

Quantitative data underwent the statistical analysis of GraphPad PRISM 8 with a 95 % confidence level. All presented data are means of at least triplicates expressed with their standard deviation (SD). Normality test were performed using Kolmogorov-Smirnov test and if needed outliers were identified and excluded with ROUT method (1 % of aggressivity of the Gaussian distribution). Depending on the design of the experiment and after normality validation, data were evaluated with unpaired *t*-test (two groups) or ANOVA (more than two groups) in association with multiple comparison in between groups (Tukey's test). *P*-values were represented as followed, and deemed significant below the 0.05 threshold: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001.

3. Results

3.1. Polymer MBs synthesis and characterization

MBs synthesis was inspired by the well-described hydrodynamic cavitation method like recently published by Bo Li. et al. [19]. In this work, the cavitation energy was replaced by ultrasonic insonation into

the polysaccharide solution. This recently patented acoustic cavitation method enabled the production of polymer MBs within 20 min (Fig. 2A) (PCT/FR2022/050309). The set-up was placed on ice to regulate the synthesis temperature rise and perfluorobutane (PFB) was constantly injected into the polysaccharide solution. The entrapped gas helped for the stability of the anionic copolymerization between cyanoacrylate monomer and polysaccharide chains. Fucoidan (Fuco) was used here as the targeting agent and so carboxymethyl dextran (CMDex) was used as the control polysaccharide for untargeted MBs. Comparing Fuco MBs and CMDex MBs (Fig. 2B), it was demonstrated that the amount of MBs produced was independent from the polysaccharide composition with a yield around 2.5×10^{10} MBs per batch. The mean size after sieve filtration was measured at $3.13 (\pm 0.81) \mu\text{m}$ for Fuco MBs and $3.07 (\pm 1.49) \mu\text{m}$ for CMDex MBs, showing no significant difference depending on the shell compositions, in accordance with the close size range of both polysaccharides (Fig. S1A). The evaluation of the surface charge was shown negative with a zeta potential close to -45 mV for Fuco MBs and close to -30 mV for CMDex MBs, also in accordance with the negatively charged groups in fucoidan and carboxymethyl dextran (Fig. S1B). The size stability was monitored over a month by measuring the size of the MBs. A slight size augmentation would be attributed to shell destabilization leading to MBs aggregation detected by the apparatus as bigger MBs. In Fig. 2C, the shelf stability was measured right after synthesis, after 3 and 4 weeks (independently of their incorporated polysaccharide). MBs were either placed at -5 °C or 20 °C to establish the best storage conditions for MBs suspension. It has been demonstrated that 5 °C was the best storage temperature as the mean MBs was stable at $3.27 (\pm 0.71) \mu\text{m}$ for 4 weeks. Room temperature storage showed a slight increased mean size to $4.09 (\pm 0.22) \mu\text{m}$ after 4 weeks, which is still in the range for possible animal injection. The whole size distribution presenting the Dv10, Dv50, Dv90 are plotted on Fig. S1C, highlighting

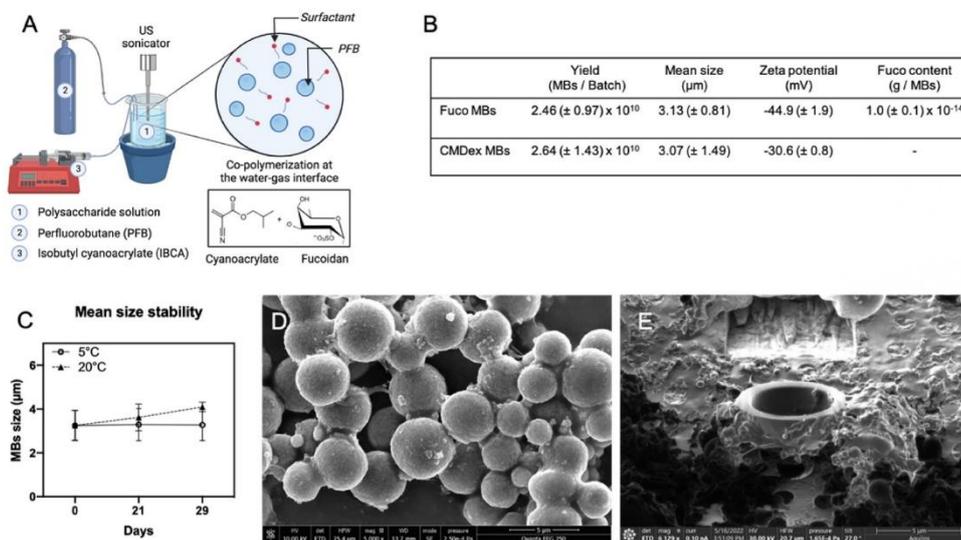


Fig. 2. Functionalized polymer MBs characterization. A) Innovative synthesis method. Monomer of isobutyl cyanoacrylate (IBCA) was injected with a needle pusher into the acidic aqueous polysaccharide solution while constant bubbling of perfluorobutane was ongoing. US sonicator was immersed inside the aqueous solution and generates continuous signal for 20 min at 30 % of amplitude. The system is placed on ice to avoid temperature rising. Due to high hydrophobicity, IBCA will tend to polymerized at the water-gas interface, copolymerizing with polysaccharides dissolved into the solution and entrapping PFB. B) Summary of principal physico-chemical characterization depending on the incorporated polysaccharide. Yield was measured with MBs counting on Malassez cell, mean size was measured with laser diffraction granulometry, zeta potential was obtained with electrophoretic light scattering and fucoidan content was dosed with methylene blue colorimetric assay. C) Mean size of MBs suspension over a month measured with laser diffraction granulometry, comparing 5 °C and 20 °C for shelf storage. D) Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM) image of MBs pointing out their homogenous rounded shape. Scale bar is 5 µm. E) Focus Ion Beam (FIB) cut through a single polymer MBs pointing out the hollow structure and the thick shell around 500 nm thick. Scale bar is 5 µm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

the size stability after 4 weeks. In complement to this size distribution study, we validated that the incorporation of rtPA presented below did not affect the mean size of the MBs (Fig. S1D).

The characterization of fucoidan content was obtained with the quantification of sulfated groups as presented in the Supplementary data (Fig. S2A-B-C). This colorimetric method based on Methylene Blue staining pointed out the presence of the sulfated polysaccharide in the range of 1×10^{-14} g/MB using CMDex MBs as negative control. Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM) images presented in Fig. 2D validated the rounded shape of MBs as well as the short polydispersity after filtration. To ensure the hollow structure of the MBs observed in confocal imaging (Fig. S3A), Focused Ion Beam (FIB) technology was used to cut through individual MBs (Fig. 2E). The shell homogeneity was then demonstrated and an estimation of the shell thickness was measured in the range of 500 nm, subsequently emphasized with confocal fluorescence imaging (Fig. S3B-C-D).

3.2. Echogenicity of MBs

One intrinsic property of MBs is their ability to respond to an ultrasound signal [32,33]. Indeed, microbubbles are now widely used in clinic as US contrast agents for US imaging. Their ability to resonate under US creates bright signal compared to surrounding tissues in cardiac echography for example. The proposed agent can be an answer for the problem of specificity in diagnostic or treatment thanks to its precise targeting. To ensure the echogenic properties of those newly synthesized MBs, a home-made *in vitro* model was established to determine the burst threshold of MBs in function of the intensity of the signal (Fig. 3A). Intensities varied from 8 V, 9 V, 10 V, 11 V, 12 V, 13 V, 14 V and 17 V corresponding respectively to the following mechanical index 0.230 (± 0.002), 0.270 (± 0.003), 0.310 (± 0.004), 0.350 (± 0.002), 0.390

(± 0.003), 0.430 (± 0.003), 0.470 (± 0.002) and 0.600 (± 0.001). The imaging sequences were measured with a 2 V signal before and after 2 sequences of the burst periods (Fig. 3B). The signal was normalized to water and to MBs insonated with 2 V all along. The intensity rise at the beginning of each burst sequence corresponds to a “blinking” phenomenon of MBs before ongoing inertial cavitation. The last part of the graph displays the loss of signal due to some MBs implosion. The difference between the initial intensity signal and the final intensity one is plotted on Fig. 3C as the disruptive ratio. This ratio determines the amount of disrupted MBs and clearly states that over 10 V (Mechanical Index = 0.31) more than 50 % of MBs underwent inertial cavitation. This is illustrated with Fig. 3D, displaying the US images of the channels before and after 8 V or 17 V US insonation. In addition, *in vivo* US imaging was performed as presented on Fig. S4. The matrix represents an US image of a mouse brain on the Bregma 0 2D section. On the left we can observe the US signal before MBs injection and on the right the accentuated contrast after MBs injection. This figure validates MBs survival *in vivo* through their contrast enhancer property.

3.3. Drug loading and targeting of MBs

MBs were functionalized with rtPA (Actilyse®), the recombinant tissue Plasminogen Activator used for human treatment. The incorporation was obtained with an adsorption protocol (Fig. 4A) where the pH rising of the MBs suspension allowed the incorporation of the protein within 2 h, followed by several washing steps with the storage solution at physiological pH. To evaluate the amount of incorporated rtPA, the protein activity was measured, ensuring that its incorporation did not affect its enzymatic activity. Primarily noticed result was the high number of incorporated proteins onto Fuco MBs compared to CMDex MBs (Fig. 4B). This specific incorporation is believed to be related to the

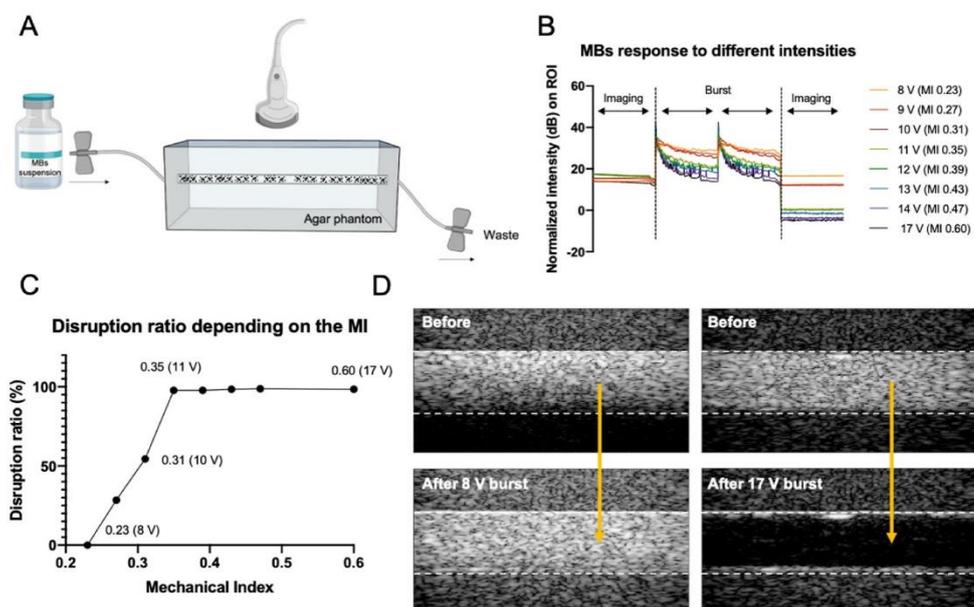


Fig. 3. Echogenicity characterization of MBs. A) Flow phantom setup mimicking blood vessel circulation. The flow can be monitored with a butterfly closure system and the US transducer is placed on top of the phantom. B) Echogenic response of MBs at 5 MHz frequency and different intensities in volt (from 8 to 17). The curve is composed of 4 sequences: 1 imaging at 2 V, 2 burst sequences depending on the different intensities and 1 more imaging sequence at 2 V to compare before and after bursting signal. C) Disruptive ratio calculated from the normalized intensity difference before and after burst sequence. Mechanical Index 0.230 (± 0.002), 0.270 (± 0.003), 0.310 (± 0.004), 0.350 (± 0.002), 0.390 (± 0.003), 0.430 (± 0.003), 0.470 (± 0.002) and 0.600 (± 0.001) correspond to the voltage signal of 8 V–17 V. D) US images from phantom setup before and after 8 V burst and before and after 17 V burst. The channel is highlighted with a dotted line and MBs signal is visible in white contrast.

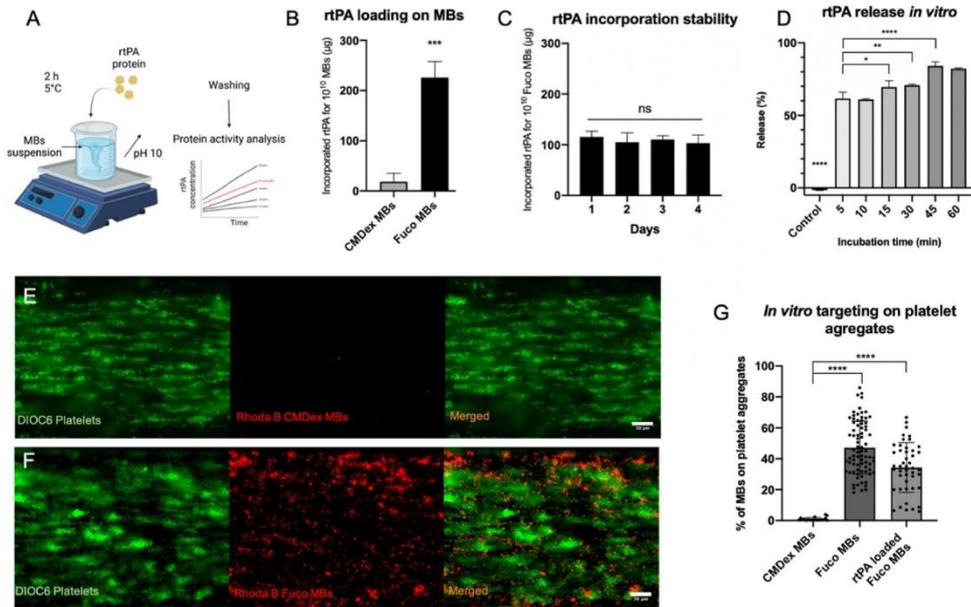


Fig. 4. Functionalization of MBs. A-B-C-D) Drug loading and validation of the rtPA activity after incorporation. A) Drug loading adsorption protocol. Briefly, 500 μg of rtPA in solution was added to a MBs suspension from which the pH has been risen to 10 with NaOH. The mix was left for 2 h under gentle agitation and then rinsed 3 times by centrifugation and discharge of the supernatant. The protein activity is then monitored on drug-loaded MBs with a kinetic substrate degradation assay (PefaFluor®). B) Protein incorporation determined from protein activity assay of rtPA onto either Fuco MBs or CMDex MBs after 3 centrifugation basing step. C) Stability of rtPA incorporation onto Fuco MBs over 4 days with washing centrifugation step in between days. D) *In vitro* release of rtPA in PBS 1X at 37 °C from 5 to 60 min rtPA was quantified in the supernatant after MBs suspension centrifugation and compared to the total amount of loaded rtPA. Control group corresponds to Fuco MBs incubated in 0.02 % Tween 20 storage solution. E-F-G) *In vitro* flow targeting. E-F) Microscopy images of Vena8 Fluoro⁺ microchannels. Platelets from Whole Human Blood were labelled with DIOC6 and MBs were synthesized with Rhodamine B, the last image is a merge of both DIOC6 and Rhodamine B channels. Images are taken under venous flow indicating that stopped MBs are attached to platelet aggregates. E) is the control group of CMDex MBs and F) is the result of Fuco MBs. Scale bar is 50 μm . G) Quantification of MBs targeting on platelet aggregates normalized to the size of the aggregates. The evaluation of rtPA-loaded Fuco MBs targeting confirmed that the drug loading did not compromise the effective targeting on P-selectins.

interaction with activated sulfated groups of fucoidan [34]. Indeed, Fucoidan MBs were able to incorporate $226 \pm 32 \mu\text{g}$ of rtPA for 10^{10} MBs compared to $19 \pm 16 \mu\text{g}$ of rtPA for 10^{10} MBs onto CMDex MBs. Then, rtPA incorporation stability was evaluated over 4 days with centrifugation washing between each day (Fig. 4C), pointing out a stable incorporation threshold of $108 \pm 5 \mu\text{g}$ of rtPA for 10^{10} MBs from day 1 to day 4. This stable incorporated score was observed after the 4th centrifugation washing step on day 1 and stable after the next washing steps. With the aim of producing reproducible results, the stable quantity of incorporated rtPA onto Fuco MBs was set to $100 \mu\text{g}/10^{10}$ MBs. The fibrinolytic activity of incorporated rtPA was validated with a fibrin agar assay (Fig. S5A) by measuring the degradation area of the gel after 2, 5 and 24 h at 37 °C. This semi quantitative method demonstrated that the fibrinolytic activity was maintained when rtPA was encapsulated compared to free rtPA (Fig. S5B). For further *in vivo* translation, release profile was performed by incubating rtPA-loaded MBs in PBS 1X at 37 °C from 5 to 60 min (Fig. 4D). It was demonstrated that more than $62 \pm 4 \%$ of release happened in the first 5 min of incubation and after 60 min of incubation up to $82 \pm 1 \%$ of rtPA was released in PBS 1X.

The targeting property of Fuco MBs were evaluated in fluidic conditions mimicking *in vivo* blood circulation (Fig. 4E-G). Platelet aggregates formation on collagen coating is highly dependent to flow rate (60 $\mu\text{l}/\text{min}$) [35] and was monitored with fluorescent microscopy to avoid channel clogging. Fuco MBs targeting was measured with Fiji image analysis after rinsing the channel with saline solution and normalized to the platelet aggregate size. Previous work validated the specificity of fucoidan for P-selectins over E and L-selectins [18], here the focus was

on expressed P-selectins by activated human platelets. The targeting (Fig. 4G) was highly significant (P Value < 0.0001) comparing CMDex MBs (Fig. 4E) to Fuco MBs (Fig. 4F). Also, the drug-loaded MBs were still able to target activated platelets with a significant difference to control CMDex MBs (P Value < 0.0001). This targeting assay validated that *ex vivo* platelet targeting was highly efficient and that rtPA incorporation did not prohibit MBs targeting despite rtPA interaction with the targeting agent. *In vivo* targeting was also evaluated with fluorescence microscopy on the stroke region (Fig. S6). Briefly, 30 min after stroke induction fluorescent MBs were injected in the tail vein and before (Fig. S6A) and after (Fig. S6B) shot were taken. The fluorescence is nicely located on the MCA bifurcation (highlighted in white) validating the affinity of Fuco MBs for the inflammatory signal of stroke *in vivo*.

3.4. Biocompatibility of MBs

Before *in vivo* injection, cytotoxicity towards Red Blood Cells (RBC), endothelial cells (HUVEC) and fibroblast (3T3) were assessed (Fig. 5). Lactate Dehydrogenase (LDH) is a cytoplasmic enzyme, thus its presence in the culture medium is a marker of cell membrane rupture. This mortality assay was performed on two cell types likely to encounter MBs *in vivo*. Mortality tests on endothelial cells were on average of 4.73 (± 2.07) % all conditions reunited (Fig. 5A) while fibroblasts showed a mortality of 7.9 (± 3.5) % independently of the condition (Fig. 5B). Overall, no mortality was measured (above 30 % threshold), neither for HUVECs and 3T3 nor 2 h, 4 h or 6 h times points and likewise for increasing MBs concentrations. The second cytocompatibility evaluation

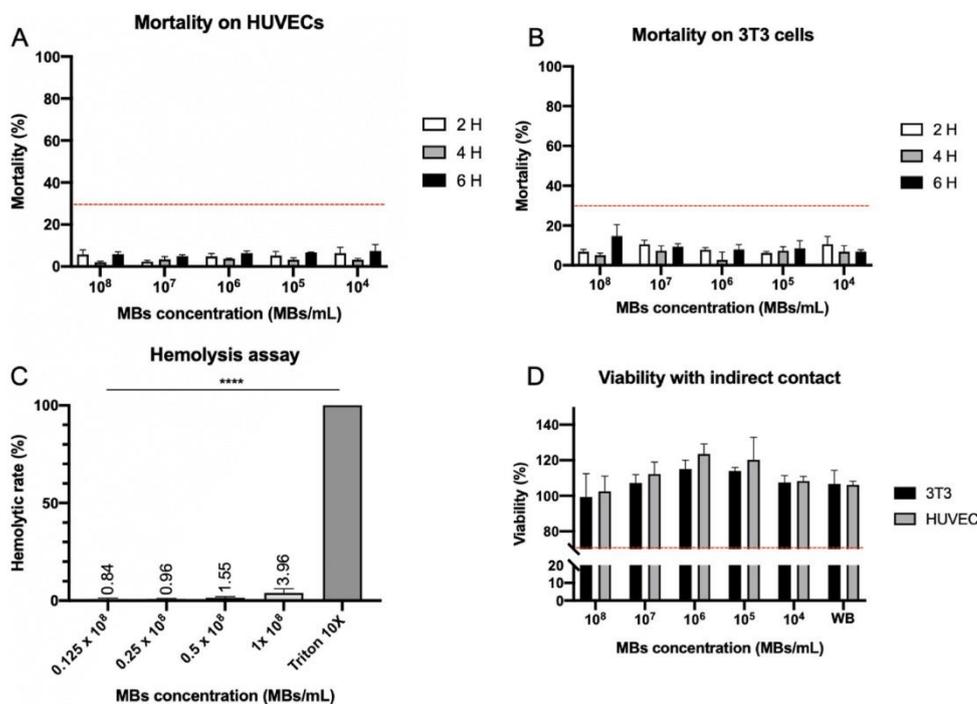


Fig. 5. Biocompatibility study of Fuco MBs on different cell types. A-B) LDH quantification assay on endothelial cells (A) and fibroblasts (B) for increasing concentration of MBs and different time points. LDH is a cytoplasmic enzyme only present in the culture medium if cells undergo apoptosis. Here, none of the concentrations or time of contact induced a mortality above the red dotted line of 30 % indicating the biocompatibility of Fuco MBs. C) Hemolysis assay of Fuco MBs on human Red Blood Cells. The time of contact here was 1 h and showed less than 4 % of hemolysis at the highest MBs concentration (10^8 MB/ml) compared to Triton 10X. D) MTT assay with indirect contact of Fuco MBs on endothelial cells and fibroblasts for 6 h. The MBs suspension was added on top of a cell culture insert with 1 μ m mesh to avoid the asphyxia of cells due to MBs debris sedimentation after long contact time in culture medium. The same Fuco MBs concentration was used as the mortality assay and 0.02 % Tween Working Buffer (WB) was also put to the test. Again, no condition induced a viability below 70 % (red dotted line). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

was performed on RBC by the measurement of hemoglobin release in the supernatant also marker of cell lysis (Fig. 5C). Normalized to Triton 10X lysis, MBs incubation with RBC for 1 h did not induce cell lysis even at 10^8 MB/ml (<4 %). Lastly, viability assay was performed for 6 h with MTT assay. To prevent from cell asphyxia because of MBs debris sedimentation (caused by the assay temperature and time conditions), the MBs suspension was added on top of a 1 μ m cell culture insert. The MTT assay evaluates the cell metabolic activity by the reduction of MTT to formazan with mitochondrial reductases. After 6 h of incubation, none of the conditions showed a diminution in the cell's metabolic activity for HUVECs or 3T3 (Fig. 5D) with a mean survival rate above 100 % compared to MBs control cells cultured without MBs. The 0.02 % Tween Working Buffer (WB) did not influence the cell viability either. Images of formazan crystals were also taken with optical microscopy comparing the highest concentration (10^8 MB/ml) to cells that were not in contact with MBs (Fig. S7). Those pictures highlighted the healthy phenotypes of cells and the correct metabolization of MTT. Therefore, no cytotoxicity was demonstrated on three different cell types in contact high concentrations of MBs, using three different assays.

3.5. In vivo stroke model

The *in vivo* stroke model was performed as presented in Fig. 6A. After a local craniotomy over the MCA, thrombin injection generated fibrin rich clot formation. Speckle imaging was performed before and after each step to validate the reduction of blood flow in the region of the

stroke (Fig. 6B). Speckle imaging enabled the visualization of the perfusion on each hemisphere and was quantified with image analysis as presented in Fig. 6C. Low signal in blue was observed in all groups (Fig. 6B), with a reduction of perfusion close to 40 % without significant difference in between groups, 30 min after the thrombin injection. Then, the treatment was carried out with intravenous tail vein injection. The final checkup was obtained at 24 h with MRI image analysis of the ischemic region. The MRI images displayed on Fig. 6D were taken 24 h after the treatment, and the white region pointed by an arrow represents the ischemic region on successive planes of mouse brains for the three groups. In pre-clinical application, the treatment for an efficient thrombolysis using rtPA injection in mice models is usually performed with 10 mg/kg ratio while we set the threshold here to 1 mg/kg of rtPA for both free rtPA and rtPA-loaded MBs [31]. In consequence, there is no significant difference in the ischemic lesion volume between the saline group ($N = 19$, 10.99 ± 4.83 mm³), the free rtPA group ($N = 20$, 8.26 ± 5.75 mm³) and neither control Fuco MBs ($N = 18$, 13.70 ± 5.80 mm³). Nevertheless, the rtPA-loaded Fuco MBs treatment significantly reduced the infarcted area by more than 50 % ($N = 18$, 3.83 ± 3.55 mm³) compared to free rtPA treatment (Fig. 6E). In addition, we compared the infarct size prevalence in each group (Fig. 6F) by defining 4 groups: no lesion (0 mm³), small lesion (<5 mm³), medium lesions (from 5 to 10 mm³) and large lesions (>10 mm³). Large lesions were only observed once in rtPA-loaded Fuco MBs treatment with a majority of small lesion ($N = 9$). On the contrary, saline group and Fuco MBs group presented a majority of large lesion ($N = 11$ and $N = 12$ respectively). Free rtPA

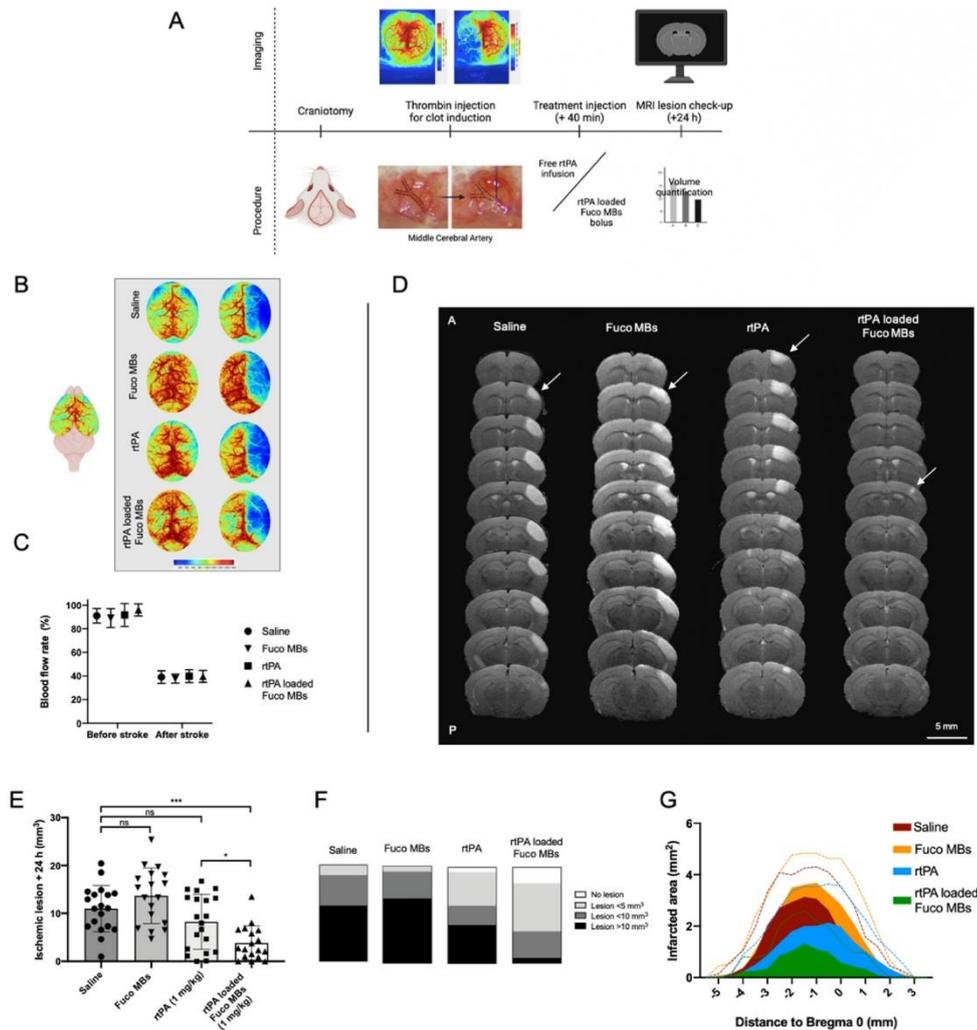


Fig. 6. In vivo stroke model study on mice comparing rtPA-loaded Fuco MBs treatment to systemic injection of rtPA. A) Graphical abstract of the experimental setup. Briefly, mice were anesthetized and placed onto a stereotaxic platform. A craniotomy allowed the direct access to the Middle Cerebral Artery (MCA) to inject thrombin. After 40 min, either saline infusion, Fuco MBs bolus, free rtPA infusion or rtPA-loaded Fuco MBs bolus were used as stroke treatment. The MRI images of the mouse brain were taken 24 h after the treatment to evaluate the infarcted area volume. B) Validation of the partial occlusion after stroke induction with laser Speckle acquisition for each group. C) Flow rates quantification from laser Speckle imaging comparing the right hemisphere to the contralateral one for each group. D) MRI images of mouse brains +24 h after the three treatment conditions from antero (A) to posterior position (P). The white arrows point out the infarcted area and the scale bar is 5 mm. Those images are representative of each group lesions. E) Lesions volumes quantification from MRI images. Volumes were measured with the Fiji software by compiling areas of all brain slices for saline, drug free Fuco MBs, free rtPA and rtPA-loaded Fuco MBs treatment. F) Lesion distribution according to their severity from: no lesion, small lesion ($<5 \text{ mm}^3$), medium lesion ($>5; <10 \text{ mm}^3$) to large lesion ($>10 \text{ mm}^3$). G) Ischemic lesion distribution means in the brain for the different groups (dotted lines represent the standard deviation). Bregma plan is considered at the plan 0 for all conditions.

group presented a reduced amount of large lesion ($N = 8$) but still had a majority of medium lesion and above. Another representation of ischemic lesions is presented in Fig. 6G displaying the mean lesion size distribution in the different planes of the brain using the Bregma as the zero position. The extent of distribution remains similar to all the groups (from -4 to $+2 \text{ mm}$) but the size of the lesions on individual segment is largely reduced with rtPA-loaded Fuco MBs treatment in green.

