Développement d'une thérapie matricielle associée ou non à une thérapie cellulaire pour le traitement des dommages cérébraux et les déficits fonctionnels après une ischémie cérébrale chez le rat

Yacine Khelif

▶ **To cite this version:**

Yacine Khelif. Développement d'une thérapie matricielle associée ou non à une thérapie cellulaire pour le traitement des dommages cérébraux et les déficits fonctionnels après une ischémie cérébrale chez le rat. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC416 . tel-02942782

HAL Id: tel-02942782
https://theses.hal.science/tel-02942782

Submitted on 18 Sep 2020

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

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

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité PHARMACIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Développement d'une thérapie matricielle associée ou non à une thérapie cellulaire pour le traitement des dommages cérébraux et les déficits fonctionnels après une ischémie cérébrale chez le rat

Présentée et soutenue par
Yacine KHELIF

Thèse soutenue publiquement le 12/09/2018 devant le jury composé de		
M. OLIVIER DETANTE	Maître de conférences HDR, Université Grenoble Alpes	Rapporteur du jury
Mme NATHALIE KUBIS	Professeur des universités, UNIVERSITE PARIS 7 PARIS DIDEROT	Rapporteur du jury
M. THOMAS FRERET	Professeur des universités, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Président du jury
Mme DULCÉ PAPY	Professeur des universités, université Paris-est créteil (UPEC)	Membre du jury
Mme MYRIAM BERNAUDIN	Directeur de recherche au CNRS, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Directeur de thèse
M. OMAR TOUZANI	Professeur des universités, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Co-directeur de thèse

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

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

IST2 IMAGERIE & STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES DES PATHOLOGIES CÉRÉBRALES & TUMORALES

1.2.7.3 Les HSPGs dans l'ischémie cérébrale 59
1.3 Développement de nouveaux traitements pour l'ischémie cérébrale 62
1.3.1 La thérapie cellulaire 65
1.3.1.1 Thérapie cellulaire utilisant des CSMs dans l'ischémie cérébrale 66
1.3.2 Arguments en faveur de l'intérêt potentiel d'une thérapie matricielles à base de RGTA (ReGeneraTing Agent) pour le traitement de l'ischémie cérébrale 74
1.3.3 Arguments en faveur de l'intérêt de la combinaison des RGTAs et des CSMs dans le traitement de l'ischémie cérébrale 79
2 Objectifs 82
3 Matériels et méthodes 84
3.1 Protocoles des études menées 84
3.2 Animaux 85
3.3 Induction de l'ischémie cérébrale transitoire 85
3.4 Extraction et culture des CSMs 87
3.5 Administration du RGTA seul ou en combinaison avec les CSMs 88
3.5.1 Administration du RGTA 88
3.5.2 Administration des CSMs 88
3.5.2.1 Administration par voie intracérébrale 88
3.5.2.2 Administration par voie Intraveineuse 89
3.6 Analyse IRM 89
3.7 Analyse de la biodistribution du RGTA 91
3.8 Tests comportementaux sensorimoteurs 91
3.8.1 Le score neurologique 91
3.8.2 Test du placement de pattes 93
3.8.3 Test du coin 95
3.8.4 Test du cylindre 96
3.8.5 Test du retrait de l'adhésif 97
3.8.6 Test de l'open-field 98
3.8.7 Test de la poutre 99
3.9 Mise à mort des animaux et extraction du cerveau 101
3.10 Études immunohistochimiques 101

3.11 Analyse statistique 103

4 Résultats 104

Étude 1 : Effet du RGTA sur la neuroprotection et la régénération tissulaire après une ischémie cérébrale 104

4.1.1 Article de l'Étude 1 : Effet du RGTA sur la neuroprotection et la régénération tissulaire après une ischémie cérébrale 107

4.1.2 Résultats complémentaires 153

4.1.3 Résultats et conclusions de l'étude 1 concernant l'effet du RGTA sur la neuroprotection et la régénération tissulaire après une ischémie cérébrale 155

4.2 Étude 2 : Effet du RGTA combiné aux cellules souches mésenchymateuses sur la neuroprotection et la régénération tissulaire après une ischémie cérébrale chez des rats normotendus et hypertendus 158

4.2.1 Article de l'étude 2 concernant l'effet du RGTA combiné aux CSMs sur la neurorprotection, et la récupération fonctionnelle suite à une ischémie cérébrale. 161

4.2.2 Résultats et conclusions de l'étude 2 concernant l'effet du RGTA combiné aux CSMs sur la neurorprotection, et la récupération fonctionnelle suite à une ischémie cérébrale. 198

5 Discussion générale et perspectives 201

6 Références 209

7 Annexe : étude Drepagreffe 228

Liste des Abréviations

ACA: artère cérébrale antérieure
ACC: artère carotide commune
ACE: artère carotide externe
ACI: artère carotide interne
ACM: artère cérébrale moyenne
ACP: artère cérébrale postérieure
ADC: coefficient de diffusion apparent
Ang-1 et -2: angiopoïétines-1 et -2
ATP: adénosine triphosphate
AVC: accident vasculaire cérébral
BHE: barrière hémato-encéphalique
BrdU: bromodésoxyuridine
BSA: *bovine serum albumine*
CSM: cellule souche mésenchymateuse
CSM-MC: milieu de culture des CSMs
CSPG: chondroitine sulfate protéoglyane
DCX: doublecortine
DSC: débit sanguin cérébral
DWI: *diffusion-weighted imaging*
ERK1/2: *extracellular signal-regulated kinases 1/2*
FGF-2: *fibroblast growth factor-2*
FLAIR: *Fluid attenuated inversion-recovery*
GAG: glycoaminoglycane
GFAP: *glial fibrillary acidic protein*
HAS: haute autorité de santé
Hb: hémoglobine
HbS: hémoglobine S
HGF: *hepatocyte gowth factor*
HS: heparane sulfate
Hsp70: *heat shock protein 70*
HSPG: héparane sulfate protéoglycane
HTA: hypertension artérielle
IL: interleukine
IRM: imagerie par résonnance magnétique
LCR : liquide céphalo-rachidien
MEC: matrice extracellulaire
MMP: métalloprotéinase
oACM: occlusion de l'ACM
PAD: pression artérielle diastolique
PAS: pression artérielle systolique
PBS: *phosphate buffer saline*
PWI: *perfusion-weighted imaging*
RGTA: ReGeneraTing Agent
ROS: espèces radicalaires de l'oxygène
rt-PA: *recombinant tissue plasminogen activator* (activateur tissulaire recombinant du plasminogène)
SD: Sprague dawley
SDF-1: *stromal cell-derived factor*-1
SHR: *spontaneously hypertensive rats*
SVF: sérum de veau fœtal
TGF-β: *transforming growth factor-β*
TNF-α: *tumor necrosis factor-α*
VE: vésicule extracellulaire
VEGF: vascular endothelial growth factor
ZSG: zone sous granulaire
ZSV: zone sous-ventriculaire

Liste des Figures et des tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Visualisation schématique du polygone de Willis

Figure 2 : Visualisation schématique du territoire vasculaire de l'artère cérébrale moyenne

Figure 3 : Modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (oACM) chez le rat

Figure 4 : Homonculus moteur et sensitif

Figure 5 : Évolution de la connaissance, de la part traitée et contrôlée de l'hypertension artérielle (HTA)

Figure 6 : Autorégulation du débit sanguin cérébral

Figure 7: Remodelage de la structure des artères par l'hypertension artérielle chronique

Figure 8: Risque de survenue d'un AVC ischémique selon la consommation d'alcool quotidienne par sexe

Figure 9 : Facteurs de risque de l'AVC

Figure 10 : Action du rt-PA dans l'ischémie cérébrale

Figure 11 : Débit sanguin cérébral (DSC) de la pénombre et du cœur ischémique

Figure 12 : Illustration schématique du mismatch PWI/DWI

Figure 13 : Définition de la pénombre ischémique selon les indicateurs biochimiques

Figure 14 : Expression de la protéine Hsp70 dans de la pénombre ischémique

Figure 15 : Schématisation de la cascade ischémique

Figure 16 : Résumé des évènements de la cascade ischémique

Figure 17 : Vue schématique de l'unité neurovasculaire formant la BHE

Figure 18 : Rôle de la MMP9 dans la transformation hémorragique

Figure 19 : Relation entre le taux du TNF-α (pg/ml) et le score SSS 24h après l'AVC

Figure 20 : Vue schématique de l'astrogliose après une ischémie cérébrale

Figure 21 : Cinétique des mécanismes endogènes de neuroprotection et de régénération cérébrale

Figure 22 : Activation corticale après stimulation du membre contro- ou ipsi-latéral

Figure 23 : Implication du VEGF et l'Ang-2 dans l'angiogenèse

Figure 24 : Dosage plasmatique du VEGF chez des patients ayant eu un AVC ischémique

Figure 25 : Expression de la DCX après une ischémie cérébrale

Figure 26 : Neurogenèse dans le striatum après ischémie cérébrale focale transitoire

Figure 27 : Les trois compartiments majeurs de la MEC dans le SNC
Figure 28 : Structure et synthèse des chaines des glycosaminoglycanes
Figure 29 : Rôles des HSPGs dans les cellules et les tissus
Figure 30 : Rôle des HSPGs dans l'activation du récepteur au FGF
Figure 31 : Différents traitements neuroprotecteurs ciblant la cascade ischémique après une ischémie cérébrale
Figure 32 : Le nombre de Q-CMNs en fonction du temps
Figure 33 : Le potentiel thérapeutique des facteurs sécrétés par les CSMs
Figure 34 : Effet immunomodulateur des CSMs
Figure 35 : Effet pléitrope des CSMs
Figure 36 : Mode d'action du RGTA après une lésion tissulaire
Figure 37 : Effet du RGTA sur les facteurs de croissance et les CSMs
Figure 38 : Protocoles des études menées
Figure 39 : Modèle intraluminale d'induction une ischémie cérébrale focale
Figure 40 : Score neurologique
Figure 41 : Test de placement de pattes
Figure 42 : Test de du coin
Figure 43 : Test de du cylindre
Figure 45 : Dispositif du test de l'open-field
Figure 46 : Test de la poutre
Figure 47 : Protocole de l'étude 1 : Effet du RGTA sur la neuroprotection et la régénération après une ischémie cérébrale
Figure 48 : Étude de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) à différents temps après une ischémie cérébrale focale transitoire chez le rat (modèle OACM 1h)
Figure 49 : Protocole de l'étude 2 : Effet du RGTA associé aux CSMs sur la neuroprotection et la récupération fonctionnelle après une ischémie cérébrale

Liste des tableaux

Tableau 1 : Symptômes de l'AVC ischémique selon la région cérébrale touchée

Tableau 2 : Exemple d'IRMs après un AVC

Tableau 3 : Les dispositifs de thrombectomie mécanique et leurs mécanismes d'action

Tableau 4 : Essais cliniques utilisant les CSMs pour le traitement de l'AVC ischémique

Avant-propos

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est causé par une diminution du flux sanguin dans le tissu cérébral, induisant des déficits neurologiques. Cette pathologie est la première cause d'handicap acquis chez l'adulte dans les pays industrialisés. À l'échelle de l'Union Européenne, la prise en charge des soins des patients ayant subi un AVC représente un poids de plus 64 milliards d'euros (Gustavsson et *al.,* 2011). À l'heure actuelle, l'arsenal thérapeutique pour le traitement de l'AVC est très réduit. Si le patient n'est pas pris en charge dans un interval de 6 h après la survenue de l'AVC, seule la rééducation est possible pour potentiellement réduire son handicap. Ce manque de traitements accentue l'importance de la recherche de nouvelles thérapies pour protéger le cerveau et restaurer les fonctions neurologiques perdues suite à l'AVC.

Dans l'introduction de ce manuscrit seront développés l'épidémiologie, les symptômes, les facteurs de risque ainsi que les traitements disponibles à la suite d'un AVC. Les différents évènements cellulaires survenant pendant et après l'ischémie cérébrale seront également décrits, pour exposer les nouvelles thérapies moléculaires et cellulaires en cours de développement. Seront particulièrement étudiées les thérapies à base d'agents de la matrice extracellulaire (MEC), ainsi que les thérapies cellulaires à base de cellules souches mésenchymateuses (CSMs).

Le premier objectif de cette thèse est l'étude de l'effet d'un agent de la MEC (le RGTA pour ReGenaraTing Agent) sur la neuroprotection, la régénération et la placticité cérébrale, ainsi que sur la récupération fontionnelle après une ischémie cérébrale focale chez le rat.

Le deuxième objectif est d'étudier la potentialisation des CSMs par le RGTA, pour l'amélioration de la neuroprotection et la récupération fonctionnelle après une ischémie cérébrale, chez des rats normo- et hyper-tendus.

Afin d'étayer notre démarche expérimentale, l'introduction bibliographique de cette thèse comprendra trois grands chapitres. Le premier est consacré aux généralités sur l'AVC (épidémiologie, symptômes cliniques, facteurs de risque, traitements actuels,…). Le deuxième chapitre est consacré à la physiopathologie de l'AVC reperenant de façon non exhaustive les évènements moléculaires et cellulaires ayant lieu lors de la phase aiguë et chronique de la pathologie (cascade ischémique, dégradation de la barrière hémato-encéphalique (BHE), inflammation, réaction gliale, mécanismes de réparation tissulaire et de plasticité cérébrale). Enfin dans le dernier chapitre, sont décrits les nouveaux traitements cellulaires et moléculaires en cours de développement pour la neuroprotection et la réparation tissulaire après une ischémie cérébrale.

1 INTRODUCTION

L'AVC est un problème de santé publique et économique majeur. Dans le monde, on compte approximativement 56 millions de morts par an, parmi lesquels on dénombre 5,5 millions de morts dus à l'AVC, ce qui représente 9,7% des morts annuels (Mukherjee et *al.,* 2011). En France, l'AVC touche plus de 150000 patients par an (Lecoffre et *al.,* 2017).

La prévalence et la gravité de cette pathologie, font d'elle la 3ème cause de mortalité dans les pays industrialisés pour les hommes et la 1ère pour les femmes. L'AVC est aussi la 1ère cause d'handicaps acquis chez l'adulte qui peuvent être moteurs et / ou cognitifs incluant la dépression et la démence. (Hackett *et al.* 2005).

Les AVCs sont caractérisés par la survenue brutale d'un déficit neurologique focal. C'est une pathologie fréquente et grave. Elle constitue une urgence et nécessite une intervention médicale voire chirurgicale. Dans cette pathologie, les récidives représentent un quart des AVCs, augmentant l'intérêt non seulement de la prise en charge rapide mais aussi du suivi des patients.

L'AVC peut survenir à n'importe quel âge, y compris pendant l'enfance. Cependant l'âge est un facteur de risque important; 75% des patients atteints d'AVC ont plus de 65 ans (HAS (haute autorité de santé) 2015 ; (De Peretti *et al.* 2012; Lecoffre *et al.* 2017)

Le terme AVC regroupe plusieurs pathologies neurovasculaires artérielles. Elles sont représentées par :

- les ischémies cérébrales (85% des AVCs), eux-mêmes regroupant deux sous catégories :
    - AIT : accidents ischémiques transitoires
    - Infarctus cérébraux
- les hémorragies cérébrales (15% des AVCs).

1.1 Généralités sur l'AVC

Deux types majeurs d'AVC peuvent affecter le tissu cérébral : l'AVC ischémique et l'AVC hémorragique représentant 85% et 15% des AVCs, respectivement (Alexandru *et al.* 2017). Seule la physiopathologie de l'AVC ischémique qui fait l'objet de cette thèse, sera détaillée.

L'AVC survient lorsque l'apport sanguin cérébral est réduit ou arrêté dans une région cérébrale. Cet arrêt de la circulation sanguine est causé par l'obstruction d'une artère cérébrale par un thrombus issu de la formation d'une plaque d'athérome et / ou d'un caillot sanguin. Si les besoins métaboliques du tissu cérébral ne sont alors plus satisfaits, l'ischémie induit une mort neuronale ayant pour conséquence des dysfonctionnements sensorimoteurs et / ou cognitifs dépendamment de la région cérébrale affectée et donc de l'anatomie vasculaire cérébrale (Rama *et al.* 2012).

1.1.1 Anatomie de la vascularisation artérielle cérébrale

La vascularisation cérébrale peut-être divisée en 2 grands réseaux. Le réseau antérieur originaire des carotides donne 2 artères majeures : l'artère cérébrale antérieure (ACA) et moyenne (ACM). L'artère cérébrale postérieure (ACP) provient du réseau postérieur qui a pour origine l'artère basilaire qui elle-même provient des artères vertébrales (Gosseaume *et al.* 2016).

Le cercle de Willis est une anastomose entre le réseau antérieur et postérieur via les artères communicantes postérieures, et entre les deux hémisphères via les artères communicantes antérieures. Ainsi le cercle de Willis, peut protéger contre une ischémie cérébrale en cas d'occlusion carotidienne unilatérale (Jung *et al.* 2013). De cette bonne vascularisation dépend la récupération des patients après une atteinte vasculaire. Cependant, la structure du polygone de Willis est très variable et peut ne pas combler les besoins tissulaires en cas d'ischémie (Iqbal 2013; Jung *et al.* 2013; Won *et al.* 2013) (figure 1)

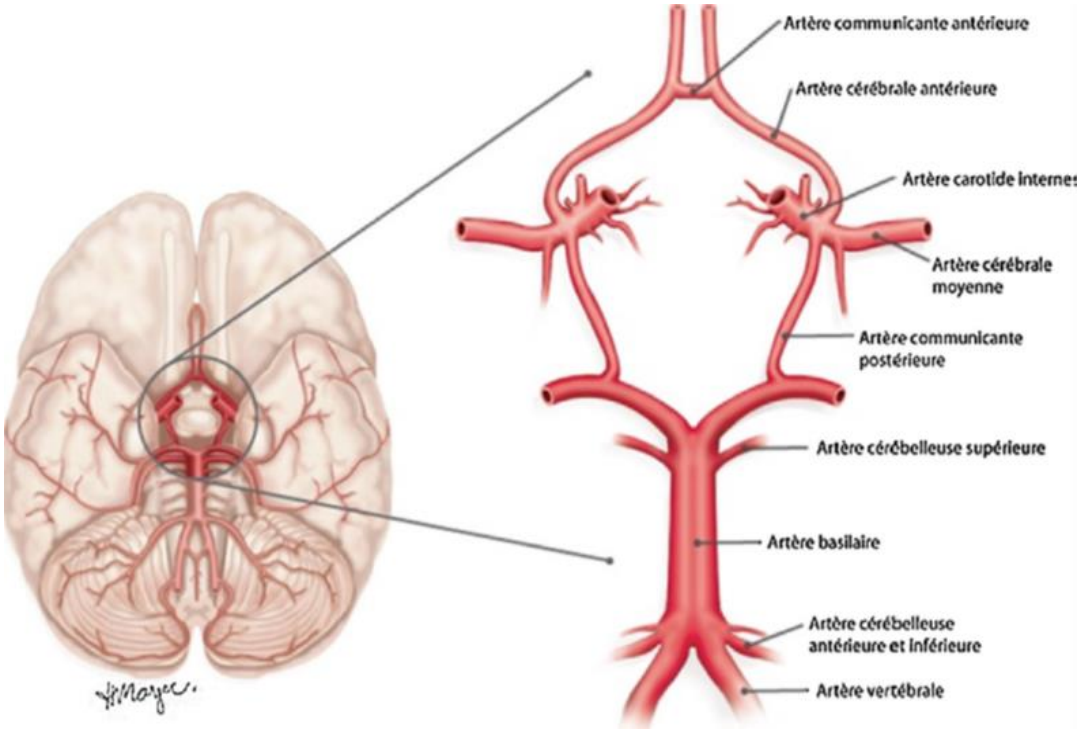


Figure 1 : **Visualisation schématique du polygone de Willis** (d'après gosseaume et *al.* 2016)

Le territoire irrigué par l'ACM comprend plusieurs régions aux fonctions différentes : sensorielles, motrices et cognitives, ce qui lui donne une place majeure dans l'ischémie cérébrale (Macrae 2011). Chez l'Homme, cette artère chemine dans la scissure latérale (sylvienne). Elle abandonne de nombreuses branches collatérales superficielles qui vont irriguer la face latérale du cerveau : cortex frontal, pariétal et temporal. Les branches profondes participent à la vascularisation du noyau lenticulaire et de la partie antérieure de la capsule interne. La partie supérieure des radiations optiques est également irriguée par l'ACM (Blumenfeld et *al*., 2010) (figure 2).

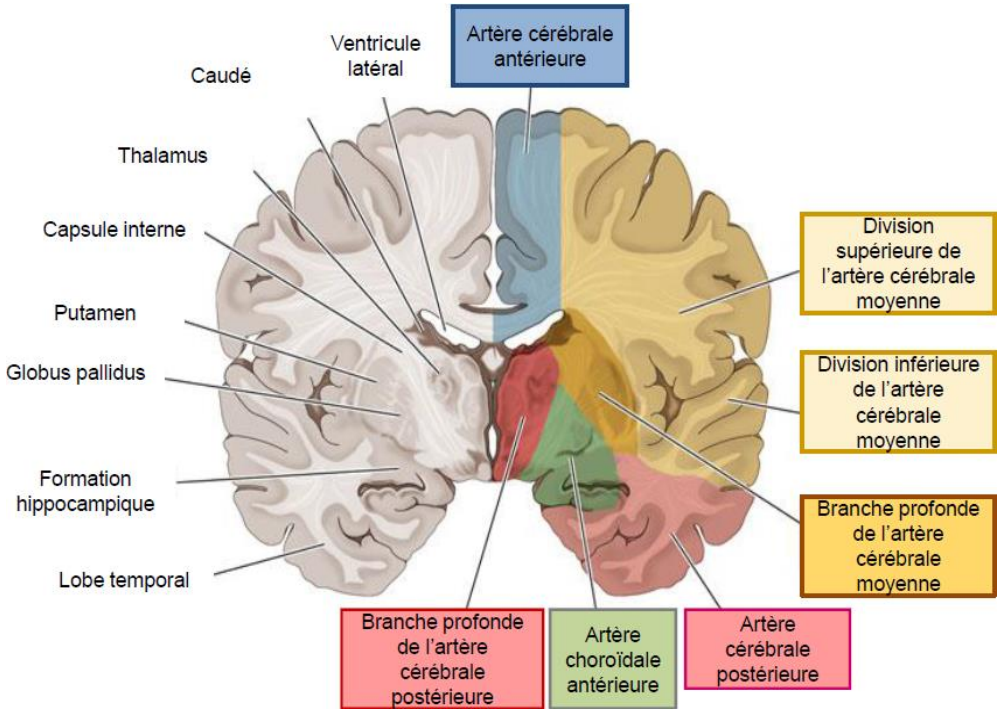


Figure 2 : **Visualisation schématique du territoire vasculaire de l'artère cérébrale moyenne** (d'après Blumenfeld et *al.*, 2010)

Les rats présentent une vascularisation analogue aux humains. En effet, la distribution anatomique de l'ACA, l'ACP, et l'ACM, chez les rats est similaire aux humains (Longa *et al.* 1989). Même si des différences subsistent telle l'absence de l'artère communicante antérieure, l'irrigation du thalamus et des ganglions de la base reste similaire (Longa et *al.*, 1989). Grâce à cette similarité vasculaire, l'occlusion de l'ACM (oACM) chez le rat représente le modèle le plus utilisé en recherche préclinique (Macrae 2011) (figure 3).

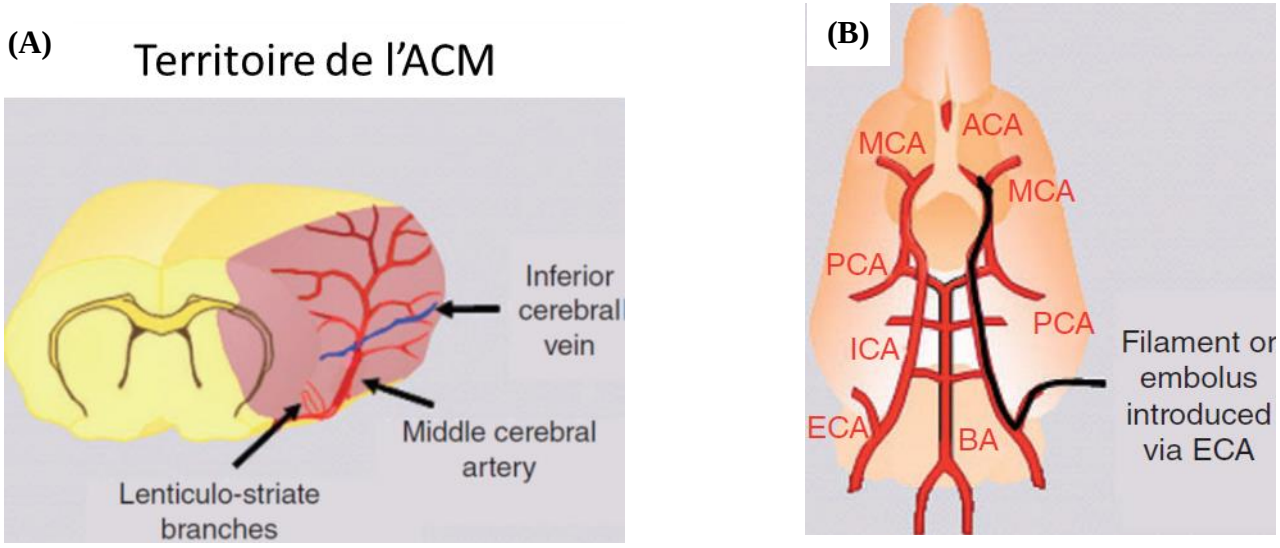


Figure 3 : **Modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (oACM) chez le rat.**

(A) Le territoire vasculaire de l'ACM chez le rat. **(B)** Modèle d'oACM avec un filament intraluminal. (D'après Macrae 2011). MCA : artère cérébrale moyenne (ACM), PCA : artère cérébrale postérieure (ACP), ICA : artère carotide interne, ECA : artère carotide externe, BA : artère basillaire

Plusieurs modèles d'oACM sont utilisés (voir pour revue(Macrae 2011)). Dans nos études, nous avons fait le choix du modèle d'oACM avec un filament intraluminal. Ce modèle présente l'avantage d'une bonne reproductibilité, avec une chirurgie facile, rapide et sans craniotomie (Macrae 2011). Cependant, ce modèle présente aussi des désavantages. On peut citer par exemple, l'impossibilité de confirmer visuellement la bonne occlusion de l'ACM, ou même l'impossibilité d'étudier la thrombolyse (Macrae 2011). La technique d'induction de l'ischémie avec ce modèle est détaillée dans la partie « matériels et méthodes ».