Since MBs treatment involves micron size bubbles, we also monitored the Blood Brain Barrier (BBB) permeability (Figs. S8A–B). By injecting Gadoteric Acid (GA) intravenously, the leakage of BBB permeability can be observed with T1 MRI acquisition as white spots around the infarcted areas (Fig. S8A). Nevertheless, this test showed no evidence of BBB impairment comparing saline, Fuco MBs, free rtPA and rtPA-loaded Fuco MBs groups (Fig. S8B). Some spots were identified with saline treatment but isolated events could also be the consequence of the surgery itself. Overall, the targeted treatment with rtPA-loaded

Fuco MBs was significantly more efficient than gold standard treatment and neither collateral hemorrhage or BBB leakage was observed.

3.6. Ex vivo fluorescence biodistribution on sectioned or complete organs

The biodistribution of rtPA-loaded Fuco MBs has been studied with organ fluorescence macroscopy (Fig. 7A-B-C). Ex vivo organ macroscopy was performed 24 h after treatment (Fig. 7A and B) on brain, lungs, liver, kidney, spleen, bladder and intestine compared to saline groups. As MBs were labelled with Rhodamine B, the fluorescence residues of MBs can be observed with an excitation wavelength of 550 nm (Fig. 7A). Normalized to the size of the organ, fluorescence count (Fig. 7B) gives a qualitative evaluation of MBs biodistribution in the body. The majority of fluorescence was observed in the brain for each Fuco MBs ($1.4 \pm 0.2 \times 10^6$ count/cm²/s) and rtPA-loaded Fuco MBs ($1.1 \pm 0.4 \times 10^6$ count/cm²/s), validating the targeting property *in vivo* but also the targeting property conservation despite rtPA loading. Then lungs and liver displayed fluorescence fulfilling their function of blood detoxification. No

fluorescence was observed neither in the kidney, spleen, bladder or intestine. We also followed the fluorescence of Fuco MBs at 2 h and 8 h post treatment in the organs (Fig. 7C) without significant difference but interestingly the specific fluorescence in the stroke area was still observed after 24 h. It enhanced the validation of Fuco MBs targeting capacity *in vivo* but also brings new insights for the P-selectins expression on activated endothelium, after clot resolution and thus interesting perspectives for molecular imaging. In regards to those results, the histology study was performed on liver explanted 2 h after Fuco MBs injection, to assess their uptake by resident macrophages. In Fig. 7D, cell nuclei were colored with DAPI and macrophages were labelled in green with an antibody against CD68 biomarker. Rhodamine B Fuco MBs residues were observed to be colocalized with macrophages biomarker CD68 indicating a potential internalization by the scavenger cells.

4. Discussion

Thrombotic diseases are life threatening conditions. Despite the

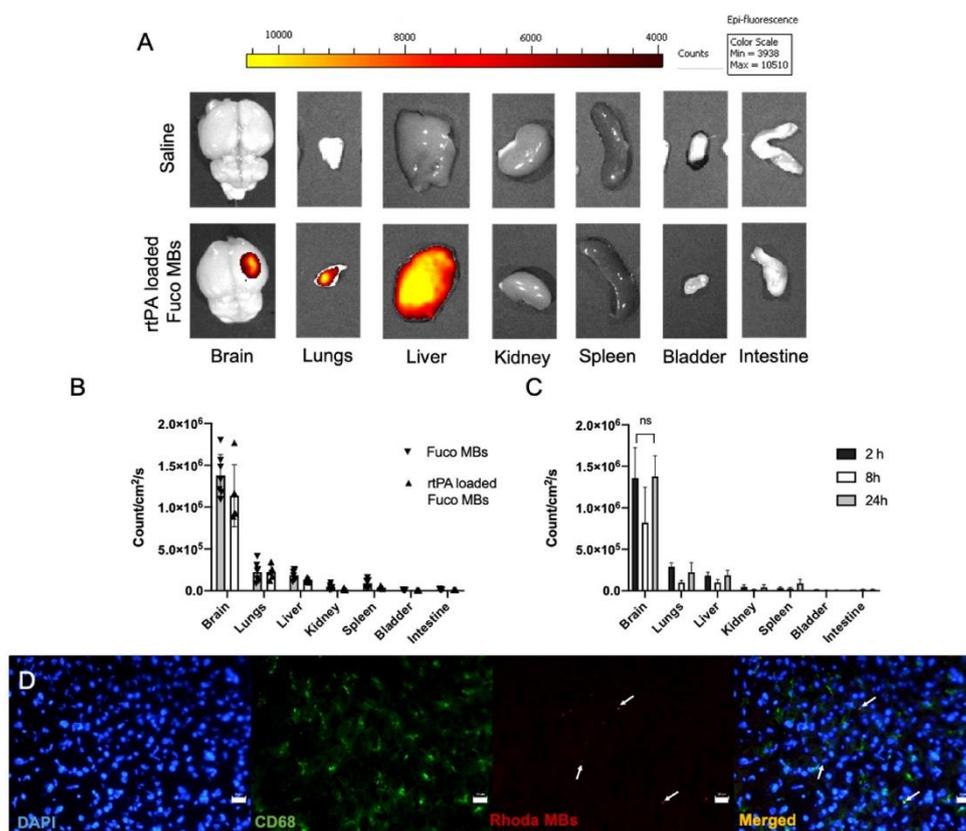


Fig. 7. Biodistribution of fluorescent MBs and MBs residues in mice. A-B-C) Ex vivo fluorescence macroscopy quantification of MBs outcome in brain, lungs, liver, kidney, spleen, bladder and intestine. A) Fluorescence macroscopy images of various organs 24 h after stroke treatment (saline: top row, rtPA-loaded Fuco MBs: bottom row). Organs were retrieved 24 h after treatment and imaged without tissue fixation. The epi fluorescence scale was set between 3938 and 10510 counts. Specific targeting of MBs to the stroke area was still visible after 24 h and liver and lungs were fulfilling their blood cleaning property as the rest of the fluorescence was observed in those two organs. B-C) Quantification of the fluorescence in each organ in counts/cm²/s. B) Comparison of Fuco MBs (N = 7) and rtPA-loaded Fuco MBs (N = 5) residues of fluorescence 24 h after stroke. C) Comparison of Fuco MBs fluorescence residues at 2 h (N = 3), 8 h (N = 3) and 24 h (N = 7) after stroke. D) Histology coloration of liver tissue 2 h after injection of Rhodamine B Fuco MBs in mice. From left to right, DAPI coloration of cell nuclei, CD68 immunostaining of macrophages, Rhodamine B Fuco MBs, Merged image. The white arrows point out the MBs fluorescent residues in red and scale bar is 20 μ m. MBs residues were found in liver tissue after 2 h and some of them seemed to be internalized in liver macrophages. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

availability of thrombolytic drugs, there are still a number of unmet medical needs for more effective and safer treatments. We presented in this study a drug-loaded targeting polymer MBs for the improvement of stroke treatment. The development of a new synthesis protocol was driven by an ambition to simplify polymer MBs production and also avoid toxic solvent and time-consuming protocols of phospholipid MBs synthesis. The stability of polymer MBs was validated over 4 weeks in suspension (Fig. S1C) and their biodistribution aligns with the liver primary function to detoxify the blood. In addition, the shell composition did not affect the shelf stability (Fig. S1D) allowing data compilation. Cyanoacrylate are strong adhesives commonly used in surgical procedures for wound closure but are also injected in humans to seal blood vessels [36]. Fucoidans on the other hand are derived from brown algae [16] and were injected in humans with NANO-ATHERO project (NCT03422055) [16,30]. Thereby, this easy to make and scalable acoustic cavitation protocol draws new perspectives for the development of biocompatible acoustic microbubbles. The shell composition was validated by Fourier Transform Infrared (FTIR) as presented on Fig. S9, displaying the characteristic pics of ester bound around 1750 and 2250 cm^{-1} for cyanoacrylate. However, the polysaccharide incorporation with either fucoidan or carboxymethyl dextran was challenging to identify given the small amount of it. This quantification was better performed with sulfate dosage (Figs. S2A–B) and fucoidan targeting properties (Fig. 4E–F–G). In addition, the use of whole Human Blood rather than P-selectin coating for the evaluation of targeting properties is a much more accurate model for *in vivo* translation and was indeed validated with fluorescence microscopy on the stroke area (Fig. S6). The micron size of MBs helped for imaging characterization with ESEM (Fig. 2D), confocal (Fig. S3A) and FIB (Fig. 2E; Fig. S3D) imaging. In that manner, we were able to estimate the shell thickness by two methods (FIB and confocal fluorescence) to 518 ± 116 nm (Fig. S3B–C–D). The wide standard deviation is also the consequence of the FIB sample preparation that affected the MBs integrity limiting the sample number ($N = 4$). After validation of MBs physicochemical properties, rtPA incorporation was obtained with a simple adsorption protocol using no additive chemical and no critical temperature. We validated the rtPA activity through two enzymatic assays, the fibrinolytic activity on agar gel (Figs. S5A–B) and the amidolytic activity on fluorescent substrate (Fig. 4A–B). Regular protein quantification with copper reduction (BCA assay) was not possible due to the reactivity of MBs without any incorporated drug. The incorporation was also validated by the shift in the surface charge of rtPA-loaded Fuco MBs compared to Fuco MBs (Fig. S1A). Lastly, the activity of the incorporated protein was stable over 4 days (Fig. 4C) with no shift in the mean size of the MBs (Fig. S1D). Therefore, to ensure the effectiveness and the quality of the treatment, rtPA-loaded MBs were not used after 4 days for *in vivo* injection.

MBs are of main interest because of their acoustic property in US imaging also validated here with a homemade US setup. Establishing echogenic evaluation is not standardized yet and it mainly relies on contrast enhancement validation. Moreover, the system is highly setup dependent (distance, probe, medium) and required probe calibration. The test was computer driven with different voltage but, in order to translate to Mechanical Index, a hydrophone calibration was performed to measure the negative pressure of the signal. Nevertheless, it gives good insights for *in vivo* translation. We wanted to determine the threshold of MBs stability for US imaging but also the disruptive ratio of MBs for later sonothrombolysis experimentation. Indeed, many teams [20–22] have been exploring the impact of bursting MBs with US for the mechanical impairment of blood clots. No standards have been determined yet, except for bio-damaging boundaries of high Mechanical Index (MI, 1.9) [37]. A better understanding of MBs response to US signal *in vivo* is a key element to perform safe and monitored sonothrombolysis. In any case, US signal was validated *in vivo* (Fig. S4) giving those newly synthesized MBs the property of US contrast enhancer agents.

Before *in vivo* injection, we validated the *in vitro* biocompatibility of cyanoacrylate degradation products [38] with mortality (Fig. 5A and B) and

viability (Fig. 5D) assays on endothelial cells and fibroblasts, and hemolytic tests (Fig. 5C). The safety of MBs was demonstrated for each cell type independently from the MBs concentration (up to 1×10^8 MB/ml) or the duration of the experiment (from 2 h to 6 h). The assays durations were selected according to the fact that MBs are not designed to be circulating after a few hours in the bloodstream. Overall, in accordance with the International Standard (ISO 10993–5) the 70 % viability and 30 % for mortality threshold were not exceeded. Thus, the safety of polymer MBs allowed the translation to the animal stroke model.

Thrombin injection triggers the formation of fibrin rich clot compared to ferric chloride model [39] that induces platelet rich thrombi. In consequence, thrombin-induced clots are more likely to respond to rtPA treatment. In this study rtPA was injected to 1/10th of the treatment usually used in mice [40]. This choice was driven by the ultimate goal to limit rtPA dose related side effects. This constrain did not prevent from an efficient clot resolution thanks to the specific targeting of rtPA-loaded Fuco MBs. Indeed, 1 mg/kg injection of rtPA loaded onto targeting MBs, reduced by more than 50 % the volume of the ischemic lesion for 18 animals (Fig. 6E–F–G). The prevalence of small ($<5 \text{ mm}^3$) and no lesion (0 mm^3) was considerably improved compared to free rtPA treatment (Fig. 6F) as well as the small extend of lesion in the different plans of the brain (Fig. 6G). While previous study showed the efficacy of rtPA targeted delivery at a reduced dose in a femoral artery clamping model [41], we have demonstrated that our newly designed system achieved competitive results in an minimally invasive arterial model, that physiologically reproduce an ischemic stroke event. The drug encapsulation was efficient protecting the protein and the specific clot targeting lead to the treatment improvement, as we demonstrated that Fuco MBs alone did not have any therapeutic properties. This result is even more promising as free rtPA treatment at the same concentration was not significantly more efficient than treatment with saline. In consequence, we can hypothesize about the synergic action of rtPA loaded onto Fucoidan MBs for a successful thrombolysis. The specific targeting of fucoidan may also be enhanced with the known affinity of rtPA for fibrin [42] and consequently improve the precise drug delivery. The targeting strategy at a molecular scale overcome the limitations that can be observed with magnetic targeting [43] considering the complex 3D vasculature of the brain. Finally, this efficient targeted drug delivery treatment gets in the range of human recommended dose of 0.9 mg/kg (according to the National Institute of Neurological disorders and Stroke), suggesting that lower dosage of encapsulated rtPA could have beneficial outcomes and reduce dose related side effects in humans too.

No animal was harmed with the injection of rtPA-loaded MBs and we aimed at reducing the number of animals. Hence, control conditions like rtPA-loaded CMDex MBs and free rtPA at 10 mg/kg for stroke treatment were not explored. Firstly, rtPA-loaded CMDex MBs treatment evaluation could highlight the importance of targeting for the clot resolution. However, efficient rtPA loading on CMDex MBs was not possible as presented in Fig. 4B. Secondly, free rtPA treatment validation of 10 mg/kg efficient thrombolysis on thrombin clot mouse model was largely studied [31], suggesting the real advantage of our dose reduced treatment.

We also studied the outcome and clearance process of MBs after stroke treatment. The circulation time of polymer MBs in the body depends on a number of factors, including size of the MBs, type of polymer, and the density of the gas core [44]. In addition, the circulation time can be influence by the presence of blood proteins that can bind to the surface of MBs and alter their movement through the body. Overall, circulation time is widely dependent of the MBs composition but is usually ranging from minutes to tens of minutes, long enough for conventional diagnosis or therapeutic methods. The biodistribution study was performed at 2 h after injection in the liver tissue with immunolabelling of resident macrophages to evaluate the early blood detoxification in the liver (Fig. 7D). In addition, the biodistribution on *ex vivo* organs revealed the final whereabouts of MBs in the body with the

expected contrast in liver and lungs (Fig. 7A) without significant difference at 2 h, 8 h or 24 h after the treatment. The residual fluorescence of rtPA-loaded Fuco MBs was also observed in the stroke region after 24 h (Fig. 7A) validating the specific targeting of fucoidan on P-selectin but also pointed out the long-term expression of the biomarker after the treatment by activated endothelial cells. This suggests an interesting insight for further molecular imaging of thrombotic diseases resolution. Especially since the residual fluorescence is not due to BBB permeability as demonstrated with Gadoteric Acid (GA) injection (Figs. S8A–B). P-selectin is a known endothelial-related inflammation biomarker [45] and an increase in its concentration within 72 h could predict the incidence of post stroke infection [46]. Nevertheless, some controversies still remain in the significance of P-selectin expression in stroke versus non stroke patients [47] and molecular imaging could be an alternative way to set the debate. In that manner the study of thrombo-inflammation with Fuco MBs may be investigated over different time points with either fluorescent microscopy or US imaging.

5. Conclusion

In the present study, we developed ultrasound responsive microbubbles for the targeted treatment of stroke. Acoustic cavitation synthesis was optimized for the production of targeting polymer MBs, firstly described here in the literature. This innovative protocol reduced the production time by three compared to gold standard hydrodynamic cavitation. The physicochemical properties and biocompatibility assessments were intensively evaluated to conclude on their contrast enhancement with US signal, effective targeting of P-selectins, and fibrinolytic potential. The *in vivo* evaluation on mice stroke model demonstrated the efficiency of rtPA-loaded Fuco MBs over clinical systemic injection of the drug. Indeed, we observed a volume reduction of the brain injury by more than 50 % with a 1/10th lower dose of rtPA than recommended in mice. No BBB permeability or hemorrhagic complication was observed and expected biodistribution was found in detoxification organs including lungs and liver, indicating a high potentiality for a safe and scalable treatment. Our finding now rises new possibilities for the application of drug-loaded targeting MBs in ischemic stroke treatment.

The main perspectives of this work now rely on the US responsive property of MBs. The ischemic memory observed after 24 h on the stroke region with residual fluorescence on activated endothelium, allowed us to think about the potential of Fuco MBs for molecular imaging [48]. We demonstrated the contrast enhancement capacity of MBs for US signal *in vivo* and targeted imaging with US is an active research field. Indeed, US technology is a non-invasive, safe for pregnant patients and less expensive method compared to other imaging modalities. With the recent advances in stroke US imaging in rats [28], P-selectin targeted MBs present new possibilities for the early diagnosis and clot resolution follow-up of stroke events. Also, chemical thrombolysis alone only achieve good outcomes for 40 % of patients [5] and clot migration can cause a variety of serious problems including distal vessels obstruction. The need for non-invasive clot damaging treatment led the scientific community to study microbubble-assisted US clot bursting: the sonothrombolysis. Especially since tissue plasminogen treatment is less efficient on distal occlusions [11], sonothrombolysis could mechanically disrupt the clot [8] in addition to fibrinolysis. Despite the fact that it is an area of active research [49], these therapies are not yet widely available or fully understood. Few boundaries are nevertheless already established, including Mechanical Index threshold of 1.9 and the need of biocompatible MBs. Our technology is then a great candidate for the development of targeted sonothrombolysis for stroke resolution.

Credit author statement

Louise FOURNIER: Conceptualization, Investigation, Experimental work, Data analysis, Writing, Visualization.; Myriam ABIQUI-

MOURGUES: Investigation (Animal model main investigator), Data validation.; Georges CHABOUH: Investigation, Data validation.; Rachida AID: Methodology.; Thibault DE LA TAILLE: Investigation.; Olivier COUTURE: Conceptualization, Methodology.; Denis VIVIEN: Review and Editing.; Cyrille ORSET: Conceptualization, Methodology.; Cédric CHAUVIERRE: Conceptualization, Review and Editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. All the authors approved the final revised version of the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Cedric CHAUVIERRE reports financial support was provided by French National Research Agency. Olivier COUTURE reports a relationship with Resolve Stroke company that includes: board membership. Cedric CHAUVIERRE has patent pending to INSERM Transfert. Louise FOURNIER has patent pending to INSERM Transfert.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

Authors thank INSERM, Université Paris Cité, Université Sorbonne Paris Nord, the ANR "FightClot" ANR-20-CE18-0005-01, and ANR "FucoChem" ANR-13-LAB1-0005-01 for the financial support. We express our gratitude to Algues & Mer for the supplying of fucoidan. The authors would like to acknowledge Christine CHOQUEUX for the ESEM images performed at Université de Technologie de Compiègne (France). We kindly thank Stephane TACHON from the Nanoimagerie department of Institut Pasteur (France) for the FIB assisted SEM images. We also thank Véronique OLLIVIER and Stéphane LOYAU for their help and expertise on the *in vitro* targeting experiment. The confocal images were also performed with the help of Camille LE GUILCHER and Chloé DUJARDIN, we also thank her and Graciela PAVON-DJAVID for their support in cell culture experiments. The illustrations were designed with BioRender online software (biorender.com).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122385>.

References

- [1] G.A. Roth, et al., GBD NHLBI JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study, *J. Am. Coll. Cardiol.* 76 (25) (2020) 2982–3021.
- [2] C.W. Tsao, et al., Heart disease and stroke statistics 2022 update: a report from the American heart association, *Circulation* 145 (8) (2022).
- [3] G. Alkarithi, C. Duval, Y. Shi, F.L. Macrae, R.A.S. Ariens, Thrombus structural composition in cardiovascular disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 41 (9) (2021) 2370–2383, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315754>.
- [4] P. Jolugbo, R.A.S. Ariens, Thrombus composition and efficacy of thrombolysis and thrombectomy in acute ischemic stroke, *Stroke* (2021) 1131–1142, <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.032810>, no. March.
- [5] S. Prabhakaran, I. Ruff, R.A. Bernstein, Acute stroke intervention: a systematic review, *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* 313 (14) (2015) 1451–1462, <https://doi.org/10.1001/jama.2015.3058>.
- [6] A. Zenysh, L. Fournier, C. Chauvierre, Nanomedicine progress in thrombolytic therapy, *Biomaterials* 258 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120297>, January.
- [7] D. Vivien, Can the benefits of rtPA treatment for stroke be improved? *Rev. Neurol.* 173 (9) (2017) 566–571, <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2017.07.003>.
- [8] A. Chang, E. Beheshtian, E.J. Llinas, O.R. Idowu, E.B. Marsh, Intravenous tissue plasminogen activator in combination with mechanical thrombectomy: clot migration, intracranial bleeding, and the impact of 'drip and ship' on effectiveness and outcomes, *Front. Neurol.* 11 (2020) 1–10, <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.585929>, December.

- [9] C. Liu, et al., Hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator treatment in acute ischemic stroke, *Cell. Mol. Neurobiol.* 42 (3) (2022) 621–646, <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00985-1>.
- [10] G.W.J. Harston, B.A. Sutherland, J. Kennedy, A.M. Buchan, The contribution of L-arginine to the neurotoxicity of recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischemia: a review of rPA neurotoxicity, *J. Cerebr. Blood Flow Metabol.* 30 (11) (2010) 1804–1816, <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.149>.
- [11] M. Gomis, A. Dávalos, Recanalization and reperfusion therapies of acute ischemic stroke: what have we learned, what are the major research questions, and where are we headed? *Front. Neurol.* 5 (2014) 1–12, <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00226>. November.
- [12] A. Rix, A. Curaj, E. Liehu, F. Kiessling, Ultrasound microbubbles for diagnosis and treatment of cardiovascular diseases, *Semin. Thromb. Hemost.* (2019), <https://doi.org/10.1055/s-0039-1688492>.
- [13] E. Falk, Pathogenesis of atherosclerosis, *J. Am. Coll. Cardiol.* 47 (8 SUPPL) (2006), <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.09.068>, 0–5.
- [14] L.A. Perkins, C.J. Anderson, E.M. Novelli, Targeting P selectin adhesion molecule in molecular imaging: P-selectin expression as a valuable imaging biomarker of inflammation in cardiovascular disease, *J. Nucl. Med.* 60 (12) (2019) 1691–1697, <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.225169>.
- [15] F. Rouzet, et al., Radiolabeled fucoidan as a P selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation, *J. Nucl. Med.* 52 (9) (2011) 1433–1440, <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.085852>.
- [16] C. Chauvierre, et al., Pharmaceutical development and safety evaluation of a GMP-grade fucoidan for molecular diagnosis of cardiovascular diseases, *Mar. Drugs* 17 (12) (2019), <https://doi.org/10.3390/md17120699>.
- [17] L. Bachelet, et al., Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1790 (2) (2009) 141–146, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.10.008>.
- [18] A. Zeynch, et al., Fucoidan-functionalized polysaccharide submicroparticles loaded with alteplase for efficient targeted thrombolytic therapy, *Biomaterials* 277 (August) (2021), <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121102>.
- [19] B. Li, et al., Functionalized polymer microbubbles as new molecular ultrasound contrast agent to target P-selectin in thrombus, *Biomaterials* 194 (2019) 139–150, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.12.023>, 2019.
- [20] K.H. Zheng, et al., 99mTc-Fucoidan as diagnostic agent for P-selectin imaging: first-in-human evaluation (phase I), *Atherosclerosis* 287 (2019) e143, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.425>, 2019.
- [21] G. Chabouh, B. Dollet, C. Quilliet, G. Couplier, Spherical oscillations of encapsulated microbubbles: effect of shell compressibility and anisotropy, *J. Acoust. Soc. Am.* 149 (2) (2021) 1240–1257, <https://doi.org/10.1121/10.0003500>.
- [22] L. Auboire, et al., Microbubbles combined with ultrasound therapy in ischemic stroke: a systematic review of in-vivo preclinical studies, *PLoS One* 13 (2) (2018) 1–19, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191788>.
- [23] R. Ghebouli, et al., Amino fucoidan as a vector for rtPA induced fibrinolysis in experimental thrombotic events, *Thromb. Haemostasis* 118 (1) (2018) 42–53, <https://doi.org/10.1160/TH17-02-0132>.
- [24] L. Fournier, T.D. La Taille, Microbubbles for human diagnosis and therapy, *Biomaterials* 294 (2023), <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122025>. January.
- [25] A.L. Klibanov, Ultrasound contrast: gas microbubbles in the vasculature, *Invest. Radiol.* 56 (1) (2021) 50–61, <https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000733>.
- [26] A. Upadhyay, S.V. Dalvi, Microbubble formulations: synthesis, stability, modeling and biomedical applications, *Ultrasound Med. Biol.* 45 (2) (2019) 301–343, <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2018.09.022>.
- [27] J.M. Lee, Z.U. Shin, G.T. Mavlonov, I.Y. Abdurakhmonov, T.H. Yi, Solid phase colorimetric method for the quantification of fucoidan, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168 (5) (2012) 1019–1024, <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9837-y>.
- [28] A. Chavignon, V. Hingot, C. Orset, D. Vivien, O. Couture, 3D transcranial ultrasound localization microscopy for discrimination between ischemic and hemorrhagic stroke in early phase, *Sci. Rep.* 12 (1) (Aug. 2022) 1–11, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18025-X>.
- [29] B. Li, et al., Development of polymer microcapsules functionalized with fucoidan to target P-selectin overexpressed in cardiovascular diseases, *Adv. Healthcare Mater.* 6 (4) (2017), <https://doi.org/10.1002/adhm.201601200>.
- [30] A.J. Koning, P.Y. Lum, J.M. Williams, R. Wright, DiOC6 staining reveals organelle structure and dynamics in living yeast cells, *Cell Motil Cytoskeleton* 25 (2) (1993) 111–128, <https://doi.org/10.1002/cm.970250202>.
- [31] C. Orset, et al., Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion, *Stroke* 38 (10) (2007) 2771–2778, <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.487520>.
- [32] O. Couture, S. Bannouf, G. Montaldo, J.F. Aubry, M. Fink, M. Tanter, Ultrafast imaging of ultrasound contrast agents, *Ultrasound Med. Biol.* 35 (11) (2009) 1908–1916, <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2009.05.020>.
- [33] O. Couture, M. Fink, M. Tanter, Ultrasound contrast plane wave imaging, *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectrics Freq. Control* 59 (12) (2012) 2676–2683, <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2012.2508>.
- [34] K. Renault, J.W. Frey, P.Y. Renard, C. Sabot, Covalent modification of biomolecules through maleimide based labeling strategies, *Bioconjugate Chem.* 29 (8) (2018) 2497–2513, <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00252>.
- [35] L.D.C. Casa, D.N. Ku, Thrombus Formation at high shear rates, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 19 (2017) 415–433, <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044539>.
- [36] O. Chevallier, et al., Efficacy, safety and outcomes of transcatheter arterial embolization with N-butyl cyanoacrylate glue for non-variceal gastrointestinal bleeding: a systematic review and meta-analysis, *Diagn. Interv. Imaging* 102 (7–8) (2021) 479–487, <https://doi.org/10.1016/j.diii.2021.03.004>.
- [37] Y. Deng, M.L. Palmeri, N.C. Rouze, G.E. Trahey, C.M. Haysteas, K.R. Nightingale, Quantifying image quality improvement using elevated acoustic output in B-mode harmonic imaging, *Ultrasound Med. Biol.* 43 (10) (2017) 2416–2425, <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2017.06.024>. QUANTIFYING.
- [38] D. García Cerdá, A.M. Ballester, A. Aliena-Valero, A. Carabén-Redaño, J.M. Lloris, Use of cyanoacrylate adhesives in general surgery, *Surg. Today* 45 (8) (2015) 939–956, <https://doi.org/10.1007/s00595-014-1056-4>.
- [39] X. Lin, et al., Establishment of a modified and standardized ferric chloride-induced rat carotid artery thrombosis model, *ACS Omega* 7 (10) (2022) 8919–8927, <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c07316>.
- [40] C. Orset, et al., Efficacy of Alteplase® in a mouse model of acute ischemic stroke: a Retrospective Pooled Analysis, *Stroke* 47 (5) (2016) 1312–1318, <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.012238>. Efficacy.
- [41] X. Hua, et al., In vivo thrombolysis with targeted microbubbles loading tissue plasminogen activator in a rabbit femoral artery thrombus model, *J. Thromb. Thrombolysis* 38 (1) (2014) 57–64, <https://doi.org/10.1007/s11239-014-1071-8>.
- [42] A. Zhu, P. Rajendram, E. Tseng, S.B. Counts, A.Y.X. Yu, Alteplase or tenecteplase for thrombolysis in ischemic stroke: an illustrated review, *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 6 (6) (2022) 1–13, <https://doi.org/10.1002/rth2.12795>.
- [43] S. Wang, et al., Accelerating thrombolysis using a precision and clot penetrating drug delivery strategy by nanoparticle shelled microbubbles, *Sci. Adv.* 6 (31) (2020), <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz8204>.
- [44] E. Stride, et al., Microbubble agents: new directions, *Ultrasound Med. Biol.* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2020.01.027>.
- [45] D.D. Zhang, et al., Inflammatory biomarkers and cerebral small vessel disease: a community based cohort study, *Stroke* 53 (7) (2022) 302–309, <https://doi.org/10.1136/svn.2021.001102>.
- [46] G. Pusch, et al., Early dynamics of P selectin and interleukin 6 predicts outcomes in ischemic stroke, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 24 (8) (2015) 1938–1947, <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.05.005>.
- [47] S. Wiseman, F. Marlborough, F. Doubal, D.J. Webb, J. Wardlaw, Blood markers of coagulation, fibrinolysis, endothelial dysfunction and inflammation in lacunar stroke versus non-lacunar stroke and non-stroke: systematic review and meta-analysis, *Cerebrovasc. Dis.* 37 (1) (2014) 64–75, <https://doi.org/10.1159/000356789>.
- [48] G. Köse, M. Darguzyte, F. Kiessling, Molecular ultrasound imaging, *Nanomaterials* 10 (10) (2020) 1–28, <https://doi.org/10.3390/nano10101935>.
- [49] T. Porter, P. Zeng, F. Xie, Advances in ultrasound therapeutics, *Curr. Cardiol. Rep.* 23 (10) (2021) 4–11, <https://doi.org/10.1007/s11886-021-01563-7>.