1.1.2 Symptômes cliniques

Les symptômes de l'AVC dépendent de la région cérébrale touchée et de la durée de l'ischémie. Les déficits moteurs peuvent être dus à l'atteinte du cortex moteur primaire et/ou de la capsule

interne. Ces symptômes peuvent se manifester par des déficits au niveau des membres supérieurs et inférieurs ainsi que de l'hémiface.

Les infarctus sylviens peuvent être de divers types car ils sont susceptibles d'atteindre des régions cérébrales plus ou moins profondes et plus ou moins étendues. Les déficits sensitifs peuvent se manifester par une hémianopsie (perte du champ visuel) controlatérale, accompagnée ou non d'une hémianesthésie (perte de la sensibilité). D'un point de vue cognitif, l'atteinte temporale et/ou frontale peut induire une aphasie (perte de l'expression par le langage) où le patient ne retrouve plus ses mots ou emploi des mots inappropriés, ainsi que des troubles de la mémoire. D'autres symptômes peuvent aussi se manifester tels l'hémiasomatognosie correspondant à la difficulté du patient à situer son corps dans l'espace, ou une anosognosie où le patient ne reconnait pas son état pathologique (Figure 4) (Tableau 1). Il existe plusieurs échelles permettant d'évaluer et de suivre l'évolution des déficits neurologiques des patients, comme l'échelle modifiée de Rankin, l'indice de Barthel ou le score NIHSS (*National Institute of Health Stroke Score)* (HAS 2009). Ces échelles sont basées sur des items évaluant plusieurs fonctions motrices et sensitives des patients.

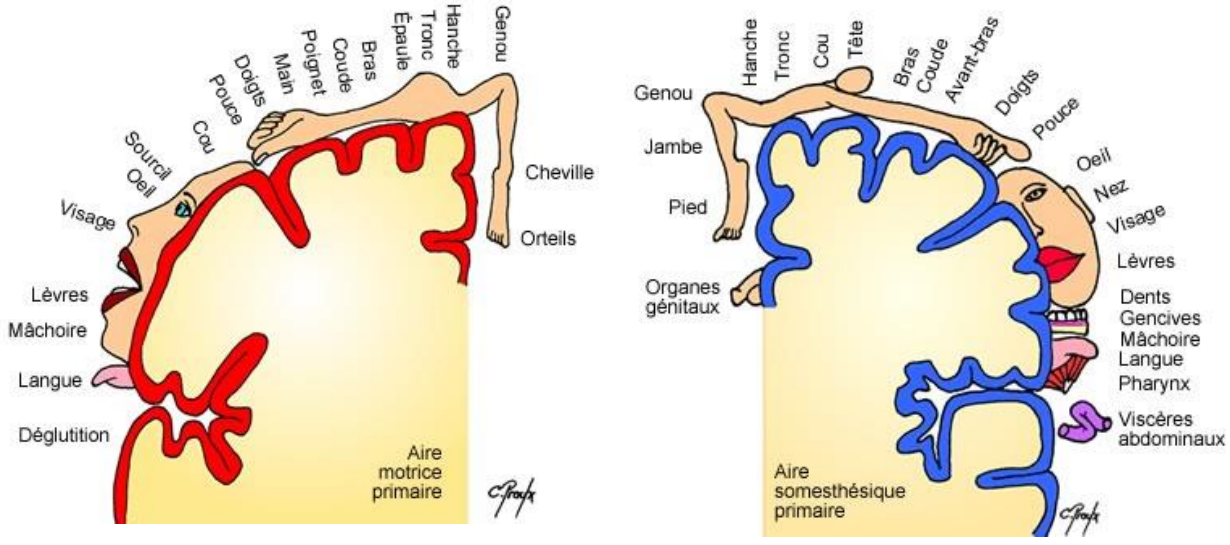


Figure 4 : **Homonculus moteur et sensitif.**

Homonculus moteur et sensitif correspondant aux territoires d'irrigation de l'artère cérébrale antérieure (ACA), et l'artère cérébrale moyenne (ACM). (D'après http://www.cours-pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html)

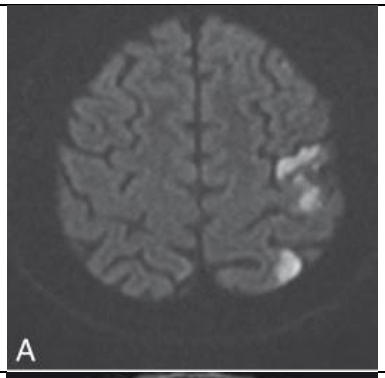
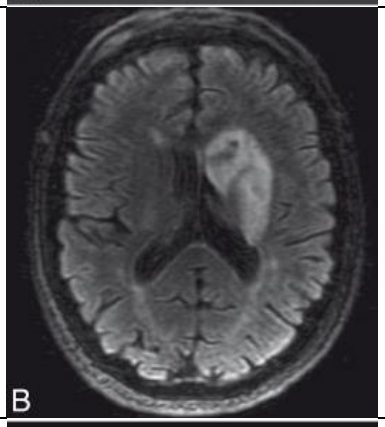
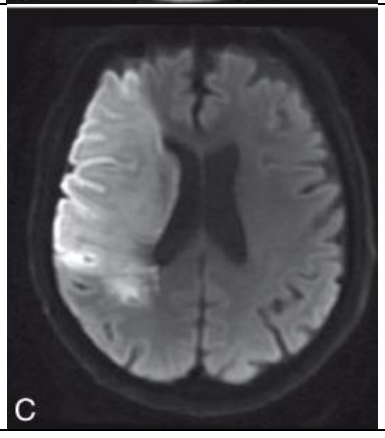
Infarctus cérébraux sylviens	**Symptômes**	**Exemple d'imagerie**
Superficiels	- Hémiplégie à prédominance brachiofaciales - Troubles sensitifs - Hémianopsie latérale homonyme - Aphasie	
Profonds	- Hémiplégie massive proportionnelle (atteinte de la capsule interne)	
Superficiels et profonds	- Hémiplégie proportionnelle et hémianesthésie - Aphasie - Déviation de la tête et des yeux vers la lésion - Troubles de conscience	

Tableau 1 : **Symptômes de l'AVC ischémique selon la région cérébrale touchée**

A Infarctus Sylvien superficiel gauche (IRM séquence diffusion). **B** Infarctus Sylvien profond gauche (IRM séquence FLAIR). **C** Infarctus Sylvien total droit (IRM séquence de diffusion) (adapté du collège des enseignants en neurologie, édition 2016)

1.1.3 Facteurs de risque

La sensibilisation, et la prévention expliquent la diminution de la mortalité due aux AVCs dans la seconde moitié du 20ème siècle. Cette prévention concerne la prise en compte de plusieurs facteurs de risques qui contribuent au développement des maladies cardiovasculaires et à l'apparition de l'AVC, dont l'hypertension artérielle, le diabète, le tabagisme, la sédentarité, et la nutrition non adaptée (Mozaffarian et *al.*, 2015). Ces facteurs se divisent en deux sous-catégories, on retrouve les facteurs de risque non modifiables et modifiables.

1.1.3.1 Les facteurs de risque non modifiables

Les facteurs de risque non modifiables regroupent l'âge, le sexe, les facteurs génétiques et ethniques. En ce qui concerne l'âge, à partir de 55 ans, le taux d'AVCs est multiplié par 2 à chaque tranche d'âge de 10 ans. Le sexe influe également sur le risque d'AVC, car les hommes courent un plus grand risque de survenue de maladies cardiovasculaires par rapport aux femmes avant la ménopause. Enfin les facteurs génétiques et l'origine ethnique peuvent influencer la survenue des maladies cardiovasculaires puisque les personnes d'origine africaine ont un risque accru de survenue de ces maladies (Béjot *et al.* 2009).

1.1.3.2 Les facteurs de risque modifiables

Hypertension artérielle (HTA)

Selon l'OMS et l'agence nationale de santé, l'hypertension artérielle (HTA) est définie par une mesure supérieure à 140 mmHg et 90 mmHg de la pression artérielle systolique (PAS) et diastolique (PAD) respectivement. La pression artérielle étant définie comme la force du sang exercée sur la paroi des artères.

Les données issues de l'enquête nationale Esteban montrent que la prévalence de l'HTA en France est de 30,6%, celle-ci est plus élevée chez les hommes que chez les femmes (36,5% contre 25,2%)

et connait une croissance avec l'âge. Cette étude montre également que seulement 1 personne sur 2 a connaissance de sa condition d'hypertendue. Parmi les personnes hypertendues, seule une moitié (47%) est traitée avec un antihypertenseur. Parmi les personnes traitées, seulement la moitié (55%) avaient une pression artérielle contrôlée (Perrine 2018). Ces données montrent clairement que le problème de l'HTA est loin d'être résolu (figure 5). Dix millions de morts par an dans le monde sont dus à l'HTA. Elle constitue le principal facteur de risque de l'AVC, multipliant par 4 et par 10 le risque de survenue d'un AVC ischémique et hémorragique, respectivement. En effet, pour chaque augmentation de la PAS/PAD de 20/10 mmHg la mortalité cardiovasculaire double en conséquence (Perrine 2018).

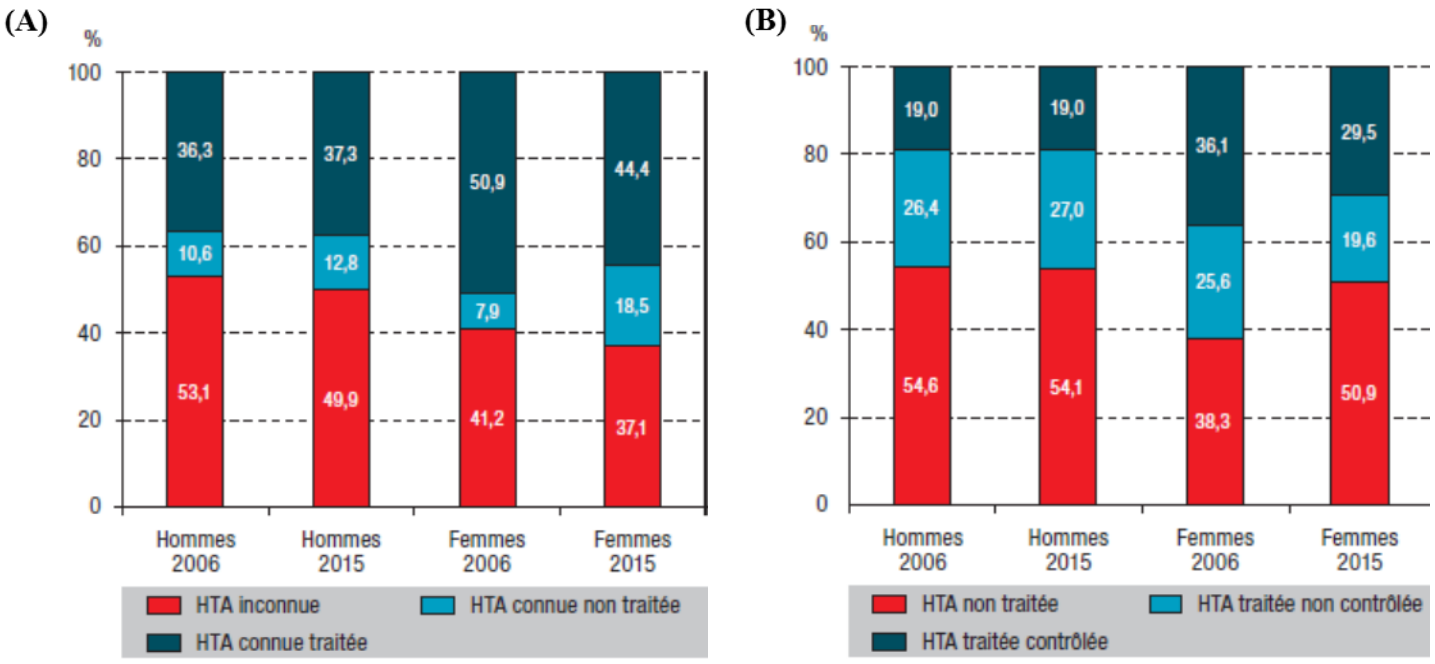


Figure 5 : **Evolution de la connaissance, de la part traitée et contrôlée de l'hypertension artérielle (HTA).** **(A)** Évolution de la connaissance de l'HTA selon le sexe, entre 2006 et 2015. **(B)** Évolution de la part traitée et contrôlée de l'HTA en France entre 2006 et 2015 selon le sexe (D'après Perrine 2018)

De plus, l'HTA est un facteur aggravant, augmentant les lésions cérébrales après la survenue de l'AVC (Kumar 2016). Une méta-analyse de 12 études cliniques regroupant 518520 participants a confirmé le lien entre l'HTA et l'AVC (M. Lee *et al.* 2011). La prévalence de l'HTA chez les patients ayant eu un AVC se situe entre 60% et 80% (B. J. Kim *et al.* 2016). De plus, 51% des AVCs induisant la mort des patients sont attribuables à l'HTA (B. J. Kim *et al.* 2016).

Plusieurs facteurs dus à l'HTA prédisposent aux AVCs. En effet, l'HTA favorise les conditions thrombophiles telles la fibrillation atriale, ou les cardiopathies ischémiques (B. J. Kim *et al.* 2016). Ces effets sont notamment dus à l'altération de l'autorégulation du flux sanguin cérébral, qui dépend du tonus et de la réactivité vasculaire. L'HTA cause des altérations morphologiques des artères cérébrales, augmente la résistance artérielle, et les dommages causés par l'AVC (Dorrance 2016)

En condition physiologique, la réactivité vasculaire régule le débit sanguin cérébral (DSC) en cas de variation de la pression artérielle dans un interval compris entre 50 et 150 mmHg. En effet, l'augmentation de la pression artérielle dans cet intervalle, induit une vasoconstriction artérielle pour un maintien d'un DSC constant (Dorrance 2016).

En condition d'HTA chronique, le plateau de l'autorégulation est déplacé vers un seuil minimal de pression artériel plus important (courbe verte, figure 6) rendant la diminution du DSC plus précoce en cas de réduction de la pression de perfusion.

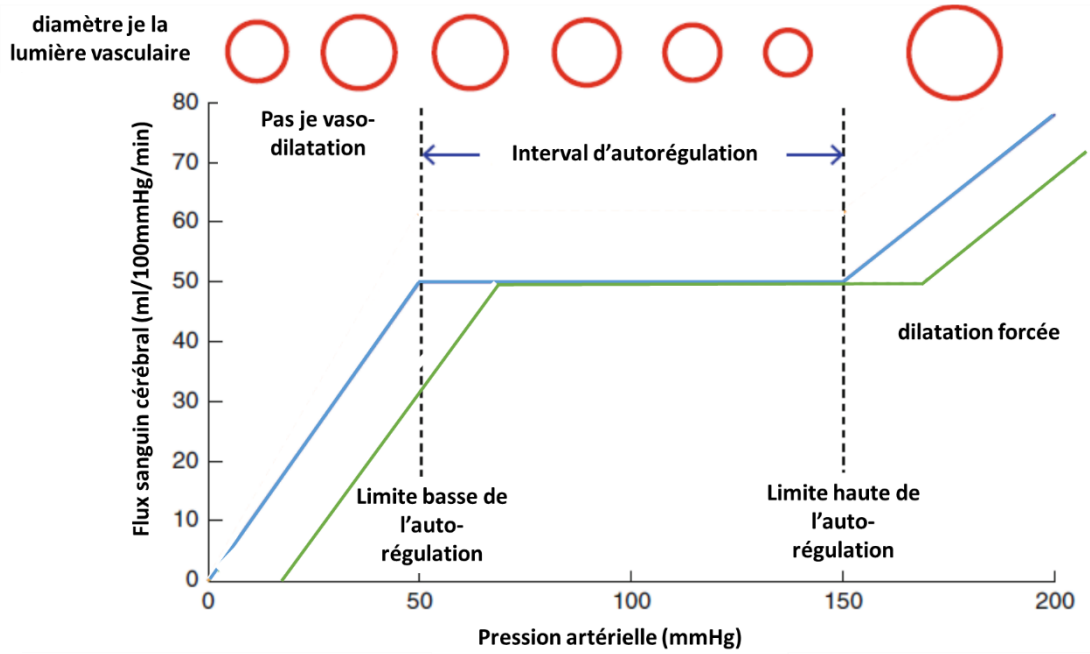


Figure 6 : **Autorégulation du débit sanguin cérébral.**

Les limites de l'autorégulation physiologique sont comprises entre 50 et 150 mmHg. La ligne bleue représente l'autorégulation en cas de normotension. La ligne verte représente l'autorégulation en cas d'hypertension artérielle chronique. Les cercles rouges représentent l'effet de la pression artérielle sur le diamètre de la lumière vasculaire des artères cérébrales (D'après Dorrance 2016)

Cette autorégulation en condition d'hypertension peut amener à la modification de la structure artérielle et une réduction de la lumière vasculaire selon un remodelage eutrophique ou hypertrophique. Dans le remodelage eutrophique, un réarrangement des cellules musculaires lisses conduit à une réduction de la lumière vasculaire sans augmentation de l'épaisseur de la média (couche de muscles lisses vasculaires). Le remodelage hypertrophique est quant à lui à une hypertrophie de la média menant à une réduction de la lumière vasculaire. L'HTA, par l'augmentation du collagène vasculaire, a pour conséquence un durcissement des vaisseaux diminuant leur vascoréactivité (Schiffrin 2004; Izzard *et al.* 2006; Dorrance 2016). Cette modification vasculaire, diminue la capacité de la vasodilatation perturbant le fonctionnement

vasculaire et présente un risque de thrombophilie menant à une ischémie cérébrale (Pires *et al.* 2013) (figure 7).

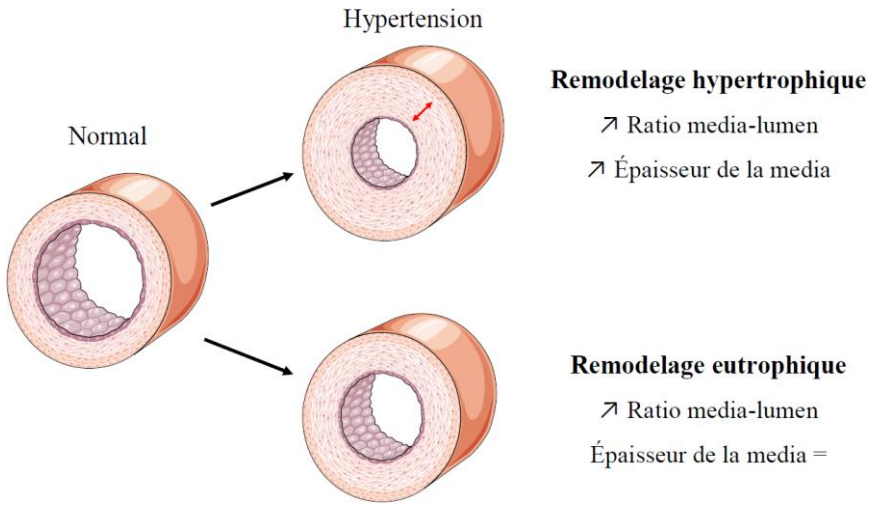


Figure 7: **Remodelage de la structure des artères par l'hypertension artérielle chronique**.
L'hypertension artérielle chronique, par un remodelage eutrophique ou hypertrophique, induit la diminution de la lumière vasculaire (D'après Schiffrin et *al.* 2004 ; Izzard et *al.* 2006 ; Dorrance 2016)

Le tabagisme

Les effets du tabac sur les fonctions cardiovasculaires sont bien connus. Une corrélation positive est établie entre le risque de survenue d'AVC et le taux et la fréquence de tabagisme. La tabagisme est la cause directe de la survenue de 20% des AVCs (O'Donnell *et al.* 2010). En effet, le tabac augmente de 2 fois le risque de développer un AVC (Lloyd-Jones *et al.* 2010).

Le tabac altère les vaisseaux en diminuant leur réactivité et favorise l'apparition et le développement des plaques d'athéromes. Parallèlement, le tabac augmente la viscosité du sang, augmente le taux de fibrinogène et l'agrégation plaquettaire (Shah *et al.* 2010). La combinaison de

ces facteurs favorise alors le détachement des plaques d'athérome et la formation de thrombus, qui peuvent se loger dans une artère cérébrale

L'alcool

En France, le taux de consommation d'alcool pur est en décroissance depuis 1950. Cependant le mode de consommation change d'une consommation régulière modérée vers une consommation occasionnelle forte, en particulier chez les jeunes (F. Beck *et al.* 2014). Même si le lien entre l'alcool et les AVCs est sujet à débat, une méta-analyse a montré qu'une consommation modérée n'était pas corrélée positivement à la survenue d'AVCs, alors qu'une forte consommation aigue est corrélée à la survenue d'AVCs (Patra *et al.* 2010) (figure 8). Cependant, aucune étude n'a établi de façon claire un mécanisme direct par lequel l'alcool augmenterait le risque d'AVCs.

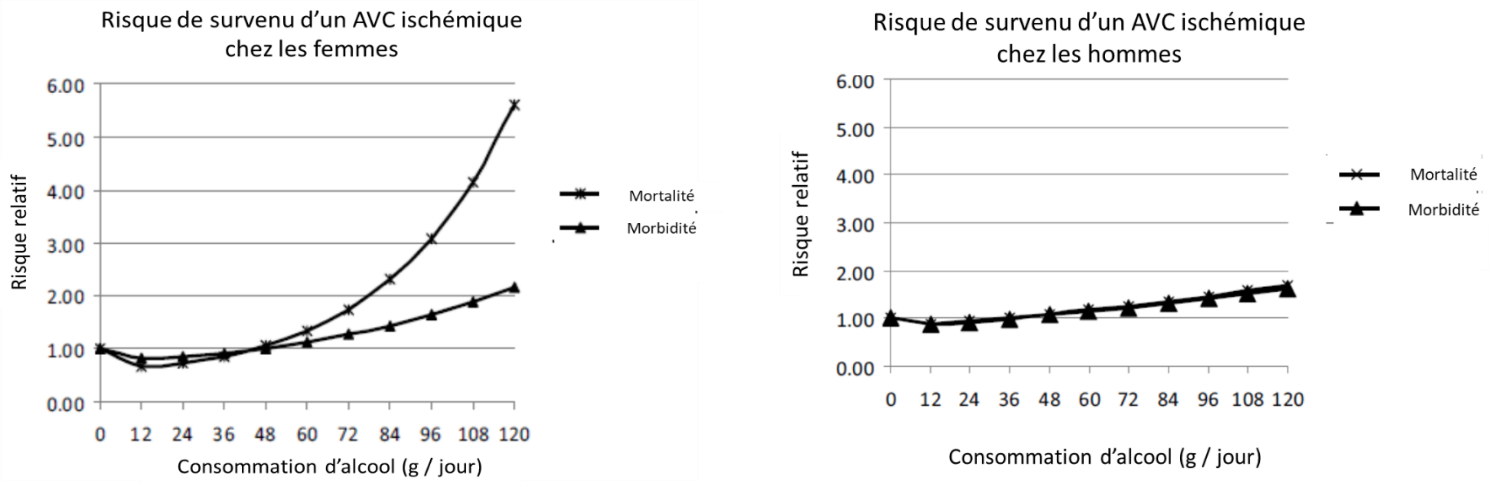


Figure 8 : **Risque de survenue d'un AVC ischémique selon la consommation d'alcool quotidienne par sexe** (D'après Patra et *al.*, 2010).

L'obésité

L'obésité est définie par une surcharge de masse graisseuse et est quantifiée par l'indice de masse corporelle. Est considérée comme obèse une personne présentant un indice de masse corporelle supérieur ou égal à 30.

En France, la prévalence du surpoids et de l'obésité suit une tendance tout aussi importante. Le surpoids touche 41% des hommes et 25,3% des femmes, et l'obésité touche environ 15,8% et 15,6% d'hommes et de femmes respectivement (Matta *et al.* 2016). L'obésité est un facteur de risque important puisque 26% des AVCs sont dus à l'obésité (O'Donnell *et al.* 2010). En effet, cette dernière altère le système cardiovasculaire, notamment par dépôt lipidique au niveau des parois artérielles et favorise la formation de thrombus, et l'apparition d'AVCs (Suk *et al.* 2003) (figure 9).

Facteurs de risque des infarctus cérébraux.

Risque relatif	
1. HTA	× 4
2. Hypercholestérolémie	× 1,5
3. Tabac	× 1,5
4. Diabète	× 2
5. Alcool (> 2 verres par jour)	× 1,9
6. Obésité	× 2
7. Contraceptifs oraux	× 2
8. Hyperhomocystéinémie	× 2
9. Cardiopathies emboligènes (55)	× 5
Facteurs de risque non modifiables	
1. Âge	× 2 après 55 ans pour chaque tranche d'âge de 10 ans
2. Sexe	× 1,25 chez l'homme

HTA : hypertension artérielle.

Figure 9 : **Facteurs de risque de l'AVC**

Le risque relatif de la survenue de l'AVC pour chaque facteur de risque (D'après Béjot et *al.*, 2010).

Autres facteurs de risque : Les maladies génétiques

Plusieurs maladies génétiques peuvent être impliquées dans l'apparition d'un AVC : la maladie de Fabry (mutation du gène de l'alpha galatosidase A), le CADASIL (artériopathie cérébrale autosomique dominante avec infarctus sous-corticaux et leucoencéphalopathie) (mutation du gène Notch 3), le syndrome MELAS (encéphalopathie mitrochondriale, acidose lactique et épisodes déficitaires neurologiques), la maladie de moyamoya ou encore la drépanocytose (Barrett *et al.* 2014). Cette dernière est la maladie génétique la plus répandue dans le monde, elle concerne 300000 à 400000 naissances par an (Kato *et al.* 2018). Cette maladie génétique à transmission autosomique récessive est issue d'une mutation du gène codant la sous-unité beta de l'hémoglobine (Hb).

L'Hb est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités alpha et deux sous-unités bêta. La mutation sur la sous-unité bêta forme alors ce qu'on appelle l'hémoglobine S (HbS). L'HbS donne une forme falciforme des globules rouges qui est caractéristique de la pathologie. Les globules falciformes ont une durée de vie réduite (10 à 20 jours, alors que l'Hb normale dure 3 à 4 mois dans l'organisme), et une faible capacité de liaison de l'oxygène puisque sa forme désoxygéner a tendance à s'agréger formant des caillots sanguins. Cette agrégation induit une anémie hémolytique et des crises vaso-occlusives qui peuvent toucher des artères cérébrales et induire un AVC ischémique.

1.1.4 Diagnostique par imagerie à résonnance magnétique (IRM)

L'imagerie cérébrale (scanner ou IRM) est nécessaire pour établir le diagnostic de l'AVC et la détermination des modalités de la prise en charge du patient. Avec une sensibilité nettement supérieure au scanner ; l'IRM, quand elle est accessible, représente le meilleur moyen d'établir un diagnostic fiable et rapide après la survenue de l'AVC (Roldan-Valadez *et al.* 2014).

Ce type d'imagerie permet dès les premières heures de l'AVC, de diagnostiquer un AVC et de distinguer un AVC hémorragique d'un AVC ischémique, permettant d'adapter au mieux la prise en charge du patient. L'IRM permet d'utiliser plusieurs séquences d'imagerie (diffusion DWI, perfusion PWI, T2/FLAIR, T2*, 3D-TOF) pour bien caractériser l'étendu des dommages cérébraux (Roldan-Valadez *et al.* 2014).

Séquence de diffusion DWI (diffusion-weighted imaging)

Cette séquence d'IRM permet de visualiser l'atteinte tissulaire de manière très précoce (quelques minutes) par une hyperintensité au niveau d'un territoire artériel. Cette séquence permet de quantifier le coefficient de diffusion apparent (ADC) qui est diminué en cas d'œdème cytotoxique, permettant de mettre en évidence une zone d'hyposignal.

Lors de la phase très précoce de l'AVC, l'œdème cytotoxique correspond à un œdème cellulaire dû à la rétention d'eau dans le cytoplasme. L'ADC quant à lui est un coefficient de diffusion reflétant l'amplitude de mouvement des molécules d'eau. Le signal obtenu à partir des cartes d'ADC permet de confirmer alors la précocité d'un AVC, car une lésion ischémique établie aura un profil contraire à celui d'une lésion aiguë ; c'est-à-dire qu'elle présentera une imagerie de diffusion en hyposignal accompagnée d'une augmentation de l'ADC (Oppenheim *et al.* 2002) (tableau 2).

Séquence $T2^*$ (ou écho de gradient)

La séquence $T2^*$ permet d'identifier l'AVC hémorragique intra-parenchymateux en hyposignal et permet donc de considérer un traitement thrombolytique en cas d'infarctus ischémique (tableau 2).

Séquence T2/FLAIR (Fluid attenuated inversion-recovery)

Cette séquence d'IRM permet aussi de visualiser les infarctus récents (quelques heures) et l'identification des AVCs anciens. En hypersignal, une occlusion peut être détectée de façon précoce, éliminant ainsi une origine non vasculaire des troubles neurologiques observés (Toyoda *et al.* 2001) (tableau 2)

Séquence de perfusion PWI (perfusion-weighted imaging)

En clinique, la séquence de perfusion n'est pas faite de façon systématique. Elle permet de visualiser en $T2^{*}$ la zone hypoperfusée par absence de passage du produit de contraste : le gadolinium. Cependant, cette séquence est d'un grand intérêt car par un mismatch diffusion/perfusion on peut visualiser l'étendue de la pénombre ischémique, zone cible des stratégies thérapeutiques de reperfusion et neuroprotection (Kakuda *et al.* 2008).

Séquence time of flight (3D-TOF)

C'est une séquence d'angio-RM ou ARM qui permet de visualiser les branches du polygone de Willis, et d'observer une occlusion artérielle.

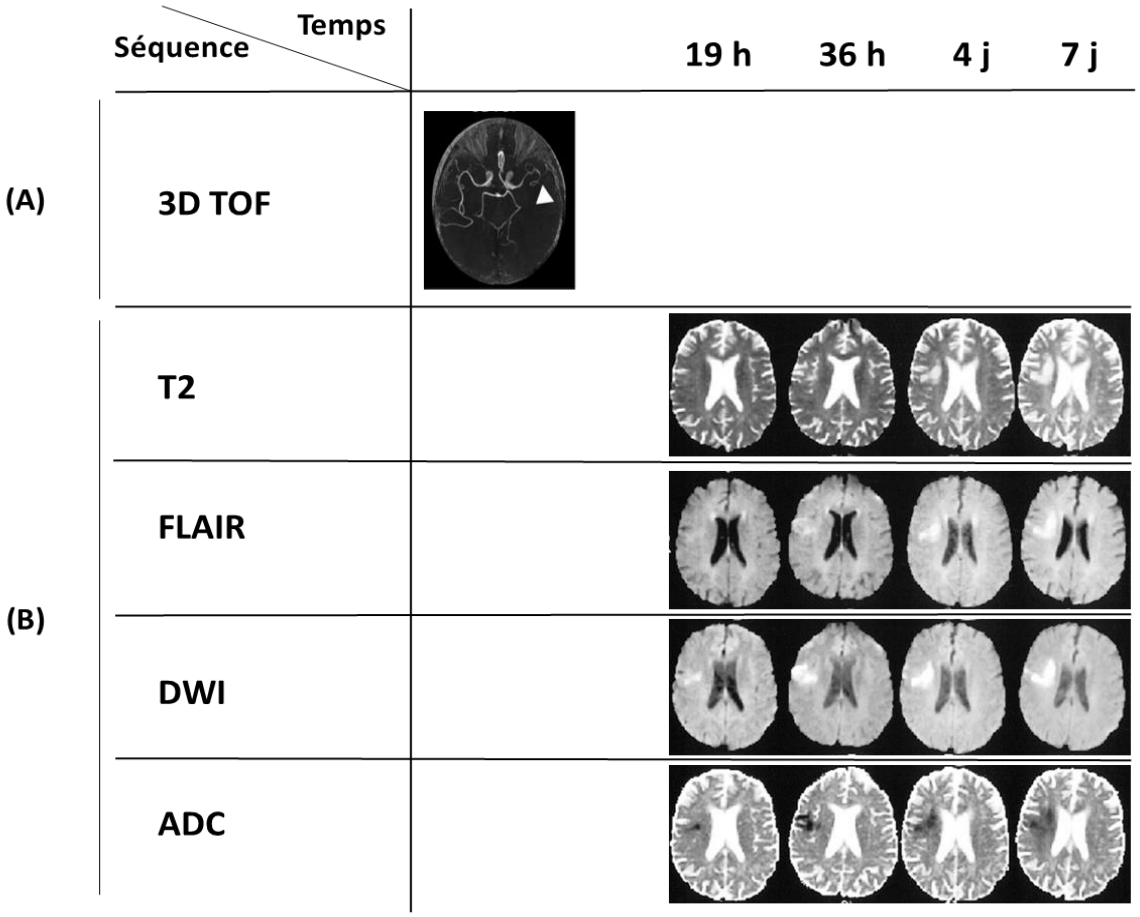


Tableau 2: **Exemples d'IRMs en fonction du temps après la survenue d'un AVC.**

(A) Exemple d'une séquence 3D TOF montrant une occlusion artérielle (Flèche blanche). **(B)** IRM à 4 temps différents après l'apparition d'une ischémie cérébrale avec différentes séquences (D'après Valdez 2014 et Lansberg et *al*., 2001).

1.1.5 Les traitements de l'AVC ischémique

1.1.6 Thrombolyse

L'actilyse® (altéplase) est le seul traitement pharmacologique disponible pour le traitement de l'AVC ischémique. Ce médicament était déjà prescrit dans l'infarctus du myocarde à la phase aiguë et dans l'embolie pulmonaire. Il est à base d'une protéine recombinante, le rt-PA (*recombinant tissue plasminogen activator*). Le t-PA est une enzyme protéolytique (sérine protéase) secrétée majoritairement par les cellules endothéliales, qui joue un rôle dans de la cascade de fibrinolyse. Cette enzyme va initier la fibrinolyse du caillot en transformant le plasminogène en plasmine menant à la destruction du caillot sanguin. L'inconvénient majeur du rt-PA est une fenêtre thérapeutique réduite, un risque élevé d'hémorragie cérébrale et de nombreuses contre-indications. Son administration par voie veineuse ne doit pas se faire au-delà 4h30 après l'apparition de l'ischémie cérébrale. Cette fenêtre peut être étendue jusqu'à 6h après l'apparition des signes d'infarctus cérébral mais celle-ci doit être faite par voie intra-artérielle dans des unités hospitalières spécialisées (Abou-Chebl 2011).

Pour étudier la relation entre la fenêtre thérapeutique du traitement (allant de 0 à 6h après l'AVC) et son efficacité, une analyse groupée de 8 études cliniques de phase III (EPITHET, ECASS III, ECASS II, ECASS, ATLANTIS B, ATLANTIS A, et NINDS 1+2) a été effectuée (HAS 2012).

Les résultats de cette analyse montrent une récupération fonctionnelle à 3 mois lorsque le traitement est administré avant 4h30 suivant l'apparition des symptômes. Cependant, la HAS reste prudente sur ces conclusions car les posologies n'étaient pas uniformes, et les analyses comportaient de nombreux tests statistiques augmentant le risque de faux positifs. De plus, lors de ces études, plusieurs effets indésirables graves ont été recensés. En effet, selon l'investigateur le nombre d'hémorragies intracrâniennes a doublé lorsque les patients recevaient du rt-PA. Cependant, la

mortalité à 3 mois était similaire entre le groupe traité par le rt-PA et le groupe placebo (HAS 2012).

En plus de la fenêtre thérapeutique limitée et du risque hémorragique accru, le rt-PA présente de nombreuses autres contre-indications. Ces dernières proscrivent l'utilisation de rt-PA si les patients présentent un risque hémorragique élevé (troubles hémorragiques, intervention chirurgicale ou traumatisme dans les 3 derniers mois, etc.), et si le patient est âgé de moins de 18 ans et plus de 80 ans. D'autres contre-indications complémentaires entrent en compte dans la prescription de rt-PA : AVC sévère, crise convulsive suivant l'AVC, plaquettes inférieures à 100 000/mm^3, HTA sévère non contrôlée (PAS >185 mmHg ou PAD>110 mmHg), etc.

Ces nombreuses contre-indications et effets secondaires font que l'actilyse n'est administré en moyenne au niveau européen qu'à 3,3% des patients admis pour un AVC ischémique (Dequatre-Ponchelle *et al.* 2014).

Les effets indésirables du rt-PA sont multifactoriels. Outre son activité catalytique, le t-PA est une enzyme agissant comme une protéase extracellulaire et impliquée dans plusieurs voies de signalisation (Kaur *et al.* 2004). En effet, le t-PA promeut la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), relayée par l'augmentation des métalloprotéinases (MMPs). En condition pathologique, le rt-PA peut induire la dégradation de la MEC, dont la laminine, qui est un composant essentiel de la lame basale des cellules endothéliales formant la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette dégradation de la MEC va empêcher alors la bonne communication intercellulaire, et expose au risque d'une hémorragie intracérébrale. Par son interaction avec les récepteurs NMDA, le rt-PA présente des effets excitotoxiques (Kaur *et al.* 2004). En effet, le rt-PA peut augmenter l'entrée calcique intracellulaire par son interaction avec la sous-unité GluN2D et le clivage de la sous-unité NR1 (figure 10) (Kaur *et al.* 2004).

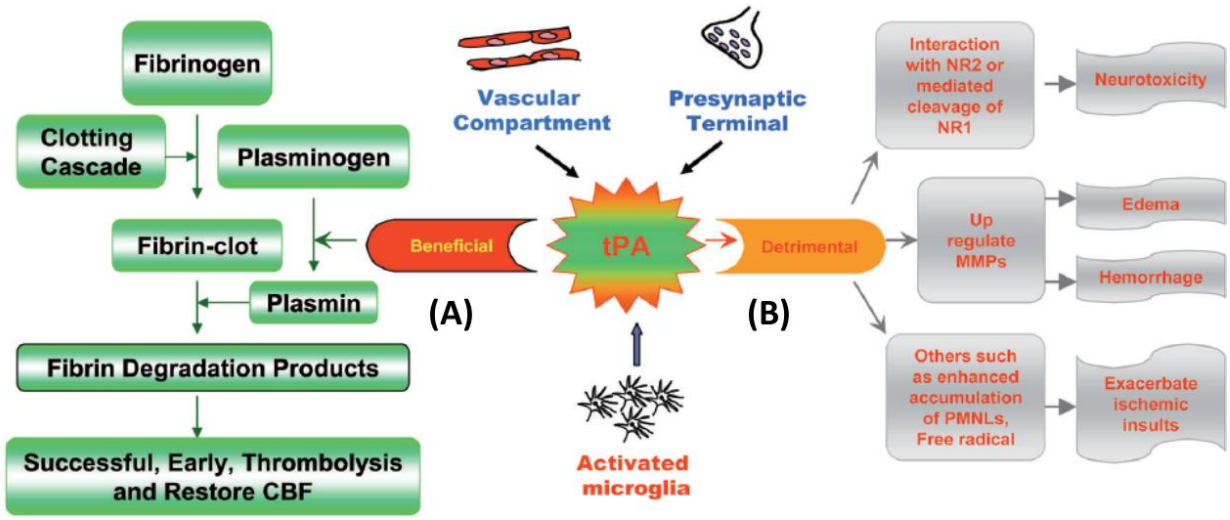


Figure 10 : **Action du rt-PA dans l'ischémie cérébrale**.

(A) Effets bénifiques du tPA menant à la thrombolyse et la restauration du DSC. **(B)** Effet délétère du tPA avec l'activation des récepteurs NMDA, l'augmentation de l'expression des MMPs, l'augmentation des leucocytes polynucléaires et des radicaux libres, qui résultent en une neurotoxicité, un œdème, un risque d'hémorragie et une aggravation de la lésion ischémique. (D'après Kaur et *al*. 2004).

1.1.7 La thrombectomie

Les limites de la thrombolyse ont favorisé l'émergence de la thrombectomie mécanique. Les approches endovasculaires se sont développées et s'adressent donc aux patients présentant des contre-indications de la thrombolyse, et aux patients présentant une situation d'échec de la fibrinolyse pour les occlusions des artères intracrâniennes de gros calibre (Bonafe *et al.* 2013).

Les dispositifs de revascularisation mécanique sont classés en 2 groupes selon leur mode d'action (HAS 2016) (Tableau 3):

- Le retrait du caillot par franchissement dit « aveugle » du siège de l'occlusion artérielle (cathétérisme distal) (*coil et stent retrievers*).

- Les systèmes de fragmentation et aspiration du thrombus (cathétérisme proximal).

Type de dispositifs	Mécanisme d'action	Similitudes	Différences
Coil retrievers **(première génération de dispositif de thrombectomie mécanique)**	Le dispositif de capture et de retrait de caillots est constitué d'un guide en nitinol conique à boucle hélicoïdale et filaments en polymère destinés à emprisonner le caillot lors de la mise en place du dispositif. Le neuroradiologue interventionnel déploie le stent à travers le caillot pour engager le thrombus, puis tire à la fois le stent et un caillot dans le cathéter.	Technique d'accès endovasculaire identique pour la procédure	Dispositif fonctionnant comme un tire-bouchon
Dispositifs d'aspiration	Système de thrombo-aspiration relié à une pompe, couplé avec un séparateur qui permet une fragmentation du caillot pour en faciliter l'extraction.		Dispositif d'accès distal ou cathéter intermédiaire, aspire le caillot à l'intérieur
Stent retrievers (deuxième génération de dispositif de thrombectomie mécanique)	Système de stents non implantables dits « stentrivers », stent en nitinol auto-extensible solidaire d'un fil poussoir et chargé dans une gaine. Le stent et le thrombus sont ensuite retirés à l'intérieur du guide cathéter.		Dispositif capture le caillot dans ses mailles

Tableau 3 : **Les dispositifs de thrombectomie mécanique et leurs mécanismes d'action** (HAS 2016).

Les conclusions du rapport de la HAS 2016, sur les données globales d'une méta-analyse rassemblant 1288 patients dans 5 études cliniques randomisées (MR CLEAN, EXTEND IA, ESCAPE, SWIFT PRIME, REVASCAT) concourent vers un avis favorable de l'utilisation de la thrombectomie dans le traitement de l'AVC ischémique. Néanmoins, les études ne montrent pas toutes un effet positif de la thrombectomie. Les études ESCAPE et SWIFT PRIME, associant la thrombectomie à la fibrinolyse par voie intraveineuse (i.v.), ont mis en évidence une réduction du handicap et une augmentation du nombre de patients indépendants à 3 mois après l'AVC. Cependant, l'étude REVASCAT incluant des patients traités uniquement avec une thrombectomie, ne permettent pas de conclure à l'efficacité de cette intervention. Ces études ont également montré que la mortalité associée à l'intervention endovasculaire n'est pas diminuée par rapport à la

thrombolyse par voie i.v., excepté dans l'étude ESCAPE où la mortalité à 3 mois est diminuée par la thrombectomie associée à la fibrinolyse par rapport à la fibrinolyse seule (HAS 2016).

1.1.8 Autres traitements

D'autres traitements sont dispensés aux patients souffrants d'un infarctus cérébral tels les traitements anti-thrombotiques ou des traitements visant les complications de l'AVC tel l'œdème cérébral (HAS 2016), mais aussi de la rééducation pour pallier aux handicaps moteurs (HAS 2012).

1.2 Physiopathologie de l'AVC

1.2.1 Cœur ischémique et pénombre

Une lésion ischémique est causée par la diminution, transitoire ou permanente, de la perfusion cérébrale. Dans un territoire vasculaire cérébral, le DSC normal se situe entre 45 et 60 ml de sang / 100 g / min. Le tissu cérébral a des seuils critiques de DSC en dessous desquels des lésions tissulaires sont induites. En effet, une réduction du DSC à des niveaux d'environ 20 ml / 100 g / min peut-être tolérée sans conséquences fonctionnelles (figure 11). Cependant, un DSC permanent en dessous de 18 ml / 100g / min, induit des dommages irréversibles (Rama *et al.* 2012).

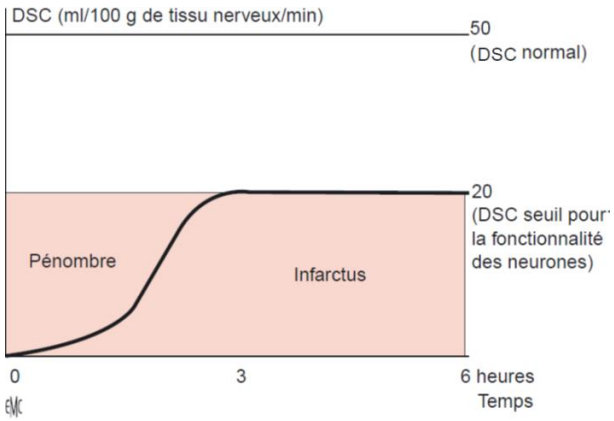


Figure 11 : **Débit sanguin cérébral (DSC) de la pénombre et du cœur ischémique**

La zone de pénombre entoure l'infarctus, ayant un DSC compris entre 10 et 20 ml pour 100 g de tissu nerveux/ minute (D'après Béjot et *al.* 2010).

Sur le plan métabolique, les neurones utilisent la plus grande partie de l'énergie consommée par le cerveau. Le cerveau dépend du glucose comme principale source d'énergie. La consommation cérébrale en glucose représente environ 20% de la consommation glucidique de l'organisme (Mergenthaler *et al.* 2013). Le cerveau consomme également environ 25% de l'oxygène total du corps, ce qui représente une consommation de 3,5 ml / 100 g / min au repos. Sa capacité à stocker de l'énergie est très faible; par conséquent, un apport sanguin continu est nécessaire pour la survie des neurones. (S.-H. Lee 2017).

Quelques minutes après une occlusion artérielle, deux régions principales sont constituées : le foyer ischémique et la pénombre ischémique.

Le foyer ischémique est caractérisé par une diminution critique du DSC et donc une diminution critique de l'oxygène et du glucose. Cette région présente une insuffisance métabolique entraînant une mort cellulaire rapide menant à une lésion cérébrale irréversible. Autour du foyer ischémique se trouve la deuxième région, à savoir la pénombre ischémique. Cette dernière est fonctionnellement altérée, souffrante d'une diminution du DSC mais reste métaboliquement active (Dirnagl, C. Iadecola, and M. a Moskowitz 1999). Ainsi, la pénombre ischémique est une région atteinte par l'AVC ischémique, mais elle peut être sauvée, ce qui en fait la principale cible des thérapies neuroprotectrices (Ramos-Cabrer *et al.* 2011).

Depuis que Astrup et collègues ont proposé le concept du foyer et de la pénombre ischémique en 1979, plusieurs études se sont attachées à caratériser ces régions(Astrup *et al.* 1981). Ces régions sont définies par imagerie, et pourraient aussi être définies selon les facteurs biochimiques exprimés.

En clinique, la meilleure méthode pour définir la pénombre ischémique est l'imagerie. En IRM, une acquisition PWI permet de visualiser la région dans lesquelles le DSC est réduit, qui par la

suite est définie comme la région ischémique. L'acquisition DWI définie le cœur ischémique. Le mismatch entre DWI et PWI définie alors la région de la pénombre ischémique (figure 12).

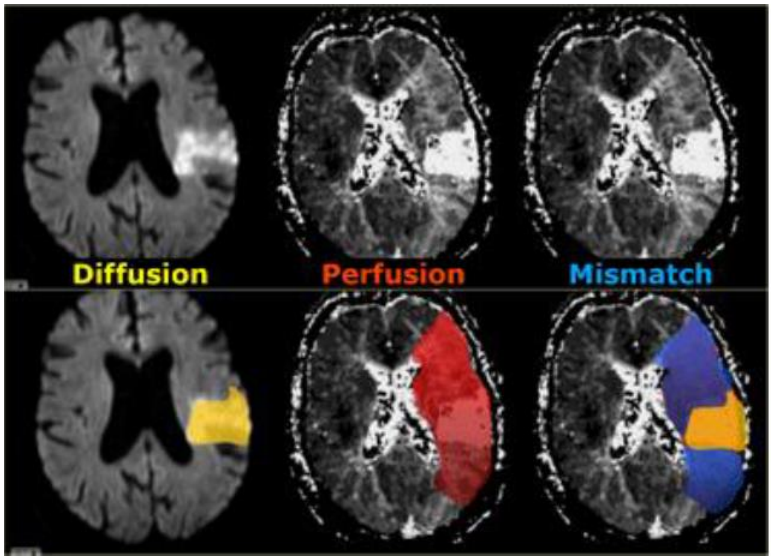


Figure 12 : **illustration schématique du mismatch PWI/DWI** (D'après http://rad.desk.nl/en/483910a4b6f14)

De façon complémentaire la pénombre ischémique peut-être aussi définie par des indicateurs biochimiques. Lors d'une ischémie cérébrale, le métabolisme cellulaire est modifié, et plusieurs mécanismes moléculaires associés à la mort cellulaire sont mis en place. La réduction rapide du DSC induit une mort nécrotique dans le cœur ischémique. Cependant, dans la pénombre, le stress cellulaire est moins important, les cellules qui ne survivent pas entrent alors en apoptose (S.-H. Lee 2017).