PARTIE VII : discussion et Conclusion

19. Discussion

L'objectif principal de ce travail de thèse était de développer un modèle d'AVC chez la souris éveillée, afin de maximiser la transposabilité des résultats précliniques aux conditions cliniques humaines. Pour ce faire, plusieurs approches ont été combinées, en intégrant des éléments clés pour surmonter les limitations des modèles actuels.

Tout d'abord, nous avons mis en place un modèle d'AVC chez la souris éveillée, avec une gestion rigoureuse du stress animal grâce à un protocole d'habituation. Cette stratégie a permis d'évaluer en temps réel la dynamique des altérations vasculaires dès les premiers instants suivant l'ischémie, sans les effets secondaires confondants de l'anesthésie sur les paramètres hémodynamiques et métaboliques cérébraux. L'imagerie ultrasonore, utilisée dès les premiers instants suivant l'ischémie, a permis une caractérisation fine de la perfusion sanguine et des changements hémodynamiques, offrant ainsi un aperçu immédiat de l'évolution des dommages vasculaires.

En parallèle, un protocole d'IRM a été adopté, inspiré des pratiques cliniques. Ce protocole, incluant l'imagerie pondérée en T2, T2*, ainsi que la perfusion par ASL, est couramment utilisé en clinique pour suivre l'évolution des lésions ischémiques et quantifier l'étendue des zones atteintes à différentes étapes.

Notre étude s'est également concentrée sur l'évaluation de l'efficacité du rtPA, traitement thrombolytique de référence, dans ce modèle de souris éveillée. En reproduisant les conditions cliniques proches de la réalité, nous avons démontré la pertinence de ce modèle pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. De plus, nous avons ajouté une évaluation fonctionnelle basée sur deux paramètres : une évaluation de l'état de repos pour examiner la connectivité inter-hémisphérique en proposant le nouvel outil de la fMLS, et une évaluation après stimulation sensorielle des vibrisses, afin de quantifier l'impact fonctionnel de l'ischémie sur le cortex somatosensoriel.

Les résultats montrent que le modèle vigile est bien toléré, sans inconfort significatif non lié à l'AVC pour les souris. L'induction de l'ischémie a été réalisée avec succès, de manière reproductible, démontrant ainsi la robustesse du modèle.

L'imagerie multimodale (IRM, Doppler, et fUS), a efficacement permis de caractériser les altérations vasculaires, les défauts de perfusion et les lésions ischémiques. L'imagerie de perfusion ASL précoce a été une modalité prédictive du devenir des lésions chez les animaux traités. Un effet bénéfique du rtPA a également été observé, avec une réduction des volumes de lésion et une amélioration de la récupération fonctionnelle.

Ces résultats confirment l'efficacité du traitement thrombolytique dans ce modèle et soulignent l'intérêt de combiner une évaluation multimodale et fonctionnelle pour mieux comprendre la dynamique de la récupération après un AVC.

Par ailleurs, réaliser des expérimentations sur des animaux sans recours à l'anesthésie n'est pas un concept nouveau, et est déjà réalisé depuis les prémices de la recherche sur l'animal, avant l'existence des anesthésiques modernes (Hales *et al.*, 1733) (Figure 62).

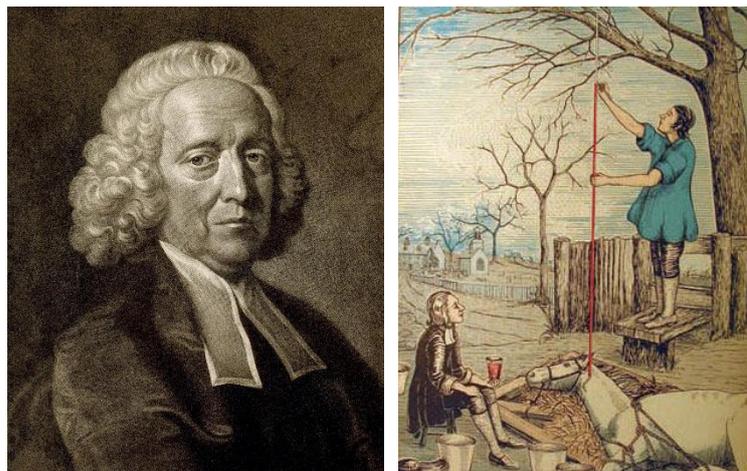


Figure 62 : première mesure de la pression artérielle par Stephen Hales.

En 1733, le révérend Stephen Hales fut la première personne à mesurer la pression artérielle en positionnant un tube en verre dans l'artère carotide d'une jument contentionnée.

Aujourd'hui, ces approches nécessitent des considérations éthiques renforcées pour minimiser le stress et l'éventuelle souffrance des animaux.

Dans le cadre de la recherche sur l'AVC, plusieurs modèles ont déjà fait l'objet d'une réalisation chez des animaux éveillés, comme le modèle de filament endoluminal, photothrombotique, l'administration d'endothéline-1, l'application de chlorure de fer, ainsi

que l'embolisation par microsphères. Cependant, le modèle d'occlusion de l'ACM par injection intraluminale de thrombine n'avait jamais été réalisé auparavant (**Tableau 9**).

Model	Intraluminal Filament	Embolic	Photo thrombosis	Endothelin-1 injection or application	Thrombin intraluminal injection	Ferric chloride application	Electro-coagulation	Mechanical clip or ligature	Macrosphere induction	Microsphere induction
Species	mice ¹ , rats ^{2,4}	mice ^{8,9} , rats ⁷⁻⁹	mice ¹⁰ , rats ¹¹⁻¹³	mice ^{14,15} , rats ¹⁶⁻¹⁹	mice ²⁰	mice ²¹ , rats ²²	mice ^{23,24} , rats ²⁵	mice ^{26,27} , rats ^{28,29}	rats ³⁰	mice ³¹ , rats ^{32,33}
Type of Occlusion	transient	transient, spontaneous reperfusion fibrin-rich	permanent ^a	permanent or transient dose-dependent ¹⁸	transient, spontaneous reperfusion fibrin-rich	permanent	permanent	transient	permanent	permanent
If present, thrombus aetiology	-	-	platelet-rich ^b	-	-	platelet-rich	-	-	-	-
Thrombolysis studies possible	no	yes ³⁴	no ^b	no	yes ²⁰	no ³⁵	no	no	no	no
Targeted Area	striatum, cortex, thalamus, SN, hypothalamus	variable MCA territory	precise target of choice within cortex	precise target of choice	cortex	cortex	cortex	cortex	MCA territory, without hypothalamus ^{30,36}	multifocal, heterogeneous
Described penumbra	yes ³⁷⁻⁴⁰	not defined	yes ^c 41	yes ¹⁹	yes ^d 42	not defined	no ⁴³	not defined	yes ⁴⁴	not defined
Functional impairment	sensorimotor ^{45,46} , PSD ^{47,48}	sensorimotor ^{49,50}	sensorimotor ⁵¹	sensorimotor ^{15,52} , PSD ⁵³ , anxiety ⁵³	limited ^{20,54}	limited ⁵⁵	sensorimotor ^{56,54,24}	sensorimotor ⁵⁷	sensorimotor ⁵⁸	sensorimotor ⁵⁸ , cognitive ⁵⁸ , PSD ⁵⁹
Reported effects of anaesthesia	yes ⁶⁰	-	yes ⁶¹	yes ⁶²	-	-	-	-	-	-
Awake induction attempted	yes ⁶³	yes ⁶⁴	yes ⁶⁵	yes ⁶²	-	yes ⁶⁶	-	-	-	yes ^{33,67}

Tableau 9 : modèles d'AVC ischémique chez les rongeurs, anesthésiés ou non.

L'injection intraluminale de thrombine chez le rongeur éveillé n'avait alors toujours pas été rapportée, constituant un domaine à explorer (ligne du bas) (*Mosneag et al., 2024a*).

L'une des principales préoccupations liées à l'utilisation de la méthodologie éveillée réside dans les considérations éthiques, en raison des risques de stress et de douleur pour les animaux. Cependant, pour les interventions chirurgicales et les études nécessitant une immobilisation, il a été démontré qu'un processus d'habituation à l'équipement utilisé permet de réduire significativement les marqueurs physiologiques du stress (*Parry et McElligott, 1993*), comme les niveaux de corticostérone, une hormone caractéristique du stress (*King et al., 2005*). Nous avons pris en compte ces recommandations en développant un protocole d'habituation spécifique pour la contention et l'imagerie, réduisant les niveaux sériques de corticostérone dès la quatrième session, ce qui confirme son efficacité pour limiter le stress chez les animaux (*Tsurugizawa et al., 2020*).

L'habituation est un processus stimulus-spécifique, classé comme un apprentissage non-associatif (*Jennings, 1906*), dans lequel l'organisme réduit sa réponse à un stimulus jugé non menaçant. Toutefois, il est essentiel de différencier l'habituation de la sensibilisation (*Blumstein, 2016*). Si un stimulus est perçu comme trop aversif, les animaux risquent d'être sensibilisés, rendant ainsi l'habituation inefficace. C'est pourquoi nous avons opté pour une approche progressive, en augmentant graduellement les sessions d'habituation.

L'induction de l'ischémie a été réalisée en deux étapes, avec une craniotomie sous anesthésie suivie d'une occlusion de l'ACM chez les souris éveillées. Nous considérons que l'anesthésie n'a que peu d'effets sur l'étape de craniotomie suivie du retrait des

méninges, et qu'il était inutile de faire subir cette procédure à des animaux éveillés. L'anesthésie associée à une analgésie est même nécessaire, le périoste et les méninges étant pourvus de nocicepteurs (Zhang *et al.*, 2010 ; Zhao et Levy, 2014), ce qui n'est pas le cas du parenchyme cérébral ou de l'ACM (Griensven et Strong, 2022). Le jour de l'induction de l'AVC, les souris ont tout de même reçu une couverture analgésique afin de soulager la douleur liée aux dépolarisations envahissantes post-AVC (Dirnagl *et al.*, 1999 ; Dohmen *et al.*, 2008a ; Binder *et al.*, 2022a).

L'imagerie chez l'animal éveillé n'est pas une nouveauté en soi. Les effets de l'anesthésie sur le métabolisme cérébral sont bien répertoriés, et des protocoles d'imagerie chez l'animal éveillé, voire en déplacement libre, ont été réalisés en débitmétrie laser-doppler (Gu *et al.*, 1999 ; Takuwa *et al.*, 2011), en IRM fonctionnelle (Sicard *et al.*, 2003 ; King *et al.*, 2005), en imagerie fUS (Brunner *et al.*, 2023), ou encore en imagerie de contraste à granularité laser (Miao *et al.*, 2011). L'ischémie cérébrale a déjà même été induite chez la souris éveillée et en mouvement libre (Seto *et al.*, 2014a). Notre étude se distingue par la combinaison des techniques d'imagerie utilisées (IRM, Doppler, fUS), offrant une vision multimodale et fine des phénomènes vasculaires précoces après AVC.

Concernant la thrombolyse au rtPA, l'anesthésie à l'isoflurane, couplée au protoxyde d'azote, n'a pas montré d'effets significatifs sur l'évolution des lésions par rapport aux souris éveillées durant le traitement, ni sur l'efficacité fibrinolytique du rtPA *ex vivo* selon des études antérieures menées au laboratoire (Gakuba *et al.*, 2011a). Toutefois, le protoxyde d'azote exerce un effet inhibiteur dose-dépendant sur le rtPA. Lors de la thrombolyse chez les rats, l'administration de protoxyde d'azote entraîne une diminution des volumes de lésion, et est associée à une augmentation des transformations hémorragiques ainsi qu'à une altération de la perméabilité de la BHE (Haelewyn *et al.*, 2011). D'autres effets de l'isoflurane ont également été étudiés, notamment dans un contexte de post-conditionnement (administré à 1,5 % pendant 1 heure) suivant la thrombolyse au rtPA chez le rat, où une réduction des transformations hémorragiques et des volumes de lésion, ainsi qu'une amélioration des scores neurologiques, ont été observés (Kim *et al.*, 2015, 2017).

Ces études appuient la pertinence de tester des molécules thérapeutiques sans anesthésie. Cependant, certaines limites et pistes d'amélioration sont à considérer concernant notre étude. Le modèle d'occlusion de l'ACM nécessite une craniotomie et le

retrait local des méninges, ce qui, bien que réalisé de la manière aussi peu invasive que possible, peut modifier la physiopathologie de l'AVC. Cette intervention peut en effet diminuer la pression intracrânienne et se rapprocher d'une craniectomie décompressive, ce qui pourrait influencer favorablement l'évolution des lésions (Beez *et al.*, 2019).

De plus, le retrait local des méninges peut altérer la réponse immunitaire après l'AVC (Arac *et al.*, 2019), et perturber les échanges lymphatiques (Louveau *et al.*, 2018), étant donné que les cellules immunitaires se localisent sur la dure-mère après un AVC (Benakis *et al.*, 2018). Une approche alternative pourrait consister à utiliser des techniques d'embolisation par microsphères dirigées à travers le crâne pour cibler l'ACM de manière moins invasive (Jia *et al.*, 2017a ; Marks *et al.*, 2024).

Il serait également nécessaire de valider ce modèle chez des souris femelles, ainsi que chez des souches présentant des profils de collatérales différents (Binder *et al.*, 2024), en incluant des comorbidités telles que l'âge (Manwani *et al.*, 2011) ou le diabète (Lebrun *et al.*, 2024).

L'évaluation à plus long terme de la récupération fonctionnelle et de la plasticité cérébrale pourrait être réalisée, en complément de tests comportementaux (Ruan et Yao, 2020), afin de croiser ces résultats avec ceux obtenus par imagerie fUS.

Les perspectives de cette étude incluent donc la valorisation du modèle d'AVC éveillé à travers divers paramètres expérimentaux cités, ainsi que son utilisation par d'autres équipes de recherche. Une extension possible serait l'intégration de la technique de l'ULM 3D présentée dans la deuxième partie des résultats (**Brève communication : An open-source platform for 3D transcranial Ultrasound Localization Microscopy in awake mice**) afin de mieux caractériser les phénomènes vasculaires post-AVC. L'ULM 3D avait déjà été testée chez des souris anesthésiées (Demeulenaere *et al.*, 2022), ainsi qu'en 2D chez des souris éveillées (Wang *et al.*, 2024a), mais la réalisation en 3D chez des animaux éveillés offre une vision complète et précise de la physiologie vasculaire et microvasculaire.

La plateforme Open-3DULM permet un accès libre aux données d'acquisition et de traitement, facilitant la reproduction du protocole de préparation des souris et de l'acquisition en ULM 3D. Cependant, la nécessité d'un équipement d'imagerie spécifique, incluant une sonde adaptée, reste une limitation notable en raison des coûts associés.

Cette technique offre un fort potentiel pour la caractérisation fine de la physiopathologie vasculaire et microvasculaire après un AVC ischémique, et applicable à d'autres pathologies vasculaires. Une autre modalité d'imagerie prometteuse à explorer est l'imagerie fULM, qui combine la résolution spatiale de l'ULM 3D avec l'évaluation de l'hyperémie fonctionnelle en réponse à une stimulation. Cette technique a par ailleurs déjà été réalisée chez des rats anesthésiés (Renaudin *et al.*, 2022a). Sa mise en œuvre en 3D chez des souris éveillées présente plusieurs défis méthodologiques (Wang *et al.*, 2024b), mais promet de riches perspectives scientifiques.

Nous n'avons toutefois pas pu tester l'efficacité des microbulles développées par L. Fournier dans le cadre de notre travail collaboratif (**Article 2 : rtPA-loaded fucoidan polymer microbubbles for the targeted treatment of stroke**) sur des souris éveillées, le protocole n'étant pas encore finalisé. L'objectif principal de ce travail était avant tout le développement des microbulles et la démonstration de sa capacité thrombolytique. Ce projet a abouti à un outil complet, bien caractérisé et conçu dans la perspective d'une transposition clinique. Concernant les expériences *in vivo*, la dose totale de rtPA vectorisé par les microbulles a été réduite à 1/10^e de la dose habituellement administrée chez la souris (Orset *et al.*, 2016), afin de limiter les effets secondaires. Malgré cette réduction, les microbulles ciblantes ont permis une lyse efficace des caillots, avec une réduction de 50 % de la taille des lésions chez 16 souris. Ce résultat est d'autant plus prometteur que l'administration de rtPA libre à la même dose n'a pas montré d'efficacité significative comparé au sérum physiologique. Nous pouvons ainsi formuler l'hypothèse d'une synergie entre le rtPA chargé sur les microbulles de fucoïdane pour une thrombolyse efficace. Le ciblage spécifique du fucoïdane pourrait également être renforcé par l'affinité du rtPA pour la fibrine (Zhu *et al.*, 2022), augmentant la précision de la délivrance du médicament.

Le traitement par microbulles ciblées s'approche de la dose recommandée pour les humains (0,9 mg/kg) (NINDS, 1995), ce qui suggère que des doses plus faibles de rtPA encapsulé pourraient suffire à produire des résultats bénéfiques tout en réduisant les effets secondaires associés à la dose chez l'humain.

Concernant les limitations méthodologiques, l'utilisation d'anesthésiques lors de nos essais chez la souris pourrait être citée comme un premier biais potentiel. Toutefois, nous avons choisi de procéder par étapes, en caractérisant d'abord ce traitement *in vivo* chez des souris anesthésiées avant d'envisager des protocoles sur des souris éveillées, une

fois que la sécurité du traitement sera bien établie. De manière générale, les expérimentations sur animaux éveillés ne devraient être envisagées qu'avec des thérapies dont la tolérance a déjà été prouvée.

Une autre limitation concerne l'absence d'un groupe témoin de souris traitées avec des microbulles non-ciblantes chargées en rtPA. Ce groupe aurait permis de distinguer l'effet du ciblage par le fucoïdane dans un contexte thromboembolique, en séparant l'affinité du fucoïdane pour la p-sélectine des plaquettes (Bachelet *et al.*, 2009) et de l'endothélium activés (Leung, 2004), de l'affinité du rtPA pour la fibrine (Camiolo *et al.*, 1971). Cet aspect n'a pas été étudié car il n'est techniquement pas possible de charger des microbulles non ciblantes avec du rtPA.

Enfin, les propriétés acoustiques des microbulles les rendent intéressantes pour l'imagerie ultrasonore et la sonothrombolyse. Leur visibilité a été validée *in vitro*, mais la stabilité de ces microbulles pour l'imagerie *in vivo*, ainsi que leur taux de rupture pour des expérimentations de sonothrombolyse, restent à explorer davantage. Plusieurs études ont déjà testé l'impact des impulsions ultrasonores sur des microbulles pour la lyse mécanique des thrombi (Bivard *et al.*, 2013 ; Klufft *et al.*, 2016 ; Monie et DeLoughery, 2017). Des investigations plus approfondies seront nécessaires pour mieux comprendre la réponse des microbulles *in vivo*, notamment pour la sonothrombolyse.

Les résultats de biodistribution, évalués *via* la Rhodamine contenue dans les microbulles, montrent que celles-ci se concentrent dans le foie et les poumons, mais aussi dans la zone ischémiée. Ces observations confirment que les microbulles atteignent efficacement leur cible, et que le surplus est recapturé dans des organes caractéristiques de la clairance (Kulle *et al.*, 2022). Des analyses histologiques supplémentaires, notamment au niveau des lésions cérébrales, permettront de mieux comprendre la biodistribution des microbulles.

La présence des microbulles dans la zone de lésion et l'expression de la p-sélectine en font un biomarqueur intéressant de l'inflammation post-AVC (Pusch *et al.*, 2015). En effet, la p-sélectine est exprimée par les cellules endothéliales activées (Zhang *et al.*, 2022), et pourrait constituer une cible d'imagerie moléculaire pertinente. Ces microbulles pourraient donc servir non seulement d'outil d'imagerie ultrasonore moléculaire, mais aussi de vecteurs pour des gaz (par exemple, de l'oxygène dans un contexte d'ischémie

(Kwan *et al.*, 2012)) ou des composés chimiques (comme des médicaments), et également d'agents pour la thrombolyse mécanique *in situ*.

À terme, nous espérons que les outils développés au cours de cette thèse et des travaux de collaboration cités se recroiseront pour caractériser les microbulles chez un modèle de souris éveillée, avec la valeur ajoutée de l'ULM 3D, dans l'optique d'avenir d'une application clinique.

20. Conclusion générale :

L'AVC reste un enjeu majeur de santé publique, avec une personne frappée toutes les deux secondes dans le monde (Suryadi, 2024). En tant que principale cause de handicap acquis chez l'adulte (Feigin *et al.*, 2023) et avec des prévisions d'augmentation de l'incidence d'ici 2030, l'AVC impose une charge lourde aux systèmes de santé et impacte gravement la qualité de vie des patients. Le traitement de l'AVC ischémique est encore limité à deux options principales : la fibrinolyse par rtPA, associée ou non à la thrombectomie mécanique (NINDS, 1995 ; Mazighi *et al.*, 2009 ; Berkhemer *et al.*, 2015). Cependant, ces traitements ne sont accessibles qu'à une minorité de patients en raison des risques d'effets secondaires graves et des contraintes d'accès techniques, avec des taux d'intervention inférieurs à 10 % (Barber *et al.*, 2001). Ce constat souligne la nécessité de poursuivre les efforts de la recherche pour améliorer la prise en charge de cette pathologie complexe.

Dans ce contexte, cette thèse s'est concentrée sur trois axes majeurs, tous liés à la problématique de la transposabilité des études précliniques à la clinique, ainsi qu'à l'optimisation des méthodes de diagnostic et de traitement. Premièrement, l'accent a été mis sur la création d'un modèle d'AVC éveillé chez la souris, un modèle qui s'affranchit des biais introduits par l'anesthésie, et permet une observation plus précise des effets des traitements dans des conditions plus proches du réel. Ce modèle a été évalué avec l'imagerie ultrasonore fonctionnelle et à l'état de repos, démontrant son potentiel à prédire l'évolution des lésions ischémiques après traitement par rtPA. Un tel résultat avait auparavant été démontré par V. Hingot et collaborateurs (Hingot *et al.*, 2020b).

Deuxièmement, une méthode d'imagerie innovante et en essor, l'ULM, a été utilisée pour observer en 3D la microcirculation cérébrale. Cette technique, qui permet une visualisation très fine du réseau vasculaire, est déjà testée depuis peu en clinique, faisant l'objet d'un essai clinique entre le laboratoire, et la société *Resolve Stroke*.

Enfin, le troisième projet a exploré l'utilisation de microbulles fonctionnalisées pour le traitement ciblé de l'AVC. Ces microbulles, en plus d'augmenter l'efficacité de la thrombolyse par l'encapsulation de rtPA, pourraient servir d'agent de contraste pour l'imagerie ultrasonore, en en faisant un outil théranostique de l'AVC.

Le point commun de ces trois projets est l'imagerie ultrasonore, qui représente une avancée prometteuse pour l'imagerie de l'AVC, grâce à ses capacités multimodales, permettant de discriminer un AVC ischémique d'un AVC hémorragique (Chavignon *et al.*, 2022), d'évaluer de nombreux paramètres hémodynamiques, et d'offrir un élément prédictif de l'évolution des lésions. Cette technique, moins coûteuse que des IRM et ayant l'avantage d'être relativement mobile, pourrait à terme équiper des centres d'imagerie locaux, ou des véhicules d'intervention afin de faciliter l'accès au diagnostic d'urgence de l'AVC.

Le potentiel théranostique des microbulles fonctionnalisées ouvre aussi de nouvelles perspectives pour un traitement combiné diagnostic et thérapeutique.

En conclusion, ces avancées illustrent l'importance de poursuivre le développement de technologies accessibles et innovantes pour améliorer la prise en charge des patients atteints d'AVC, tant au niveau du diagnostic précoce que du traitement ciblé, et de faciliter leur transposition vers la clinique pour rendre ces outils disponibles à un plus grand nombre de patients.

Références

A, J. (2020). Prospects for Diminishing the Impact of Nonamyloid Small-Vessel Diseases of the Brain. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 60.

<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021712>

Abbott, N. J., Rönnbäck, L. et Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41-53.

<https://doi.org/10.1038/nrn1824>

Acute Ischemic Stroke Thrombus Composition. (2024a). *Neuroscience*, 550, 11-20.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.12.010>

Acute Ischemic Stroke Thrombus Composition. (2024b). *Neuroscience*, 550, 11-20.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.12.010>

Ahmad, A. S., Satriotomo, I., Fazal, J., Nadeau, S. E. et Doré, S. (2015). Considerations for the Optimization of Induced White Matter Injury Preclinical Models. *Frontiers in Neurology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00172>

Ahmadi-Noorbakhsh, S., Farajli Abbasi, M., Ghasemi, M., Bayat, G., Davoodian, N., Sharif-Paghaleh, E., Poormoosavi, S. M., Rafizadeh, M., Maleki, M., Shirzad-Aski, H., Kargar Jahromi, H., Dadkhah, M., Khalvati, B., Safari, T., Behmanesh, M. A.,

Khoshnam, S. E., Houshmand, G. et Talaei, S. A. (2022). Anesthesia and analgesia for common research models of adult mice. *Laboratory Animal Research*, 38(1), 40.

<https://doi.org/10.1186/s42826-022-00150-3>

Akassoglou, K., Kombrinck, K. W., Degen, J. L. et Strickland, S. (2000). Tissue Plasminogen Activator–Mediated Fibrinolysis Protects against Axonal Degeneration and Demyelination after Sciatic Nerve Injury. *Journal of Cell Biology*, 149(5), 1157-1166.