En réponse au stress, les cellules de la région tissulaire sous-perfusée expriment des protéines telles que la *Heat shock protein* 70 (Hsp70), protéine chaperon induite dans les mécanismes de réparation cellulaire et anti-apoptotiques. La région de surexpression de la Hsp70 peut-être alors assimilée à la pénombre ischémique (figure 13) (S.-H. Lee 2017).

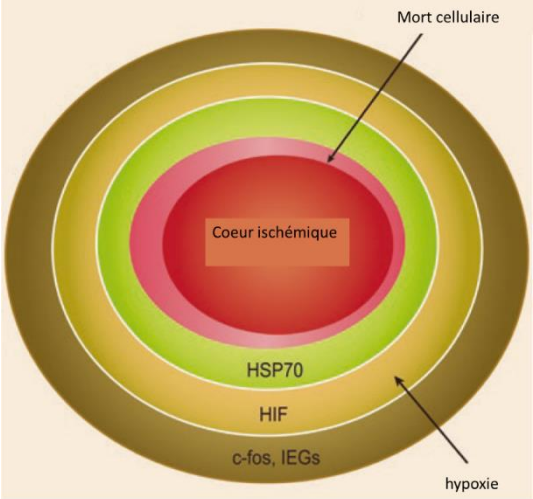


Figure 13 : **Définition de la pénombre ischémique selon les indicateurs biochimiques** (D'après (S.-H. Lee 2017)

En effet, la protéine Hsp70 est peu exprimée en condition physiologique, alors qu'après un stress tel une ischémie elle devient la protéine la plus exprimée dans la cellule (Sharp et *al.*, 2014). Vingt-quatre heures après une oACM de 10 minutes l'expression de Hsp70 s'étend sur tout le territoire de l'ACM. Alors qu'à la suite d'une oACM de 90 minutes, l'infarctus est bien établi et l'expression de Hsp70 se limite à une zone réduite aux frontières des territoires irrigués par l'ACM et les artères cérébrales adjacentes. Ceci montre que la distribution de l'expression de Hsp70 marque l'étendu de la pénombre ischémique (Sharp *et al.* 2014) (Figure 14).

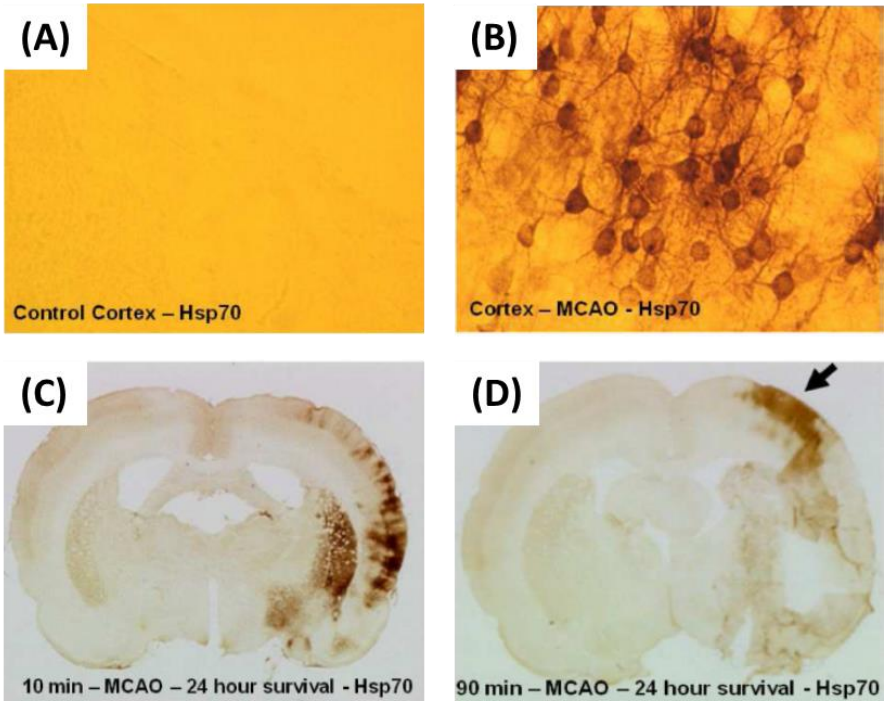


Figure 14 : **Expression de la protéine Hsp70 dans de la pénombre ischémique.**
(A) Hsp70 est peu exprimée en condition physiologique. **(B)** Vingt-quatre heures après une oACM l'expression de Hsp70 est induite dans les neurones. **(C)** Expression de Hsp70, 24 heures après une oACM de 10 minutes. **(D)** Expression de Hsp70, 24 heures après une oACM de 90 minutes. (D'après Sharp et *al.* 2014)

1.2.2 La cascade ischémique

La cascade ischémique consiste en une série de réactions cellulaires et moléculaires en chaine. Dans une région cérébrale où le DSC est diminué de façon critique, la consommation d'adénosine triphosphate (ATP) doit continuer malgré un apport de glucose et d'oxygène insuffisant (Xing *et al.* 2012). En conséquence, la phosphorylation oxydative cesse, provoquant la chute des niveaux d'ATP. La respiration anaérobie mène alors au développement d'une acidose lactique et des espèces radicalaires de l'oxygène (ROS). Cela conduit également à une perte d'homéostasie ionique dans les neurones. Les pompes ioniques Na^+/K^+ ATPase et Ca^{2+} ATP dépendantes sont perturbées. Les

ions Na^+, Cl^-, Ca^{2+} se concentrent alors dans l'espace cytoplasmique entrainant également l'entrée de l'eau dans les neurones (Dirnagl, C. Iadecola, and M. A. Moskowitz 1999).

L'excès de Ca^{2+} provoque la génération de ROS et l'activation des enzymes dépendantes du calcium telles que les endonucléases et les phospholipases. L'activation dépendante du Ca^{2+}, des phospholipases A2 et des cyclooxygénases produit des ROS (Dirnagl, C. Iadecola, and M. A. Moskowitz 1999). Le phénomène de péroxydation par les ROS entraine une commutation cellulaire vers une cascade apoptotique par la destruction des acides nucléiques et des protéines cellulaires. La membrane des mitochondries se décompose libérant des quantités massives de radicaux libres, et de cytochrome-c dans le cytoplasme qui déclenche une apoptose caspases-dépendante (Deb *et al.* 2010). Au cours de la cascade ischémique, l'augmentation de Ca^{2+} et ROS déclenchent une réponse inflammatoire. Dans cet état inflammatoire, les enzymes protéolytiques telles que les métalloprotéinases matricielles et l'oxyde nitrique altèrent la MEC, augmentent les dommages cellulaires et induisent la perméabilité de la BHE (figure 15 et 16) (WANG *et al.* 2007), (Dirnagl *et al.* 2014).

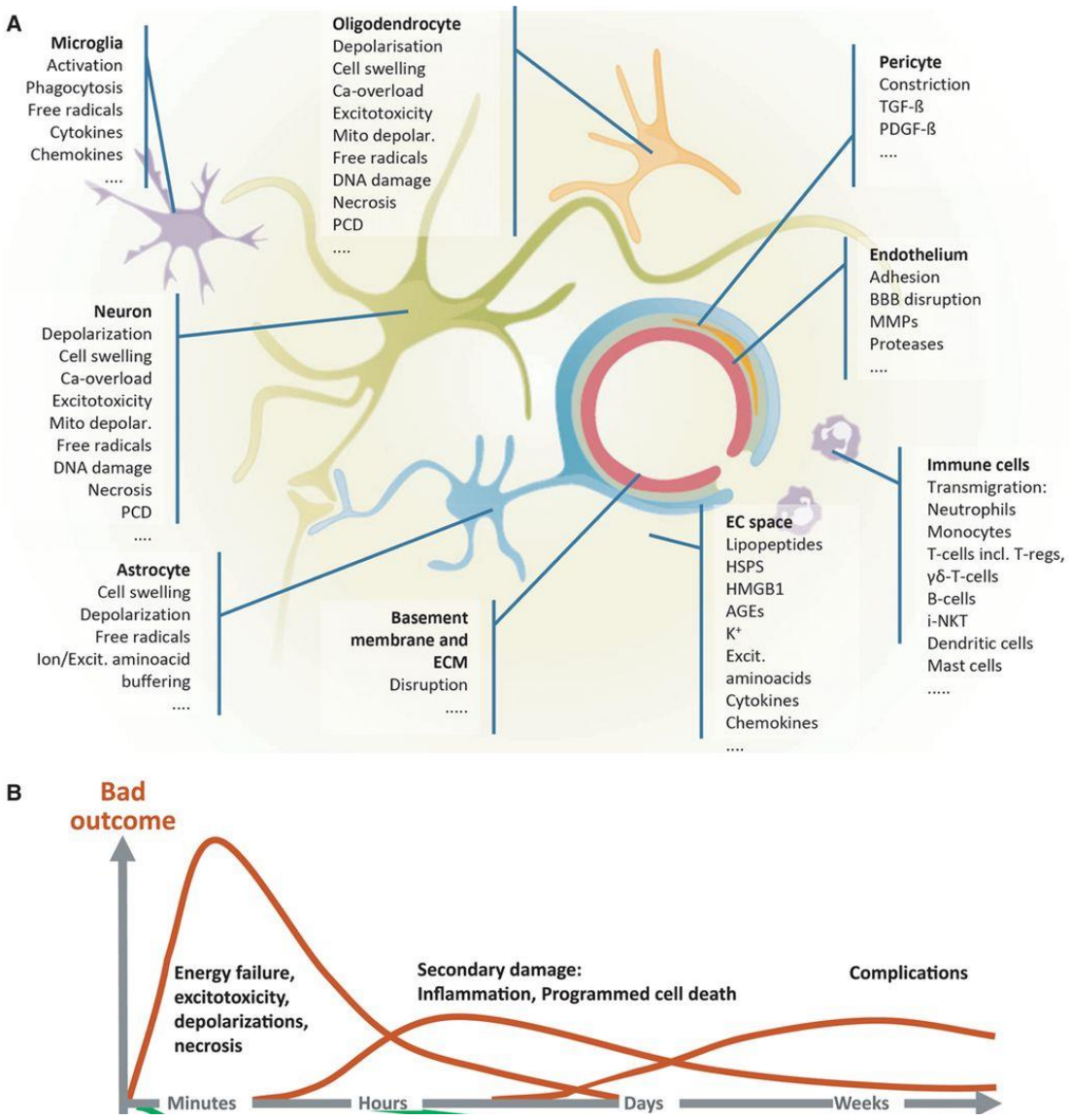


Figure 15 : **Schématisation de la cascade ischémique**
(A) Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la cascade ischémique. **(B)** Cinétique des évènements se déroulant lors l'ischémie cérébrale (Modifié d'après Dirnagl et *al.* 2014)

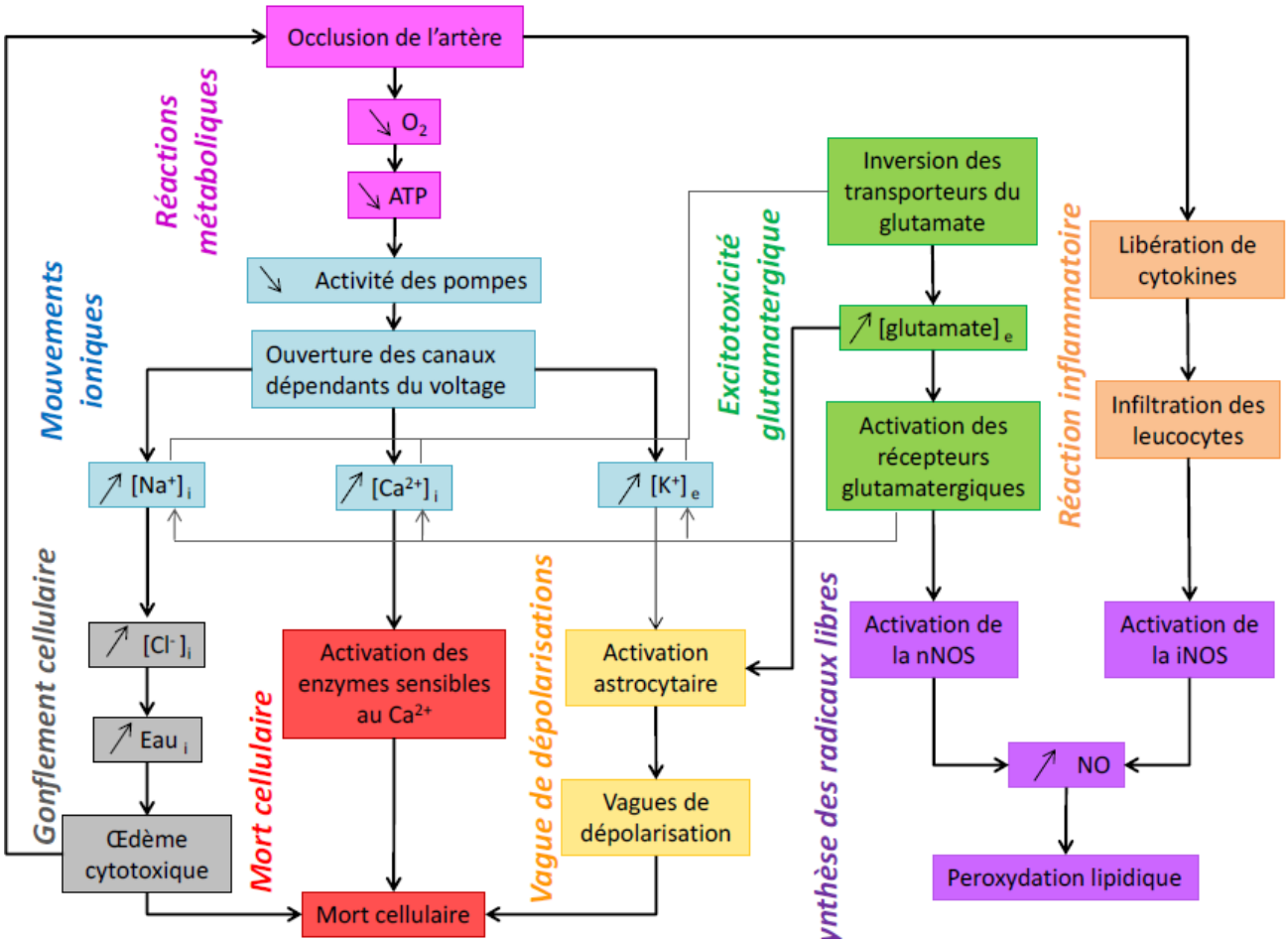


Figure 16 : **Résumé des évènements de la cascade ischémique** (http://www.umpa.enslyon.fr/~numed/research_neurology.html).

1.2.3 Altérations de la BHE dans l'ischémie cérébrale

La BHE est localisée à l'interface entre le sang et le tissu cérébral. Elle est formée par les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins cérébraux, les astrocytes, les péricytes, les neurones et la lame basale (Figure 17). L'ensemble de ces cellules et la lame basale constituent l'unité neurovasculaire.

La lame basale de l'endothélium cérébral est constituée de 3 couches. La première synthétisée par les cellules endothéliales est caractérisée par la présence de la laminine 4 et 5. La deuxième, se caractérise par la présence de laminine 1 et 2, et est synthétisée par les astrocytes. La troisième caractérisée par la présence du collagène IV, se trouve entre les deux premières, elle est formée par les deux types cellulaires. Ces trois couches sont également constituées de différents types de collagène, de glycoprotéines et de protéoglycanes (Cardoso *et al.* 2010).

La lame basale participe activement à la dynamique de la BHE. Elle contient de nombreuses protéines, métalloprotéases et leurs inhibiteurs sont impliqués dans la régulation dynamique de la BHE dans les conditions physiologiques ainsi que pathologiques (Cardoso *et al.* 2010).

Les propriétés de la BHE sont principalement déterminées par les jonctions serrées et adhérentes la rendant imperméable (J.-H. Kim *et al.* 2013).

Dans des conditions physiologiques, cela empêche l'extravasation de macromolécules et empêche la migration cellulaire du compartiment sanguin vers le parenchyme cérébral. Au niveau des jonctions adhérentes, les cadhérines ferment la fente intercellulaire et sont liées dans le cytoplasme de la cellule par des protéines d'échafaudage alpha, bêta et gamma caténine. Les jonctions adhérentes forment le support structurel du tissu. Elles sont essentielles pour la formation des jonctions serrées. Leur perturbation conduit à la rupture de la BHE. Les jonctions serrées consistent en un complexe de protéines qui ferment la fente intercellulaire en aval des jonctions adhérentes. Elles sont responsables de la restriction de la diffusion paracellulaire des ions et autres solutés

polaires, et bloquent efficacement la pénétration des macromolécules (Oby *et al.* 2006). Lors d'un AVC, les cellules du tissu ischémique meurent, et la MEC et ses composants sont dégradés, y compris les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPGs) (Fukuda *et al.* 2004). Ces changements induisent une atteinte de la BHE qui entraîne un œdème vasogénique, par la fuite de protéines dans le parenchyme. L'œdème cérébral est un déterminant important de la survie du patient au-delà des premières heures suivant l'AVC. L'ouverture de la BHE induit des conséquences cliniques délétères, à la fois par l'augmentation de la pression intracrânienne et par le risque de transformation hémorragique associé au traitement par le tPA (J.-H. Kim *et al.* 2013).

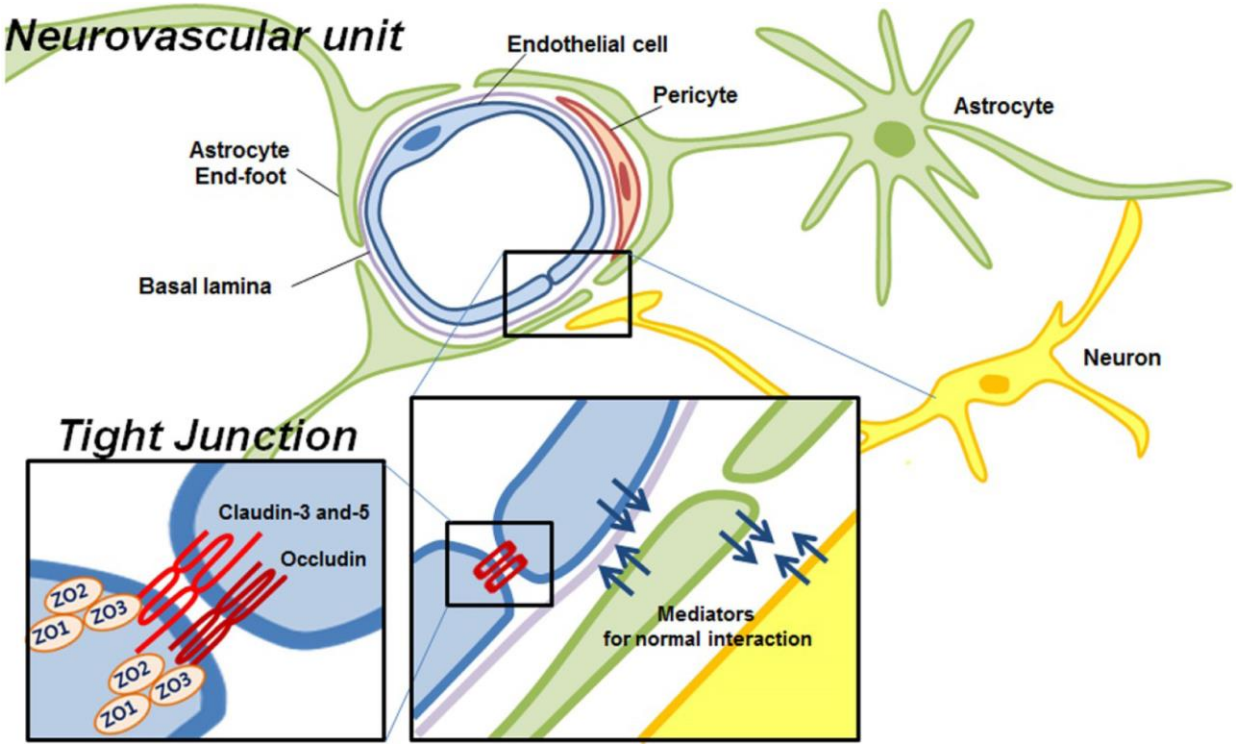


Figure 17 : **Vue schématique de l'unité neurovasculaire formant la BHE** (D'après (J.-H. Kim *et al.* 2013)

1.2.3.1 La BHE et la dégradation matricielle par les MMPs

Les MMPs sont une famille de plus de 28 enzymes protéolytiques, responsablent de la dégradation et du remodelage matriciel, que ça soit en condition physiologique ou pathologique (Maccawley et *al.,* 2001). *In vivo,* Fukuda et collègues (2004) ont montré que l'ischémie cérébrale active des protéases qui conduisent à la dégradation rapide des microvaisseaux (Fukuda *et al.* 2004). Une autre étude a suggéré que l'ischémie cérébrale et la reperfusion pourraient induire l'expression des MMPs -2 et -9. L'augmentation de l'activité de ces dernières, était liée à la perméabilité microvasculaire cérébrale, l'altération de la BHE, l'invasion des cellules inflammatoires et l'œdème cérébral (Pfefferkorn *et al.* 2003). En effet, Gidday et collègues (2005) ont montré que la MMP-9 dans le tissu cérébral ischémique joue un rôle pro-inflammatoire qui aide les neutrophiles à migrer de la circulation sanguine vers le parenchyme cérébral (Gidday *et al.* 2005).
L'augmentation de l'activité de la MMP-9 peut agir sur les jonctions des cellules endothéliales de la BHE et la membrane basale, ce qui altère l'architecture de la BHE, augmente sa perméabilité et l'étendu de l'œdème cérébral vasogénique (Eldrup *et al.* 2006).

L'expression de la MMP-9 est augmentée 4 h après l'occlusion de l'ACM. Dans les 12 h et 24 h qui suivent l'ischémie cérébrale, l'expression de la MMP-9 dans le site lésionnel augmente de manière significative, corrélant avec le pic de l'œdème cérébral vasogénique, ce qui pourrait suggérer que la MMP-9 joue un rôle important dans les lésions cérébrales secondaires et l'œdème vasogénique (Yang *et al.* 2015).

Montaner et collègues (2001) ont également montré que l'activité de MMP-9 augmente au début de l'AVC et de la réponse pro-inflammatoire, tandis que l'activité de MMP-2 apparait dans la phase de réparation et de la régénération vasculaire (Montaner *et al.* 2001). Des résultats d'autopsies ont montré qu'une semaine après l'infarctus, la MMP-9 était exprimée par les neutrophiles, et une

semaine plus tard, la MMP-2 est exprimée par les macrophages. Dans cette étude les auteurs ont également montré que le niveau de MMP-2 plasmatique était plus élevé chez les patients ayant des antécédents d'AVC (Montaner *et al.* 2001). D'autres études ont également suggéré que la MMP-9 pourrait également être liée à la traduction de l'hémorragie après la thrombolyse par tPA (Figure 18) (Chaturvedi *et al.* 2014).

L'ensemble de ces observations souligne le rôle important du remodelage de la MEC que ça soit pendant la phase aiguë de l'ischémie cérébrale ou pendant la phase de réparation et de régénération tissulaire (Khatri *et al.* 2007; Turner *et al.* 2016).

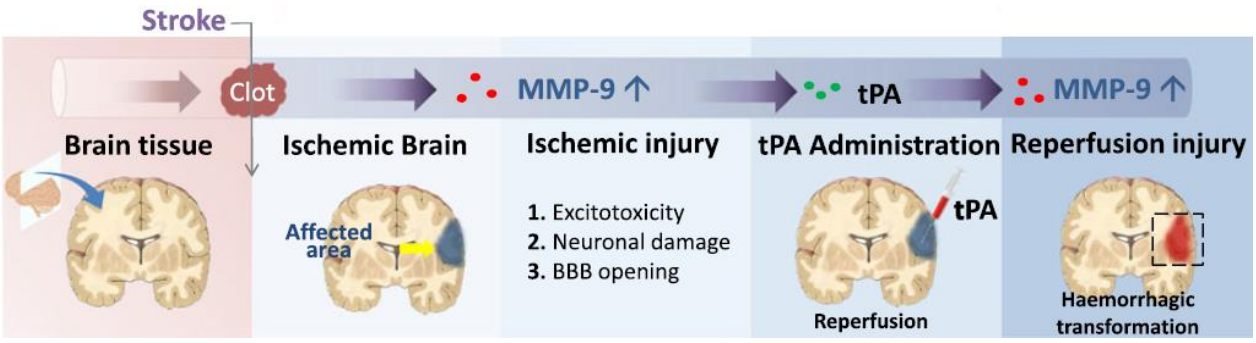


Figure 18 : **Rôle de la MMP9 dans la transformation hémorragique**

L'ischémie cérébrale active la MMP-9. Cette dernière est impliquée dans l'excitoxicité, les dommages neuronaux, et l'ouverture de la BHE. La reperfusion par le t-PA augmente l'activation de la MMP-9 qui est impliquée dans la transformation hémorragique. (D'après (Chaturvedi *et al.* 2014)

1.2.4 La réaction inflammatoire

La réponse inflammatoire consiste en l'activation des cellules microgliales (cellules inflammatoires intrinsèques) et l'infiltration de cellules périphériques inflammatoires.

Les microglies sont des macrophages spécialisés qui résident dans le parenchyme cérébral. Au repos, ceux-ci présentent un phénotype caractérisé par des processus minces. Ces cellules sont très sensibles aux changements dans leur milieu environnant et disposent de nombreuses fonctions : élimination des débris cellulaires, régulation des synapses neurales, la production de facteurs trophiques, l'inflammation, implication dans la neurogenèse et la réparation tissulaire (Cruz *et al.* 2016).

Au cours des premiers stades de l'ischémie, avec la diminution de l'oxygène et de l'ATP dans parenchyme cérébral, les neurones libèrent des molécules telles que la lipocaline 2 et l'interleukine (IL)-4. Ces molécules sont capables d'activer la microglie et induire un phénotype M2 protecteur, caractérisé par la production des cytokines anti-inflammatoires IL-10, IL-4 et une augmentation de la phagocytose (Xing *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2015). Ce phénotype a été observé au cours des 7 premiers jours après l'ischémie. Il atteint le pic maximum à 3-5 jours, et diminue au jour 14, ce qui suggère que la microglie favorise la survie neuronale au cours de cette première étape en tentant de réduire la libération de médiateurs de l'inflammation et en synthétisant des facteurs anti-inflammatoires tels que le *transforming growth factor-β* (TGF-β), l'arginase-1 et le CD206, en plus de produire des facteurs de croissance comme *l'insuline like growth factor-1* et le *ciliary neutrophic growth factor* qui facilitent les mécanismes de réparation tissulaire (Zhao *et al.* 2015).

Quand le milieu environnant change vers des concentrations élevées de Ca^{2+}, radicaux libres, glutamate et débris de la nécrose neuronale, le phénotype microglial passe progressivement de M2 à M1, et commence à exprimer des gènes tels que l'oxyde nitrique synthase, CD16 et CD32 ainsi que des marqueurs de surface tels que CD11b et le complexe d'histocompatiblité II (Hu *et al.* 2012) Le phénotype M1 se distingue par une diminution de l'activité de phagocytose et une augmentation de la production de médiateurs pro-inflammatoires: IL-1β, IL-6, le *tumor necrosis factor*-α (TNF-α) et une augmentation de NO, H_2O_2, ROS, MMP, et des chimiokines telles que CXCL10, CCL2, MCP-1, CXCL1 et CCL5 qui tous favorisent le développement d'un milieu pro-inflammatoire (Patel *et al.* 2013). Cette polarisation microgliale pourrait être une piste de modulation de l'inflammation afin d'induire un phénotype M2 et d'être en mesure d'obtenir les effets bénéfiques d'un milieu anti-inflammatoire, accompagnés de facteurs trophiques facilitant la réparation tissulaire (Hu *et al.* 2012).

Par ailleurs, par la mise en place de changements de perméabilité de la BHE, les leukocytes circulant se retrouvent dans le parenchyme cérébral contribuant à augmenter l'inflammation et ainsi augmenter les dommages cérébraux (J. Huang *et al.* 2006). En effet, la sécrétion des divers facteurs d'inflammation, augmente le recrutement leucocytaire, particulièrement après la reperfusion avec l'augmentation des ROS et l'activation de facteurs pro-inflammatoires tel que le *nuclear factor κB* (Morgan *et al.* 2011).

Trente minutes après le début de l'ischémie cérébrale, les leukocytes, et particulièrement les neutrophiles, adhèrent aux parois vasculaires et s'infiltrent dans le parenchyme (J. Huang *et al.* 2006). En 2001, une étude clinique a analysé la présence du TNF-α dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le sérum de 39 patients. Cette étude a montré que dans le sérum et le LCR de 25 patients souffrant d'un AVC ischémique, le taux de TNF-α augmente significativement dès les premières 24h, comparativement aux 15 patients du groupe contrôle (Zaremba *et al.* 2001). De

plus, cette même étude a montré une corrélation significative entre l'augmentation du taux de TNF-α dans le LCR et le sérum, et la gravité des déficits neurologiques mesurés par l'échelle SSS (*Scandinavian Stroke Score*), qui est donne un score mesurant l'intégrité des fonctions neurologiques des patients (Zaremba *et al.* 2001) (figure 19).

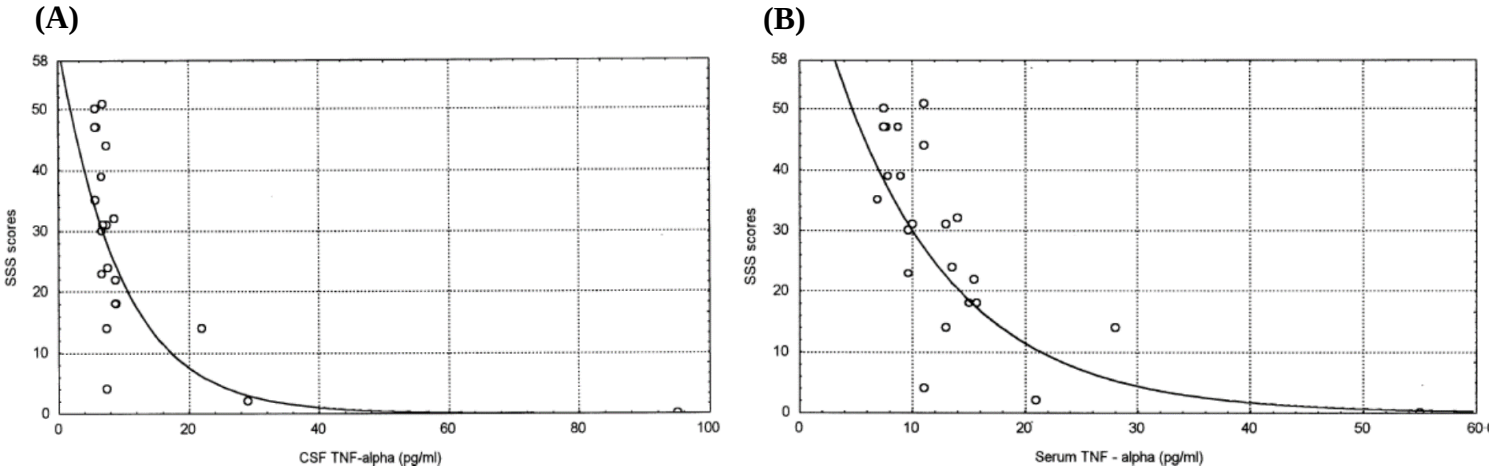


Figure 19 : **Relation entre le taux du TNF-α (pg/ml) et le score SSS (Scandinavian Stroke Score) 24h après l'AVC**. Le taux du TNF-α augmente avec la diminution du score SSS dans le **(A)** LCR et **(B)** le sérum. Un patient en bonne santé obtient le score maximum de 58) (D'après Zaremba et *al.* 2001)

Plus tardivement, les monocytes attirées par les facteurs chimioattractants tels le *monocyte chemoattractant protein-1* et inflammatoires tels le TNF-α s'infiltrent aussi dans le parenchyme, et représentent la population majoritaire des cellules inflammatoires après les 3 premiers jours suivant l'ischémie cérébrale (ElAli *et al.* 2016). Les monocytes sont majoritairement recrutés lors de la phase chronique de l'AVC, et ont un rôle de phagocytose des débris cellulaires, participant ainsi à la plasticité et aux processus de régénération tissulaire (ElAli et *al.*, 2016).

1.2.5 La réaction gliale

Parallèlement, aux phénomènes immunitaires, l'inflammation peut activer la réaction gliale connue sous le nom de gliose. Cette réaction est caractérisée par la présence des cellules de la microglie, les astrocytes, et l'expression de molécules spécifique de la MEC tels les CSPGs (chondroïtines sulfate protéoglycanes) (L. Huang, Z. B. Wu, *et al.* 2014)

L'activation des cellules astrocytaires, induit leur prolifération, leur migration vers le site de la lésion, leur hypertrophie et la sécrétion des CSPGs formant un ensemble constituant la cicatrice gliale. Cette cicatrice protège le parenchyme cérébral sain en limitant l'étendue de la réaction inflammatoire du tissu ischémique, et protégeant le tissu sain de l'ouverture de la BHE (Silver *et al.* 2004; Sofroniew 2009). L'activation et la prolifération des astrocytes peut être induite par diverses molécules pro-inflammatoires (TNF-α, endothelin-1, IL-1, IL-6…) (Fitch *et al.* 2008) mais aussi par des facteurs tel que l'*epithelial growth factor*, le FGF (*fibroblast growth factor*), ou l'ATP (Sofroniew 2009).

Cependant, en cas de lésion étendue la cicatrice gliale agit comme une barrière mécanique pour la repousse des neurites, inhibant ainsi le processus de régénération cellulaire (Bao *et al.* 2012) (figure 20).

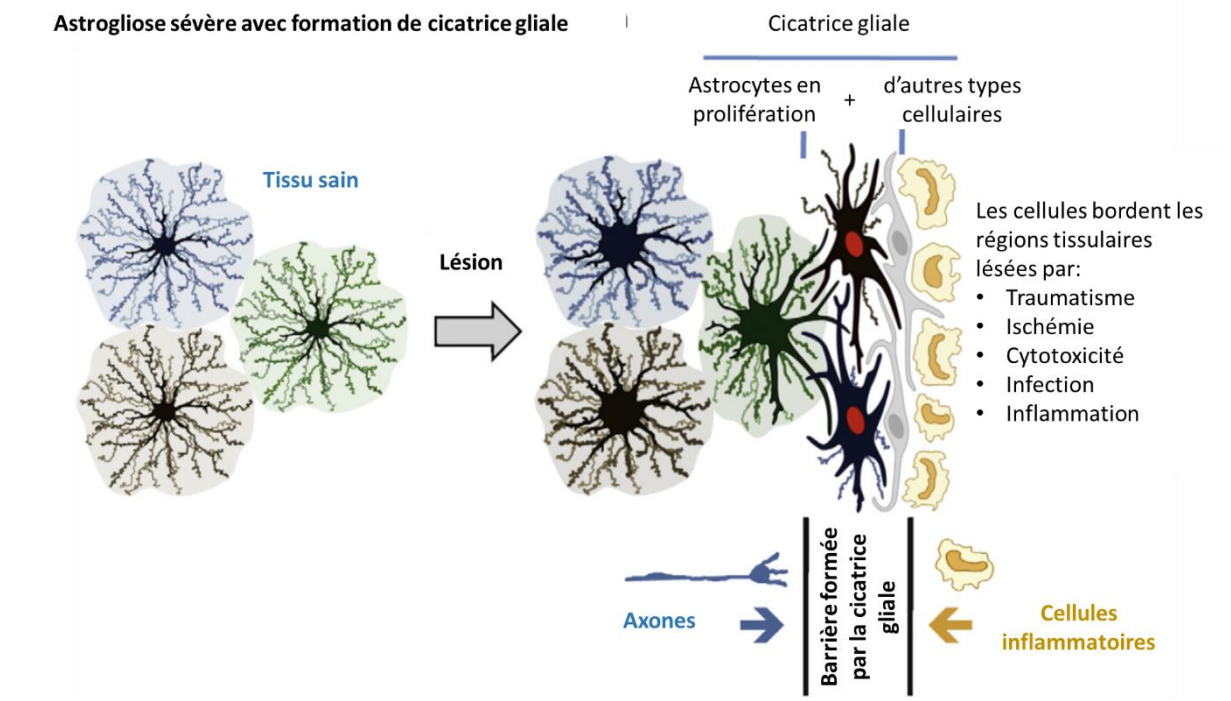


Figure 20 : **Vue schématique de l'astrogliose après une ischémie cérébrale**

Réaction astrogliale sévère avec une mise en place d'une cicatrice gliale aux bordures de la lésion tissulaire, contenant les cellules endommagées et inflammatoires. La cicatrice gliale est formée par les astrocytes en prolifération (cellules avec noyaux rouge dans la figure) et d'autres cellules gliales (noyau gris dans la figure). Une cicatrice gliale bien établie est formée par des astrocytes ayant de long processus, formant une barrière, empêchant la croissance axonale, mais aussi empêchant l'extension de la réaction inflammatoire protégeant ainsi le tissu sain (modifié d'après Sofroniew 2009).

Cette inhibition de la régénération est en partie due à la surexpression des CSPGs (Silver et *al.*, 2004). Dans des expériences d'inhibition des CSPGs, la repousse neurale n'a pu avoir lieu qu'après un traitement enzymatique dégradant les CSPGs (Silver et *al.*, 2004). Les mêmes résultats ont été observés par une désactivation du gène du GFAP (*glial fibrillary acidic protein)* et de la vimentine. En effet, dans cette expérience, l'extinction de ces gènes diminue la cicatrice gliale et favorise la régénération axonale après un AVC. Cependant, dans cette étude la réduction de la cicatrice gliale a aggravé la lésion cérébrale (Sofroniew 2009).

1.2.6 Régénération endogène et récupération fonctionnelle

1.2.6.1 Plasticité cérébrale après l'ischémie cérébrale

Selon la HAS, 75% des patients survivant après un AVC conservent des séquelles plus ou moins importantes selon l'étendu et la localisation de l'infarctus. Les déficits des fonctions motrices, sensorielles, et cognitives peuvent toutefois diminuer avec le temps grâce à la plasticité cérébrale. Cette dernière inclut des changements anatomophysiologiques cellulaires et moléculaires telle la repousse axonale et la modification de l'expression de divers facteurs qui influent sur la récupération fonctionnelle (Carmichael *et al.* 2005). Cette plasticité a lieu essentiellement dans les 3 mois qui suivent l'ischémie cérébrale (figure 21) (Jaillard *et al.* 2009).

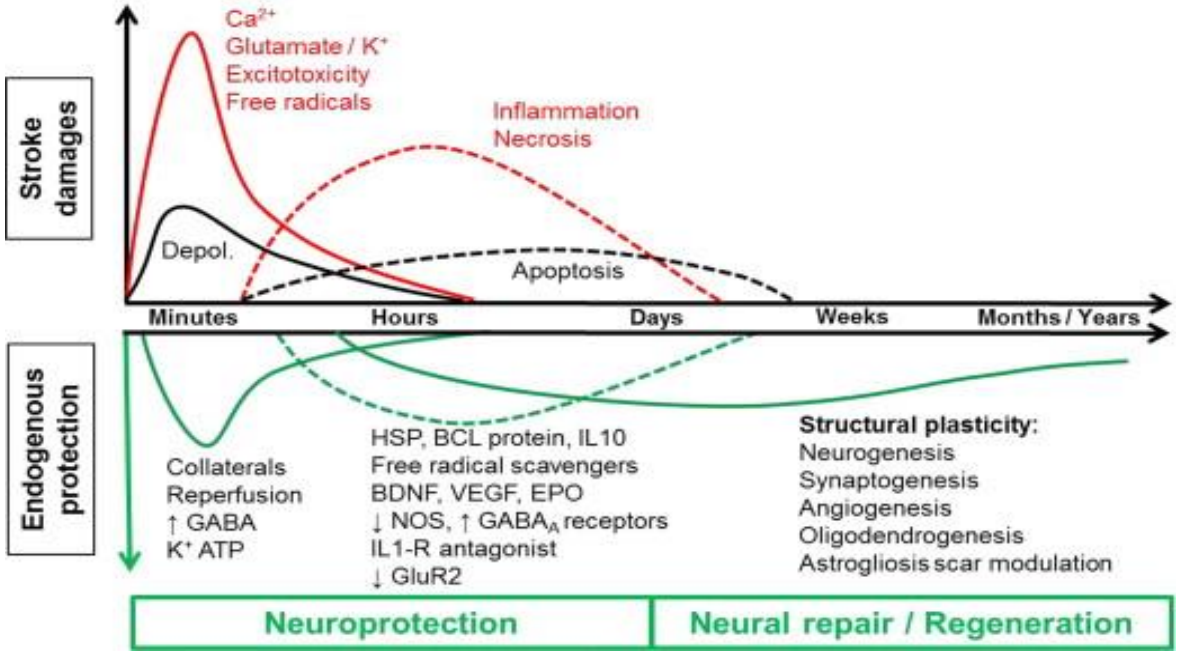


Figure 21 : **Cinétique des mécanismes endogènes de neuroprotection et de régénération cérébrale** (D'après Detante et *al*. 2014).

Les évènements de récupération fonctionnelle et de réparation tissulaire ont lieu essentiellement dans l'hémisphère ipsilatéral, et peuvent être étendus à l'hémisphère controlatéral si l'étendu de la lésion est considérable. Ces évènements peuvent être modulés selon des facteurs cellulaires (inflammation, réaction gliale, apoptose,...), moléculaires (sécrétion de facteurs favorisant ou inhibant la plasticité), l'âge, les antécédents du patient, et l'environnement (Benowitz *et al.* 2007; Cramer 2008)

Comme mentionné précédemment, la plasticité cérébrale passe en partie par un phénomène de plasticité synaptique. Des études *in vivo*, ont montré qu'après une oACM permanente chez le rat, l'activation des récepteurs NMDA est potentialisée pendant 4 semaines (Centonze *et al.* 2007). Les reconnexions des synapses perdues sont favorisées par des potentialisations à long terme dans le cortex ipsilatéral (Sist *et al.* 2011). En outre, après un AVC, on assiste à un remodelage neuro-anatomique de la région péri-lésionnelle avec une croissance axonale, un remodelage dendritique et une synaptogenèse accompagnée par une expression de GAP-43 qui persiste pendant des semaines après l'AVC (C. E. Brown *et al.* 2008). Ce remodelage passe par une modification précoce de l'expression génique des facteurs favorisant ou inhibant la croissance axonale, et qui perdure plusieurs mois après l'AVC (Carmichael et *al.,* 2005). En effet, l'augmentation de la synaptophysine et de la GAP-43, facteurs favorisants la plasticité cérébrale, est observée pendant quelques mois après une ischémie cérébrale chez la souris (Gorup *et al.* 2015). L'expression des gènes inhibiteurs de la croissance axonale tels que l'éphrine-A5 et le brevican fluctuent également pendant la récupération. C'est donc l'équilibre des profils d'expression favorisant la croissance axonale et son inhibition qui régit la plasticité adaptative après une atteinte ischémique (figure 21).

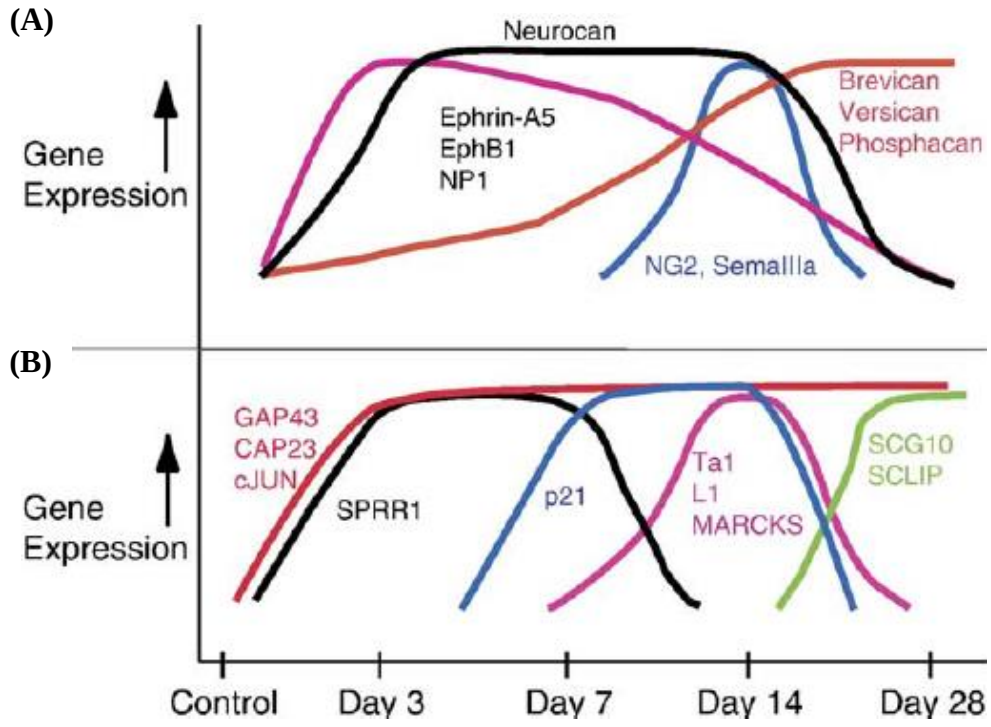


Figure 21 : **Expression génique après la survenue de l'AVC.**

Cinétique de l'expression des gènes **(A)** favorisant ou **(B)** inhibant la plasticité cérébrale (D'après Carmichael et *al.* 2005)

L'utilisation de l'imagerie fonctionnelle a démontré que les patients atteints d'altérations sensorimotrices ont une réorganisation corticale (Carey *et al.* 2006). De plus, l'augmentation de l'activité sensorimotrice dans le cortex ipsilatéral a été corrélée avec une amélioration de la récupération fonctionnelle des patients (Schaechter *et al.* 2006). Des études *in vivo* ont aussi montré une réorganisation neuro-anatomique après un AVC. En 2009, Winship et Murphy ont montré qu'un AVC chez les rongeurs endommageant le cortex somatosensoriel antérieur abouti à un remodelage de la représentation des membres antérieurs. En effet, les auteurs ont montré que la cartographie adaptative est initiée au niveau cellulaire par les neurones survivants ayant adopté de nouveaux rôles en plus de leur fonction habituelle. Après la récupération fonctionnelle, ces neurones "multitâches" deviennent plus sélectifs à un stimulus particulier, ce qui peut refléter une

phase transitoire dans une fonction sensorimotrice à une nouvelle fonction qui remplace le neurone perdu (Winship *et al.* 2009).

À la suite d'une ischémie cérébrale, la plasticité cérébrale peut aussi être observée dans l'hémisphère controlatéral. L'activité élevée dans l'hémisphère controlatéral a généralement été associée à des infarctus étendus et, en tant que telle, à une mauvaise récupération (Schaechter *et al.* 2006). Le recrutement du cortex moteur controlatéral des patients atteints de lésions étendues a été confirmé en utilisant l'IRM fonctionnelle (Bestmann et *al.*, 2010), suggérant que les régions controlatérales du cerveau peuvent participer à la récupération de l'AVC. Les observations cliniques montrent que les patients qui ont un second AVC dans l'hémisphère controlatéral présentent de plus grands déficits sensorimoteurs et perdent les capacités fonctionnelles récupérées après le premier AVC (Riecker *et al.* 2010).

Comme mentionné précédemment, pendant la phase de récupération post-AVC, l'imagerie fonctionnelle montre des modifications dans les profils d'activation somatosensorielle non seulement dans le cortex ipsilatéral mais aussi dans le cortex controlatéral (C. E. Brown *et al.* 2008; Weber *et al.* 2008). Cependant, cette activation du cortex controlatéral est transitoire. À la suite d'une stimulation du membre touché par l'ischémie, l'activation du cortex controlésionnel est observée dès le premier jour après l'ischémie, puis diminuée à 3 jours et devient inexistante à 14 jours (Dijkhuizen *et al.* 2003) (figure 22). D'autres études ont montré que l'activation controlatérale n'est pas toujours observée, et la récupération des fonctions sensorimotrices est principalement associée à la restauration de l'activité ipsilatérale (Weber *et al.* 2008).