<https://doi.org/10.1083/jcb.149.5.1157>

Alawneh, K. Z., Al Qawasmeh, M., Raffee, L. A., Abuzayed, B., Bani Hani, D. A., Abdalla, K. M., Al-Mnayyis, A. M. et Fataftah, J. (2020). A snapshot of Ischemic stroke risk factors, sub-types, and its epidemiology: Cohort study. *Annals of Medicine and Surgery*, 59, 101-105. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2020.09.016>

Alexandrov, A. V. et Grotta, J. C. (2002). Arterial reocclusion in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Neurology*, 59(6), 862-867.

<https://doi.org/10.1212/wnl.59.6.862>

Alexandrov Andrei V., Molina Carlos A., Grotta James C., Garami Zsolt, Ford Shiela R., Alvarez-Sabin Jose, Montaner Joan, Saqqur Maher, Demchuk Andrew M., Moyé Lemuel A., Hill Michael D. et Wojner Anne W. (s. d.). Ultrasound-Enhanced Systemic Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke. *New England Journal of Medicine*, 351(21), 2170-2178. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa041175>

Al-Kifu, S. et Malhis, M. (2024). Association of hypertension, diabetes, and dyslipidemia with response to thrombolytic therapy in ST-segment elevation myocardial infarction. *University Of Aleppo Research Journal: 2024, Vol: 184. 69, 184, 1-21.*

Amelia K. Boehme, Charles Esenwa, and Mitchell S.V. Elkind. (2017, 3 février). Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circulation Research*.

<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.116.308398>

Ames, A., 3rd, Wright, R. L., Kowada, M., Thurston, J. M., & Majno, G. (1968). Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *The American journal of pathology*, 52(2), 437-453. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2013326/?page=1>

Amin, H. P., Madsen, T. E., Bravata, D. M., Wira, C. R., Johnston, S. C., Ashcraft, S., Burrus, T. M., Panagos, P. D., Wintermark, M., Esenwa, C. et on behalf of the American Heart Association Emergency Neurovascular Care Committee of the Stroke Council and Council on Peripheral Vascular Disease. (2023). Diagnosis, Workup, Risk Reduction of Transient Ischemic Attack in the Emergency Department Setting: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Stroke*, 54(3), e109-e121.

<https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000418>

András, I. E., Deli, M. A., Veszeka, S., Hayashi, K., Hennig, B. et Toborek, M. (2007). The NMDA and AMPA/KA Receptors are Involved in Glutamate-Induced Alterations of Occludin Expression and Phosphorylation in Brain Endothelial Cells. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 27(8), 1431-1443. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600445>

Anfray, A., Drieu, A., Hingot, V., Hommet, Y., Yetim, M., Rubio, M., Deffieux, T., Tanter, M., Orset, C. et Vivien, D. (2020). Circulating tPA contributes to neurovascular coupling by a mechanism involving the endothelial NMDA receptors. *Journal of*

Cerebral Blood Flow & Metabolism, 40(10), 2038-2054.

<https://doi.org/10.1177/0271678X19883599>

Angelo Mosso. (1880). *Sulla circolazione del sangue nel cervello dell'uomo : ricerche sfigmografiche*.

Anglés-Cano, E. (1994). Overview on fibrinolysis: Plasminogen activation pathways on fibrin and cell surfaces. *Chemistry and Physics of Lipids*, 67-68, 353-362.

[https://doi.org/10.1016/0009-3084\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0009-3084(94)90157-0)

Apostolova, I., Wunder, A., Dirnagl, U., Michel, R., Stemmer, N., Lukas, M., Derlin, T., Gregor-Mamoudou, B., Goldschmidt, J., Brenner, W. et Buchert, R. (2012). Brain perfusion SPECT in the mouse: Normal pattern according to gender and age.

NeuroImage, 63(4), 1807-1817. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.08.038>

Arac, A., Grimaldeston, M. A., Galli, S. J., Bliss, T. M. et Steinberg, G. K. (2019). Meningeal Mast Cells as Key Effectors of Stroke Pathology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 126. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00126>

Archer, D. P., Walker, A. M., McCann, S. K., Moser, J. J. et Appireddy, R. M. (2017). Anesthetic Neuroprotection in Experimental Stroke in Rodents: A Systematic Review and Meta-analysis. *Anesthesiology*, 126(4), 653-665.

<https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001534>

Arun K. Gupta and Adrian W. Gelb. (2008). *Essentials of Neuroanesthesia and Neurointensive Care*. <https://www.sciencedirect.com/book/9781416046530/essentials-of-neuroanesthesia-and-neurointensive-care#book-info>

Asahi, M., Asahi, K., Jung, J.-C., del Zoppo, G. J., Fini, M. E. et Lo, E. H. (2000). Role for Matrix Metalloproteinase 9 after Focal Cerebral Ischemia: Effects of Gene Knockout and Enzyme Inhibition with BB-94. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 20(12), 1681-1689. <https://doi.org/10.1097/00004647-200012000-00007>

Ashok Srinivasan, Mayank Goyal, Faisal Al Azri, Cheemun Lum. (s. d.). State-of-the-Art Imaging of Acute Stroke. *RadioGraphics*, (26), 75-85.

<https://doi.org/10.1148/rg.26si065501>

Ashwin A. Pillai; Prasanna Tadi; Arun Kanmanthareddy. (2023). *Cardioembolic Stroke*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536990/>

- Astrup, J., Siesjö, B. K. et Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*, *12*(6), 723-725. <https://doi.org/10.1161/01.STR.12.6.723>
- ASTRUP, T. et PERMIN, P. M. (1947). Fibrinolysis in the Animal Organism. *Nature*, *159*(4046), 681-682. <https://doi.org/10.1038/159681b0>
- Attwell, D., Buchan, A. M., Charpak, S., Lauritzen, M., MacVicar, B. A. et Newman, E. A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, *468*(7321), 232-243. <https://doi.org/10.1038/nature09613>
- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C. N., O'Farrell, F. M. et Dalkara, T. (2016). What is a pericyte? *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *36*(2), 451-455. <https://doi.org/10.1177/0271678X15610340>
- Bailey, J. (2018). Does the Stress of Laboratory Life and Experimentation on Animals Adversely Affect Research Data? A Critical Review. *Alternatives to Laboratory Animals*, *46*(5), 291-305. <https://doi.org/10.1177/026119291804600501>
- Bányai, L., Váradi, A. et Patthy, L. (1983). Common evolutionary origin of the fibrin-binding structures of fibronectin and tissue-type plasminogen activator. *FEBS Letters*, *163*(1), 37-41. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)81157-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)81157-0)
- Baranger, J., Demene, C., Frerot, A., Faure, F., Delanoë, C., Serroune, H., Houdouin, A., Mairesse, J., Biran, V., Baud, O. et Tanter, M. (2021). Bedside functional monitoring of the dynamic brain connectivity in human neonates. *Nature Communications*, *12*(1), 1080. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21387-x>
- Barber, P. A., Hoyte, L., Kirk, D., Foniok, T., Buchan, A. et Tuor, U. (2005). Early T1- and T2-weighted MRI signatures of transient and permanent middle cerebral artery occlusion in a murine stroke model studied at 9.4T. *Neuroscience Letters*, *388*(1), 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.06.067>
- Barber, P. A., Zhang, J., Demchuk, A. M., Hill, M. D. et Buchan, A. M. (2001). Why are stroke patients excluded from TPA therapy? *Neurology*, *56*(8), 1015-1020. <https://doi.org/10.1212/WNL.56.8.1015>
- Barca, C., Kiliaan, A. J., Foray, C., Wachsmuth, L., Hermann, S., Faber, C., Schäfers, M., Wiesmann, M., Jacobs, A. H. et Zinnhardt, B. (2022). A Longitudinal PET/MRI Study of Colony-Stimulating Factor 1 Receptor-Mediated Microglia Depletion in Experimental

Stroke. *Journal of Nuclear Medicine*, 63(3), 446.

<https://doi.org/10.2967/jnumed.121.262279>

Bardutzky, J., Shen, Q., Henninger, N., Schwab, S., Duong, T. Q. et Fisher, M. (2007). Characterizing Tissue Fate After Transient Cerebral Ischemia of Varying Duration Using Quantitative Diffusion and Perfusion Imaging. *Stroke*, 38(4), 1336-1344.

<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000259636.26950.3b>

Barron, H. C., Mars, R. B., Dupret, D., Lerch, J. P. et Sampaio-Baptista, C. (2020). Cross-species neuroscience: closing the explanatory gap. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376(1815), 20190633.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0633>

Basser, P. J., Mattiello, J. et LeBihan, D. (1994a). Estimation of the Effective Self-Diffusion Tensor from the NMR Spin Echo. *Journal of Magnetic Resonance, Series B*, 103(3), 247-254. <https://doi.org/10.1006/jmrb.1994.1037>

Basser, P. J., Mattiello, J. et LeBihan, D. (1994b). MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophysical Journal*, 66(1), 259-267. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80775-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80775-1)

Bath, P. M. W., Macleod, M. R. et Green, A. R. (2009). Emulating Multicentre Clinical Stroke Trials: A New Paradigm for Studying Novel Interventions in Experimental Models of Stroke. *International Journal of Stroke*, 4(6), 471-479. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2009.00386.x>

Beauchamp, A., Yee, Y., Darwin, B. C., Raznahan, A., Mars, R. B. et Lerch, J. P. (2022). Whole-brain comparison of rodent and human brains using spatial transcriptomics. *eLife*, 11, e79418. <https://doi.org/10.7554/eLife.79418>

Beckmann, N., Stirnimann, R. et Bochen, D. (1999). High-Resolution Magnetic Resonance Angiography of the Mouse Brain: Application to Murine Focal Cerebral Ischemia Models. *Journal of Magnetic Resonance*, 140(2), 442-450.

<https://doi.org/10.1006/jmre.1999.1864>

Beekman, F. J., van der Have, F., Vastenhouw, B., van der Linden, A. J. A., van Rijk, P. P., Burbach, J. P. H. et Smidt, M. P. (2005). U-SPECT-I: A Novel System for

Submillimeter-Resolution Tomography with Radiolabeled Molecules in Mice. *Journal of Nuclear Medicine*, 46(7), 1194. <http://jnm.snmjournals.org/content/46/7/1194.abstract>

Beez, T., Munoz-Bendix, C., Steiger, H.-J. et Beseoglu, K. (2019). Decompressive craniectomy for acute ischemic stroke. *Critical Care*, 23(1), 209.

<https://doi.org/10.1186/s13054-019-2490-x>

Begg, C., Cho, M., Eastwood, S., Horton, R., Moher, D., Olkin, I., Pitkin, R., Rennie, D., Schulz, K. F., Simel, D. et Stroup, D. F. (1996). Improving the Quality of Reporting of Randomized Controlled Trials: The CONSORT Statement. *JAMA*, 276(8), 637-639.

<https://doi.org/10.1001/jama.1996.03540080059030>

Benakis, C., Llovera, G. et Liesz, A. (2018). The meningeal and choroidal infiltration routes for leukocytes in stroke. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 11, 1756286418783708. <https://doi.org/10.1177/1756286418783708>

Benarroch, E. (2023). What Are the Roles of Pericytes in the Neurovascular Unit and Its Disorders? *Neurology*, 100(20), 970-977.

<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000207379>

Benchenane, K., Berezowski, V., Fernández-Monreal, M., Brillault, J., Valable, S., Dehouck, M.-P., Cecchelli, R., Vivien, D., Touzani, O. et Ali, C. (2005). Oxygen Glucose Deprivation Switches the Transport of tPA Across the Blood–Brain Barrier From an LRP-Dependent to an Increased LRP-Independent Process. *Stroke*, 36(5), 1059-1064.

<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000163050.39122.4f>

Bercoff, J., Montaldo, G., Loupas, T., Savery, D., Mézière, F., Fink, M. et Tanter, M. (2011). Ultrafast compound Doppler imaging: providing full blood flow characterization. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 58(1), 134-147.

<https://doi.org/10.1109/TUFFC.2011.1780>

Berger, T., Borgdorff, A., Crochet, S., Neubauer, F. B., Lefort, S., Fauvet, B., Ferezou, I., Carleton, A., Lüscher, H.-R. et Petersen, C. C. H. (2007). Combined Voltage and Calcium Epifluorescence Imaging In Vitro and In Vivo Reveals Subthreshold and Suprathreshold Dynamics of Mouse Barrel Cortex. *Journal of Neurophysiology*, 97(5), 3751-3762.

<https://doi.org/10.1152/jn.01178.2006>

Berkhemer, O. A., Fransen, P. S. S., Beumer, D., Berg, L. A. van den, Lingsma, H. F., Yoo, A. J., Schonewille, W. J., Vos, J. A., Nederkoorn, P. J., Wermer, M. J. H., Walderveen, M. A. A. van, Staals, J., Hofmeijer, J., Oostayen, J. A. van, Nijeholt, G. J. L. à, Boiten, J., Brouwer, P. A., Emmer, B. J., Bruijn, S. F. de, ... Dippel, D. W. J. (2015). A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke. *New England Journal of Medicine*, 372(1), 11-20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411587>

Berndt, N., Kovács, R., Schoknecht, K., Rösner, J., Reiffurth, C., Maechler, M., Holzhütter, H.-G., Dreier, J. P., Spies, C. et Liotta, A. (2021). Low neuronal metabolism during isoflurane-induced burst suppression is related to synaptic inhibition while neurovascular coupling and mitochondrial function remain intact. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 41(10), 2640-2655. <https://doi.org/10.1177/0271678X211010353>

Bertero, A., Liska, A., Pagani, M., Parolisi, R., Masferrer, M. E., Gritti, M., Pedrazzoli, M., Galbusera, A., Sarica, A., Cerasa, A., Buffelli, M., Tonini, R., Buffo, A., Gross, C., Pasqualetti, M. et Gozzi, A. (2018). Autism-associated 16p11.2 microdeletion impairs prefrontal functional connectivity in mouse and human. *Brain*, 141(7), 2055-2065. <https://doi.org/10.1093/brain/awy111>

Bickford, P. C., Chadman, K., Williams, B., Shukitt-Hale, B., Holmes, D., Tagliatalata, G. et Joseph, J. (1999). Effect of normobaric hyperoxia on two indexes of synaptic function in fisher 344 rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7), 817-824. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00260-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00260-3)

Biernaskie, J., Chernenko, G. et Corbett, D. (2004). Efficacy of Rehabilitative Experience Declines with Time after Focal Ischemic Brain Injury. *Journal of Neuroscience*, 24(5), 1245-1254. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3834-03.2004>

Biernaskie, J., Szymanska, A., Windle, V. et Corbett, D. (2005). Bi-hemispheric contribution to functional motor recovery of the affected forelimb following focal ischemic brain injury in rats. *European Journal of Neuroscience*, 21(4), 989-999. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03899.x>

Binder, N. F., El Amki, M., Glück, C., Middleham, W., Reuss, A. M., Bertolo, A., Thurner, P., Deffieux, T., Lambride, C., Epp, R., Handelsmann, H.-L., Baumgartner, P., Orset, C., Bethge, P., Kulcsar, Z., Aguzzi, A., Tanter, M., Schmid, F., Vivien, D., ...

- Wegener, S. (2024). Leptomeningeal collaterals regulate reperfusion in ischemic stroke and rescue the brain from futile recanalization. *Neuron*, *112*(9), 1456-1472.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2024.01.031>
- Binder, N. F., Glück, C., Middleham, W., Alasoadura, M., Pranculeviciute, N., Wyss, M. T., Chuquet, J., Weber, B., Wegener, S. et El Amki, M. (2022a). Vascular Response to Spreading Depolarization Predicts Stroke Outcome. *Stroke*, *53*(4), 1386-1395. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.038085>
- Binder, N. F., Glück, C., Middleham, W., Alasoadura, M., Pranculeviciute, N., Wyss, M. T., Chuquet, J., Weber, B., Wegener, S. et El Amki, M. (2022b). Vascular Response to Spreading Depolarization Predicts Stroke Outcome. *Stroke*, *53*(4), 1386-1395. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.038085>
- Biswal, B., Zerrin Yetkin, F., Haughton, V. M. et Hyde, J. S. (1995). Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar mri. *Magnetic Resonance in Medicine*, *34*(4), 537-541. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910340409>
- Bivard, A., Lin, L. et Parsons, M. W. (2013). Review of Stroke Thrombolytics. *J Stroke*, *15*(2), 90-98. <https://doi.org/10.5853/jos.2013.15.2.90>
- Blaschke, Dr, Hensel, L., Minassian, A., Vlachakis, S., Tscherpel, C., Vay, S. U., Rabenstein, M., Schroeter, M., Fink, G. R., Hoehn, M., Grefkes, C. et Rueger, M. A. (2021). Translating Functional Connectivity After Stroke: Functional Magnetic Resonance Imaging Detects Comparable Network Changes in Mice and Humans. *Stroke*, *52*(9), 2948-2960. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.032511>
- Blumstein, D. T. (2016). Habituation and sensitization: new thoughts about old ideas. *Animal Behaviour*, *120*, 255-262. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.05.012>
- Bokkers, R. P., Hernandez, D. A., Merino, J. G., Mirasol, R. V., van Osch, M. J., Hendrikse, J., Warach, S. et Latour, L. L. (2012). Whole-Brain Arterial Spin Labeling Perfusion MRI in Patients With Acute Stroke. *Stroke*, *43*(5), 1290-1294. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.589234>
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P. et Lipton, S. A. (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences, 92(16), 7162-7166.

<https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7162>

Boutillier, B. (s. d.). *Neurosciences médicales - ELSEVIER - Campus référence - 2842997506*. http://www.remede.org/librairie-medicale/livre_1452_157.html

Bradford, H. F., Ward, H. K. et Thomas, A. J. (1978). GLUTAMINE—A MAJOR SUBSTRATE FOR NERVE ENDINGS. *Journal of Neurochemistry*, 30(6), 1453-1459. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1978.tb10477.x>

Brinjikji, W., Nogueira, R. G., Kivimäki, P., Layton, K. F., Delgado Almandoz, J. E., Hanel, R. A., Mendes Pereira, V., Almekhlafi, M. A., Yoo, A. J., Jahromi, B. S., Gounis, M. J., Patel, B., Abbasi, M., Fitzgerald, S., Mereuta, O. M., Dai, D., Kadirvel, R., Doyle, K., Savastano, L., ... Kallmes, D. F. (2021). Association between clot composition and stroke origin in mechanical thrombectomy patients: analysis of the Stroke Thromboembolism Registry of Imaging and Pathology. *Journal of NeuroInterventional Surgery*, 13(7), 594. <https://doi.org/10.1136/neurintsurg-2020-017167>

Brott, T., Adams, H. P., Olinger, C. P., Marler, J. R., Barsan, W. G., Biller, J., Spilker, J., Holleran, R., Eberle, R. et Hertzberg, V. (1989). Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke*, 20(7), 864-870. <https://doi.org/10.1161/01.STR.20.7.864>

Brown, C. E., Aminoltehari, K., Erb, H., Winship, I. R. et Murphy, T. H. (2009). *In Vivo* Voltage-Sensitive Dye Imaging in Adult Mice Reveals That Somatosensory Maps Lost to Stroke Are Replaced over Weeks by New Structural and Functional Circuits with Prolonged Modes of Activation within Both the Peri-Infarct Zone and Distant Sites. *The Journal of Neuroscience*, 29(6), 1719. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4249-08.2009>

Brown, C. E., Li, P., Boyd, J. D., Delaney, K. R. et Murphy, T. H. (2007). Extensive Turnover of Dendritic Spines and Vascular Remodeling in Cortical Tissues Recovering from Stroke. *The Journal of Neuroscience*, 27(15), 4101. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4295-06.2007>

Brown, E. N., Purdon, P. L. et Van Dort, C. J. (2011). General Anesthesia and Altered States of Arousal: A Systems Neuroscience Analysis. *Annual Review of Neuroscience*. Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153200>

Brunner, C., Montaldo, G. et Urban, A. (2023). Functional ultrasound imaging of stroke in awake rats. *eLife*, 12, RP88919. <https://doi.org/10.7554/eLife.88919>

Brus-Ramer, M., Carmel, J. B. et Martin, J. H. (2009). Motor Cortex Bilateral Motor Representation Depends on Subcortical and Interhemispheric Interactions. *Journal of Neuroscience*, 29(19), 6196-6206. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5852-08.2009>

Buljubasic, N., Rusch, N. J., Marijic, J., Kampine, J. P. et Bosnjak, Z. J. (1992). Effects of Halothane and Isoflurane on Calcium and Potassium Channel Currents in Canine Coronary Arterial Cells. *Anesthesiology*, 76(6), 990-998.
<https://doi.org/10.1097/00000542-199206000-00020>

C Granziera, * Open Modal, 1 , 2 H D'Arceuil, * Open Modal, # Open Modal, 1 L Zai3 P.J Magistretti4 A.G Sorensen1 and A.J de Crespigny1. (2007, 13 novembre). Long-Term Monitoring of Post-Stroke Plasticity After Transient Cerebral Ischemia in Mice Using In Vivo and Ex Vivo Diffusion Tensor MRI. *The Open Neuroimaging Journal*.
<https://openneuroimagingjournal.com/VOLUME/1/PAGE/10/FULLTEXT/>

Calabresi, P., Napolitano, M., Centonze, D., Marfia, G. A., Gubellini, P., Teule, M. A., Berretta, N., Bernardi, G., Frati, L., Tolu, M. et Gulino, A. (2000). Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *European Journal of Neuroscience*, 12(3), 1002-1012. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00991.x>

Camiolo, S. M., Thorsen, S. et Astrup, T. (1971). Fibrinogenolysis and fibrinolysis with tissue plasminogen activator, urokinase, streptokinase-activated human globulin, and plasmin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 138(1), 277-280.
<https://doi.org/10.3181/00379727-138-35878>

Canazza, A., Minati, L., Boffano, C., Parati, E. et Binks, S. (2014). Experimental Models of Brain Ischemia: A Review of Techniques, Magnetic Resonance Imaging, and Investigational Cell-Based Therapies. *Frontiers in Neurology*, 5.
<https://www.frontiersin.org/journals/neurology/articles/10.3389/fneur.2014.00019>

Candelario-Jalil, E., Dijkhuizen, R. M. et Magnus, T. (2022). Neuroinflammation, Stroke, Blood-Brain Barrier Dysfunction, and Imaging Modalities. *Stroke*, 53(5), 1473-1486.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.122.036946>

- Carano, R. A. D., Li, F., Irie, K., Helmer, K. G., Silva, M. D., Fisher, M. et Sotak, C. H. (2000). Multispectral analysis of the temporal evolution of cerebral ischemia in the rat brain. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 12(6), 842-858.
[https://doi.org/10.1002/1522-2586\(200012\)12:6<842::AID-JMRI7>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1522-2586(200012)12:6<842::AID-JMRI7>3.0.CO;2-5)
- Carmichael, S. T., Archibeque, I., Luke, L., Nolan, T., Momiy, J. et Li, S. (2005). Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex. *Experimental Neurology*, 193(2), 291-311.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.01.004>
- Carmichael, S. T. et Chesselet, M.-F. (2002). Synchronous Neuronal Activity Is a Signal for Axonal Sprouting after Cortical Lesions in the Adult. *The Journal of Neuroscience*, 22(14), 6062. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-14-06062.2002>
- Carmit Libruder a , , Amit Ram a , , Yael HersHKovitz a , , Dolev Karolinsky a , , David Tanne b c , , Natan M. Bornstein d , , et Inbar Zucker a e. (2022). The contribution of potentially modifiable risk factors to acute ischemic stroke burden - Comparing young and older adults. *Preventive Medecine*.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091743521005065>
- Chan, P. H. (1994). Oxygen Radicals in Focal Cerebral Ischemia. *Brain Pathology*, 4(1), 59-65. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1994.tb00811.x>
- Chaney, A. M., Johnson, E. M., Cropper, H. C. et James, M. L. (2018). PET Imaging of Neuroinflammation Using [11C]DPA-713 in a Mouse Model of Ischemic Stroke. *JoVE*, (136), e57243. <https://doi.org/10.3791/57243>
- Chang, M. L., Yang, J., Kem, S., Klaidman, L., Sugawara, T., Chan, P. H. et Adams, J. D. (2002). Nicotinamide and ketamine reduce infarct volume and DNA fragmentation in rats after brain ischemia and reperfusion. *Neuroscience Letters*, 322(3), 137-140.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02520-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02520-4)
- Chavignon, A., Hingot, V., Orset, C., Vivien, D. et Couture, O. (2022). 3D transcranial ultrasound localization microscopy for discrimination between ischemic and hemorrhagic stroke in early phase. *Scientific Reports*, 12(1), 14607. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18025-x>

- Cheatwood, J. L., Emerick, A. J. et Kartje, G. L. (2008a). Neuronal plasticity and functional recovery after ischemic stroke. *Topics in Stroke Rehabilitation*, 15(1), 42-50. <https://doi.org/10.1310/tsr1501-42>
- Cheatwood, J. L., Emerick, A. J., Schwab, M. E. et Kartje, G. L. (2008b). Nogo-A Expression After Focal Ischemic Stroke in the Adult Rat. *Stroke*, 39(7), 2091-2098. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.507426>
- Chen, G., Kamat, P. K., Ahmad, A. S. et Doré, S. (2020). Distinctive effect of anesthetics on the effect of limb remote ischemic postconditioning following ischemic stroke. *PLOS ONE*, 15(1), e0227624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227624>
- Chen, Y., Chen, B., Yu, T., Yin, L., Sun, M., He, W. et Ma, C. (2021). Photoacoustic Mouse Brain Imaging Using an Optical Fabry-Pérot Interferometric Ultrasound Sensor. *Frontiers in Neuroscience*, 15. <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2021.672788>
- Cheng, T., Petraglia, A. L., Li, Z., Thiyagarajan, M., Zhong, Z., Wu, Z., Liu, D., Maggirwar, S. B., Deane, R., Fernández, J. A., LaRue, B., Griffin, J. H., Chopp, M. et Zlokovic, B. V. (2006). Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nature Medicine*, 12(11), 1278-1285. <https://doi.org/10.1038/nm1498>
- Chirantan Banerjee and Marc I. Chimowitz. (2017, 3 février). Stroke Caused by Atherosclerosis of the Major Intracranial Arteries. *Circulation Research*. <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/circresaha.116.308441>
- Chohan, S. A., Venkatesh, P. K. et How, C. H. (2019). Long-term complications of stroke and secondary prevention: an overview for primary care physicians. *Singapore Medical Journal*, 60(12), 616-620. <https://doi.org/10.11622/smedj.2019158>
- Christensen-Jeffries, K., Browning, R. J., Tang, M.-X., Dunsby, C. et Eckersley, R. J. (2015). In vivo acoustic super-resolution and super-resolved velocity mapping using microbubbles. *IEEE transactions on medical imaging*, 34(2), 433-440. <https://doi.org/10.1109/TMI.2014.2359650>
- Comelli, M. C., Guidolin, D., Seren, M. S., Zanoni, R., Canella, R., Rubini, R. et Manev, H. (1993). Time course, localization and pharmacological modulation of immediate early inducible genes, brain-derived neurotrophic factor and trkB messenger RNAs in the rat

brain following photochemical stroke. *Neuroscience*, 55(2), 473-490.

[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90517-J](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90517-J)

contrôle qualité en échographie avec élaboration d'un travail pratique. (s. d.). Récupéré le 1 octobre 2024 de <https://www.utc.fr/tsibh/public/3abih/11/pi/groupe6/index.html>

Correa, F., Gauberti, M., Parcq, J., Macrez, R., Hommet, Y., Obiang, P., Hernangómez, M., Montagne, A., Liot, G., Guaza, C., Maubert, E., Ali, C., Vivien, D. et Docagne, F. (2011). Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(6), 1229-1242.

<https://doi.org/10.1084/jem.20101880>

Correa-Paz, C., Pérez-Mato, M., Bellemain-Sagnard, M., González-Domínguez, M., Marie, P., Pérez-Gayol, L., López-Arias, E., del Pozo-Filú, L., López-Amoedo, S., Bugallo-Casal, A., Alonso-Alonso, M. L., Candamo-Lourido, M., Santamaría-Cadavid, M., Arias-Rivas, S., Rodríguez-Yañez, M., Iglesias-Rey, R., Castillo, J., Vivien, D., Rubio, M. et Campos, F. (2024). Pharmacological preclinical comparison of tenecteplase and alteplase for the treatment of acute stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 44(8), 1306-1318. <https://doi.org/10.1177/0271678X241237427>

Cosgrove, D. et Lassau, N. (2010). Imaging of perfusion using ultrasound. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 37 Suppl 1, S65-85.