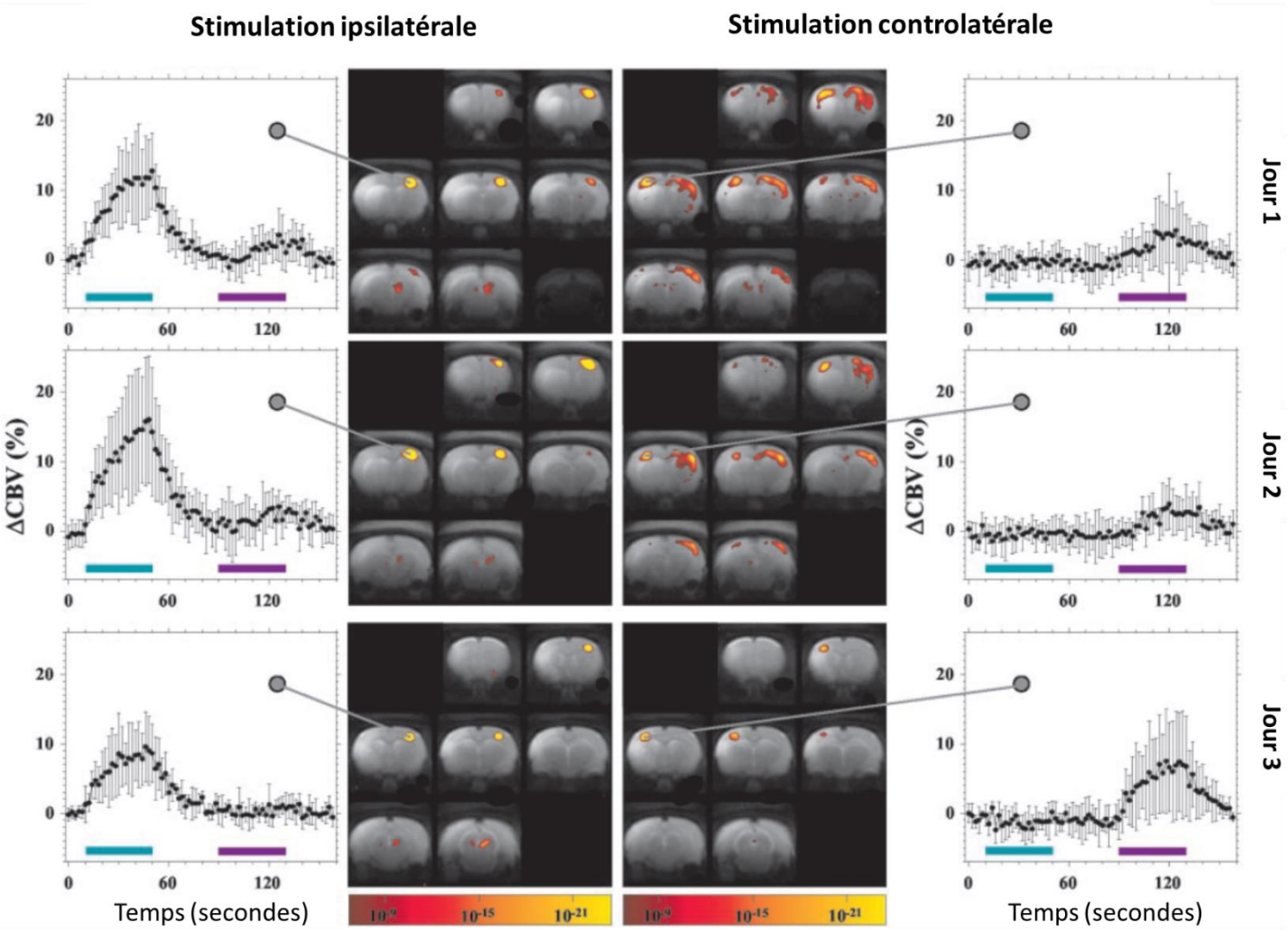


Figure 22 : **Activations corticales après stimulation du membre contro- ou ipsi-latéral**
CBV : *cerebral blood volume* (volume sanguine cérébral) (D'après Dijkhuizen et *al.*, 2003)

Deux autres phénomènes sont majeurs pour la régénération tissulaire et la récupération fonctionnelle après un AVC: l'angiogenèse et la neurogenèse.

1.2.6.2 L'angiogenèse

Dans les 12 à 24 premières heures suivant l'ischémie cérébrale, le système vasculaire est activé pour la création de nouveaux vaisseaux. Ce processus peut se faire par angiogenèse (prolifération

de cellules endothéliales à partir de vaisseaux préexistants) et/ou vasculogenèse (recrutement de progéniteurs issus de la moelle osseuse qui génèrent ensuite de nouveaux vaisseaux) (H. Beck *et al.* 2009; Greenberg *et al.* 2013). Après une ischémie cérébrale, l'angiogenèse et la vasculogenèse sont activées par la sécrétion de nombreux facteurs de croissance dits angiogéniques dont le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), le FGF-2 et les angiopoïétines-1 et -2 (Ang-1 et -2). Ces dernières se lient à leur récepteur Tie-2. Ce récepteur est exprimé de façon prédominante dans les cellules endothéliales. L'Ang-1 en se liant à Tie-2 induit sa phosphorylation, et maintien ainsi la stabilité vasculaire. Ang-2 inhibe cette phosphorylation par compétition, déstabilisant les vaisseaux et activant l'angiogenèse (Gurnik *et al.* 2016). À la suite d'une ischémie cérébrale, l'expression d'Ang-2 augmente, permettant l'initiation de l'angiogenèse par la désolidarisation de la lame basale des cellules endothéliales. Ces dernières vont être en contact avec le VEGF, qui stimule leur prolifération, et recrute les cellules endothéliales progénitrices. De façon tardive, l'Ang-1 est surexprimée afin de stabiliser les vaisseaux nouvellement créés et permettre leur maturation (figure 23) (Kiersznbaum 2006).

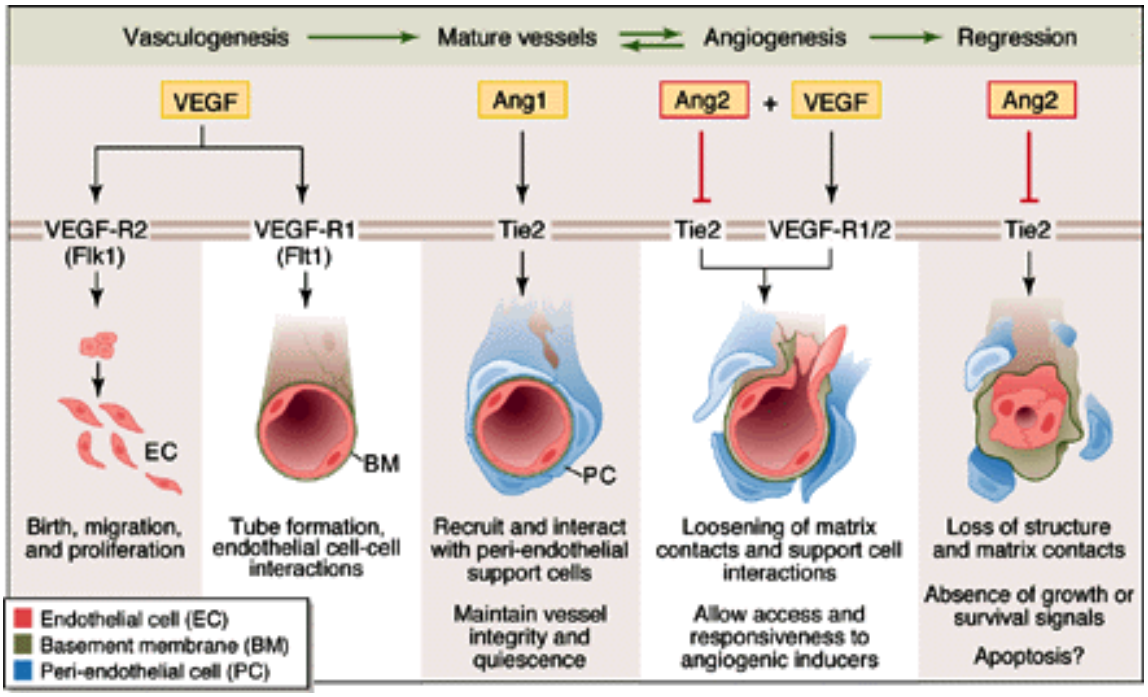


Figure 23 : **Implication du VEGF et l'Ang-2 dans l'angiogenèse** (D'après Hanahan et *al*., 1997).

Le VEGF est surexprimé dans les premières heures qui suivent l'ischémie cérébrale avec un pic atteint à 7 jours (Kovacs *et al.* 1996; Slevin *et al.* 2000). Cependant, d'autres études ont montré une expression du VEGF qui atteint un pic dans les 12h et 48h après l'ischémie cérébrale chez la souris (Marti *et al.* 2000). Ce facteur est impliqué dans la création de nouveaux vaisseaux en favorisant l'angiogenèse mais aussi comme chimioattractant en mobilisant les cellules endothéliales progénitrices circulantes (Greenberg *et al.* 2013). En effet, après l'ischémie cérébrale, le VEGF est retrouvé dans le plasma des patients. Or, les cellules progénitrices expriment les

récepteurs au VEGF. Le blocage de ces récepteurs bloque la mobilisation de ces cellules et altère la vasculogenèse (Slevin et *al.*, 2000) (figure 24)

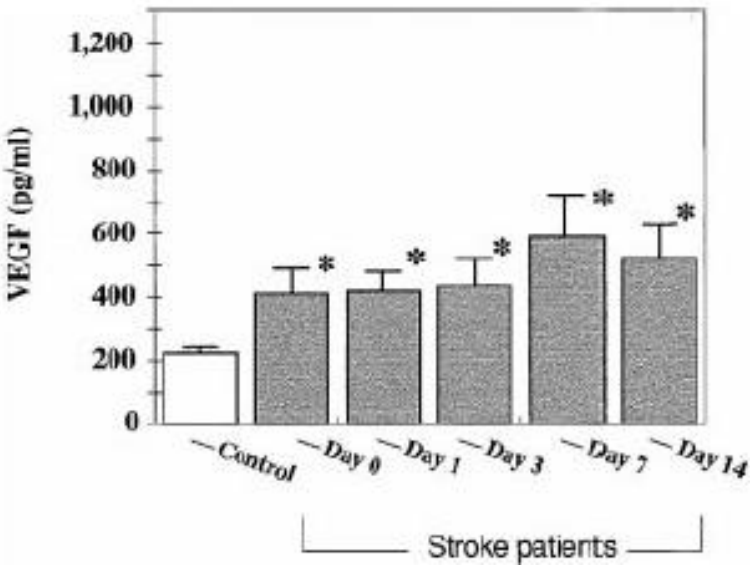


Figure 24 : **Dosage plasmatique du VEGF chez des patients ayant eu un AVC ischémique** (D'après Slevin et *al.* 2000).

Dans une étude menée par Krupinski et ses collègues (Krupinski *et al.* 1994), les auteurs ont analysé l'angiogenèse dans les cerveaux de 10 patients ayant survécu 5 à 92 jours après un AVC. Les résultats ont montré une augmentation significative du nombre de vaisseaux par immunomarquage, dans la zone périlésionnelle qui est corrélée positivement à la durée de survie des patients après l'AVC (Krupinski *et al.* 1994).

Dans une étude plus récente publiée par Navarro et ses collègues en 2011, les auteurs ont étudié les facteurs pro- et anti-angiogéniques présents dans le plasma de 109 patients ayant eu un AVC touchant le territoire de l'ACM, et traités par thrombolyse. Les données ont montré que l'augmentation des facteurs pro-angiogéniques (stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)α, FGF, ou le VEGF-A) par rapport aux facteurs anti-angiogéniques (endostatine, angiostatine,

thrombospondine-1 et -2) est corrélée avec une meilleure récupération fonctionnelle des patients mesurée avec l'échelle NIHSS (Navarro-Sobrino *et al.* 2011).

Il est intéressant de noter que les facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF ont également des effets neuroprotecteurs après l'ischémie cérébrale. L'administration du VEGF exogène après une ischémie cérébrale réduit l'œdème et le volume lésionnel après une oACM de 4h, tout en augmentant l'angiogenèse cérébrale (Manoonkitiwongsa *et al.* 2004). Ce rôle du VEGF a été confirmé par l'administration d'anticorps anti-VEGF, ayant pour conséquence, une augmentation du volume de l'infarctus cérébrale après une oACM (Hayashi *et al.* 1998; Talwar *et al.* 2014). Cependant, d'autres études ont démontré que le VEGF a des effets délétères lors de la phase aiguë de l'AVC par l'augmentation de la MMP-9 associée à la perméabilisation de la BHE (Valable *et al.* 2005).

La récupération fonctionnelle est en partie dépendante de l'angiogenèse. Cette dernière pouvant être elle-même liée à la neurogenèse post-ischémique (Pellegrini *et al.* 2013).

1.2.6.3 La neurogenèse

La neurogenèse adulte a fait l'objet de nombreux débats. Le dogme était que la neurogenèse est inexistante à l'âge adulte. En 1962 Altman et Das prouvent le contraire avec une étude *in vivo* chez le rat adulte, observant la genèse de nouveaux neurones au niveau de l'hippocampe (Altman 1962). La neurogenèse a été confirmée dans plusieurs études au niveau de la zone sous-ventriculaire (ZSV) (Reynolds *et al.* 1992; Richards *et al.* 1992), et dans la zone sous granulaire (ZSG) du gyrus denté du rongeur adulte (Gage *et al.* 1995). Plus tard, Eriksson et collaborateurs montrent que la neurogenèse hippocampique existe aussi chez l'Homme adulte (Riksson *et al.* 1998).

Seize ans après l'étude d'Eriksson et collègues, le débat est relancé avec deux publications montrant des résultats opposés, Sorrells et collègues suggérant une absence de neurogenèse

hippocampique, et Boldrini et collègues redémontrant au contraire la présence de neurogenèse chez l'adulte (Boldrini *et al.* 2018; Sorrells *et al.* 2018).

Récemment une troisième niche de cellules souches neurales a été mise en évidence dans l'hypothalamus chez les rongeurs (Sharif *et al.* 2017). Cette même niche a aussi été mise en évidence chez l'Homme, par la présence de cellules exprimant les marqueurs de cellules souches neuronale et de neuroblastes. En effet, des cellules exprimant la nestine, sox2, la vimentine, et la GFAP ont été observées le long de la paroi du 3ème ventricule. De plus, lors de leur migration, à l'instar des cellules souches de ZSV et ZSG, ces cellules expriment la doublecortine (DCX) (Sharif et *al.*, 2017).

La neurogenèse a été démontrée après ischémie cérébrale dans de nombreux modèles *in vivo*. En 2006, Kokaia et collaborateurs ont démontré dans un modèle d'oACM chez le rongeur, que la ZSV ipsilatérale subit des modifications morphologiques et fonctionnelles à long terme. La taille de la ZSV croit jusqu'à 6 semaines après l'oACM, phénomène expliqué par la multiplication des cellules souches dans cette zone. Cette production de neuroblastes continue jusqu'à 1 an après l'ischémie et ceci même dans des cerveaux de rats âgés (Kokaia *et al.* 2006).

Produits dans la ZSV et la ZSG, les neuroblastes expriment des marqueurs spécifiques dont la DCX. Ces derniers guidés par des chimioattractants (SDF-1/CXCR4) vont migrer vers le site lésionnel (Kokaia et *al.*, 2006). Cette étape est importante, car 80% des cellules générées meurent par apoptose (Arvidsson *et al.* 2002). En effet, un co-marquage de la DCX avec le marqueur apoptotique PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) a été observé sur ces cellules. De plus, l'administration d'un inhibiteur la caspase-3 augmente le nombre de cellules marquées à la DCX (Kokaia *et al.* 2006). Cette mort neuronale précoce des cellules neuronales nouvellement formées, peut être expliquée par l'inflammation tissulaire induite par l'ischémie cérébrale et/ou par l'absence

d'établissement de connexions synaptiques de ces nouvelles cellules avec les autres cellules (Kokaia et *al.*, 2006). Arrivées au site lésionnel, les cellules n'expriment plus le marqueur de neurone immature DCX (figure 25), et expriment plusieurs marqueurs dont NeuN et MAP-2, signe de la maturation neuronale (Abrous *et al.* 2005).

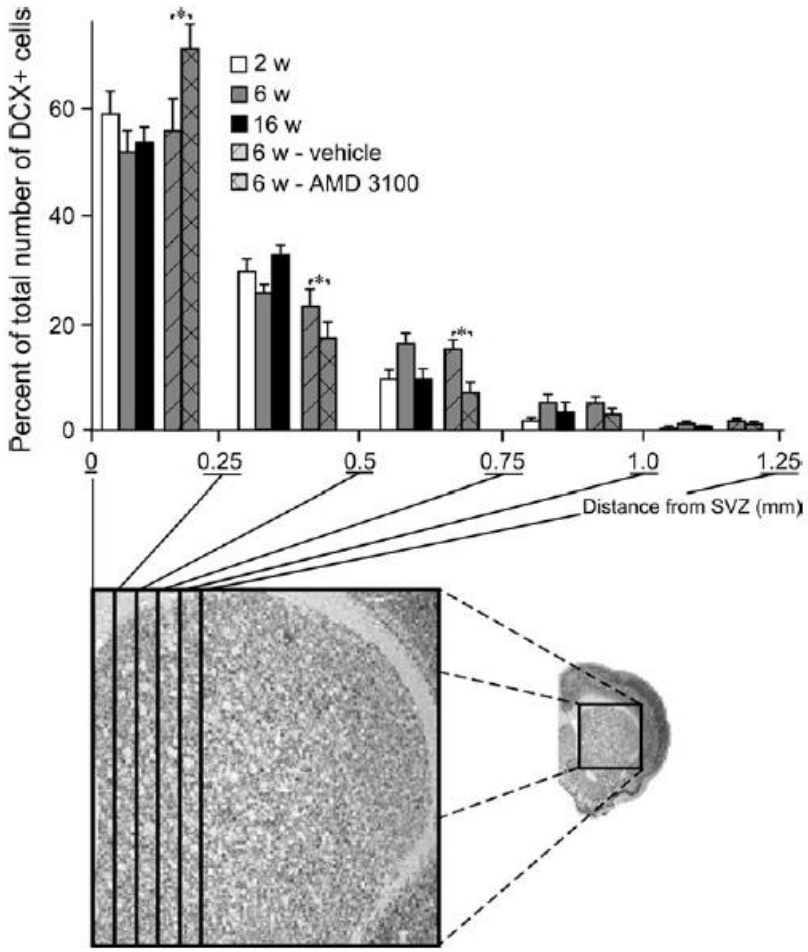


Figure 25 : **Expression de la DCX après une ischémie cérébrale**

Distribution des cellules DCX^+ nouvellement formées 2, 6 et 16 semaines après oACM, de la ZSV au striatum. La migration des cellules DCX^+ est dépendante de l'interaction SDF-1/CXCR4. L'administration intraventriculaire de l'AMD3100 (inhibiteur de CXCR4) à 6 semaines après oACM inhibe la migration cellulaire au striatum (D'après Kokaia et *al.* 2006).

Au final, seul 0.2% des cellules générées arrivent à maturation et deviennent fonctionnelles après l'ischémie (figure 26) (Arvidsson *et al.* 2002). Ce constat démontre la nécessité de développer de nouvelles thérapies pour améliorer la neurogenèse, et de façon plus générale, améliorer la récupération fonctionnelle. Pour le développement de ces thérapies, il est essentiel de comprendre les mécanismes sous-jacents de la communication cellulaire pour laquelle la MEC joue un rôle central.

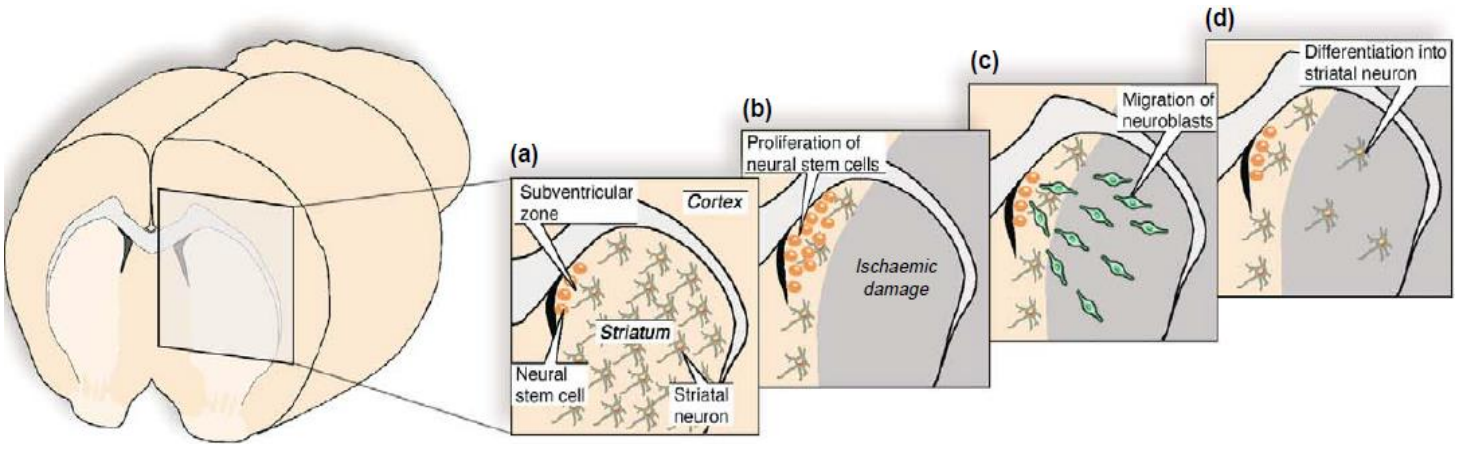


Figure 26 : **Neurogenèse dans le striatum après ischémie cérébrale focale transitoire**

(a) Les cellules souches neurales ou les progéniteurs neuronaux dans la ZSV **(b)** L'oACM menant à une perte cellulaire striatitale et corticale induit une augmentation de la prolifération des progéniteurs à partir de la ZSV. **(c)** Les neuroblastes migrent jusqu'à la zone lésionnelle **(d)** où ils vont finir leur différenciation en neurones mature (D'après Kokaia et *al*. 2003).

1.2.7 La MEC et la réparation tissulaire

1.2.7.1 Généralités sur la MEC

La MEC est une structure acellulaire formée de différentes macromolécules qui constituent l'échafaudage de tous les tissus. Sa proportion, et sa composition change en fonction des tissues. C'est une structure dynamique en remodelage constant. La MEC forme un réseau tridimensionnel, interagissant et connectant les cellules entres-elles, mais aussi en connectant les cellules avec les molécules de signalisation présentes dans l'espace extracellulaire. Par l'adhérence des cellules à la MEC cette dernière régule leur forme et leur motilité. La MEC sert aussi de réservoir aux différentes molécules de signalisation, régulant leur biodisponibilité par la formation de gradient, et les protégeant de la dégradation par les protéases (Hynes *et al.* 2012; Wilgus 2012).

Les macromolécules composant la MEC sont de 3 types : les protéines de structure (collagène, élastine), les protéines d'adhésion (laminine, fibronectine) et les protéoglycanes.

La MEC constitue entre 10 et 20% du volume total du cerveau (Lau *et al.* 2013). Dans le cerveau, elle se dispose en 3 compartiments majeurs : la membrane basale, le réseau péri-neuronal, et la matrice interstitielle.

La membrane basale sépare les cellules endothéliales du parenchyme cérébral. Elle est majoritairement constituée de collagène, laminine, fibronectine, et des HSPGs de type dystroglycanes et perlecanes. La membrane basale entre dans la composition de la BHE, protégeant le parenchyme cérébral du compartiment vasculaire.

Le réseau péri-neuronal, est un réseau dense autour des corps neuronaux et des dendrites. Il est composé principalement de protéoglycanes de type CSPGs, mais aussi de laminine et fibronectine. Ce réseau permet la stabilisation des connexions et le maintien de la plasticité synaptique.

Enfin, le réseau matriciel interstitiel comprend la MEC qui n'est pas organisée en une structure particulière telle que la membrane basale ou les réseaux péri-neuronaux. Il comprend toutes les différentes molécules citées auparavant : protéoglycanes, hyaluronane, collagènes, élastines, laminines, et fibronectines (figure 27) (Lau *et al.* 2013).

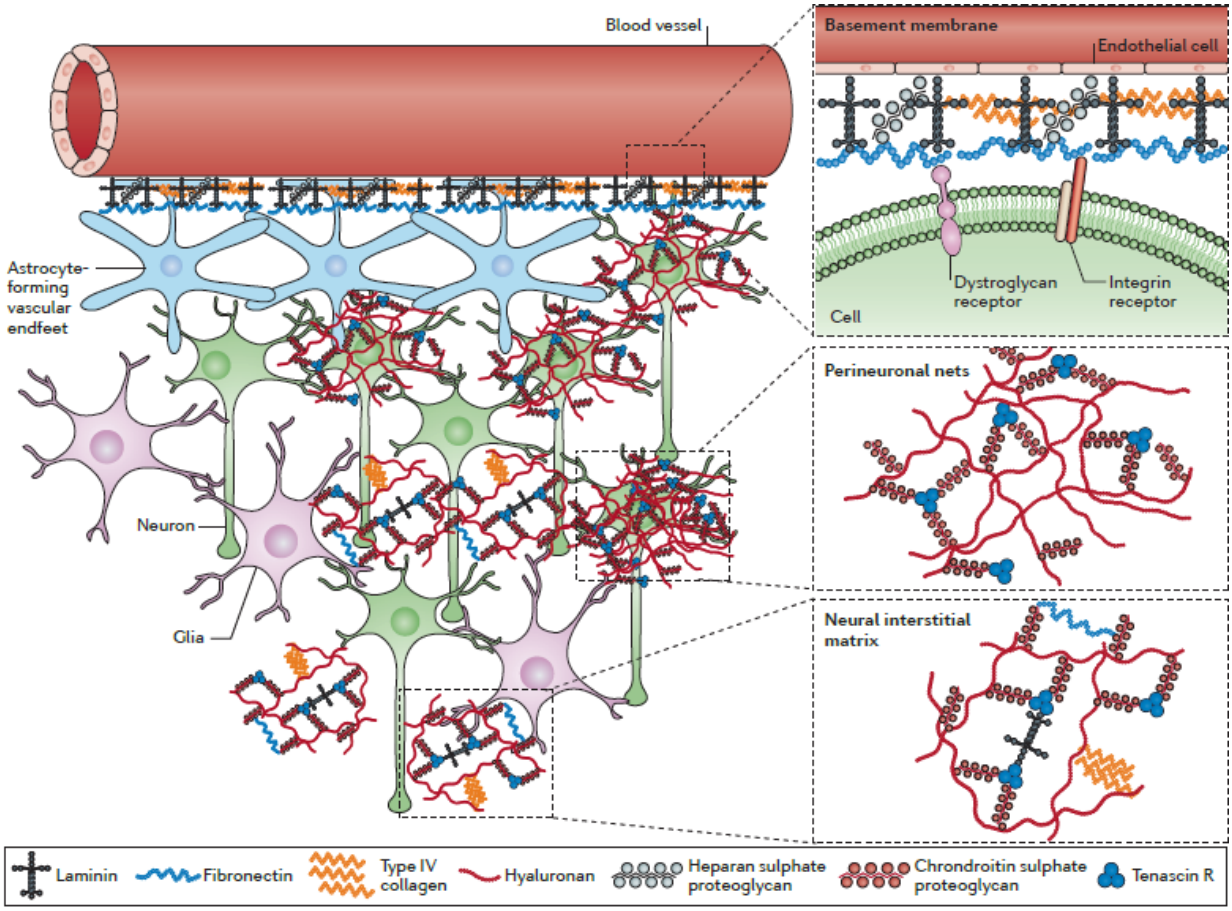


Figure 27 : **Les trois compartiments majeurs de la MEC dans le SNC** (D'après Lau et *al.* 2013).

La MEC du parenchyme cérébral se compose principalement de protéoglycanes. Ces derniers sont constitués d'un corps protéique auquel sont attachés des chaines de glycoaminoglycanes (GAGs). Différents types de protéoglycanes sont présents dans le SNC : CSPGs, les HSPGs, les dermatanes sulfate protéoglycanes, et les kératanes sulfates protéoglycanes (Lau et *al.*, 2013).

Les protéoglycanes se différencient par leur composition du corps protéique et/ou des GAGs qui y sont attachés. Les GAGs sont de longues chaines de 20 à 200 unités disaccharidiques répétées, sulfatées à plusieurs positions, leur conférant une charge négative. La nature des unités disaccharidiques détermine celle des GAGs, et des protéoglycanes. Ces unités sont formées par l'association d'un galactose, acide glucuronique, ou acide iduronique à un N-acétylglucosamine ou un N-acétylgalactosamine (figure 28) (Mihov *et al.* 2015).

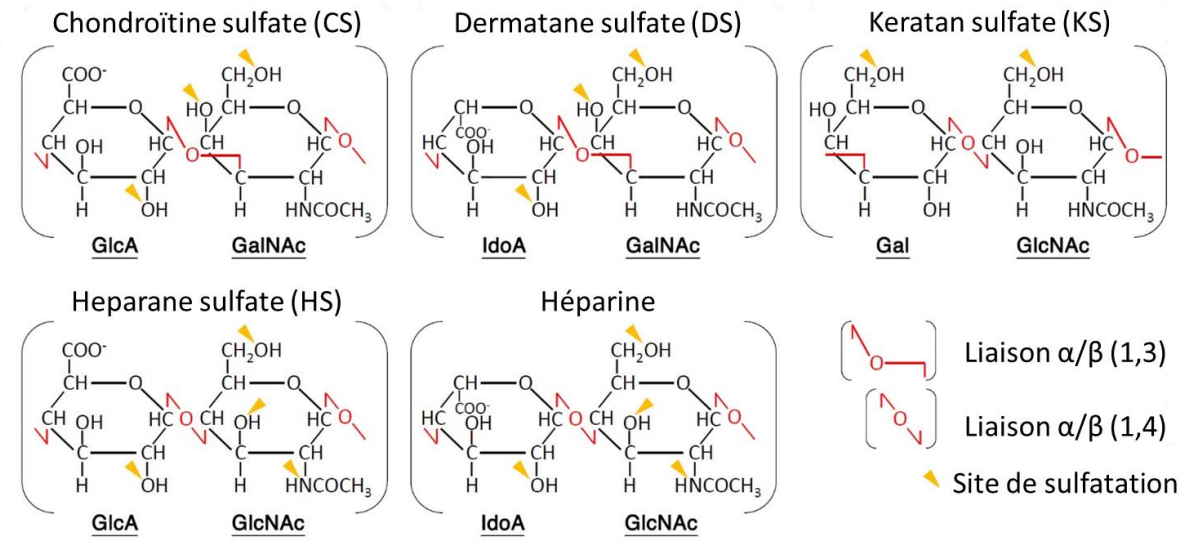


Figure 28 : **Structure et synthèse des chaines des glycosaminoglycanes.**
Les GAGs sont des chaines de polysaccharides formées de : xylose (Xyl), galactose (Gal), acide glucuronique (GlcA), acide iduronique (IdoA), N-acétyl-glucosamine (GlcNAc), N-acétyl-galactosamine (GalNAc). Les GAGs peuvent être sulfatés à différents sites représentés par les flèches en orange (D'après Mihov et Spiess 2015).

1.2.7.2 Le rôle des HSPGs

Comme définis précédemment, les HSPGs sont des protéines sur lesquelles sont attachées des chaines d'héparane sulfate. Les HSPGs peuvent être classifiés en 3 types : les HSPGs trans-membranaires comprenant des molécules telles le syndécane, le bétaglycane, et le CD44v3; les HSPGs de la famille des glypicanes qui sont liés à la membrane par une encre glycosylphosphatidylinositol; et enfin les HSPGs secrétés comme par exemple l'agrine, le perlécane, et le collagène XVIII (Bishop *et al.* 2007). Physiologiquement les HSPGs ont des rôles différents (figure 29). Le perlécane, l'agrine, le collagène XVIII sont présents dans la membrane basale, et aident à la migration cellulaire. La serglycine est retrouvée au niveau des vésicules sécrétées par les cellules hématopoïétiques, et cellules immunitaires. La serglycine joue un rôle dans la formation des vésicules, leur maintien, et aussi le maintien de l'activité des protéases qui sont dans les vésicules. Après sa sécrétion, la serglycine joue aussi un rôle dans la coagulation, l'immunité et la réparation tissulaire (Sarrazin *et al.* 2011).

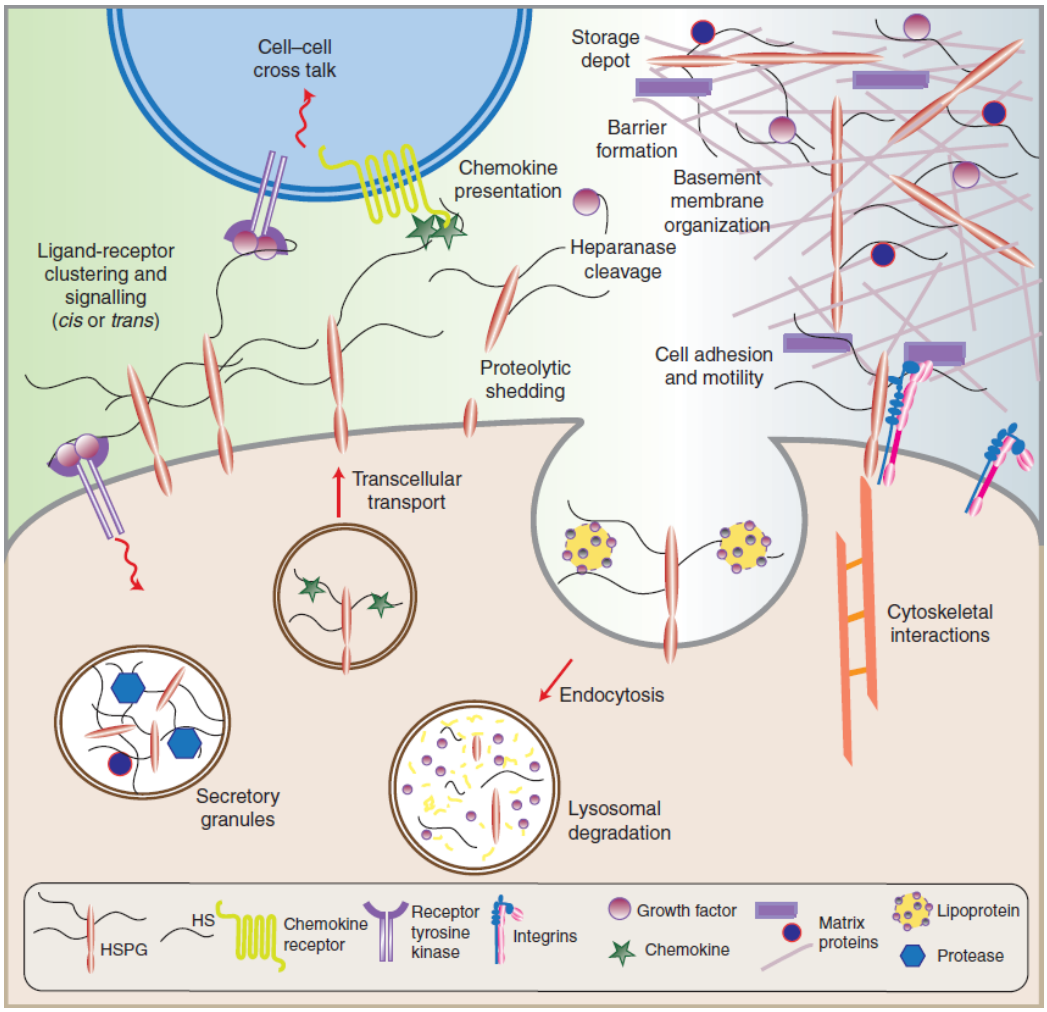


Figure 29 : **Rôles des HSPGs dans les cellules et les tissus** (D'après Sarrazin et *al.* 2011).

D'autre part, les HSPGs peuvent lier, stocker, et protéger différentes molécules : cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, et morphogènes. Ces facteurs peuvent être libérés par une dégradation contrôlée des chaines d'héparane sulfate (HS). Cette libération moléculaire progressive forme des gradients nécessaires à la différentions cellulaire lors du développement, mais servent aussi dans le recrutement et la migration des leucocytes et cellules souches. Les HSPGs peuvent aussi avoir un rôle de récepteur et de co-récepteur de facteurs de croissance type tyrosine-kinase, en diminuant leur seuil d'activation ou en prolongeant leur activation. Enfin, les

HSPGs membranaires interagissent avec les intégrines pour faciliter l'adhésion des cellules avec la MEC, l'adhésion intercellulaire, et la motilité cellulaire (Chua *et al.* 2004).

1.2.7.3 Les HSPGs dans l'ischémie cérébrale

Les HSPGs ont un rôle dans la phase aiguë et chronique de l'AVC. Dans les temps courts qui suivent l'ischémie cérébrale, l'inflammation active différentes enzymes protéolytiques telles que les MMPs ou l'héparanase. Ces enzymes activés en excès dégradent la MEC et les HSPGs ; interférant ainsi avec leurs fonctions physiologiques. En 2007, Takahashi et collègues ont observé une augmentation de l'expression de l'héparanase dans les astrocytes. Cette activité pourrait être corrélée avec la migration astrocytaire vers le site lésionnel et le début de la réaction astrogliale menant à la mise en place et à la formation de la cicatrice gliale (Takahashi *et al.* 2007). Le clivage des héparanes sulfate (HS) par les héparanases produit des oligosaccharides de 4 à 7 kDa qui restent biologiquement actifs, interagissant avec différents ligands et facilitant leur interaction avec les récepteurs cible (Zhang 2014). Cette observation pourrait confirmer que les héparanases peuvent jouer un rôle anti-inflammatoire. En effet, après une ischémie cérébrale, les héparanases sont surexprimés par les cellules endothéliales et les astrocytes (Zhang 2014). Or son expression au niveau des cellules endothéliales pourrait dégrader les HSPGs de la membrane basale et empêcher l'infiltration leucocytaire. Les héparanases produites par les astrocytes, dégradent les HS qui peuvent toujours lier et potentialiser des molécules anti-inflammatoires telles que le TGF-β. Les HS peuvent lier et moduler l'effet de nombreuses cytokines telles que les MIP, RANTES, IL-8, IL-2, et l'IL-10 (Sarrazin *et al.* 2011). De plus, l'augmentation de l'expression des héparanases dans les cellules endothéliales, 3 à 7 jours après l'ischémie, coïncide avec celle du FGF-2, et de l'Ang-2 ; deux facteurs angiogéniques et neurogéniques (J. Li *et al.* 2012). Une hypothèse serait que cette sécrétion d'héparanase pourrait faciliter la création de nouveaux vaisseaux, la migration de

nouveaux neurones, et favoriser la repousse axonale. Cependant, une activation excessive de l'héparanase pourrait aggraver la lésion ischémique. En effet, l'un des phénomènes majeurs lors d'un AVC est la rupture de la BHE, donnant lieu à un œdème cérébral (Venkat *et al.* 2017). Cette rupture est en partie due à la dégradation de la lame basale, et ses constituants particulièrement le perlécane appartenant à la famille des HSPGs. Roberts et collègues (2012) soutiennent l'intérêt du perlécane dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale (Roberts *et al.* 2012). Une première étude montre qu'une ischémie induite chez des souris exprimant que 10% de perlecane par rapport aux souris sauvages ont des lésions cérébrales plus étendues. Une deuxième étude montre que l'administration du domaine V du perlécane dans un modèle d'ischémie cérébrale, induit une neuroprotection, une récupération fonctionnelle, une réduction de la cicatrice gliale et une angiogenèse (Roberts *et al.* 2012)

Lors de la réaction gliale faisant suite à l'AVC, la MEC joue un rôle important dans la mise en place de la cicatrice gliale. En 2012, Hill et collaborateurs ont démontré que deux composants importants de la MEC, les HSPGs et les CSPGs, jouent un rôle clé dans le développement de la cicatrice gliale et dans la régénération post-ischémique cérébrale. Dans cette étude, des HSPGs ou une enzyme dégradant les CSPGs ont été administrés 7 jours après l'induction d'une ischémie permanente chez le rat. Les résultats ont montré que les HSPGs ou l'inhibition des CSPGs ont un effet bénéfique sur la régénération du tissu cérébral et la récupération fonctionnelle, en réduisant l'épaisseur de la cicatrice gliale, en augmentant la croissance des neurites et en augmentant aussi l'expression du FGF-2 (Hill *et al.* 2012). En effet, les CSPGs considérés comme ayant un rôle opposé aux HSPGs, sont secrétés par les astrocytes lors de l'ischémie et forment la cicatrice gliale (L. Huang, Z.-B. Wu, *et al.* 2014). Cette dernière va permettre de former une barrière pour empêcher l'extension de la lésion ischémique, mais elle va aussi empêcher la croissance axonale

et la régénération tissulaire lors de la phase chronique de l'AVC (L. Huang, Z.-B. Wu, *et al.* 2014). Les HSPGs ont un rôle prédominant dans la réparation tissulaire, et la récupération fonctionnelle, par leur rôle d'intéraction et de co-recepteur de différents facteurs de croissance. En effet, les HSPGs se lient notamment au VEGF et potentialisent ainsi son effet (Sun *et al.* 2003). Après une ischémie cérébrale, ce facteur voit son expression augmentée ce qui induit une augmentation de la plasticité cérébrale à travers une augmentation de l'angiogenèse, mais aussi de la neurogenèse (Sun *et al.* 2003). Les HSPGs potentialisent aussi les effets du FGF-2 (Roskoski 2012; Yashiro *et al.* 2016). Les HS agissent comme co-récepteurs pour l'activation des voies de signalisations ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*) dépendantes du récepteur du FGF-2. Cette voie de signalisation est impliquée dans différentes fonctions cellulaires : adhésion, cycle mitotique, migration, survie, différentiation, métabolisme et prolifération (Roskoski 2012). Ainsi les HSPGs ont un rôle complexe et sont impliqués dans différents processus cellulaires du développement jusqu'à l'âge adulte (Yamada *et al.* 2017). Leur régulation est importante pour l'homéostasie tissulaire, et la compréhension plus précise de leur mode de fonctionnement pourrait aboutir à des thérapies ciblant diverses pathologies (Figure 30).

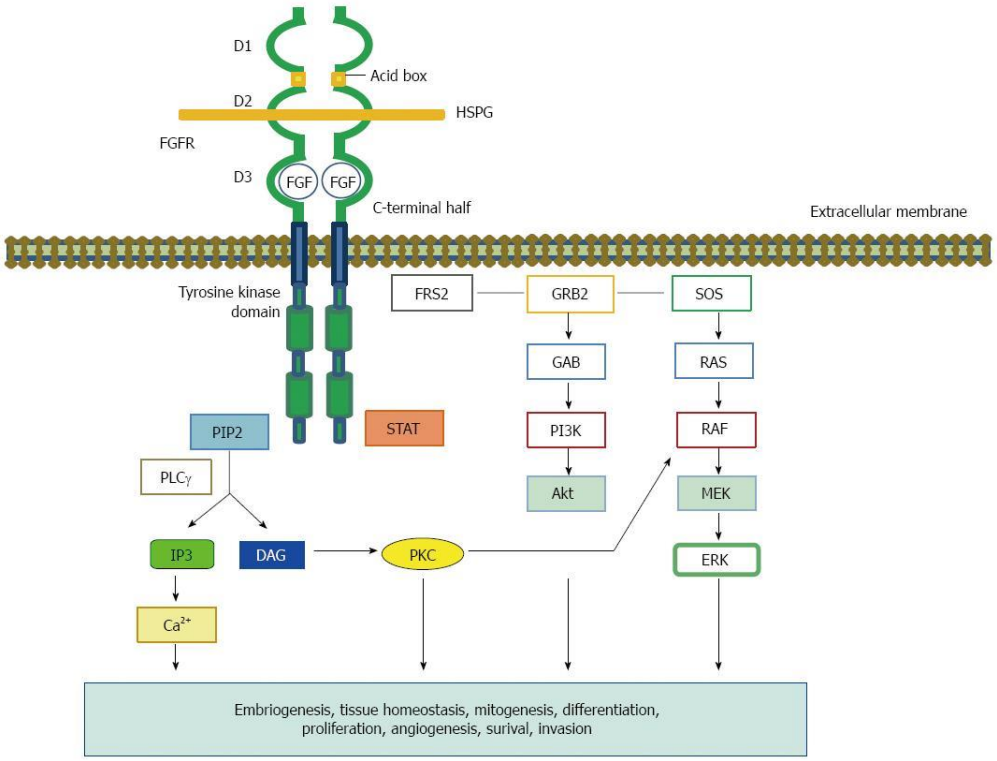


Figure 30 : **Rôle des HSPGs dans l'activation du récepteur au FGF** (D'après Yashiro et *al.* 2016).

1.3 Développement de nouveaux traitements pour l'ischémie cérébrale

Face au poids que représente l'AVC sur la société, de nombreuses stratégies thérapeutiques ont été étudiées (Karsy *et al.* 2017). Le seul traitement pharmacologique disponible en clinique, l'altéplase, n'est administré qu'à 3,3% des patients en Europe (Dequatre-Ponchelle *et al.* 2014). Lorsque la thrombolyse ou la thrombectomie est contre indiquée, il est nécessaire de disposer de solutions thérapeutiques neuroprotectrices et/ou régénératrices qui sont encore à ce jour inexistantes malgré des recherches intensives et des résultats prometteurs en préclinique.

Les stratégies thérapeutiques pourraient agir à différents niveaux en ciblant non seulement la mort neuronale (stratégies thérapeutiques dites neuroprotectrices) mais aussi la plasticité cérébrale et la récupération fonctionnelle (stratégies thérapeutiques dites régénératrices).

De 1995 à 2015 plus de 430 médicaments ont été testés pour l'ischémie cérébrale. Parmi ces 430 candidats, seulement 40 ont passé l'étape préclinique pour un test clinique, dont seulement un 1/3 cible un mécanisme de neuroprotection (Karsy et *al.,* 2017).

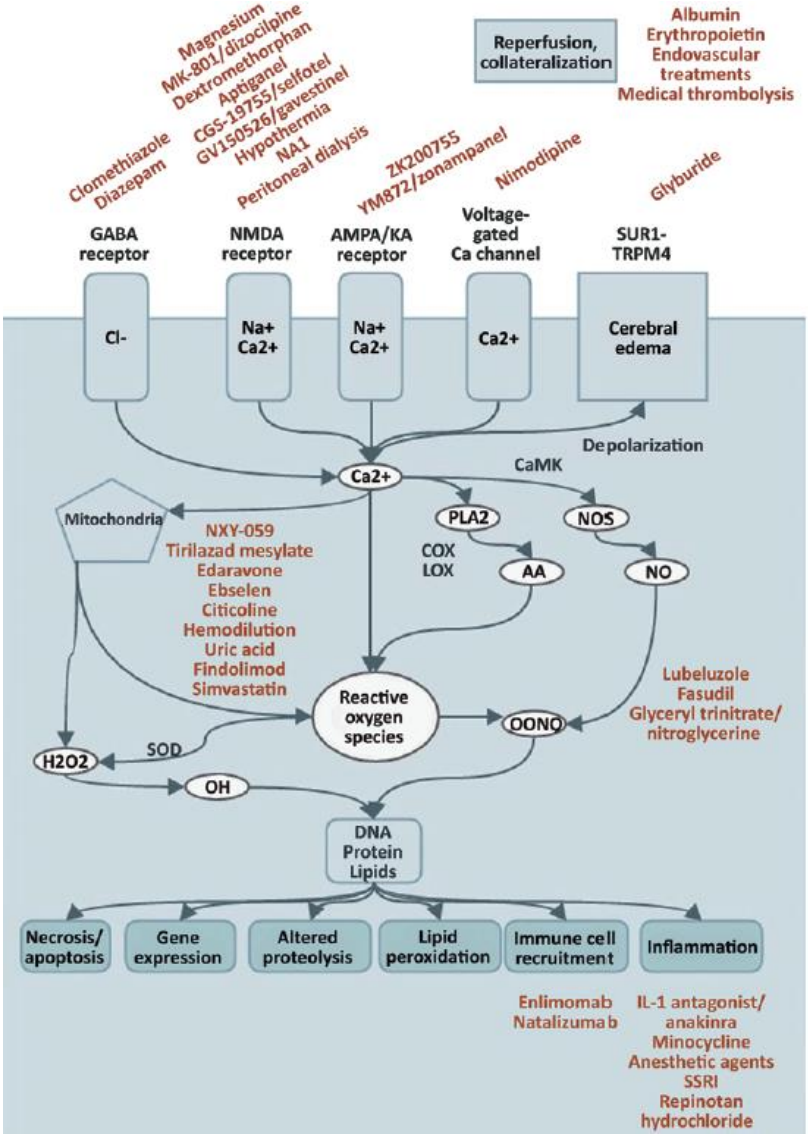


Figure 31 : **Différents traitements neuroprotecteurs ciblant la cascade ischémique après une ischémie cérébrale** (D'après Karsy et *al.* 2017)

AA: arachidonic acid; CaMK: calcium/calmodulin-dependent protein kinase; COX: cyclooxygenase; H2O2: hydrogen peroxide; KA: kainate; LOX: lipoxygenase; NO: nitric oxide; NOS: nitric oxide synthase; OH: hydroxide ion; OONO: peroxynitrite; PLA2: phospholipase A2; SOD: superoxide dismutase; SSRI: selective serotonin-reuptake inhibitor.

Selon une estimation, plus de 1000 composés à visée neuroprotectrice ont été testés, pour aboutir seulement à 200 essais cliniques sans aucune mise sur le marché (Minnerup *et al.* 2012). Parmi ces agents neuroprotecteurs, un composé en particulier s'est démarqué : le NXY-059.

Le cas du NXY-059

Le NXY-059 est un agent antioxydant qui piège les radicaux libres. Les résultats des essais précliniques, effectués chez le rat et le lapin ont montré une neuroprotection avec une diminution du volume lésionnel et une récupération fonctionnelle (cette dernière observée aussi chez le marmouset) après son administration jusqu'à 4 h après l'ischémie (Green 2008). Après ces études, 3 essais cliniques ont été mis en place dont deux concernent le traitement de l'AVC ischémique : SAINT (1700 patients) et SAINT I (3200 patients). L'analyse groupée de ces deux études n'a montré aucun effet du médicament par rapport au groupe placebo (Diener *et al.* 2008).

Plusieurs raisons ont été avancées pour essayer d'expliquer cet échec de translation thérapeutique. Les recommandations STAIR préconisent de mettre en évidence l'effet neuroprotecteur dans différents centres d'études avec différents modèles et différents investigateurs. Le NYX-059 a effectivement été testé dans différents centres, mais les résultats n'étaient pas reproductibles. De plus, son étude chez le marmouset n'a pas montré de diminution de lésion (diminution de 28% statistiquement non significative), mais uniquement une amélioration dans l'utilisation de bras gauche dans un seul test moteur (le stair case). D'autres facteurs dans le design de l'étude clinique ont pu contribuer à cet échec. En effet, lors de ces études, les patients inclus avaient des lésions hétérogènes, et la fenêtre thérapeutique était large incluant les patients jusqu'à 6 h après ischémie cérébrale. Or, les études précliniques ne portaient que sur un modèle d'ischémie cérébrale touchant l'ACM, et la fenêtre thérapeutique maximale ayant un montrée un effet bénéfique était de 3 h après l'ischémie. De plus, aucune étude n'a montré que cet agent pouvait franchir la BHE et atteindre le

site lésionnel (Savitz 2007). Ces échecs répétés dans le traitement de l'ischémie cérébrale visant la neuroprotection ont encouragé le développement de thérapies alternatives visant également la régénération tissulaire et récupération fonctionnelle. La thérapie cellulaire, à ce titre semble prometteuse.

1.3.1 La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire représente un nouvel espoir thérapeutique. En effet, la thérapie cellulaire peut être neuroprotectrice et/ou régénératrice, avec une large fenêtre thérapeutique allant de quelques heures à quelques semaines (de Vasconcelos dos Santos *et al.* 2010; Komatsu *et al.* 2010; S. H. Lee *et al.* 2015).