<https://doi.org/10.1007/s00259-010-1537-7>

Couture, O., Besson, B., Montaldo, G., Fink, M. et Tanter, M. (2011). Microbubble ultrasound super-localization imaging (MUSLI). Dans *2011 IEEE International Ultrasonics Symposium* (p. 1285-1287). <https://doi.org/10.1109/ULTSYM.2011.6293576>

CRAIGIE, E. H. (1945). THE ARCHITECTURE OF THE CEREBRAL CAPILLARY BED. *Biological Reviews*, 20(4), 133-146. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1945.tb00446.x>

Cramer, S. C. (2008). Repairing the human brain after stroke: I. Mechanisms of spontaneous recovery. *Annals of Neurology*, 63(3), 272-287.

<https://doi.org/10.1002/ana.21393>

Cucchiara, R. F., Theye, R. A. et Michenfelder, J. D. (1974). The Effects of Isoflurane on Canine Cerebral Metabolism and Blood Flow. *Anesthesiology*, 40(6), 571-574.

<https://doi.org/10.1097/00000542-197406000-00011>

Cumbler, E. (2015). In-Hospital Ischemic Stroke. *The Neurohospitalist*, 5(3), 173-181.

<https://doi.org/10.1177/1941874415588319>

D'Agostino, D. P., Putnam, R. W. et Dean, J. B. (2007). Superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) Production in CA1 Neurons of Rat Hippocampal Slices Exposed to Graded Levels of Oxygen. *Journal of Neurophysiology*, 98(2), 1030-1041. <https://doi.org/10.1152/jn.01003.2006>

Danial, N. N. et Korsmeyer, S. J. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, 116(2), 205-219. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00046-7)

Dashdorj, N., Corrie, K., Napolitano, A., Petersen, E., Mahajan, R. P. et Auer, D. P. (2013). Effects of Subanesthetic Dose of Nitrous Oxide on Cerebral Blood Flow and Metabolism: A Multimodal Magnetic Resonance Imaging Study in Healthy Volunteers. *Anesthesiology*, 118(3), 577-586. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3182800d58>

David, H. N., Leveille, F., Chazalviel, L., MacKenzie, E. T., Buisson, A., Lemaire, M. et Abraini, J. H. (2003). Reduction of Ischemic Brain Damage by Nitrous Oxide and Xenon. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23(10), 1168-1173.

<https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000087342.31689.18>

Dean, J. B., Mulkey, D. K., Henderson, R. A., Potter, S. J. et Putnam, R. W. (2004). Hyperoxia, reactive oxygen species, and hyperventilation: oxygen sensitivity of brain stem neurons. *Journal of Applied Physiology*, 96(2), 784-791.

<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00892.2003>

Deffieux, T., Demene, C., Pernot, M. et Tanter, M. (2018). Functional ultrasound neuroimaging: a review of the preclinical and clinical state of the art. *Neurotechnologies*, 5(1), 128-135. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.001>

Demené, C., Robin, J., Dizeux, A., Heiles, B., Pernot, M., Tanter, M. et Perren, F. (2021). Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients. *Nature biomedical engineering*, 5(3), 219-228. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00697-x>

Demené, C., Tiran, E., Sieu, L.-A., Bergel, A., Gennisson, J. L., Pernot, M., Deffieux, T., Cohen, I. et Tanter, M. (2016). 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography. *NeuroImage*, 127, 472-483.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.11.014>

Demeulenaere, O., Bertolo, A., Pezet, S., Ialy-Radio, N., Osmanski, B., Papadacci, C., Tanter, M., Deffieux, T. et Pernot, M. (2022). In vivo whole brain microvascular imaging in mice using transcranial 3D Ultrasound Localization Microscopy. *eBioMedicine*, 79, 103995. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103995>

Desailly, Y., Couture, O., Fink, M. et Tanter, M. (2013). Sono-activated ultrasound localization microscopy. *Applied Physics Letters*, 103(17), 174107.

<https://doi.org/10.1063/1.4826597>

Dickinson, R., Peterson, B. K., Banks, P., Simillis, C., Martin, J. C. S., Valenzuela, C. A., Maze, M. et Franks, N. P. (2007). Competitive Inhibition at the Glycine Site of the N - Methyl-d-aspartate Receptor by the Anesthetics Xenon and Isoflurane: Evidence from Molecular Modeling and Electrophysiology. *Anesthesiology*, 107(5), 756-767.

<https://doi.org/10.1097/01.anes.0000287061.77674.71>

Dirnagl, U. et Fisher, M. (2012). International, Multicenter Randomized Preclinical Trials in Translational Stroke Research: It's Time to Act. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(6), 933-935. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.51>

Dirnagl, U., Iadecola, C. et Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 22(9), 391-397.

[https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(99\)01401-0](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01401-0)

Dohmen, C., Sakowitz, O. W., Fabricius, M., Bosche, B., Reithmeier, T., Ernestus, R.-I., Brinker, G., Dreier, J. P., Woitzik, J., Strong, A. J. et Graf, R. (2008a). Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Annals of Neurology*, 63(6), 720-728. <https://doi.org/10.1002/ana.21390>

Dohmen, C., Sakowitz, O. W., Fabricius, M., Bosche, B., Reithmeier, T., Ernestus, R.-I., Brinker, G., Dreier, J. P., Woitzik, J., Strong, A. J. et Graf, R. (2008b). Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Annals of Neurology*, 63(6), 720-728. <https://doi.org/10.1002/ana.21390>

Doppler effect and Doppler echocardiography. (s. d.). Cardiovascular Education. Récupéré le 30 septembre 2024 de <https://ecgwaves.com/topic/doppler-effect-and-doppler-studies-in-echocardiography/>

Dreier, J. P. et Reiffurth, C. (2017). Exploitation of the spreading depolarization-induced cytotoxic edema for high-resolution, 3D mapping of its heterogeneous propagation paths. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(9), 2112-2114. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700760114>

Drieu, A., Levard, D., Vivien, D. et Rubio, M. (2018). Anti-inflammatory treatments for stroke: from bench to bedside. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 11, 1756286418789854. <https://doi.org/10.1177/1756286418789854>

Du, Y., Deng, W., Wang, Z., Ning, M., Zhang, W., Zhou, Y., Lo, E. H. et Xing, C. (2017). Differential subnetwork of chemokines/cytokines in human, mouse, and rat brain cells after oxygen–glucose deprivation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(4), 1425-1434. <https://doi.org/10.1177/0271678X16656199>

Dunn, A. K., Bolay, H., Moskowitz, M. A. et Boas, D. A. (2001). Dynamic Imaging of Cerebral Blood Flow Using Laser Speckle. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 21(3), 195-201. <https://doi.org/10.1097/00004647-200103000-00002>

Dyslipidemia as a risk factor for ischemic stroke - PubMed. (s. d.). Récupéré le 9 octobre 2024 de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19849661/>

E. Mace, G. Montaldo, B. -F. Osmanski, I. Cohen, M. Fink et M. Tanter. (2013). Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 60(3), 492-506. <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2013.2592>

Eastwood, D., Findlay, L., Poole, S., Bird, C., Wadhwa, M., Moore, M., Burns, C., Thorpe, R. et Stebbings, R. (2010). Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+ effector memory T-cells. *British Journal of Pharmacology*, 161(3), 512-526. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00922.x>

Écosystème de la radiologie : un paradoxe à la française. (s. d.). Récupéré le 1 octobre 2024 de <https://www.thema-radiologie.fr/actualites/2936/ecosysteme-de-la-radiologie-un-paradoxe-a-la-francaise.html>

El Amki, M. et Wegener, S. (2017). Improving Cerebral Blood Flow after Arterial Recanalization: A Novel Therapeutic Strategy in Stroke. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2669. <https://doi.org/10.3390/ijms18122669>

Ellegood, J., Anagnostou, E., Babineau, B. A., Crawley, J. N., Lin, L., Genestine, M., DiCicco-Bloom, E., Lai, J. K. Y., Foster, J. A., Peñagarikano, O., Geschwind, D. H., Pacey, L. K., Hampson, D. R., Laliberté, C. L., Mills, A. A., Tam, E., Osborne, L. R., Kouser, M., Espinosa-Becerra, F., ... Lerch, J. P. (2015). Clustering autism: using neuroanatomical differences in 26 mouse models to gain insight into the heterogeneity. *Molecular Psychiatry*, 20(1), 118-125. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.98>

Engelhard, K., Werner, C., Eberspächer, E., Bachl, M., Blobner, M., Hildt, E., Hutzler, P. et Kochs, E. (2003). The Effect of the α 2-Agonist Dexmedetomidine and the N-Methyl-d-Aspartate Antagonist S(+)-Ketamine on the Expression of Apoptosis-Regulating Proteins After Incomplete Cerebral Ischemia and Reperfusion in Rats. *Anesthesia & Analgesia*, 96(2). https://journals.lww.com/anesthesia-analgesia/fulltext/2003/02000/the_effect_of_the__2_agonist_dexmedetomidine_and.41.aspx

Engelter, S. T., Bonati, L. H. et Lyrer, P. A. (2006). Intravenous thrombolysis in stroke patients of ≥ 80 versus < 80 years of age—a systematic review across cohort studies. *Age and Ageing*, 35(6), 572-580. <https://doi.org/10.1093/ageing/af1104>

Engineering a memory with LTD and LTP | Nature. (s. d.). Récupéré le 26 septembre 2024 de <https://www.nature.com/articles/nature13294>

Errico, C., Osmanski, B.-F., Pezet, S., Couture, O., Lenkei, Z. et Tanter, M. (2016). Transcranial functional ultrasound imaging of the brain using microbubble-enhanced ultrasensitive Doppler. *NeuroImage*, 124, 752-761. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.09.037>

Errico, C., Pierre, J., Pezet, S., Desailly, Y., Lenkei, Z., Couture, O. et Tanter, M. (2015). Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature*, 527(7579), 499-502. <https://doi.org/10.1038/nature16066>

Evans. (2000). *Doppler ultrasound : physics, instrumentation, and signal processing*.

Expression in E. coli of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity - Kagitani - 1985 - FEBS Letters - Wiley Online Library. (s. d.).

Récupéré le 23 septembre 2024 de

<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/0014-5793%2885%2980860-7?sid=nlm%3Apubmed>

Fang, B., Song, Y., Han, Z., Wei, X., Lin, Q., Zhu, X., Yang, R., Sun, J., Tian, G., Liu, X., Cao, G., Shi, Y., Nie, N., Li, D. et Zhao, R. C. (2007). Synergistic interactions between 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and imatinib in patients with chronic myeloid leukemia in blastic phase that is resistant to standard-dose imatinib.

Leukemia Research, 31(10), 1441-1444. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.02.004>

Feigin, V. L., Owolabi, M. O., Feigin, V. L., Abd-Allah, F., Akinyemi, R. O.,

Bhattacharjee, N. V., Brainin, M., Cao, J., Caso, V., Dalton, B., Davis, A., Dempsey, R.,

Duprey, J., Feng, W., Ford, G. A., Gall, S., Gandhi, D., Good, D. C., Hachinski, V., ...

Zagożdżon, P. (2023). Pragmatic solutions to reduce the global burden of stroke: a World

Stroke Organization–Lancet Neurology Commission. *The Lancet Neurology*, 22(12),

1160-1206. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(23\)00277-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(23)00277-6)

Ferezou, I., Haiss, F., Gentet, L. J., Aronoff, R., Weber, B. et Petersen, C. C. H. (2007).

Spatiotemporal Dynamics of Cortical Sensorimotor Integration in Behaving Mice.

Neuron, 56(5), 907-923. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.007>

Figure 2: Cellular constituents of the blood–brain barrier. | Nature Reviews

Neuroscience. (s. d.). <https://www.nature.com/articles/nrn1824/figures/2>

Fisher, M., Feuerstein, G., Howells, D. W., Hurn, P. D., Kent, T. A., Savitz, S. I. et Lo, E.

H. (2009). Update of the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable Preclinical

Recommendations. *Stroke*, 40(6), 2244-2250.

<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.541128>

Fournier, A. P., Morvan, M. I., Martinez de Lizarrondo, S. et Gauberti, M. (2024).

Immuno-MRI for Stroke Diagnosis and Prognosis. *ISCHEMIC STROKE: from fibrinolysis to functional recovery*, 550, 53-61.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.12.007>

- Fredriksson, L., Lawrence, D. A. et Medcalf, R. L. (2016). tPA Modulation of the Blood–Brain Barrier: A Unifying Explanation for the Pleiotropic Effects of tPA in the CNS. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 43, 154-168. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1586229>
- Fredriksson, L., Li, H., Fieber, C., Li, X. et Eriksson, U. (2004). Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC. *The EMBO Journal*, 23(19), 3793-3802. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600397>
- Fukuda, S. et Warner, D. S. (2007). Cerebral protection. *British Journal of Anaesthesia*, 99(1), 10-17. <https://doi.org/10.1093/bja/aem140>
- Furie, B. et Furie, B. C. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *The New England Journal of Medicine*, 359(9), 938-949. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0801082>
- Furie Bruce et Furie Barbara C. (s. d.). Mechanisms of Thrombus Formation. *New England Journal of Medicine*, 359(9), 938-949. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0801082>
- Fuxe, K., Bjelke, B., Andbjør, B., Grahn, H., Rimondini, R. et Agnati, L. F. (1997). Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia. *NeuroReport*, 8(11), 2623-2629. <https://doi.org/10.1097/00001756-199707280-00040>
- Gakuba, C., Gauberti, M., Mazighi, M., Defer, G., Hanouz, J.-L. et Vivien, D. (2011a). Preclinical Evidence Toward the Use of Ketamine for Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator-Mediated Thrombolysis Under Anesthesia or Sedation. *Stroke*, 42(10), 2947-2949. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.620468>
- Gakuba, C., Gauberti, M., Mazighi, M., Defer, G., Hanouz, J.-L. et Vivien, D. (2011b). Preclinical Evidence Toward the Use of Ketamine for Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator-Mediated Thrombolysis Under Anesthesia or Sedation. *Stroke*, 42(10), 2947-2949. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.620468>
- Gama Sosa, M. A., Gasperi, R. D., Rocher, A. B., Wang, A. C.-J., Janssen, W. G. M., Flores, T., Perez, G. M., Schmeidler, J., Dickstein, D. L., Hof, P. R. et Elder, G. A. (2010). Age-related vascular pathology in transgenic mice expressing presenilin 1-associated familial Alzheimer's disease mutations. *The American Journal of Pathology*, 176(1), 353-368. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090482>

- Ganjoo, P. et Kapoor, I. (2017). Chapter 6 - Neuropharmacology. Dans H. Prabhakar (dir.), *Essentials of Neuroanesthesia* (p. 103-122). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805299-0.00006-3>
- Gardener, H., Sacco, R. L., Rundek, T., Battistella, V., Cheung, Y. K. et Elkind, M. S. V. (2020). Race and Ethnic Disparities in Stroke Incidence in the Northern Manhattan Study. *Stroke*, 51(4), 1064-1069. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.028806>
- Gasiorowska, A., Wydrych, M., Drapich, P., Zadrozny, M., Steczkowska, M., Niewiadomski, W. et Niewiadomska, G. (2021). The Biology and Pathobiology of Glutamatergic, Cholinergic, and Dopaminergic Signaling in the Aging Brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 654931. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.654931>
- Gauberti, M., Fournier, A. P., Docagne, F., Vivien, D. et Martinez de Lizarrondo, S. (2018). Molecular Magnetic Resonance Imaging of Endothelial Activation in the Central Nervous System. *Theranostics*, 8(5), 1195-1212. <https://doi.org/10.7150/thno.22662>
- Gauberti, M., Montagne, A., Marcos-Contreras, O. A., Le Béhot, A., Maubert, E. et Vivien, D. (2013). Ultra-Sensitive Molecular MRI of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Reveals a Dynamic Inflammatory Penumbra After Strokes. *Stroke*, 44(7), 1988-1996. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.000544>
- Gisele S. Silva, Walter J. Koroshetz, R. Gilberto González, and Lee H. Schwamm et Gisele S. Silva, Walter J. Koroshetz, R. Gilberto González,. (2010). Causes of Ischemic Stroke. Dans *Acute Ischemic Stroke* (© Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 25-42).
- Gonzalez, C. L. R., Gharbawie, O. A., Williams, P. T., Kleim, J. A., Kolb, B. et Whishaw, I. Q. (2004). Evidence for bilateral control of skilled movements: ipsilateral skilled forelimb reaching deficits and functional recovery in rats follow motor cortex and lateral frontal cortex lesions. *European Journal of Neuroscience*, 20(12), 3442-3452. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03751.x>
- Goyal, M., Menon, B. K., van Zwam, W. H., Dippel, D. W. J., Mitchell, P. J., Demchuk, A. M., Dávalos, A., Majoie, C. B. L. M., van der Lugt, A., de Miquel, M. A., Donnan, G. A., Roos, Y. B. W. E. M., Bonafe, A., Jahan, R., Diener, H.-C., van den Berg, L. A., Levy, E. I., Berkhemer, O. A., Pereira, V. M., ... Jovin, T. G. (2016). Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient

data from five randomised trials. *The Lancet*, 387(10029), 1723-1731.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00163-X)

Gralla, J., Brekenfeld, C., Mordasini, P. et Schroth, G. (2012). Mechanical Thrombolysis and Stenting in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 43(1), 280-285.

<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.626903>

Grandjean, J., Canella, C., Anckaerts, C., Ayranci, G., Bougacha, S., Bienert, T., Buehlmann, D., Coletta, L., Gallino, D., Gass, N., Garin, C. M., Nadkarni, N. A., Hübner, N. S., Karatas, M., Komaki, Y., Kreitz, S., Mandino, F., Mechling, A. E., Sato, C., ...

Gozzi, A. (2020). Common functional networks in the mouse brain revealed by multi-centre resting-state fMRI analysis. *NeuroImage*, 205, 116278.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116278>

Grandjean, J., Zerbi, V., Balsters, J. H., Wenderoth, N. et Rudin, M. (2017). Structural Basis of Large-Scale Functional Connectivity in the Mouse. *The Journal of Neuroscience*, 37(34), 8092. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0438-17.2017>

Griensven, H. van et Strong, J. (2022). *Pain - E-Book: Pain - E-Book*. Elsevier Health Sciences.

Grines, C. L., Topol, E. J., O'Neill, W. W., George, B. S., Kereiakes, D., Phillips, H. R., Leimberger, J. D., Woodlief, L. H. et Califf, R. M. (1995). Effect of cigarette smoking on outcome after thrombolytic therapy for myocardial infarction. *Circulation*, 91(2), 298-303. <https://doi.org/10.1161/01.cir.91.2.298>

Gronke, R. S., Knauer, D. J., Veeraraghavan, S. et Baker, J. B. (1989). A Form of Protease Nexin I Is Expressed on the Platelet Surface During Platelet Activation. *Blood*, 73(2), 472-478. <https://doi.org/10.1182/blood.V73.2.472.472>

Gross, T. J., Kremens, K., Powers, L. S., Brink, B., Knutson, T., Domann, F. E., Philibert, R. A., Milhem, M. M. et Monick, M. M. (2014). Epigenetic Silencing of the Human NOS2 Gene: Rethinking the Role of Nitric Oxide in Human Macrophage Inflammatory Responses. *The Journal of Immunology*, 192(5), 2326-2338.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301758>

Grotta, J. C. (2013). Stroke Progress Review Group. *Stroke*, 44(6_suppl_1), S111-S113.

<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.000970>

Gu, W., Jiang, W., Brännström, T. et Wester, P. (1999). Long-term cortical CBF recording by laser-Doppler flowmetry in awake freely moving rats subjected to reversible photothrombotic stroke. *Journal of Neuroscience Methods*, 90(1), 23-32.

[https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(99\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(99)00041-2)

Gualandris, A., Jones, T. E., Strickland, S. et Tsirka, S. E. (1996). Membrane depolarization induces calcium-dependent secretion of tissue plasminogen activator. *Journal of Neuroscience*, 16(7), 2220-2225. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-07-02220.1996>

Guan, J., Pavlovic, D., Dalkie, N., Waldvogel, H. J., O'Carroll, S. J., Green, C. R. et Nicholson, L. F. B. (2013). Vascular degeneration in Parkinson's disease. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 23(2), 154-164. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2012.00628.x>

Gupta, A., Tsai, L.-H. et Wynshaw-Boris, A. (2002). Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nature Reviews Genetics*, 3(5), 342-355.

<https://doi.org/10.1038/nrg799>

Gverić, D., Herrera, B. M. et Cuzner, M. L. (2005). tPA Receptors and the Fibrinolytic Response in Multiple Sclerosis Lesions. *The American Journal of Pathology*, 166(4), 1143-1151. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62334-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62334-6)

Gverić, D., Herrera, B., Petzold, A., Lawrence, D. A. et Cuzner, M. L. (2003). Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors. *Brain*, 126(7), 1590-1598. <https://doi.org/10.1093/brain/awg167>

Haelewyn, B., David, H. N., Colloc'h, N., Colomb, D. G., Risso, J.-J. et Abraini, J. H. (2011). Interactions between Nitrous Oxide and Tissue Plasminogen Activator in a Rat Model of Thromboembolic Stroke. *Anesthesiology*, 115(5), 1044-1053.

<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3182342860>

Haelewyn, B., David, H. N., Rouillon, C., Chazalviel, L., Lecocq, M., Risso, J.-J., Lemaire, M. et Abraini, J. H. (2008). Neuroprotection by nitrous oxide: Facts and evidence. *Critical Care Medicine*, 36(9), 2651-2659.

<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318183f646>

- Hajjar, K. A., Jacovina, A. T. et Chacko, J. (1994). An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(33), 21191-21197.
- Hajjar, K. A. et Reynolds, C. M. (1994). alpha-Fucose-mediated binding and degradation of tissue-type plasminogen activator by HepG2 cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 93(2), 703-710. <https://doi.org/10.1172/JCI117023>
- Hales, S., Hales, S., Innys, W., Manby, R. et Woodward, T. (1733). *Statical essays, containing haemastaticks, or, An account of some hydraulick and hydrostatical experiments made on the blood and blood vessels of animals : also an account of some experiments on stones in the kidneys and bladder : with an enquiry into the nature of those anomalous concretions : to which is added, an appendix, containing observations and experiments relating to several subjects in the first volume, the greater part of which were read at several meetings before the Royal Society : with an index to both volumes. Vol. II* (vol. v.2 (1733), p. 1-438). Printed for W. Innys and R. Manby, at the west-end of St. Paul's, and T. Woodward, at the Half-Moon between Temple-Gate, Fleetstreet. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.106596>
- Haley, P. J. (2003). Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology*, 188(1), 49-71. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00043-X)
- Henning, E. C., Latour, L. L., Hallenbeck, J. M. et Warach, S. (2008). Reperfusion-Associated Hemorrhagic Transformation in SHR Rats. *Stroke*, 39(12), 3405-3410. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.520304>
- Higashida, R. T. et Furlan, A. J. (2003). Trial Design and Reporting Standards for Intra-Arterial Cerebral Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 34(8), e109-e137. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000082721.62796.09>
- Hill, R. A., Tong, L., Yuan, P., Murikinati, S., Gupta, S. et Grutzendler, J. (2015). Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes. *Neuron*, 87(1), 95-110. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.001>
- Hingot, V. (2019). *Development of ultrasound localization microscopy to measure cerebral perfusion during stroke : a study in mouse models prior to its translation in humans* [phdthesis, Sorbonne Université]. <https://theses.hal.science/tel-03173500>

Hingot, V., Brodin, C., Lebrun, F., Heiles, B., Chagnot, A., Yetim, M., Gauberti, M., Orset, C., Tanter, M., Couture, O., Deffieux, T. et Vivien, D. (2020a). Early Ultrafast Ultrasound Imaging of Cerebral Perfusion correlates with Ischemic Stroke outcomes and responses to treatment in Mice. *Theranostics*, *10*(17), 7480-7491.

<https://doi.org/10.7150/thno.44233>

Hingot, V., Brodin, C., Lebrun, F., Heiles, B., Chagnot, A., Yetim, M., Gauberti, M., Orset, C., Tanter, M., Couture, O., Deffieux, T. et Vivien, D. (2020b). Early Ultrafast Ultrasound Imaging of Cerebral Perfusion correlates with Ischemic Stroke outcomes and responses to treatment in Mice. *Theranostics*, *10*(17), 7480-7491.

<https://doi.org/10.7150/thno.44233>

Hingot, V., Errico, C., Heiles, B., Rahal, L., Tanter, M. et Couture, O. (2019). Microvascular flow dictates the compromise between spatial resolution and acquisition time in Ultrasound Localization Microscopy. *Scientific Reports*, *9*(1), 2456.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-38349-x>

Hobohm, C., Günther, A., Grosche, J., Roßner, S., Schneider, D. et Brückner, G. (2005). Decomposition and long-lasting downregulation of extracellular matrix in perineuronal nets induced by focal cerebral ischemia in rats. *Journal of Neuroscience Research*, *80*(4), 539-548. <https://doi.org/10.1002/jnr.20459>

Hoffman, W. E., Pelligrino, D., Werner, C., Kochs, E., Albrecht, R. F. et am Esch, J. S. (1992). Ketamine Decreases Plasma Catecholamines and Improves Outcome from Incomplete Cerebral Ischemia in Rats. *Anesthesiology*, *76*(5), 755-762.

<https://doi.org/10.1097/00000542-199205000-00014>

Hong, G., Lee, J. C., Robinson, J. T., Raaz, U., Xie, L., Huang, N. F., Cooke, J. P. et Dai, H. (2012). Multifunctional in vivo vascular imaging using near-infrared II fluorescence. *Nature Medicine*, *18*(12), 1841-1846. <https://doi.org/10.1038/nm.2995>

Hopewell, S., Boutron, I., Chan, A.-W., Collins, G. S., de Beyer, J. A., Hróbjartsson, A., Nejtgaard, C. H., Østengaard, L., Schulz, K. F., Tunn, R. et Moher, D. (2022). An update to SPIRIT and CONSORT reporting guidelines to enhance transparency in randomized trials. *Nature Medicine*, *28*(9), 1740-1743. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01989-8>

- Hossmann, K.-A. (2006). Pathophysiology and Therapy of Experimental Stroke. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26(7), 1055-1081. <https://doi.org/10.1007/s10571-006-9008-1>
- Hoylaerts, M., Rijken, D. C., Lijnen, H. R. et Collen, D. (1982). Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *Journal of Biological Chemistry*, 257(6), 2912-2919. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)81051-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)81051-7)
- Hoyte, L. C., Brooks, K. J., Nagel, S., Akhtar, A., Chen, R., Mardiguian, S., McAteer, M. A., Anthony, D. C., Choudhury, R. P., Buchan, A. M. et Sibson, N. R. (2010). Molecular Magnetic Resonance Imaging of Acute Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in a Mouse Model of Cerebral Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 30(6), 1178-1187. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.287>
- Hoyte, L., Kaur, J. et Buchan, A. M. (2004). Lost in translation: taking neuroprotection from animal models to clinical trials. *Experimental Neurology*, 188(2), 200-204. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.05.008>
- Hui, C., Tadi, P., Khan Suheb, M. Z. et Patti, L. (2024). Ischemic Stroke. Dans *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499997/>
- Hummel, F. C. et Cohen, L. G. (2005). Drivers of brain plasticity. *Current Opinion in Neurology*, 18(6). https://journals.lww.com/co-neurology/fulltext/2005/12000/drivers_of_brain_plasticity.9.aspx
- Hung, S. H., Kramer, S., Werden, E., Campbell, B. C. V., & Brodtmann, A. (2022). Pre-stroke Physical Activity and Cerebral Collateral Circulation in Ischemic Stroke: A Potential Therapeutic Relationship? *Frontiers in neurology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.804187>
- Hurtado, M., Lozano, J. J., Castellanos, E., López-Fernández, L. A., Harshman, K., Martínez-A, C., Ortiz, A. R., Thomson, T. M. et Paciucci, R. (2007). Activation of the epidermal growth factor signalling pathway by tissue plasminogen activator in pancreas cancer cells. *Gut*, 56(9), 1266-1274. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.097188>

- Iadecola, C. (2017). The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*, 96(1), 17-42.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030>
- Iadecola, C. et Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature Medicine*, 17(7), 796-808. <https://doi.org/10.1038/nm.2399>
- Ichinose, A., Kisiel, W. et Fujikawa, K. (1984). Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *FEBS letters*, 175(2), 412-418.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80779-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80779-6)
- Iida, H., Ohata, H., Iida, M., Watanabe, Y. et Dohi, S. (1998). Isoflurane and Sevoflurane Induce Vasodilation of Cerebral Vessels via ATP-sensitive K⁺Channel Activation. *Anesthesiology*, 89(4), 954-960. <https://doi.org/10.1097/00000542-199810000-00020>
- Imaging the Impact of Cortical Microcirculation on Synaptic Structure and Sensory-Evoked Hemodynamic Responses In Vivo* | *PLOS Biology*. (s. d.). Récupéré le 30 septembre 2024 de
<https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0050119>
- Incidence of Silent Ischemic Infarct after Diagnostic Conventional Cerebral Angiogram. (2021). *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 31(03), 314-317.
<https://doi.org/10.29271/jcpsp.2021.03.314>
- Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum* - *PubMed*. (s. d.). Récupéré le 9 octobre 2024 de
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2254158/>
- Ito, H., Kanno, I., Kato, C., Sasaki, T., Ishii, K., Ouchi, Y., Iida, A., Okazawa, H., Hayashida, K., Tsuyuguchi, N., Ishii, K., Kuwabara, Y. et Senda, M. (2004). Database of normal human cerebral blood flow, cerebral blood volume, cerebral oxygen extraction fraction and cerebral metabolic rate of oxygen measured by positron emission tomography with ¹⁵O-labelled carbon dioxide or water, carbon monoxide and oxygen: a multicentre study in Japan. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 31(5), 635-643. <https://doi.org/10.1007/s00259-003-1430-8>
- Jacobs, M. A., Knight, R. A., Soltanian-Zadeh, H., Zheng, Z. G., Goussev, A. V., Peck, D. J., Windham, J. P. et Chopp, M. (2000). Unsupervised segmentation of multiparameter

MRI in experimental cerebral ischemia with comparison to T2, diffusion, and ADC MRI parameters and histopathological validation. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 11(4), 425-437. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2586\(200004\)11:4<425::AID-JMRI11>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2586(200004)11:4<425::AID-JMRI11>3.0.CO;2-0)

Jade, l'équipe H. (2017, 9 octobre). Nervous System - Central and Peripheral Nervous System Function. *Health Jade*. <https://healthjade.net/the-nervous-system/>

Jax, T. W., Peters, A. J., Plehn, G. et Schoebel, F.-C. (2009). Hemostatic risk factors in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes - a two year follow-up of 243 patients. *Cardiovascular Diabetology*, 8(1), 48. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-8-48>

Jayaraj, R. L., Azimullah, S., Beiram, R., Jalal, F. Y. et Rosenberg, G. A. (2019). Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 142. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1516-2>

Jennings, H. S. (Herbert S. (1906). *Behavior of the lower organisms*. New York, The Columbia university press, The Macmillan company, agents; [etc., etc.]. <http://archive.org/details/behavioroflowero00jenn>

Jeong, S.-M., Lee, H. R., Han, K., Jeon, K. H., Kim, D., Yoo, J. E., Cho, M. H., Chun, S., Lee, S. P., Nam, K.-W. et Shin, D. W. (2022). Association of Change in Alcohol Consumption With Risk of Ischemic Stroke. *Stroke*, 53(8), 2488-2496. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.037590>

Jevtović-Todorović, V., Todorović, S. M., Mennerick, S., Powell, S., Dikranian, K., Benschhoff, N., Zorumski, C. F. et Olney, J. W. (1998). Nitrous oxide (laughing gas) is an NMDA antagonist, neuroprotectant and neurotoxin. *Nature Medicine*, 4(4), 460-463. <https://doi.org/10.1038/nm0498-460>

Jia, J.-M., Chowdary, P. D., Gao, X., Ci, B., Li, W., Mulgaonkar, A., Plautz, E. J., Hassan, G., Kumar, A., Stowe, A. M., Yang, S.-H., Zhou, W., Sun, X., Cui, B. et Ge, W.-P. (2017a). Control of cerebral ischemia with magnetic nanoparticles. *Nature methods*, 14(2), 160-166. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4105>

Jia, J.-M., Chowdary, P. D., Gao, X., Ci, B., Li, W., Mulgaonkar, A., Plautz, E. J., Hassan, G., Kumar, A., Stowe, A. M., Yang, S.-H., Zhou, W., Sun, X., Cui, B. et Ge, W.-

- P. (2017b). Control of cerebral ischemia with magnetic nanoparticles. *Nature Methods*, 14(2), 160-166. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4105>
- Jiang, M., Sun, L., Feng, D.-X., Yu, Z.-Q., Gao, R., Sun, Y.-Z. et Chen, G. (2017). Neuroprotection provided by isoflurane pre-conditioning and post-conditioning. *Medical Gas Research*, 7(1), 48-55. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.202910>
- Johnston, K. C., Li, J. Y., Lyden, P. D., Hanson, S. K., Feasby, T. E., Adams, R. J., Faught, R. E. et Haley, E. C. (1998). Medical and Neurological Complications of Ischemic Stroke. *Stroke*, 29(2), 447-453. <https://doi.org/10.1161/01.STR.29.2.447>
- Jonckers, E., Van Audekerke, J., De Visscher, G., Van der Linden, A. et Verhoye, M. (2011). Functional Connectivity fMRI of the Rodent Brain: Comparison of Functional Connectivity Networks in Rat and Mouse. *PLOS ONE*, 6(4), e18876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018876>
- Jones, E. G. (1970). On the mode of entry of blood vessels into the cerebral cortex. *Journal of Anatomy*, 106(Pt 3), 507-520.
- Jones, E. G. (2000). Cortical and subcortical contributions to activity-dependent plasticity in primate somatosensory cortex. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 1-37. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.1>
- Jones, T. A. et Schallert, T. (1994a). Use-dependent growth of pyramidal neurons after neocortical damage. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(4), 2140-2152. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-04-02140.1994>
- Jones, T. et Schallert, T. (1994b). Jones TA, Schallert T Use-dependent growth of pyramidal neurons after neocortical damage. *J Neurosci* 14:2140-2152. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 14, 2140-52.
- Jung, W. B., Shim, H.-J. et Kim, S.-G. (2019). Mouse BOLD fMRI at ultrahigh field detects somatosensory networks including thalamic nuclei. *NeuroImage*, 195, 203-214. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.03.063>
- Jurcau, A. et Simion, A. (2022). Neuroinflammation in Cerebral Ischemia and Ischemia/Reperfusion Injuries: From Pathophysiology to Therapeutic Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010014>

Kaas, J. H. (2011). Neocortex in early mammals and its subsequent variations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1225(1), 28-36. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.05981.x>

Kaneko, M., Mimuro, J., Matsuda, M. et Sakata, Y. (1991). The plasminogen activator inhibitor-1 binding site in the kringle-2 domain of tissue-type plasminogen activator. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 178(3), 1160-1166. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)91014-4](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)91014-4)

Kang, Y.-R., Kim, J.-T., Lee, J. S., Kim, B. J., Kang, K., Lee, S. J., Kim, J. G., Cha, J.-K., Kim, D.-H., Park, T. H., Lee, K. B., Lee, J., Hong, K.-S., Cho, Y.-J., Park, H.-K., Lee, B.-C., Yu, K.-H., Oh, M. S., Kim, D.-E., ... Bae, H.-J. (2022). Differential influences of LDL cholesterol on functional outcomes after intravenous thrombolysis according to prestroke statin use. *Scientific Reports*, 12(1), 15478. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19852-8>

Káradóttir, R., Cavelier, P., Bergersen, L. H. et Attwell, D. (2005). NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature*, 438(7071), 1162-1166. <https://doi.org/10.1038/nature04302>

Karatas, H., Erdener, S. E., Gursoy-Ozdemir, Y., Gurer, G., Soylemezoglu, F., Dunn, A. K. et Dalkara, T. (2011). Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl₃ application: A novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis studies. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(6), 1452-1460. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.8>

Kawai, Y., Aoki, I., Umeda, M., Higuchi, T., Kershaw, J., Higuchi, M., Silva, A. C. et Tanaka, C. (2010). In vivo visualization of reactive gliosis using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *NeuroImage*, 49(4), 3122-3131. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.11.005>

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. et Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>

Kety, S. S. (1950). Circulation and metabolism of the human brain in health and disease. *The American Journal of Medicine*, 8(2), 205-217. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(50\)90363-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(50)90363-9)

Keun-Sik Hong. (2017, 19 mai). Blood Pressure Management for Stroke Prevention and in Acute Stroke. *Journal of Stroke*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5466289/>

Kido, Y., Nanchi, I., Fusamae, Y., Matsuzaki, T., Akazawa, T., Sawada, H., Iwasaki, M., Nishida, K., Tsuchiya, E. et Okuda, T. (2022). Species difference in brain penetration of P-gp and BCRP substrates among monkey, dog and mouse. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 42, 100426. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2021.100426>

Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M. et Altman, D. G. (2010). Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *British Journal of Pharmacology*, 160(7), 1577-1579. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x>

Kim, E. J., Kim, S. Y., Lee, J. H., Kim, J. M., Kim, J.-S., Byun, J. I. et Koo, B.-N. (2015). Effect of isoflurane post-treatment on tPA-exaggerated brain injury in a rat ischemic stroke model. *Korean Journal of Anesthesiology*, 68(3), 281-286.

<https://doi.org/10.4097/kjae.2015.68.3.281>

Kim, E. Y., Heo, J. H., Lee, S.-K., Kim, D. J., Suh, S.-H., Kim, J. et Kim, D. I. (2006). Prediction of thrombolytic efficacy in acute ischemic stroke using thin-section noncontrast CT. *Neurology*, 67(10), 1846-1848.

<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000244492.99737.a8>

Kim, H., Kim, J.-T., Lee, J. S., Kim, B. J., Kang, J., Lee, K.-J., Park, J.-M., Kang, K., Lee, S. J., Kim, J. G., Cha, J.-K., Kim, D.-H., Park, T. H., Lee, K. B., Lee, J., Hong, K.-S., Cho, Y.-J., Park, H.-K., Lee, B.-C., ... Bae, H.-J. (2022). Stroke of Other Determined Etiology: Results From the Nationwide Multicenter Stroke Registry. *Stroke*, 53(8), 2597-2606. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.037582>

Kim, H.-K., Lee, S. Y., Oh, H.-K., Kang, B.-H., Ku, H.-J., Lee, Y., Shin, J.-Y., Hong, Y.-K. et Joe, Y. A. (2003). Inhibition of endothelial cell proliferation by the recombinant kringle domain of tissue-type plasminogen activator. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(4), 740-746. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00656-9](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00656-9)

Kim, S. Y., Cheon, S. Y., Kim, E. J., Lee, J. H., Kam, E. H., Kim, J. M., Park, M. et Koo, B.-N. (2017). Isoflurane Postconditioning Inhibits tPA-Induced Matrix Metalloproteinases Activation After Hypoxic Injury via Low-Density Lipoprotein

- Receptor-Related Protein and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. *Neurochemical Research*, 42(5), 1533-1542. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2211-2>
- Kimbrow, J. R., Kelly, P. J., Drummond, J. C., Cole, D. J. et Patel, P. M. (2000). Isoflurane and pentobarbital reduce AMPA toxicity in vivo in the rat cerebral cortex. *Anesthesiology*, 92(3), 806-812. <https://doi.org/10.1097/00000542-200003000-00024>
- King, J. A., Garelick, T. S., Brevard, M. E., Chen, W., Messenger, T. L., Duong, T. Q. et Ferris, C. F. (2005). Procedure for minimizing stress for fMRI studies in conscious rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 148(2), 154-160. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.04.011>
- Kitaoka, Y., Kitaoka, Y., Kumai, T., Lam, T. T., Kuribayashi, K., Isenoumi, K., Munemasa, Y., Motoki, M., Kobayashi, S. et Ueno, S. (2004). Involvement of RhoA and possible neuroprotective effect of fasudil, a Rho kinase inhibitor, in NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *Brain Research*, 1018(1), 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.070>
- Kläsner, B., Mamrak, U., Huisman, M., Plesnila, N., Schwaiger, M. et Drzezga, A. (2007). Small animal 18F-FDG PET in vivo imaging of the penumbra in mice. *Journal of Nuclear Medicine*, 48(supplement 2), 248P. http://jnm.snmjournals.org/content/48/supplement_2/248P.1.abstract
- Kluft, C., Sidelmann, J. J. et Gram, J. B. (2016). Assessing Safety of Thrombolytic Therapy. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 43, 300-310. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584130>
- Kohrs, R. et Durieux, M. E. (1998). Ketamine: Teaching an Old Drug New Tricks. *Anesthesia & Analgesia*, 87(5). https://journals.lww.com/anesthesia-analgesia/fulltext/1998/11000/ketamine__teaching_an_old_drug_new_tricks.39.aspx
- Kolinko, Y., Krakorova, K., Cendelin, J., Tonar, Z. et Kralickova, M. (2015). Microcirculation of the brain: morphological assessment in degenerative diseases and restoration processes. *Reviews in the Neurosciences*, 26(1), 75-93. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0049>
- Krafft, P. R., Bailey, E. L., Lekic, T., Rolland, W. B., Altay, O., Tang, J., Wardlaw, J. M., Zhang, J. H. et Sudlow, C. L. M. (2012). Etiology of Stroke and Choice of Models.

International Journal of Stroke, 7(5), 398-406. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2012.00838.x>

Krebs, C., Fernandes, H. B., Sheldon, C., Raymond, L. A. et Baimbridge, K. G. (2003). Functional NMDA Receptor Subtype 2B Is Expressed in Astrocytes after Ischemia *In Vivo* and Anoxia *In Vitro*. *The Journal of Neuroscience*, 23(8), 3364. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-08-03364.2003>

Krubitzer, L. (2007). The Magnificent Compromise: Cortical Field Evolution in Mammals. *Neuron*, 56(2), 201-208. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.002>

KRUEGER, K. et BUSCH, E. (2002). Protocol of a Thromboembolic Stroke Model in the Rat: Review of the Experimental Procedure and Comparison of Models. *Investigative Radiology*, 37(11). https://journals.lww.com/investigativeradiology/fulltext/2002/11000/protocol_of_a_thromboembolic_stroke_model_in_the.3.aspx

Kuiper, J., Van't Hof, A., Otter, M., Biessen, E. A., Rijken, D. C. et van Berkel, T. J. (1996). Interaction of mutants of tissue-type plasminogen activator with liver cells: effect of domain deletions. *The Biochemical Journal*, 313 (Pt 3)(Pt 3), 775-780. <https://doi.org/10.1042/bj3130775>

Kulle, A., Thanabalasuriar, A., Cohen, T. S. et Szydlowska, M. (2022). Resident macrophages of the lung and liver: The guardians of our tissues. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1029085>

Kwan, J. J., Kaya, M., Borden, M. A. et Dayton, P. A. (2012). Theranostic Oxygen Delivery Using Ultrasound and Microbubbles. *Theranostics*, 2(12), 1174-1184. <https://doi.org/10.7150/thno.4410>

L, B., I, B., D, L., R, V., M, J.-P., F, C. et D, L. (2009). Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. *Biochimica et biophysica acta*, 1790(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.10.008>

L, Y., A, A., H, S., P, D., E, F., S, W., Eh, B. et Mj, L. (2004). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5676). <https://doi.org/10.1126/science.1096645>

- LaRovere, K. L. (2015). Transcranial Doppler ultrasound in children with stroke and cerebrovascular disorders. *Current Opinion in Pediatrics*, 27(6).
https://journals.lww.com/co-pediatrics/fulltext/2015/12000/transcranial_doppler_ultrasound_in_children_with.11.aspx
- Lassen, N. A. et Ingvar, D. H. (1961). The blood flow of the cerebral cortex determined by radioactive krypton85. *Experientia*, 17(1), 42-43. <https://doi.org/10.1007/BF02157946>
- Le, T. T., Im, G. H., Lee, C. H., Choi, S. H. et Kim, S.-G. (s. d.). Mapping cerebral perfusion in mice under various anesthesia levels using highly sensitive BOLD MRI with transient hypoxia. *Science Advances*, 10(9), eadm7605.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.adm7605>
- Lebrun, F., Levard, D., Lemarchand, E., Yetim, M., Furon, J., Potzaha, F., Marie, P., Lesept, F., Blanc, M., Haelewyn, B., Rubio, M., Letourneur, A., Violle, N., Orset, C. et Vivien, D. (2024). Improving stroke outcomes in hyperglycemic mice by modulating tPA/NMDAR signaling to reduce inflammation and hemorrhages. *Blood Advances*, 8(5), 1330-1344. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2023011744>
- Lee, M.-H., Im, S.-H., Jo, K. W. et Yoo, D.-S. (2023). Recanalization Rate and Clinical Outcomes of Intravenous Tissue Plasminogen Activator Administration for Large Vessel Occlusion Stroke Patients. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 66(2), 144-154.
<https://doi.org/10.3340/jkns.2022.0120>
- Leonetti, C., Macrez, R., Pruvost, M., Hommet, Y., Bronsard, J., Fournier, A., Perrigault, M., Machin, I., Vivien, D., Clemente, D., De Castro, F., Maubert, E. et Docagne, F. (2017). Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0160-5>
- Leung, K. (2004). 99mTc-Fucoidan, a polysaccharidic ligand of P-selectin. Dans *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. National Center for Biotechnology Information (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91523/>
- Levin, E. G. et Loskutoff, D. J. (1982). Cultured bovine endothelial cells produce both urokinase and tissue-type plasminogen activators. *Journal of Cell Biology*, 94(3), 631-636. <https://doi.org/10.1083/jcb.94.3.631>

- Levin, M. F., Kleim, J. A. et Wolf, S. L. (2009b). What do motor « recovery » and « compensation » mean in patients following stroke? *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 23(4), 313-319. <https://doi.org/10.1177/1545968308328727>
- Levin, M. F., Kleim, J. A. et Wolf, S. L. (2009a). What Do Motor “Recovery” and “Compensation” Mean in Patients Following Stroke? *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 23(4), 313-319. <https://doi.org/10.1177/1545968308328727>
- Levin, M. F., Michaelsen, S. M., Cirstea, C. M. et Roby-Brami, A. (2002). Use of the trunk for reaching targets placed within and beyond the reach in adult hemiparesis. *Experimental Brain Research*, 143(2), 171-180. <https://doi.org/10.1007/s00221-001-0976-6>
- Lewandowski, S. A., Fredriksson, L., Lawrence, D. A. et Eriksson, U. (2016). Pharmacological targeting of the PDGF-CC signaling pathway for blood–brain barrier restoration in neurological disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 167, 108-119. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.07.016>
- Li, C.-X., Patel, S., Auerbach, E. J. et Zhang, X. (2013a). Dose-dependent effect of isoflurane on regional cerebral blood flow in anesthetized macaque monkeys. *Neuroscience Letters*, 541, 58-62. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.02.007>
- Li, F., Zhu, L., Zhang, J., He, H., Qin, Y., Cheng, Y. et Xie, Z. (2019). Oral Contraceptive Use and Increased Risk of Stroke: A Dose–Response Meta-Analysis of Observational Studies. *Frontiers in Neurology*, 10. <https://www.frontiersin.org/journals/neurology/articles/10.3389/fneur.2019.00993>
- Li, Y. et Yang, G.-Y. (2017). Pathophysiology of Ischemic Stroke. Dans P. A. Lapchak et G.-Y. Yang (dir.), *Translational Research in Stroke* (p. 51-75). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5804-2_4
- Li, Y., Zhu, S., Yuan, L., Lu, H., Li, H. et Tong, S. (2013b). Predicting the ischemic infarct volume at the first minute after occlusion in rodent stroke model by laser speckle imaging of cerebral blood flow. *Journal of Biomedical Optics*, 18(7). <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.7.076024>

- Liebner, S., Dijkhuizen, R. M., Reiss, Y., Plate, K. H., Agalliu, D. et Constantin, G. (2018). Functional morphology of the blood–brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 135(3), 311-336. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1815-1>
- Lijnen, H. R. (2017). Plasmin and Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling. *Thrombosis and Haemostasis*, 86, 324-333. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1616230>
- Lindsay, P., Furie, K. L., Davis, S. M., Donnan, G. A. et Norrving, B. (2014). World Stroke Organization Global Stroke Services Guidelines and Action Plan. *International Journal of Stroke*, 9(SA100), 4-13. <https://doi.org/10.1111/ijss.12371>
- Liu, X., Eickhoff, S. B., Caspers, S., Wu, J., Genon, S., Hoffstaedter, F., Mars, R. B., Sommer, I. E., Eickhoff, C. R., Chen, J., Jardri, R., Reetz, K., Dogan, I., Aleman, A., Kogler, L., Gruber, O., Caspers, J., Mathys, C. et Patil, K. R. (2021). Functional parcellation of human and macaque striatum reveals human-specific connectivity in the dorsal caudate. *NeuroImage*, 235, 118006. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2021.118006>
- Lochner, J. E., Honigman, L. S., Grant, W. F., Gessford, S. K., Hansen, A. B., Silverman, M. A. et Scalettar, B. A. (2006). Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *Journal of Neurobiology*, 66(6), 564-577. <https://doi.org/10.1002/neu.20250>
- Lopez-Atalaya, J. P., Roussel, B. D., Levrat, D., Parcq, J., Nicole, O., Hommet, Y., Benchenane, K., Castel, H., Leprince, J., To Van, D., Bureau, R., Rault, S., Vaudry, H., Petersen, K.-U., Santos, J. S. O., Ali, C. et Vivien, D. (2008a). Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(6), 1212-1221. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.14>
- Lopez-Atalaya, J. P., Roussel, B. D., Levrat, D., Parcq, J., Nicole, O., Hommet, Y., Benchenane, K., Castel, H., Leprince, J., To Van, D., Bureau, R., Rault, S., Vaudry, H., Petersen, K.-U., Santos, J. S. O., Ali, C. et Vivien, D. (2008b). Toward Safer Thrombolytic Agents in Stroke: Molecular Requirements for NMDA Receptor-Mediated Neurotoxicity. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 28(6), 1212-1221. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.14>

Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., Lambolez, B., Cauli, B., Mothet, J.-P., Vivien, D. et Maubert, E. (2016). Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Molecular Neurobiology*, 53(7), 5000-5012.

<https://doi.org/10.1007/s12035-015-9432-7>

Louveau, A., Herz, J., Alme, M. N., Salvador, A. F., Dong, M. Q., Viar, K. E., Herod, G., Knopp, J., Setliff, J., Lupi, A. L., Mesquita, S. D., Frost, E. L., Gaultier, A., Harris, T. H., Cao, R., Hu, S., Lukens, J. R., Smirnov, I., Overall, C. C., ... Kipnis, J. (2018). CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature. *Nature neuroscience*, 21(10), 1380-1391. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0227-9>

Lu, C.-Y., Li-Sheng Chen, S. et Pan, S.-L. (2024). Physical activity and the risk of ischemic stroke: A population-based longitudinal follow-up study in Taiwan (KCIS no. 43). *Journal of Clinical Neuroscience*, 121, 18-22.

<https://doi.org/10.1016/j.jocn.2024.01.028>

Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M. et Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), a005058. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058>

Ma, H., Campbell, B. C. V., Parsons, M. W., Churilov, L., Levi, C. R., Hsu, C., Kleinig, T. J., Wijeratne, T., Curtze, S., Dewey, H. M., Miteff, F., Tsai, C.-H., Lee, J.-T., Phan, T. G., Mahant, N., Sun, M.-C., Krause, M., Sturm, J., Grimley, R., ... Donnan, G. A. (2019). Thrombolysis Guided by Perfusion Imaging up to 9 Hours after Onset of Stroke. *New England Journal of Medicine*, world. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1813046>

Ma, H., Jiang, Z., Xu, J., Liu, J. et Guo, Z.-N. (2021). Targeted nano-delivery strategies for facilitating thrombolysis treatment in ischemic stroke. *Drug Delivery*, 28(1), 357.

<https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1879315>

Macé, E., Montaldo, G., Cohen, I., Baulac, M., Fink, M. et Tanter, M. (2011). Functional ultrasound imaging of the brain. *Nature Methods*, 8(8), 662-664.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.1641>

MACFARLANE, R. G. et PILLING, J. (1947). Fibrinolytic Activity of Normal Urine. *Nature*, 159(4049), 779-779. <https://doi.org/10.1038/159779a0>

- Macrae, I. M. (2011). Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia. *British Journal of Pharmacology*, *164*(4), 1062-1078. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01398.x>
- Madoiwa, S., Komatsu, N., Mimuro, J., Kimura, K., Matsuda, M. et Sakata, Y. (1999). Developmental expression of plasminogen activator inhibitor-1 associated with thrombopoietin-dependent megakaryocytic differentiation. *Blood*, *94*(2), 475-482.
- Maeda, K., Mies, G., Oláh, L. et Hossmann, K.-A. (2000). Quantitative Measurement of Local Cerebral Blood Flow in the Anesthetized Mouse Using Intraperitoneal [14C]Iodoantipyrine Injection and Final Arterial Heart Blood Sampling. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *20*(1), 10-14. <https://doi.org/10.1097/00004647-200001000-00003>
- Mandino, F., Vrooman, R. M., Foo, H. E., Yeow, L. Y., Bolton, T. A. W., Salvan, P., Teoh, C. L., Lee, C. Y., Beauchamp, A., Luo, S., Bi, R., Zhang, J., Lim, G. H. T., Low, N., Sallet, J., Gigg, J., Lerch, J. P., Mars, R. B., Olivo, M., ... Grandjean, J. (2022). A triple-network organization for the mouse brain. *Molecular Psychiatry*, *27*(2), 865-872. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01298-5>
- Mangiardi, M., Bonura, A., Iaccarino, G., Alessiani, M., Bravi, M. C., Crupi, D., Pezzella, F. R., Fabiano, S., Pampana, E., Stilo, F., Alfano, G. et Anticoli, S. (2023). The Pathophysiology of Collateral Circulation in Acute Ischemic Stroke. *Diagnostics*, *13*(14). <https://doi.org/10.3390/diagnostics13142425>
- Manwani, B., Liu, F., Xu, Y., Persky, R., Li, J. et McCullough, L. D. (2011). Functional recovery in aging mice after experimental stroke. *Brain, behavior, and immunity*, *25*(8), 1689-1700. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.06.015>
- Marilyn J. Cipolla. (2009). *The Cerebral Circulation* (Morgan&Claypool Publishers). <https://access.portico.org/Portico/auView?auId=ark:%2F27927%2Fpgg3gvb7b84>
- Markicevic, M., Savvateev, I., Grimm, C. et Zerbi, V. (2021). Emerging imaging methods to study whole-brain function in rodent models. *Translational Psychiatry*, *11*(1), 457. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01575-5>

- Marks, K., Ahn, S.-J., Rai, N., Anfray, A., Iadecola, C. et Anrather, J. (2024, 18 juin). *A minimally invasive thrombotic stroke model to study circadian rhythm in awake mice*, 2024.06.10.598243. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2024.06.10.598243>
- Martín, A., Ramos-Cabrer, P. et Planas, A. M. (2016). Noninvasive Brain Imaging in Small Animal Stroke Models: MRI, PET, and SPECT. Dans U. Dirnagl (dir.), *Rodent Models of Stroke* (p. 147-186). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-5620-3_11
- Matys, T., Pawlak, R., Matys, E., Pavlides, C., McEwen, B. S. et Strickland, S. (2004). Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(46), 16345-16350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407355101>
- Mayor, S. (2002). Mouse genome shows many disease genes shared with humans. *BMJ : British Medical Journal*, 325(7376), 1319. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1124795/>
- Mazighi, M., Serfaty, J.-M., Labreuche, J., Laissy, J.-P., Meseguer, E., Lavallée, P. C., Cabrejo, L., Slaoui, T., Guidoux, C., Lapergue, B., Klein, I. F., Olivot, J.-M., Raphaeli, G., Gohin, C., Claeys, E. S. et Amarenco, P. (2009). Comparison of intravenous alteplase with a combined intravenous–endovascular approach in patients with stroke and confirmed arterial occlusion (RECANALISE study): a prospective cohort study. *The Lancet Neurology*, 8(9), 802-809. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70182-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70182-6)
- McAteer, M. A., Sibson, N. R., von zur Muhlen, C., Schneider, J. E., Lowe, A. S., Warrick, N., Channon, K. M., Anthony, D. C. et Choudhury, R. P. (2007). In vivo magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide. *Nature Medicine*, 13(10), 1253-1258. <https://doi.org/10.1038/nm1631>
- McColl, B. W., Carswell, H. V., McCulloch, J. et Horsburgh, K. (2004). Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice. *Brain Research*, 997(1), 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.10.028>
- Medical neuroscience*. (2004). Philadelphia : Saunders. http://archive.org/details/medicalneuroscie0000unse_j7h3

Meghana Gore; Kamna Bansal; Mahammed Z. Khan Suheb; Forshing Lui; Ria Monica D. Asuncion. (2024). *Lacunar Stroke* (StatPearls).

Mehra, A., Ali, C., Parcq, J., Vivien, D. et Docagne, F. (2016). The plasminogen activation system in neuroinflammation. *NEUROINFLAMMATION: A common denominator for stroke, multiple sclerosis and Alzheimer's disease*, 1862(3), 395-402. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.011>

Mehra, A., Guérit, S., Macrez, R., Gosselet, F., Sevin, E., Lebas, H., Maubert, E., Vries, H. E. D., Bardou, I., Vivien, D. et Docagne, F. (2020). Nonionotropic Action of Endothelial NMDA Receptors on Blood–Brain Barrier Permeability via Rho/ROCK-Mediated Phosphorylation of Myosin. *Journal of Neuroscience*, 40(8), 1778-1787. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0969-19.2019>

Meng, X., Fisher, M., Shen, Q., Sotak, C. H. et Duong, T. Q. (2004). Characterizing the diffusion/perfusion mismatch in experimental focal cerebral ischemia. *Annals of Neurology*, 55(2), 207-212. <https://doi.org/10.1002/ana.10803>

Menozi, L., Yang, W., Feng, W. et Yao, J. (2022). Sound out the impaired perfusion: Photoacoustic imaging in preclinical ischemic stroke. *Frontiers in Neuroscience*, 16. <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2022.1055552>

Merzenich, M. M., Kaas, J. H., Wall, J., Nelson, R. J., Sur, M. et Felleman, D. (1983). Topographic reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 in adult monkeys following restricted deafferentation. *Neuroscience*, 8(1), 33-55. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90024-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90024-6)

Miao, P., Tong, S., Lu, H., Liu, Q. et Li, Y. (2011). Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow in freely moving animals. *Journal of Biomedical Optics*, 16(9), 090502. <https://doi.org/10.1117/1.3625231>

Mikulik, R., Bar, M., Cernik, D., Herzig, R., Jura, R., Jurak, L., Neumann, J., Sanak, D., Ostry, S., Sevcik, P., Skoda, O., Skoloudik, D., Vaclavik, D. et Tomek, A. (2021). Stroke 20 20: Implementation goals for intravenous thrombolysis. *European Stroke Journal*, 6(2), 151-159. <https://doi.org/10.1177/23969873211007684>

- Miranda, E. et Lomas, D. A. (2006). Neuroserpin: a serpin to think about. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(6), 709-722. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5077-4>
- MM. Brown-Séguard, Charcot, Vulpian. (1893). *Archives de physiologie normale et pathologique* (Masson (Paris)). <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k432764t>
- Mohammed Yousufuddincorresponding author1 and Nathan Young2. (2019, 1^{er} mai). Aging and ischemic stroke. *Aging*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6535078/>
- Monfils, M.-H., Plautz, E. J. et Kleim, J. A. (2005). In search of the motor engram: motor map plasticity as a mechanism for encoding motor experience. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 11(5), 471-483. <https://doi.org/10.1177/1073858405278015>
- Monie, D. D. et DeLoughery, E. P. (2017). Pathogenesis of thrombosis: cellular and pharmacogenetic contributions. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy; Vol 7, Supplement 3 (December 21, 2017): Cardiovascular Diagnosis and Therapy (Thrombosis)*. <https://cdt.amegroups.org/article/view/17035>
- Mori, H. et Mishina, M. (1995). Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*, 34(10), 1219-1237. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(95\)00109-J](https://doi.org/10.1016/0028-3908(95)00109-J)
- Mosconi, M. G. et Paciaroni, M. (2022). Treatments in Ischemic Stroke: Current and Future. *European Neurology*, 85(5), 349-366. <https://doi.org/10.1159/000525822>
- Moseley, M. E., Cohen, Y., Mintorovitch, J., Chileuitt, L., Shimizu, H., Kucharczyk, J., Wendland, M. F. et Weinstein, P. R. (1990). Early detection of regional cerebral ischemia in cats: Comparison of diffusion- and T2-weighted MRI and spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, 14(2), 330-346. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910140218>
- Mosenzon, O., Cheng, A. Y., Rabinstein, A. A. et Sacco, S. (2023). Diabetes and Stroke: What Are the Connections? *Journal of Stroke*, 25(1), 26-38. <https://doi.org/10.5853/jos.2022.02306>
- Mosneag, I.-E., Flaherty, S. M., Wykes, R. C. et Allan, S. M. (2024a). Stroke and Translational Research – Review of Experimental Models with a Focus on Awake

Ischaemic Induction and Anaesthesia. *ISCHEMIC STROKE: from fibrinolysis to functional recovery*, 550, 89-101. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.11.034>

Mosneag, I.-E., Flaherty, S. M., Wykes, R. C. et Allan, S. M. (2024b). Stroke and Translational Research – Review of Experimental Models with a Focus on Awake Ischaemic Induction and Anaesthesia. *ISCHEMIC STROKE: from fibrinolysis to functional recovery*, 550, 89-101. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.11.034>

Mujanovic, A., Ng, F., Meinel, T. R., Dobrocky, T., Piechowiak, E. I., Kurmann, C. C., Seiffge, D. J., Wegener, S., Wiest, R., Meyer, L., Fiehler, J., Olivot, J. M., Ribo, M., Nguyen, T. N., Gralla, J., Campbell, B. C., Fischer, U. et Kaesmacher, J. (2024). No-reflow phenomenon in stroke patients: A systematic literature review and meta-analysis of clinical data. *International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society*, 19(1), 58-67. <https://doi.org/10.1177/17474930231180434>

Mulder, M. J. H. L., Jansen, I. G. H., Goldhoorn, R.-J. B., Venema, E., Chalos, V., Compagne, K. C. J., Roozenbeek, B., Lingsma, H. F., Schonewille, W. J., van den Wijngaard, I. R., Boiten, J., Albert Vos, J., Roos, Y. B. W. EM., van Oostenbrugge, R. J., van Zwam, W. H., Majoie, C. B. L. M., van der Lugt, A., Dippel, D. W. J. et for the MR CLEAN Registry Investigators. (2018). Time to Endovascular Treatment and Outcome in Acute Ischemic Stroke. *Circulation*, 138(3), 232-240. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032600>

Murphy, T. H. et Corbett, D. (2009). Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(12), 861-872. <https://doi.org/10.1038/nrn2735>

Murphy, T. H., Li, P., Betts, K. et Liu, R. (2008). Two-Photon Imaging of Stroke Onset *In Vivo* Reveals That NMDA-Receptor Independent Ischemic Depolarization Is the Major Cause of Rapid Reversible Damage to Dendrites and Spines. *The Journal of Neuroscience*, 28(7), 1756. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5128-07.2008>

Nacu, A., Kvistad, C. E., Logallo, N., Naess, H., Waje-Andreassen, U., Aamodt, A. H., Solhoff, R., Lund, C., Tobro, H., Rønning, O. M., Salvesen, R., Idicula, T. T. et Thomassen, L. (2015). A pragmatic approach to sonothrombolysis in acute ischaemic stroke: the Norwegian randomised controlled sonothrombolysis in acute stroke study (NOR-SASS). *BMC Neurology*, 15, 110. <https://doi.org/10.1186/s12883-015-0359-4>

- Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R. O. L. et Parnavelas, J. G. (2003). Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex: Observations Based on Real-time Imaging. *Cerebral Cortex*, 13(6), 607-611. <https://doi.org/10.1093/cercor/13.6.607>
- Nagai, N., De Mol, M., Lijnen, H. R., Carmeliet, P. et Collen, D. (1999). Role of Plasminogen System Components in Focal Cerebral Ischemic Infarction. *Circulation*, 99(18), 2440-2444. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.18.2440>
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine*, 333(24), 1581-1587. <https://doi.org/10.1056/NEJM199512143332401>
- Neag, M.-A., Mitre, A.-O., Catinean, A. et Mitre, C.-I. (2020). An Overview on the Mechanisms of Neuroprotection and Neurotoxicity of Isoflurane and Sevoflurane in Experimental Studies. *Brain Research Bulletin*, 165, 281-289. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.10.011>
- Neumann-Haefelin, T., Kastrup, A., de Crespigny, A., Ringer, T. M., Sun, G. H., Yenari, M. A. et Moseley, M. E. (2001). MRI of subacute hemorrhagic transformation in the rat suture occlusion model. *NeuroReport*, 12(2). https://journals.lww.com/neuroreport/fulltext/2001/02120/mri_of_subacute_hemorrhagic_transformation_in_the.25.aspx
- Neurotoxic responses by microglia elicited by excitotoxic injury in the mouse hippocampus. (1998). *Current Biology*, 8(1), 19-25. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70016-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70016-8)
- New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. (2009). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(1), 4-13. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03220.x>
- Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margaille, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E. T., Vivien, D. et Buisson, A. (2001). The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nature Medicine*, 7(1), 59-64. <https://doi.org/10.1038/83358>

- Nicotera, P. et Lipton, S. A. (1999). Excitotoxins in Neuronal Apoptosis and Necrosis. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 19(6), 583-591. <https://doi.org/10.1097/00004647-199906000-00001>
- Nogles, T. E. et Galuska, M. A. (2024). Middle Cerebral Artery Stroke. Dans *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556132/>
- Nogueira, R. C., Beishon, L., Bor-Seng-Shu, E., Panerai, R. B. et Robinson, T. G. (2021). Cerebral Autoregulation in Ischemic Stroke: From Pathophysiology to Clinical Concepts. *Brain Sciences*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/brainsci11040511>
- Nordt, T. K., Moser, M., Kohler, B., Ruef, J., Peter, K., Kübler, W. et Bode, C. (2017). Augmented Platelet Aggregation as Predictor of Reocclusion after Thrombolysis in Acute Myocardial Infarction. *Thrombosis and Haemostasis*, 80, 881-886. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1615382>
- Nudo, R. J., Wise, B. M., SiFuentes, F. et Milliken, G. W. (1996). Neural Substrates for the Effects of Rehabilitative Training on Motor Recovery After Ischemic Infarct. *Science*, 272(5269), 1791-1794. <https://doi.org/10.1126/science.272.5269.1791>
- O'Collins, V. E., Macleod, M. R., Donnan, G. A., Horky, L. L., van der Worp, B. H. et Howells, D. W. (2006). 1,026 Experimental treatments in acute stroke. *Annals of Neurology*, 59(3), 467-477. <https://doi.org/10.1002/ana.20741>
- O'Donnell, L. J. et Westin, C.-F. (2011). An Introduction to Diffusion Tensor Image Analysis. *Functional Imaging*, 22(2), 185-196. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2010.12.004>
- O'Donnell, M. E. (2014). Chapter Four - Blood-Brain Barrier Na Transporters in Ischemic Stroke. Dans T. P. Davis (dir.), *Advances in Pharmacology* (vol. 71, p. 113-146). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.06.011>
- O'Donnell, M. J., Chin, S. L., Rangarajan, S., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., Rao-Melacini, P., Zhang, X., Pais, P., Agapay, S., Lopez-Jaramillo, P., Damasceno, A., Langhorne, P., McQueen, M. J., Rosengren, A., Dehghan, M., Hankey, G. J., Dans, A. L., Elsayed, A., ... INTERSTROKE investigators. (2016). Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *Lancet (London, England)*, 388(10046), 761-775. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30506-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30506-2)

Ogawa, S., Lee, T. M., Kay, A. R. et Tank, D. W. (1990). Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(24), 9868-9872. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.24.9868>

Olufemi, O. V. (s. d.). *Subacute posterior cerebral artery infarct | Radiology Case | Radiopaedia.org*. Radiopaedia. Récupéré le 25 septembre 2024 de <https://radiopaedia.org/cases/subacute-posterior-cerebral-artery-infarct?lang=us>

Orset, C., Haelewyn, B., Allan, S. M., Ansar, S., Campos, F., Cho, T. H., Durand, A., El Amki, M., Fatar, M., Garcia-Yébenes, I., Gauberti, M., Grudzenski, S., Lizasoain, I., Lo, E., Macrez, R., Margaille, I., Maysami, S., Meairs, S., Nighoghossian, N., ... Vivien, D. (2016). Efficacy of Alteplase in a Mouse Model of Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 47(5), 1312-1318. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.012238>

Osmanski, B.-F., Pezet, S., Ricobaraza, A., Lenkei, Z. et Tanter, M. (2014). Functional ultrasound imaging of intrinsic connectivity in the living rat brain with high spatiotemporal resolution. *Nature Communications*, 5(1), 5023. <https://doi.org/10.1038/ncomms6023>

P, R., A, B., S, K., L, E., H, C., S, L., J, L., S, S. et P, L. (2024). Differential Vulnerability and Response to Injury among Brain Cell Types Comprising the Neurovascular Unit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 44(22). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1093-22.2024>

Paasonen, J., Stenroos, P., Salo, R. A., Kiviniemi, V. et Gröhn, O. (2018). Functional connectivity under six anesthesia protocols and the awake condition in rat brain. *NeuroImage*, 172, 9-20. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.01.014>

Pacheco-Barrios, K., Giannoni-Luza, S., Navarro-Flores, A., Rebello-Sanchez, I., Parente, J., Balbuena, A., Melo, P. S. de, Otiniano-Sifuentes, R., Rivera-Torrejón, O., Abanto, C., Alva-Diaz, C., Musolino, P. L. et Fregni, F. (2022). Burden of Stroke and Population-Attributable Fractions of Risk Factors in Latin America and the Caribbean. *Journal of the American Heart Association*, world. <https://doi.org/10.1161/JAHA.122.027044>

Paciaroni, M., Balucani, C., Agnelli, G., Caso, V., Silvestrelli, G., Grotta, J. C., Demchuk, A. M., Sohn, S.-I., Orlandi, G., Leys, D., Pezzini, A., Alexandrov, A. V., Silvestrini, M., Fofi, L., Barlinn, K., Inzitari, D., Ferrarese, C., Tassi, R., Tsivgoulis, G.,

- ... Toni, D. (2012). Systemic thrombolysis in patients with acute ischemic stroke and Internal Carotid ARtery Occlusion: the ICARO study. *Stroke*, 43(1), 125-130. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.630624>
- Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *European Journal of Neuroscience*, 33(8), 1351-1365. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07628.x>
- Parcq, J., Bertrand, T., Montagne, A., Baron, A. F., Macrez, R., Billard, J. M., Briens, A., Hommet, Y., Wu, J., Yepes, M., Lijnen, H. R., Dutar, P., Anglés-Cano, E. et Vivien, D. (2012). Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death and Differentiation*, 19(12), 1983-1991. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.86>
- Parpura, V., Basarsky, T. A., Liu, F., Jęftinija, K., Jęftinija, S. et Haydon, P. G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte–neuron signalling. *Nature*, 369(6483), 744-747. <https://doi.org/10.1038/369744a0>
- Parry, T. J. et McElligott, J. G. (1993). A method for restraining awake rats using head immobilization. *Physiology & Behavior*, 53(5), 1011-1015. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(93\)90283-L](https://doi.org/10.1016/0031-9384(93)90283-L)
- Pawlak, R., Magarinos, A. M., Melchor, J., McEwen, B. et Strickland, S. (2003a). Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nature Neuroscience*, 6(2), 168-174. <https://doi.org/10.1038/nn998>
- Pawlak, R., Magarinos, A. M., Melchor, J., McEwen, B. et Strickland, S. (2003b). Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nature Neuroscience*, 6(2), 168-174. <https://doi.org/10.1038/nn998>
- Pawlak, R., Nagai, N., Urano, T., Napiorkowska-Pawlak, D., Ihara, H., Takada, Y., Collen, D. et Takada, A. (2002). Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience*, 113(4), 995-1001. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00166-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00166-5)
- Pawluk, H., Kołodziejaska, R., Grzešek, G., Woźniak, A., Kozakiewicz, M., Kosinska, A., Pawluk, M., Grzechowiak, E., Wojtasik, J. et Kozera, G. (2022). Increased Oxidative Stress Markers in Acute Ischemic Stroke Patients Treated with Thrombolytics.

International Journal of Molecular Sciences, 23(24).

<https://doi.org/10.3390/ijms232415625>

(PDF) Conception de polysaccharides sulfatés inhibiteurs de l'héparanase pour le traitement de l'angiogénèse tumorale. (s. d.). Récupéré le 9 octobre 2024 de https://www.researchgate.net/publication/324121784_Conception_de_polysaccharides_sulfatés_inhibiteurs_de_l'heparanase_pour_le_traitement_de_l'angiogenese_tumorale

Pennica, D., Holmes, W. E., Kohr, W. J., Harkins, R. N., Vehar, G. A., Ward, C. A., Bennett, W. F., Yelverton, E., Seeburg, P. H., Heyneker, H. L., Goeddel, D. V. et Collen, D. (1983). Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature*, 301(5897), 214-221. <https://doi.org/10.1038/301214a0>

Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., ... Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLOS Biology*, 18(7), e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>

Pervolaraki, E., Tyson, A. L., Pibiri, F., Poulter, S. L., Reichelt, A. C., Rodgers, R. J., Clapcote, S. J., Lever, C., Andreae, L. C. et Dachtler, J. (2019). The within-subject application of diffusion tensor MRI and CLARITY reveals brain structural changes in *Nrxn2* deletion mice. *Molecular Autism*, 10(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13229-019-0261-9>

Pikija, S., Magdic, J., Trkulja, V., Unterkreuter, P., Mutzenbach, J. S., Novak, H. F., Weymayr, F., Hauer, L. et Sellner, J. (2016). Intracranial Thrombus Morphology and Composition Undergoes Time-Dependent Changes in Acute Ischemic Stroke: A CT Densitometry Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), 1959. <https://doi.org/10.3390/ijms17111959>

Ploughman, M., Windle, V., MacLellan, C. L., White, N., Doré, J. J. et Corbett, D. (2009). Brain-Derived Neurotrophic Factor Contributes to Recovery of Skilled Reaching After Focal Ischemia in Rats. *Stroke*, 40(4), 1490-1495. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.531806>

Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S. et Sanacora, G. (2012). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(1), 22-37. <https://doi.org/10.1038/nrn3138>

Protecting the ischaemic penumbra as an adjunct to thrombectomy for acute stroke / *Nature Reviews Neurology*. (s. d.). Récupéré le 24 septembre 2024 de <https://www.nature.com/articles/s41582-018-0002-2>

Pu, L., Wang, L., Zhang, R., Zhao, T., Jiang, Y., le, Dr et Han, L. (2023). Projected Global Trends in Ischemic Stroke Incidence, Deaths and Disability-Adjusted Life Years From 2020 to 2030. *Stroke*, 54(5), 1330-1339. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.122.040073>

Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin. (1982). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 719(2), 318-328. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(82\)90105-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(82)90105-2)

Pusch, G., Debrabant, B., Molnar, T., Feher, G., Papp, V., Banati, M., Kovacs, N., Szapary, L. et Illes, Z. (2015). Early Dynamics of P-selectin and Interleukin 6 Predicts Outcomes in Ischemic Stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association*, 24(8), 1938-1947. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.05.005>

Quenault, A., Martinez de Lizarrondo, S., Etard, O., Gauberti, M., Orset, C., Haelewyn, B., Segal, H. C., Rothwell, P. M., Vivien, D., Touzé, E. et Ali, C. (2017). Molecular magnetic resonance imaging discloses endothelial activation after transient ischaemic attack. *Brain*, 140(1), 146-157. <https://doi.org/10.1093/brain/aww260>

Raichle, M. E. et Mintun, M. A. (2006). BRAIN WORK AND BRAIN IMAGING. *Annual Review of Neuroscience*. Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112819>

Rånby, M., Bergsdorf, N. et Nilsson, T. (1982). Enzymatic properties of the one- and two-chain form of tissue plasminogen activator. *Thrombosis Research*, 27(2), 175-183. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(82\)90197-9](https://doi.org/10.1016/0049-3848(82)90197-9)

REASONER, D. K., WARNER, D. S., TODD, M. M. et MCALLISTER, A. (1990). EFFECTS OF NITROUS OXIDE ON CEREBRAL METABOLIC RATE IN RATS

ANAESTHETIZED WITH ISOFLURANE†. *British Journal of Anaesthesia*, 65(2), 210-215. <https://doi.org/10.1093/bja/65.2.210>

Reeker, W., Werner, C., Möllenberg, O., Mielke, L. et Kochs, E. (2000). High-dose S(+)-ketamine improves neurological outcome following incomplete cerebral ischemia in rats. *Canadian Journal of Anesthesia*, 47(6), 572-578. <https://doi.org/10.1007/BF03018950>

Reijerkerk, A., Kooij, G., Van Der Pol, S. M. A., Leyen, T., Lakeman, K., Van Het Hof, B., Vivien, D. et De Vries, H. E. (2010). The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. *Journal of Neurochemistry*, 113(2), 447-453. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06598.x>

Reijerkerk, A., Kooij, G., van der Pol, S. M. A., Leyen, T., van het Hof, B., Couraud, P.-O., Vivien, D., Dijkstra, C. D. et de Vries, H. E. (2008). Tissue-Type Plasminogen Activator Is a Regulator of Monocyte Diapedesis through the Brain Endothelial Barrier. *The Journal of Immunology*, 181(5), 3567-3574. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3567>

Reinstrup, P., Ryding, E., Algotsson, L., Berntman, L. et Uski, T. (1994). Effects of Nitrous Oxide on Human Regional Cerebral Blood Flow and Isolated Pial Arteries. *Anesthesiology*, 81(2), 396-402. <https://doi.org/10.1097/00000542-199408000-00018>

Renaudin, N., Demené, C., Dizeux, A., Ialy-Radio, N., Pezet, S. et Tanter, M. (2022a). Functional ultrasound localization microscopy reveals brain-wide neurovascular activity on a microscopic scale. *Nature Methods*, 19(8), 1004-1012. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01549-5>

Renaudin, N., Demené, C., Dizeux, A., Ialy-Radio, N., Pezet, S. et Tanter, M. (2022b). Functional ultrasound localization microscopy reveals brain-wide neurovascular activity on a microscopic scale. *Nature Methods*, 19(8), 1004-1012. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01549-5>

Ribo, M., Molina, C., Montaner, J., Rubiera, M., Delgado-Mederos, R., Arenillas, J. F., Quintana, M. et Alvarez-Sabín, J. (2005). Acute hyperglycemia state is associated with lower tPA-induced recanalization rates in stroke patients. *Stroke*, 36(8), 1705-1709. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000173161.05453.90.9f>

- Riedel, C. H., Zimmermann, P., Jensen-Kondering, U., Stingele, R., Deuschl, G. et Jansen, O. (2011). The importance of size: successful recanalization by intravenous thrombolysis in acute anterior stroke depends on thrombus length. *Stroke*, 42(6), 1775-1777. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.609693>
- Rijken, D. C. et Collen, D. (1981). Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *Journal of Biological Chemistry*, 256(13), 7035-7041. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69095-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69095-2)
- Rijken, D. C., Hoylaerts, M. et Collen, D. (s. d.). *Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator*.
- Rijken, D. C., Wijngaards, G., Zaal-de Jong, M. et Welbergen, J. (1979). Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 580(1), 140-153. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(79\)90205-8](https://doi.org/10.1016/0005-2795(79)90205-8)
- Rochmah, T. N., Rahmawati, I. T., Dahlui, M., Budiarto, W. et Bilqis, N. (2021). Economic Burden of Stroke Disease: A Systematic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(14), 7552. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147552>
- Rogove, A. D., Siao, C.-J., Keyt, B., Strickland, S. et Tsirka, S. E. (1999). Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *Journal of Cell Science*, 112(22), 4007-4016. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.22.4007>
- Rowley HA. (2001). The Four Ps of Acute Stroke Imaging: Parenchyma, Pipes, Perfusion, and Penumbra. *AJNR Am J Neuroradiol.*, 599-601. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7976007/>
- Roy, C. S. et Sherrington, C. S. (1890). On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *The Journal of Physiology*, 11(1-2), 85-158. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1890.sp000321>
- Ruan, J. et Yao, Y. (2020). Behavioral tests in rodent models of stroke. *Brain hemorrhages*, 1(4), 171-184. <https://doi.org/10.1016/j.hest.2020.09.001>

Saar, G., Cheng, N., Belluscio, L. et Koretsky, A. P. (2015). Laminar specific detection of APP induced neurodegeneration and recovery using MEMRI in an olfactory based Alzheimer's disease mouse model. *NeuroImage*, *118*, 183-192.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.05.045>

Saini, V., Guada, L. et Yavagal, D. R. (2021). Global Epidemiology of Stroke and Access to Acute Ischemic Stroke Interventions. *Neurology*, *97*(20_Supplement_2), S6-S16.

<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000012781>

Sakadžić, S., Roussakis, E., Yaseen, M. A., Mandeville, E. T., Srinivasan, V. J., Arai, K., Ruvinskaya, S., Devor, A., Lo, E. H., Vinogradov, S. A. et Boas, D. A. (2010). Two-photon high-resolution measurement of partial pressure of oxygen in cerebral vasculature and tissue. *Nature Methods*, *7*(9), 755-759. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1490>

Sakai, H., Sheng, H., Yates, R. B., Ishida, K., Pearlstein, R. D. et Warner, D. S. (2007). Isoflurane Provides Long-term Protection against Focal Cerebral Ischemia in the Rat.

Anesthesiology, *106*(1), 92-99. <https://doi.org/10.1097/00000542-200701000-00017>

Samson, A. L., Nevin, S. T., Croucher, D., Niego, B., Daniel, P. B., Weiss, T. W., Moreno, E., Monard, D., Lawrence, D. A. et Medcalf, R. L. (2008). Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function.

Journal of Neurochemistry, *107*(4), 1091-1101. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05687.x>

Saqqur, M., Uchino, K., Demchuk, A. M., Molina, C. A., Garami, Z., Calleja, S., Akhtar, N., Orouk, F. O., Salam, A., Shuaib, A., Alexandrov, A. V. et CLOTBUST Investigators. (2007). Site of arterial occlusion identified by transcranial Doppler predicts the response to intravenous thrombolysis for stroke. *Stroke*, *38*(3), 948-954.

<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000257304.21967.ba>

Sato, Y., Falcone-Juengert, J., Tominaga, T., Su, H. et Liu, J. (2022). Remodeling of the Neurovascular Unit Following Cerebral Ischemia and Hemorrhage. *Cells*, *11*(18).

<https://doi.org/10.3390/cells11182823>

Saver, J. L. (2006). Time is brain--quantified. *Stroke*, *37*(1), 263-266.

<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000196957.55928.ab>

Schmidt-Pogoda, A., Bonberg, N., Koecke, M. H. M., Strecker, J.-K., Wellmann, J., Bruckmann, N.-M., Beuker, C., Schäbitz, W.-R., Meuth, S. G., Wiendl, H., Minnerup, H. et Minnerup, J. (2020a). Why Most Acute Stroke Studies Are Positive in Animals but Not in Patients: A Systematic Comparison of Preclinical, Early Phase, and Phase 3 Clinical Trials of Neuroprotective Agents. *Annals of Neurology*, 87(1), 40-51.

<https://doi.org/10.1002/ana.25643>

Schmidt-Pogoda, A., Bonberg, N., Koecke, M. H. M., Strecker, J.-K., Wellmann, J., Bruckmann, N.-M., Beuker, C., Schäbitz, W.-R., Meuth, S. G., Wiendl, H., Minnerup, H. et Minnerup, J. (2020b). Why Most Acute Stroke Studies Are Positive in Animals but Not in Patients: A Systematic Comparison of Preclinical, Early Phase, and Phase 3 Clinical Trials of Neuroprotective Agents. *Annals of Neurology*, 87(1), 40-51.

<https://doi.org/10.1002/ana.25643>

Sergio Fantini, Angelo Sassaroli, Kristen T. Tgavalekos et Joshua Kornbluth. (2016). Cerebral blood flow and autoregulation: current measurement techniques and prospects for noninvasive optical methods. *Neurophotonics*, 3(3), 031411.

<https://doi.org/10.1117/1.NPh.3.3.031411>

Serota, H. M. et Gerard, R. W. (1938). LOCALIZED THERMAL CHANGES IN THE CAT'S BRAIN. *Journal of Neurophysiology*, 1(2), 115-124.

<https://doi.org/10.1152/jn.1938.1.2.115>

Serum Glucose Level and Diabetes Predict Tissue Plasminogen Activator–Related Intracerebral Hemorrhage in Acute Ischemic Stroke | Stroke. (s. d.). Récupéré le 27 septembre 2024 de <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.STR.30.1.34>

Seto, A., Taylor, S., Trudeau, D., Swan, I., Leung, J., Reeson, P., Delaney, K. R. et Brown, C. E. (2014a). Induction of ischemic stroke in awake freely moving mice reveals that isoflurane anesthesia can mask the benefits of a neuroprotection therapy. *Frontiers in Neuroenergetics*, 6, 1. <https://doi.org/10.3389/fnene.2014.00001>

Seto, A., Taylor, S., Trudeau, D., Swan, I., Leung, J., Reeson, P., Delaney, K. R. et Brown, C. E. (2014b). Induction of ischemic stroke in awake freely moving mice reveals that isoflurane anesthesia can mask the benefits of a neuroprotection therapy. *Frontiers in Neuroenergetics*, 6(APR). <https://doi.org/10.3389/fnene.2014.00001>

- Shah, R. S. et Cole, J. W. (2010a). Smoking and stroke: the more you smoke the more you stroke. *Expert review of cardiovascular therapy*, 8(7), 917-932.
<https://doi.org/10.1586/erc.10.56>
- Shah, R. S. et Cole, J. W. (2010b). Smoking and stroke: the more you smoke the more you stroke. *Expert review of cardiovascular therapy*, 8(7), 917-932.
<https://doi.org/10.1586/erc.10.56>
- Shibata, M. et Blatteis, C. M. (1991). High perfusate PO₂ impairs thermosensitivity of hypothalamic thermosensitive neurons in slice preparations. *Brain Research Bulletin*, 26(3), 467-471. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(91\)90026-G](https://doi.org/10.1016/0361-9230(91)90026-G)
- Shiraishi, K., Wang, Z., Kokuryo, D., Aoki, I. et Yokoyama, M. (2017). A polymeric micelle magnetic resonance imaging (MRI) contrast agent reveals blood–brain barrier (BBB) permeability for macromolecules in cerebral ischemia-reperfusion injury. *Journal of Controlled Release*, 253, 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.020>
- Sicard, K., Shen, Q., Brevard, M. E., Sullivan, R., Ferris, C. F., King, J. A. et Duong, T. Q. (2003). Regional Cerebral Blood Flow and BOLD Responses in Conscious and Anesthetized Rats under Basal and Hypercapnic Conditions: Implications for Functional MRI Studies. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23(4), 472-481.
<https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000054755.93668.20>
- Siepmann, M., Schmitz, G., Bzyl, J., Palmowski, M. et Kiessling, F. (2011). Imaging tumor vascularity by tracing single microbubbles. Dans *2011 IEEE International Ultrasonics Symposium* (p. 1906-1909). <https://doi.org/10.1109/ULTSYM.2011.0476>
- Sigler, A., Mohajerani, M. H. et Murphy, T. H. (2009). Imaging rapid redistribution of sensory-evoked depolarization through existing cortical pathways after targeted stroke in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28), 11759-11764.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0812695106>
- Simon Jung, Roland Wiest, Jan Gralla, Richard McKinley, Heinrich P Mattle et David Liebeskind. (2017, 11 décembre). Relevance of the cerebral collateral circulation in ischaemic stroke: time is brain, but collaterals set the pace. *Swiss Medical Weekly*.

Site internet EFSA charge de morbidité. <https://www.efsa.europa.eu/fr/glossary/burden-disease#:~:text=Fa%C3%A7on%20dont%20une%20maladie%20touche,ou%20d'autres%20indicateurs%20reconnus>.

Site internet « Ortolang » « Outils et Ressources pour un Traitement Optimisé de la LANGue » - Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales.

Smith, A. G. et Rowland Hill, C. (2018). Imaging assessment of acute ischaemic stroke: a review of radiological methods. *British Journal of Radiology*, 91(1083), 20170573. <https://doi.org/10.1259/bjr.20170573>

Smith, A. M. et Dragunow, M. (2014). The human side of microglia. *Trends in Neurosciences*, 37(3), 125-135. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.12.001>

Song, H. W., Foreman, K. L., Gastfriend, B. D., Kuo, J. S., Palecek, S. P. et Shusta, E. V. (2020). Transcriptomic comparison of human and mouse brain microvessels. *Scientific Reports*, 10(1), 12358. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69096-7>

Soria, G., Wiedermann, D., Justicia, C., Ramos-Cabrer, P. et Hoehn, M. (2008). Reproducible imaging of rat corticothalamic pathway by longitudinal manganese-enhanced MRI (L-MEMRI). *NeuroImage*, 41(3), 668-674. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.03.018>

Sotak, C. H. (2002). The role of diffusion tensor imaging in the evaluation of ischemic brain injury – a review. *NMR in Biomedicine*, 15(7-8), 561-569. <https://doi.org/10.1002/nbm.786>

Souvik Sen et Amar Anand. (2020). Magnetic Resonance Imaging in Acute Stroke. *Medscape*. <https://emedicine.medscape.com/article/1155506-overview?form=fpf>

Spellman, M. W., Basa, L. J., Leonard, C. K., Chakel, J. A., O'Connor, J. V., Wilson, S. et van Halbeek, H. (1989). Carbohydrate Structures of Human Tissue Plasminogen Activator Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 264(24), 14100-14111. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71649-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71649-9)

Spence, J. D. (2019). Nutrition and Risk of Stroke. *Nutrients*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/nu11030647>

Spiotta, A. M., Chaudry, M. I., Hui, F. K., Turner, R. D., Kellogg, R. T. et Turk, A. S. (2015). Evolution of thrombectomy approaches and devices for acute stroke: a technical

review. *Journal of NeuroInterventional Surgery*, 7(1), 2-7.

<https://doi.org/10.1136/neurintsurg-2013-011022>

Sprengers, E. D. et Kluft, C. (1987). Plasminogen activator inhibitors. *Blood*, 69(2), 381-387.

Srinivasan, A., Goyal, M., Azri, F. A. et Lum, C. (2006). State-of-the-Art Imaging of Acute Stroke. *RadioGraphics*, 26(suppl_1), S75-S95.

<https://doi.org/10.1148/rg.26si065501>

Staessens, S. et De Meyer, S. F. (2021). Thrombus heterogeneity in ischemic stroke.

Platelets, 32(3), 331-339. <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1748586>

Staessens, S., François, O., Brinjikji, W., Doyle, K. M., Vanacker, P., Andersson, T. et De Meyer, S. F. (2021). Studying Stroke Thrombus Composition After Thrombectomy: What Can We Learn? *Stroke*, 52(11), 3718-3727.

<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.034289>

Stenroos, P., Pirttimäki, T., Paasonen, J., Paasonen, E., Salo, R. A., Koivisto, H.,

Natunen, T., Mäkinen, P., Kuulasmaa, T., Hiltunen, M., Tanila, H. et Gröhn, O. (2021).

Isoflurane affects brain functional connectivity in rats 1 month after exposure.

NeuroImage, 234, 117987. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2021.117987>

Steven K. Feske MD. (2021). Ischemic Stroke. *The American Journal of Medicine*,

134(12), 1457-1464. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2021.07.027>

Stride, E. et Saffari, N. (2003). Microbubble ultrasound contrast agents: A review.

Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, 217(6), 429-447. <https://doi.org/10.1243/09544110360729072>

Stroemer, R. P., Kent, T. A. et Hulsebosch, C. E. (1995). Neocortical Neural Sprouting, Synaptogenesis, and Behavioral Recovery After Neocortical Infarction in Rats. *Stroke*,

26(11), 2135-2144. <https://doi.org/10.1161/01.STR.26.11.2135>

Structural Requirements for Activation of Latent Platelet-derived Growth Factor CC by Tissue Plasminogen Activator. (2005). *Journal of Biological Chemistry*, 280(29),

26856-26862. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503388200>

Su, E. J., Fredriksson, L., Geyer, M., Folestad, E., Cale, J., Andrae, J., Gao, Y., Pietras,

K., Mann, K., Yepes, M., Strickland, D. K., Betsholtz, C., Eriksson, U. et Lawrence, D.

- A. (2008). Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nature Medicine*, 14(7), 731-737.
<https://doi.org/10.1038/nm1787>
- Sullender, C. T., Richards, L. M., He, F., Luan, L. et Dunn, A. K. (2022). Dynamics of isoflurane-induced vasodilation and blood flow of cerebral vasculature revealed by multi-exposure speckle imaging. *Journal of Neuroscience Methods*, 366, 109434.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2021.109434>
- Suryadi, B. (2024). Methods for Detecting Early Symptoms of Stroke: A Literature Review. *Jurnal Ilmiah Ilmu Keperawatan Indonesia*, 14(01), 32-43.
<https://doi.org/10.33221/jiiki.v14i01.3165>
- Suzuki, Y., Nagai, N. et Umemura, K. (2016). A Review of the Mechanisms of Blood-Brain Barrier Permeability by Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment for Cerebral Ischemia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00002>
- SUZUKI, Y., NAGAI, N., UMEMURA, K., COLLEN, D. et LIJNEN, H. R. (2007). Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(8), 1732-1739.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02628.x>
- T, B., A, B., S, C., Fb, N., S, L., B, F., I, F., A, C., Hr, L. et Cc, P. (2007). Combined voltage and calcium epifluorescence imaging in vitro and in vivo reveals subthreshold and suprathreshold dynamics of mouse barrel cortex. *Journal of neurophysiology*, 97(5).
<https://doi.org/10.1152/jn.01178.2006>
- Takagi, K. et Takeo, S. (2003). [The model of stroke induced by microsphere embolism in rats]. *Nihon Yakurigaku Zasshi. Folia Pharmacologica Japonica*, 121(6), 440-446.
<https://doi.org/10.1254/fpj.121.440>
- Takuwa, H., Autio, J., Nakayama, H., Matsuura, T., Obata, T., Okada, E., Masamoto, K. et Kanno, I. (2011). Reproducibility and variance of a stimulation-induced hemodynamic response in barrel cortex of awake behaving mice. *Brain Research*, 1369, 103-111.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.11.007>

- Tamura, A., Graham, D. I., McCulloch, J. et Teasdale, G. M. (1981). Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *1*(1), 53-60. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1981.6>
- Tanne, D., Kasner, S. E., Demchuk, A. M., Koren-Morag, N., Hanson, S., Grond, M. et Levine, S. R. (2002). Markers of increased risk of intracerebral hemorrhage after intravenous recombinant tissue plasminogen activator therapy for acute ischemic stroke in clinical practice: the Multicenter rt-PA Stroke Survey. *Circulation*, *105*(14), 1679-1685. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000012747.53592.6a>
- Tanswell, P., Seifried, E., Su, P. C., Feuerer, W. et Rijken, D. C. (1989). Pharmacokinetics and systemic effects of tissue-type plasminogen activator in normal subjects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *46*(2), 155-162. <https://doi.org/10.1038/clpt.1989.120>
- Targeting the blood-brain barrier for the delivery of stroke therapies. (2021). *Advanced Drug Delivery Reviews*, *171*, 332-351. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.015>
- Temma, T., Magata, Y., Kuge, Y., Shimonaka, S., Sano, K., Katada, Y., Kawashima, H., Mukai, T., Watabe, H., Iida, H. et Saji, H. (2006). Estimation of Oxygen Metabolism in a Rat Model of Permanent Ischemia Using Positron Emission Tomography with Injectable ¹⁵O-O₂. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *26*(12), 1577-1583. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600302>
- Teruya, J. (2021). Hemostasis Basics: Figures and Facts. Dans J. Teruya (dir.), *Management of Bleeding Patients* (p. 3-10). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-56338-7_1
- Thiebaut, A. M., Gauberti, M., Ali, C., Martinez De Lizarrondo, S., Vivien, D., Yepes, M. et Roussel, B. D. (2018). The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond. *The Lancet Neurology*, *17*(12), 1121-1132. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30323-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30323-5)
- Thinking out of the dish: what to learn about cortical development using pluripotent stem cells. (2014). *Trends in Neurosciences*, *37*(6), 334-342. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.03.005>

Thrombus composition and thrombolysis resistance in stroke. (2023). *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 7(4), 100178.

<https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100178>

Tillett, W. S. et Garner, R. L. (1933). THE FIBRINOLYTIC ACTIVITY OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI. *Journal of Experimental Medicine*, 58(4), 485-502.

<https://doi.org/10.1084/jem.58.4.485>

Tiran, E., Ferrier, J., Deffieux, T., Gennisson, J.-L., Pezet, S., Lenkei, Z. et Tanter, M. (2017). Transcranial Functional Ultrasound Imaging in Freely Moving Awake Mice and Anesthetized Young Rats without Contrast Agent. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 43(8), 1679-1689. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2017.03.011>

Tissue Plasminogen Activator Contributes to the Late Phase of LTP and to Synaptic Growth in the Hippocampal Mossy Fiber Pathway. (1998). *Neuron*, 21(4), 813-825.

[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80597-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80597-8)

Tissue-Type Plasminogen Activator Triggers the Synaptic Vesicle Cycle in Cerebral Cortical Neurons - Fang Wu, Enrique Torre, David Cuellar-Giraldo, Lihong Cheng, g Yi, Edyta K Bichler, Paul S García, Manuel Yepes, 2015. (s. d.). Récupéré le 26 septembre 2024 de <https://journals.sagepub.com/doi/10.1038/jcbfm.2015.155>

Tong, C., Dai, J., Chen, Y., Zhang, K., Feng, Y. et Liang, Z. (2019). Differential coupling between subcortical calcium and BOLD signals during evoked and resting state through simultaneous calcium fiber photometry and fMRI. *NeuroImage*, 200, 405-413.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.07.006>

Tsirka, S. E., Bugge, T. H., Degen, J. L. et Strickland, S. (1997). Neuronal death in the central nervous system demonstrates a non-fibrin substrate for plasmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(18), 9779-9781.

<https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9779>

Tsirka, S. E., Gualandris, A., Amaral, D. G. et Strickland, S. (1995). Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature*, 377(6547), 340-344. <https://doi.org/10.1038/377340a0>

Tsurugizawa, T., Tamada, K., Ono, N., Karakawa, S., Kodama, Y., Debacker, C., Hata, J., Okano, H., Kitamura, A., Zalesky, A. et Takumi, T. (s. d.). Awake functional MRI

detects neural circuit dysfunction in a mouse model of autism. *Science Advances*, 6(6), eaav4520. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav4520>

Tuneva, E. O., Bychkova, O. N. et Boldyrev, A. A. (2003). Effect of NMDA on Production of Reactive Oxygen Species by Human Lymphocytes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 136(2), 159-161. <https://doi.org/10.1023/A:1026366907084>

Turana, Y., Teng kawan, J., Chia, Y. C., Nathaniel, M., Wang, J.-G., Sukonthasarn, A., Chen, C.-H., Minh, H. V., Buranakitjaroen, P., Shin, J., Siddique, S., Nailes, J. M., Park, S., Teo, B. W., Sison, J., Ann Soenarta, A., Hoshide, S., Tay, J. C., Prasad Sogunuru, G., ... the HOPE Asia Network. (2021). Hypertension and stroke in Asia: A comprehensive review from HOPE Asia. *The Journal of Clinical Hypertension*, 23(3), 513-521. <https://doi.org/10.1111/jch.14099>

Two-photon imaging of stroke onset in vivo reveals that NMDA-receptor independent ischemic depolarization is the major cause of rapid reversible damage to dendrites and spines - PubMed. (s. d.). Récupéré le 30 septembre 2024 de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18272696/>

Tziomalos Konstantinos, Athyros G. Vasilios, Karagiannis Asterios et Mikhailidis P. Dimitri. (2009). Dyslipidemia as a Risk Factor for Ischemic Stroke. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9(14), 1291-1297. <https://doi.org/10.2174/156802609789869628>

Tzoumas, S., Nunes, A., Olefir, I., Stangl, S., Symvoulidis, P., Glasl, S., Bayer, C., Multhoff, G. et Ntziachristos, V. (2016). Eigenspectra optoacoustic tomography achieves quantitative blood oxygenation imaging deep in tissues. *Nature Communications*, 7(1), 12121. <https://doi.org/10.1038/ncomms12121>

Ultrasound-Enhanced Systemic Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke | New England Journal of Medicine. (s. d.). Récupéré le 27 septembre 2024 de <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa041175>

Valery L Feigin, Benjamin A Stark, Catherine Owens Johnson, Gregory A Roth, Catherine Bisignano, Gdiom Gebreheat Abady, Mitra Abbasifard, Mohsen Abbasi-Kangevari, Foad Abd-Allah, Vida Abedi, Ahmed Abualhasan, Niveen ME Abu-Rmeileh, Abdelrahman I Abushouk, Oladimeji M Adebayo, Gina Agarwal, Pradyumna Agasthi, Bright Opoku Ahinkorah, Sohail Ahmad, Sepideh Ahmadi, ... Christopher J L Murray.

- (2021, 3 septembre). 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*. [https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422\(21\)00252-0/fulltext#%20](https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422(21)00252-0/fulltext#%20)
- van der Zijden, J. P., Bouts, M. J. R. J., Wu, O., Roeling, T. A. P., Bleys, R. L., van der Toorn, A. et Dijkhuizen, R. M. (2008a). Manganese-Enhanced MRI of Brain Plasticity in Relation to Functional Recovery after Experimental Stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 28(4), 832-840.
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600576>
- van der Zijden, J. P., van der Toorn, A., van der Marel, K. et Dijkhuizen, R. M. (2008b). Longitudinal in vivo MRI of alterations in perilesional tissue after transient ischemic stroke in rats. *Experimental Neurology*, 212(1), 207-212.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.03.027>
- van Meer, M. P. A., Otte, W. M., van der Marel, K., Nijboer, C. H., Kavelaars, A., van der Sprenkel, J. W. B., Viergever, M. A. et Dijkhuizen, R. M. (2012). Extent of Bilateral Neuronal Network Reorganization and Functional Recovery in Relation to Stroke Severity. *The Journal of Neuroscience*, 32(13), 4495.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3662-11.2012>
- Walter N. Kernan, MD, Silvio E. Inzucchi, MD, Carla Sawan, MD, Richard F. Macko, MD, and Karen L. Furie, MD. (2012, 30 octobre). Obesity: A Stubbornly Obvious Target for Stroke Prevention. *Stroke*.
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/strokeaha.111.639922>
- Wang, L. V. et Yao, J. (2016). A practical guide to photoacoustic tomography in the life sciences. *Nature Methods*, 13(8), 627-638. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3925>
- Wang, X., Lee, S.-R., Arai, K., Lee, S.-R., Tsuji, K., Rebeck, G. W. et Lo, E. H. (2003). Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nature Medicine*, 9(10), 1313-1317.
<https://doi.org/10.1038/nm926>
- Wang, Y. F., Tsirka, S. E., Strickland, S., Stieg, P. E., Soriano, S. G. et Lipton, S. A. (1998). Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal

cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nature Medicine*, 4(2), 228-231.

<https://doi.org/10.1038/nm0298-228>

Wang, Y., Lowerison, M. R., You, Q., Lin, B.-Z., Llano, D. A. et Song, P. (2024a).

Longitudinal Awake Imaging of Deep Mouse Brain Microvasculature with Super-resolution Ultrasound Localization Microscopy. <https://doi.org/10.7554/elife.95168.1>

Wang, Y., Shin, Y., You, Q., Lin, B.-Z., Lowerison, M. R. et Song, P. (2024b).

Functional ultrasound localization microscopy in the murine brain: Challenges and new techniques. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 155(3_Supplement), A23.

<https://doi.org/10.1121/10.0026656>

Ward, N. S., Brown, M. M., Thompson, A. J. et Frackowiak, R. S. J. (2003). Neural

correlates of motor recovery after stroke: a longitudinal fMRI study. *Brain*, 126(11), 2476-2496. <https://doi.org/10.1093/brain/awg245>

Warner, D. S., James, M. L., Laskowitz, D. T. et Wijdicks, E. F. (2014). Translational Research in Acute Central Nervous System Injury: Lessons Learned and the Future.

JAMA Neurology, 71(10), 1311-1318. <https://doi.org/10.1001/jamaneuro.2014.1238>

Watanabe, T., Frahm, J. et Michaelis, T. (2010). Myelin mapping in the living mouse

brain using manganese-enhanced magnetization transfer MRI. *NeuroImage*, 49(2),

1200-1204. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.09.050>

Watson, B. D., Dietrich, W. D., Busto, R., Wachtel, M. S. et Ginsberg, M. D. (1985).

Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis.

Annals of Neurology, 17(5), 497-504. <https://doi.org/10.1002/ana.410170513>

Weisel, J. W. et Litvinov, R. I. (2013). Mechanisms of fibrin polymerization and clinical

implications. *Blood*, 121(10), 1712-1719. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-306639>

What Is Blood-brain Barrier Permeability. (s. d.). CUSABIO. Récupéré le 26 septembre

2024 de <https://www.cusabio.com/Neuroscience/Blood-brain-Barrier-Permeability.html>

Whishaw, I. Q. (2000). Loss of the innate cortical engram for action patterns used in

skilled reaching and the development of behavioral compensation following motor cortex

lesions in the rat. *Neuropharmacology*, 39(5), 788-805. [https://doi.org/10.1016/S0028-](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00259-2)

[3908\(99\)00259-2](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00259-2)

- Wilson, S. R. et Burns, P. N. (2010). Microbubble-enhanced US in Body Imaging: What Role? *Radiology*, 257(1), 24-39. <https://doi.org/10.1148/radiol.10091210>
- Wolters, M., van Hoof, R. H. M., Wagenaar, A., Douma, K., van Zandvoort, M. A. M. J., Hackeng, T. H., Post, M. J., Backes, W. H. et Kooi, M. E. (2013). MRI artifacts in the ferric chloride thrombus animal model: an alternative solution. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11(9), 1766-1769. <https://doi.org/10.1111/jth.12340>
- Xu, F., Liu, P., Pascual, J. M., Xiao, G. et Lu, H. (2012). Effect of Hypoxia and Hyperoxia on Cerebral Blood Flow, Blood Oxygenation, and Oxidative Metabolism. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(10), 1909-1918. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.93>
- Xu, M. et Wang, L. V. (2006). Photoacoustic imaging in biomedicine. *Review of Scientific Instruments*, 77(4), 041101. <https://doi.org/10.1063/1.2195024>
- Xue, R., Sawada, M., Goto, S., Hurn, P. D., Traystman, R. J., van Zijl, P. C. M. et Mori, S. (2001). Rapid three-dimensional diffusion MRI facilitates the study of acute stroke in mice. *Magnetic Resonance in Medicine*, 46(1), 183-188. <https://doi.org/10.1002/mrm.1174>
- Yang, X., Chen, Y.-H., Xia, F. et Sawan, M. (2021). Photoacoustic imaging for monitoring of stroke diseases: A review. *Photoacoustics*, 23, 100287. <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2021.100287>
- Yemisci, M., Gursoy-Ozdemir, Y., Vural, A., Can, A., Topalkara, K. et Dalkara, T. (2009). Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nature Medicine*, 15(9), 1031-1037. <https://doi.org/10.1038/nm.2022>
- Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, E. G., Bugge, T. H., Strickland, D. K. et Lawrence, D. A. (2003). Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(10), 1533-1540. <https://doi.org/10.1172/JCI19212>
- Yifan Zhou, 1 Huimin Jiang, 1 Huimin Wei, 2 Lu Liu, 3 Chen Zhou, corresponding author 1, * and Xunming Jicorresponding author 1, 4, *. (2022, 6 octobre). Venous stroke—a stroke subtype that should not be ignored.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9582250/#:~:text=Stroke%20is%20caused%20not%20only,%E2%80%93%25%20of%20all%20strokes.>

Yokoo, N., Sheng, H., Mixco, J., Homi, H. M., Pearlstein, R. D. et Warner, D. S. (2004). Intraischemic Nitrous Oxide Alters Neither Neurologic Nor Histologic Outcome: A Comparison with Dizocilpine. *Anesthesia & Analgesia*, 99(3).

https://journals.lww.com/anesthesia-analgesia/fulltext/2004/09000/intraischemic_nitrous_oxide_alters_neither.45.aspx

Young, A. R., Ali, C., Duretête, A. et Vivien, D. (2007). Neuroprotection and stroke: time for a compromise. *Journal of Neurochemistry*, 103(4), 1302-1309.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04866.x>

Zhang, D.-D., Cao, Y., Mu, J.-Y., Liu, Y.-M., Gao, F., Han, F., Zhai, F.-F., Zhou, L.-X., Ni, J., Yao, M., Li, M.-L., Jin, Z.-Y., Zhang, S.-Y., Cui, L.-Y., Shen, Y. et Zhu, Y.-C. (2022). Inflammatory biomarkers and cerebral small vessel disease: a community-based cohort study. *Stroke and Vascular Neurology*, 7(4), 302. <https://doi.org/10.1136/svn-2021-001102>

Zhang, H. F., Maslov, K., Stoica, G. et Wang, L. V. (2006). Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging. *Nature Biotechnology*, 24(7), 848-851. <https://doi.org/10.1038/nbt1220>

Zhang, K., Loong, S. S. E., Yuen, L. Z. H., Venketasubramanian, N., Chin, H.-L., Lai, P. S. et Tan, B. Y. Q. (2023). Genetics in Ischemic Stroke: Current Perspectives and Future Directions. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 10(12).

<https://doi.org/10.3390/jcdd10120495>

Zhang, L., Ma, J., Wang, M., Zhang, L., Sun, W., Ji, H., Yue, C., Huang, J., Zi, W., Li, F., Guo, C. et Wang, P. (2024). The Association Between National Institutes of Health Stroke Scale Score and Clinical Outcome in Patients with Large Core Infarctions Undergoing Endovascular Treatment. *Neurology and Therapy*, 13(3), 563-581.

<https://doi.org/10.1007/s40120-024-00588-8>

Zhang, S. et Murphy, T. H. (2007). Imaging the Impact of Cortical Microcirculation on Synaptic Structure and Sensory-Evoked Hemodynamic Responses In Vivo. *PLOS Biology*, 5(5), e119. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050119>

- Zhang, X., Levy, D., Nosedá, R., Kainz, V., Jakubowski, M. et Burstein, R. (2010). Activation of Meningeal Nociceptors by Cortical Spreading Depression: Implications for Migraine with Aura. *Journal of Neuroscience*, 30(26), 8807-8814. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0511-10.2010>
- Zhang, Z., Zhang, R. L., Jiang, Q., Raman, S. B. K., Cantwell, L. et Chopp, M. (1997). A New Rat Model of Thrombotic Focal Cerebral Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 17(2), 123-135. <https://doi.org/10.1097/00004647-199702000-00001>
- Zhao, J. et Levy, D. (2014). The sensory innervation of the calvarial periosteum is nociceptive and contributes to headache-like behavior. *PAIN*, 155(7), 1392. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.04.019>
- Zhou, S.-Y., Guo, Z.-N., Zhang, D.-H., Qu, Y. et Jin, H. (2022). The Role of Pericytes in Ischemic Stroke: From Cellular Functions to Therapeutic Targets. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15. <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-neuroscience/articles/10.3389/fnmol.2022.866700>
- Zhu, A., Rajendram, P., Tseng, E., Coutts, S. B. et Yu, A. Y. X. (2022). Alteplase or tenecteplase for thrombolysis in ischemic stroke: An illustrated review. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 6(6), e12795. <https://doi.org/10.1002/rth2.12795>
- 小泉仁一, 吉田洋二, 中沢貞二 et 大根田玄寿. (1986b). 虚血性脳浮腫の実験的研究. 脳卒中, 8(1), 1-8. <https://doi.org/10.3995/jstroke.8.1>
- 小泉仁一, 吉田洋二, 中沢貞二 et 大根田玄寿. (1986a). 虚血性脳浮腫の実験的研究. 脳卒中, 8(1), 1-8. <https://doi.org/10.3995/jstroke.8.1>

Développement d'un modèle préclinique chez la souris éveillée et stratégie thrombolytique ciblée pour l'AVC ischémique

Mots clés : AVC, Accident Vasculaire Cérébral, ischémique, préclinique, IRM, fUS, connectivité, récupération fonctionnelle, souris, rtPA, thérapie ciblée, ultrasons, ULM 3D, cerveau, repos, éveillé.

Résumé

L'Accident Vasculaire Cérébral (AVC) ischémique, causé par l'obstruction d'une artère cérébrale, est l'une des principales causes de mortalité et d'invalidité dans le monde. Bien que des traitements comme le rtPA et la thrombectomie mécanique existent, seul un faible pourcentage de patients y a accès. Par ailleurs, malgré l'investissement de la recherche, les difficultés à transposer les résultats des modèles animaux aux essais cliniques humains limitent le développement de nouvelles thérapies.

Cette thèse présente un modèle d'AVC chez la souris éveillée visant à améliorer la transposabilité des études précliniques. Grâce à l'imagerie ultrasonore fonctionnelle (fUS) et à l'IRM, ce modèle permet une évaluation en temps réel des paramètres hémodynamiques ainsi qu'une analyse de la récupération fonctionnelle après l'ischémie. Nous proposons également un nouvel outil d'évaluation de la connectivité cérébrale post-AVC, apportant des informations sur la récupération cérébrale et la réponse au traitement. L'efficacité du traitement thrombolytique standard, le rtPA, a été testée, et une approche innovante de traitement ciblé a été explorée. Les résultats soulignent le potentiel de ces approches multimodales et thérapeutiques ciblées pour améliorer la prise en charge des AVC ischémiques, ouvrant la voie à de nouvelles perspectives de recherche translationnelle.

Abstract

Ischemic stroke, caused by the obstruction of a cerebral artery, is one of the leading causes of mortality and disability worldwide. Despite the availability of treatments such as rtPA and endovascular thrombectomy, only a small percentage of patients have access to these. Moreover, despite substantial research efforts, challenges in translating results from animal models to human clinical trials limit the development of new therapies.

This thesis presents a novel stroke model in awake mice to improve the translatability of preclinical studies. Through the use of functional ultrasound (fUS) and MRI, this model enables real-time assessment of hemodynamic parameters and functional recovery following ischemia. Additionally, we propose a new tool for evaluating post-stroke brain connectivity, providing insights into brain recovery and treatment response. The efficacy of the standard thrombolytic treatment, rtPA, was evaluated, and an innovative targeted treatment approach was explored. The results underscore the potential of these multimodal imaging approaches and targeted therapies to enhance ischemic stroke management, opening new avenues for translational research.