Plusieurs types cellulaires ont été testés dans le cadre de l'AVC : les cellules souches neurales, les cellules souches embryonnaires, les cellules souches pluripotentes induites, et les cellules souches mésenchymateuses (CSMs). Parmi ces cellules, les CSMs présentent plusieurs avantages. Ces cellules sont facilement obtenues à partir des patients, et peuvent être cultivées rapidement, sans poser de problèmes éthiques ni immunologiques majeurs (Houkin *et al.* 2017). Les CSMs peuvent être extraites à partir de plusieurs tissues : moelle osseuse, tissu adipeux, cordon ombilical, placenta, sang, etc. Ces cellules sont douées d'une plasticité incluant une capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires : neuronal, tendineux, musculaire, etc. (Sousa *et al.* 2014)

Devant la multiplicité des sources de CSMs, trois critères ont été retenus pour définir les CSMs : 1) ces cellules ont la capacité d'adhérer au plastique, 2) elles expriment des marqueurs spécifiques : $CD73^{+}$, $CD90^{+}$, $CD105^{+}$, $CD14^{-}$, $CD34^{-}$, $CD45^{-}$ et le HLA-DR^{-}, 3) elles ont la capacité de se différencier *in vitro* en adipocytes, chondrocytes, et ostéoblastes (Hass *et al.* 2011).

1.3.1.1 Thérapie cellulaire utilisant des CSMs dans l'ischémie cérébrale

Après une ischémie cérébrale, il a été montré que les CSMs migrent vers la lésion cérébrale. La migration des CSMs vers le site infarcie s'effectue grâce au CXCR-4 ; récepteur au SDF-1 exprimé par ces cellules (X. Liu *et al.* 2011). Une fois à côté du site lésionnel les CSMs peuvent exprimer des marqueurs neuronaux (Yano *et al.* 2005). Dans une expérience effectuée par Yano et collaborateurs, 7 jours après avoir induit une oACM permanente chez des souris, des CSMs ont été transplantées dans le striatum. Les observations ont montré que ces CSMs se retrouvent au niveau de la région infarcie, prolifèrent et expriment des marqueurs neuronaux MAP2 et NeuN jusqu'à 3 mois après leur transplantation (Yano *et al.* 2005). Dans une étude similaire, Li et collègues montrent que les CSMs transplantées dans le striatum 4 jours après une oACM, migrent vers la lésion, expriment le marqueur NeuN, et favorisent la récupération fonctionnelle des animaux (Y. Li *et al.* 2000).

L'effet des CSMs dans la réparation tissulaire et la récupération fonctionnelle après une ischémie cérébrale ne passerait pas uniquement par le phénomène de remplacement cellulaire. En effet, ces cellules sont connues pour secréter des facteurs de croissance neuroprotecteurs, neurogéniques, angiogéniques et immunomodulateurs. Les études soutiennent que l'effet bénéfique des CSMs passerait majoritairement par cette sécrétion paracrine de facteurs trophiques. Cette hypothèse est notamment soutenue du fait qu'après une injection de CSMs, celles-ci enclenchent un programme apoptotique dès les premières heures après leur arrivés dans le site lésionnel. En effet, Brenneman et collègues (2010) ont marqué des cellules mononucléaires (CMNs) issues de la moelle osseuse, contenant environ 0,5% de CSMs. Seulement quelques heures après leur administration intra-artérielle, le taux les cellules détectables décroit rapidement, dû à une mort cellulaire apoptotique (Brenneman *et al.* 2010) (figure 32).

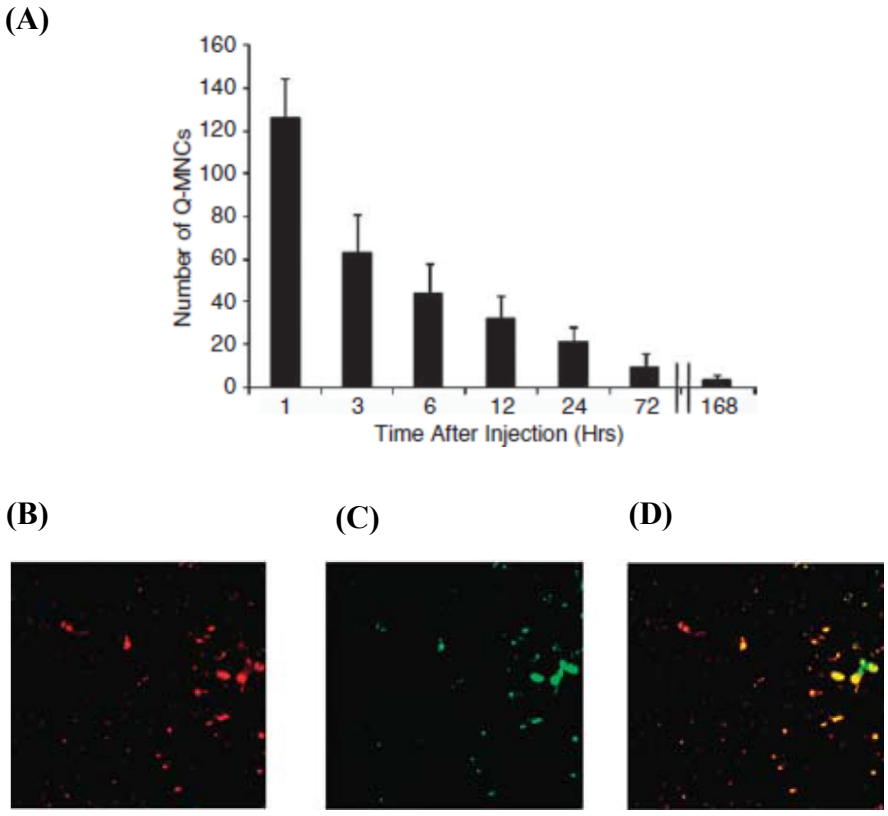


Figure 32 : **Le nombre de Q-CMNs en fonction du temps.**

(A) Le nombre de CMNs dans la zone péri-lésionnelle en fonction du temps.

Images de microscopie à fluorescence dans la région péri-lésionnelle illustrant en **(B)** les CMNs marqués (Q-CMNs), en **(C)** des cellules marquées (TUNEL-CMNs), et en **(D)** les CMNs en apoptose doublement marquées TUNEL-Q-CMNs (D'après (Brenneman *et al.* 2010)

Grâce à cette sécrétion paracrine, le surnageant du milieu de culture des CSMs (CSM-MC) contient une variété de facteurs trophiques qui pourraient présenter un intérêt thérapeutique au même titre que les cellules elles-mêmes (figure 33) (Johnstone *et al.* 2015). Huit jours après l'induction d'une oACM chez des rats, Cho et collègues (2012) ont administré des CSM-MC humaines dans le ventricule latéral de façon continue pendant 7 jours. Les résultats obtenus montrent une récupération fonctionnelle des animaux. Celle-ci, est expliquée par une diminution de la mort cellulaire, une augmentation de l'angiogenèse, et une diminution de la réaction gliale (Cho *et al.*

2012). Ces résultats ont été confirmé dans des expériences similaires où le CSM-MC a démontré des effets neuroprotecteurs, angiogéniques, neurogéniques, et anti-inflammatoires après l'induction d'une ischémie cérébrale (Egashira *et al.* 2012; Tsai *et al.* 2014). Ces études montrent l'intérêt du CSM-MC dans le traitement de l'ischémie cérébrale en agissant positivement sur un large panel de processus cellulaires : apoptose, inflammation, gliose, angiogenèse, et neurogenèse ; qui se traduit par une neuroprotection et une récupération fonctionnelle des animaux (Cho *et al.* 2012; Egashira *et al.* 2012; Tsai *et al.* 2014). Ces effets passent par l'expression de facteurs neuroprotecteurs et réparateurs tels que le NGF (*neural growth factor*), l'IGF (*insulin growth factor*)-1, le VEGF, le GDNF (*glial cell-derived neurotrophic factor*), l'HGF (*hepatocyte gowth factor*), le FGF-2, et le SDF-1 (Johnstone *et al.* 2015). Ces facteurs exercent leur effet neuroprotecteur en réduisant l'excitotoxicité glutaminergique et en activant les voies de survie cellulaire, de neurogenèse et de synaptogenèse via l'activation d'Akt, de la voie p-cAMP-CREB/BDNF, et de la voie MAPK/ERK (Johnstone *et al.* 2015).

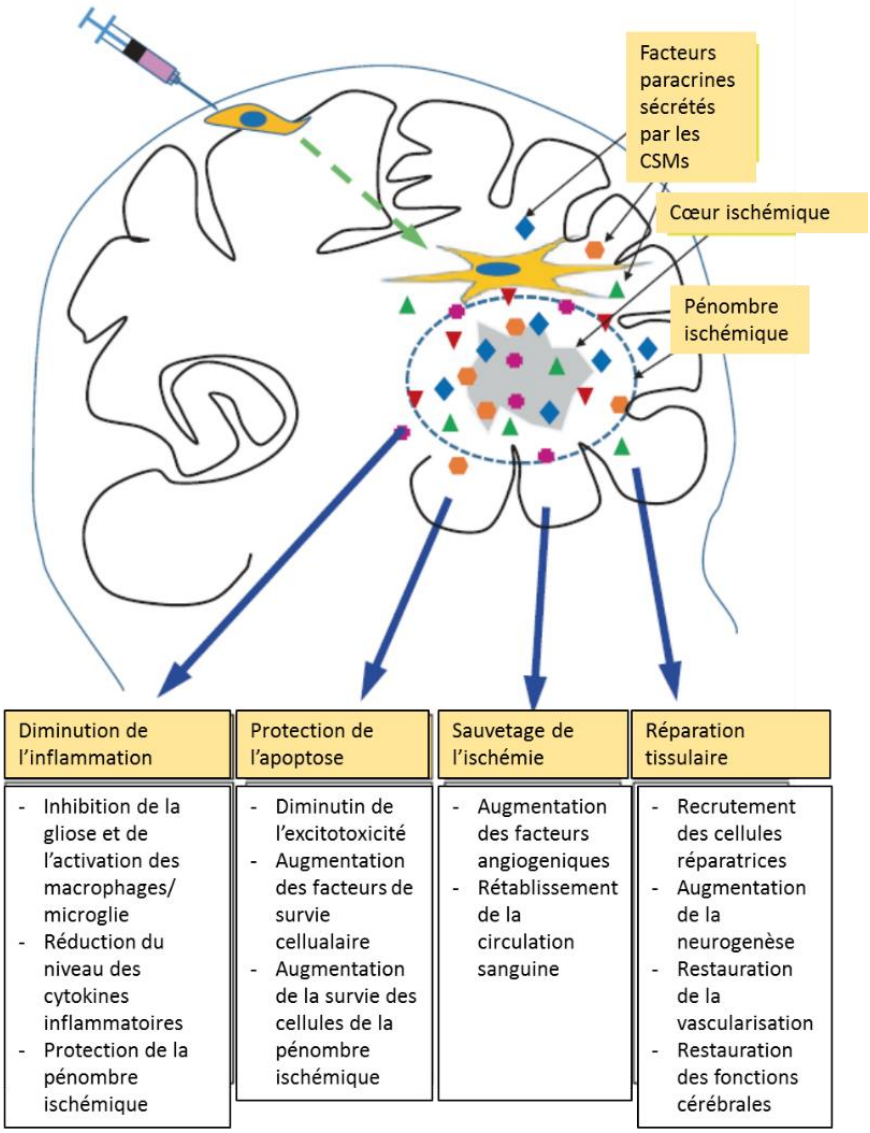


Figure 33 : **Le potentiel thérapeutique des facteurs sécrétés par les CSMs** (modifié d'après (Johnstone *et al.* 2015).

La neuroprotection induite par les CSMs après une ischémie cérébrale pourrait être aussi attribuée à son effet immunomodulateur. Lors de la phase aiguë de l'AVC, il a été montré que l'inflammation a un effet délétère aggravant la lésion ischémique. Or, les CSMs sécrètent de nombreux facteurs anti-inflammatoires, et interagissent directement avec les cellules immunitaires. Parmi les facteurs immunomodulateurs secrétés on retrouve le TGF-β1, la prostaglandine E2, le HGF, l'indolemine-pyrrole 2,3-dioxygenase, l'oxide nitrique (NO) et l'interleukine-10 (IL-10) (Gao *et al.* 2016). Ainsi,

par la sécrétion paracrine et le contact cellulaire direct les CSMs modulent les réponses immunitaires innées et adaptatives. Ceci en inhibant l'activation et la prolifération des lymphocytes T et B, les cellules dendritiques, et les cellules NK, mais aussi en favorisant l'action des cellules T régulatrices (figure 34) (Gao *et al.* 2016).

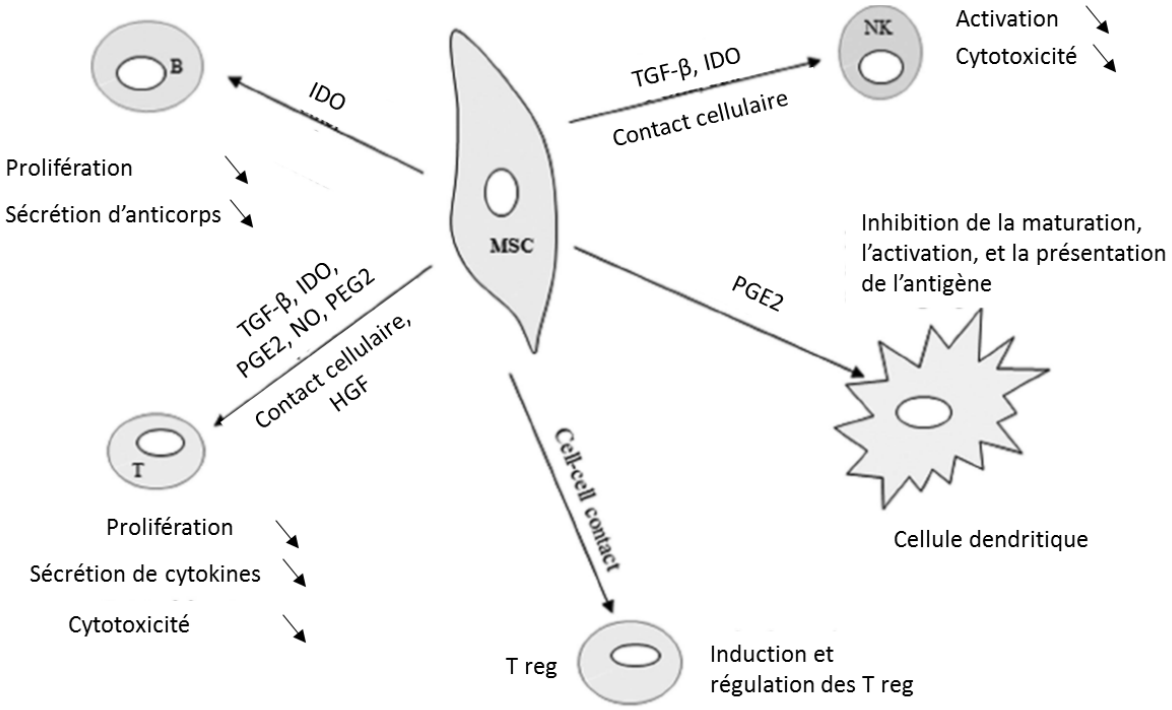


Figure 34 : **Effet immunomodulateur des CSMs**

Les MSCs inhibent la prolifération des cellules lymphocytes B et T, activent les lymphocytes T-regulateurs, inhibent les cellules NK et inhibent la maturation et l'activation des cellules dendritiques. L'immunomodulation est médiée par des facteurs solubles et par contact cellulaire direct (modifié d'après (Gao *et al.* 2016).

Les CSMs regroupent de nombreux avantages qui font de ces cellules les meilleurs candidats pour une application clinique. En effet, les cellules utilisées doivent être faciles à extraire, à cultiver et avoir des caractéristiques de cellules souches : auto-renouvèlement et différenciation, tout en étant non cancérigènes, et avoir un potentiel de migration vers le site lésionnel. De plus, les CSMs sont peu immunogènes. En effet, l'une de leur caractéristique est la sous expression du complexe HLA-DR, ce qui ouvre la perspective d'une allogreffe, dès la phase aiguë de l'ischémie cérébrale (Bang *et al.* 2005). Depuis la première étude utilisant les CSMs chez les patients atteint d'un AVC en 2005, plusieurs autres études se sont succédées. Ces études ont montré la faisabilité et l'innocuité de cette thérapie cellulaire, prenant en charge des patients aux profils variés, et utilisant des méthodologies différentes : fenêtre thérapeutique, et dose cellulaire injectée. La plupart de ces études n'ont montré aucune toxicité majeure de la thérapie cellulaire à court ou à long terme (suivi des patients de 90 jours jusqu'à 5 ans après l'administration cellulaire) (Bang *et al.* 2005).

Dans une méta analyse regroupant 16 études cliniques, Chen et collaborateurs, démontrent que cette thérapie cellulaire apporte une amélioration significative de la récupération motrice améliorant la qualité de vie des patients. Cependant, pour une meilleure analyse d'autres études sont nécessaires pour évaluer l'efficacité des thérapies cellulaires dans le traitement de l'ischémie cérébrale (Chen *et al.* 2002). Toutes ces études ont utilisé des CSMs autologues injectées par voie i.v. L'inconvénient majeur de ces études, est le temps de culture des CSMs pour obtenir un nombre suffisant (environ 6 semaines), la mort cellulaire après l'injection des CSMs, et le faible nombre de cellules qui arrivent au site lésionnel. Même si la fenêtre thérapeutique optimale n'est pas encore définie, une intervention rapide après l'apparition de l'ischémie cérébrale est recommandée particulièrement lorsque la BHE est ouverte, et que l'expression des chimioattractants tels que le SDF-1 est toujours présente dans le site lésionnel (Spees *et al.* 2004). Pour pallier à ces problèmes,

des alternatives sont proposées : une administration de CSMs allogéniques, une administration cellulaire en intra-artériel ou intracérébrale plutôt qu'en i.v., ou encore plus récemment l'administration des vésicules extracellulaires sécrétées par les CSMs (Bang 2016) (Tableau 4)

Author, reference	Study design	Stroke	Cell dose	Manipulation	Mode of application	Efficacy	Adverse effects	Safety test
Suarez-Monteaqudo, 2009 [40]	No control group Treatment, $n = 5$ 1 year f/u	Chronic Ischemic or ICH	N/A	Isolation using normal saline	Intracerebral	N/A	None	N/A
Battistella, 2011 [41]	No control group Treatment, $n = 6$ 6 months f/u	Subacute MCA infarct	$1–5 \times 108$	Isolation using human albumin-containing normal saline	Intra-arterial	N/A	Seizure after 200 days	N/A
Savitz, 2011 [42]	No control group Treatment, $n = 10$ 6 months f/u	Acute (24–72 h) Large MCA infarct	1×106 /kg		Intravenous	mRS 1 shift vs. historical control	None	Cell viability, MSC surface markers, bacteria, fungi, mycoplasma
Friedrich, 2012 [43]	No control group Treatment, $n = 20$ 6 months f/u	Acute (3–7 days) Non-lacunar infarct	2.2×108		Intra-arterial	mRS 0–2 in 40 %	None	Cell viability
Li, 2013 [44]	Control, $n = 40$ Treatment, $n = 60$ 6 months f/u	Acute (5–9 days) ICH	1.33×1013	Isolation using normal saline	Intracerebral	NIHSS and Barthel index improved	None	Cell viability

Tableau 4 : **Essais cliniques utilisant les CSMs pour le traitement de l'AVC ischémique** (D'après (Bang 2016)

Les CSMs allogéniques représentent une alternative séduisante aux cellules autologues. L'AVC ischémique survient majoritairement chez des personnes âgées. Or, il a été démontré que le pool de CSMs décroit significativement avec l'âge, en nombre et aussi en capacité mitotique. Par conséquent, la disponibilité d'un nombre suffisant de CSMs pour un traitement cellulaire, pourrait prendre plus de temps, dépassant ainsi la fenêtre thérapeutique idéale (Caplan 2009). De plus, les

CSMs sont immunomodulateurs et expriment très peu le complexe majeur d'histocompatibilité II, ce qui pourrait justifier leur utilisation en clinique (Castillo-Melendez *et al.* 2013)(figure 35).

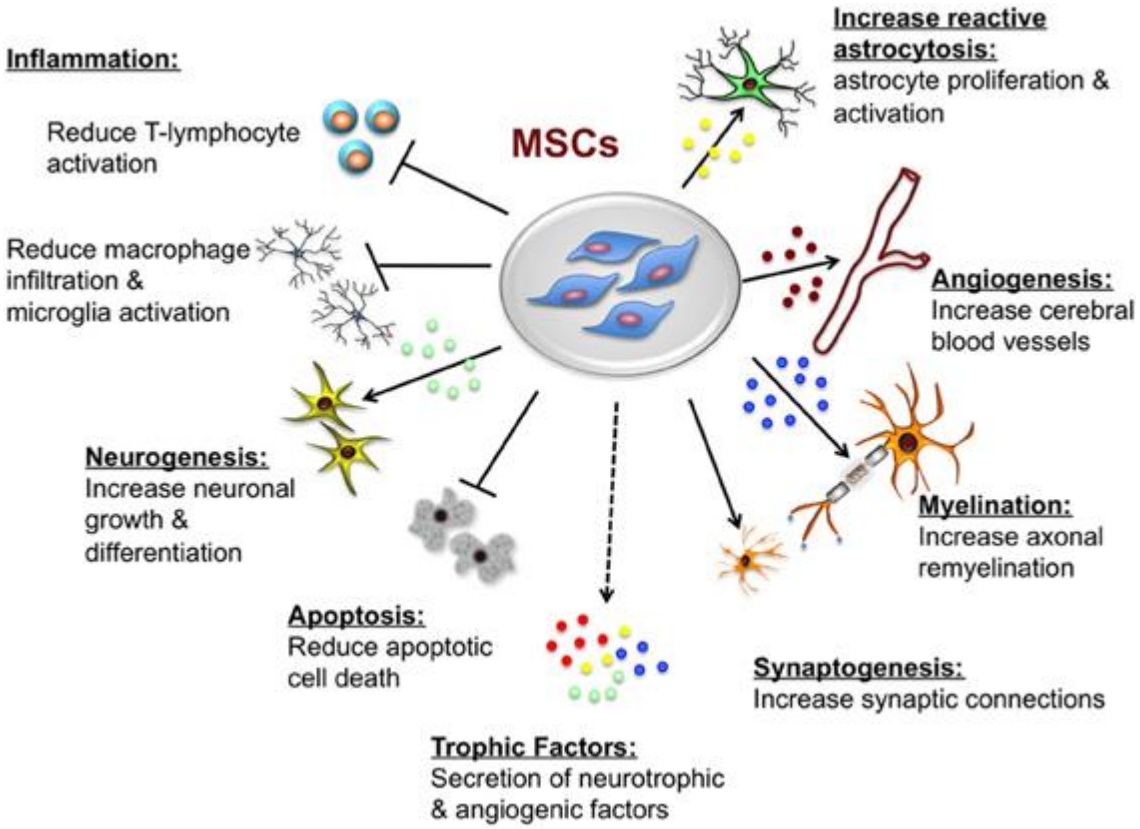


Figure 35 : **Effet pléitrope des CSMs**

Les effets bénéfiques des CSMs sont principalement médiés par un effet paracrine. Les CSMs sécrètent des facteurs neurotrophiques et angiogéniques qui favorisent la croissance et la différentiation neuronale, la synaptogenèse et l'angiogenèse. Les CSMs inhibent l'apoptose, l'inflammation et l'activation microgliale (D'après Castillo-Melendez et *al.* 2013).

Même si les CSMs allogéniques activent très peu le système immunitaire, il a été montré que ces cellules sont vulnérables au complément présent dans le sérum, rendant leur viabilité moins importante que les CSMs autologues (Y. Li *et al.* 2014). Cependant, ce problème pourrait être

résolu avec le développement les interventions intra-artérielles après l'ischémie cérébrale. En effet, une administration intra-artérielle pourrait limiter le contact des cellules avec le sérum et augmenter leur viabilité. De plus, une administration intracérébrale pourrait également être envisageable augmentant le nombre de cellules atteignant le site lésionnel. Plus d'études sont nécessaires pour déterminer le mode d'administration optimal pour une thérapie cellulaire. Car au-delà, de la viabilité et du nombre de cellules atteignant la lésion, le mode d'administration pourrait modifier le fonctionnement et le mécanisme d'action des CSMs, notamment sur la sécrétion des facteurs trophiques (Eckert *et al.* 2013). L'environnement cellulaire, la MEC particulièrement, peut aussi modifier le comportement des CSMs nouvellement adminitrées.

1.3.2 Arguments en faveur de l'intérêt potentiel d'une thérapie matricielles à base de RGTA (ReGeneraTing Agent) pour le traitement de l'ischémie cérébrale

Le rôle de la MEC et de ses composants a bien été démontré dans la communication et la réparation tissulaire. Lors d'une lésion tissulaire cette dernière est détruite par l'activation de différentes protéases l'empêchant de jouer son rôle physiologique. La destruction de la MEC va induire une rupture des communications cellulaires. En effet, suite à cette destruction, les différents médiateurs, cytokines, et facteurs de croissances stockés dans la MEC se retrouvent alors vulnérables à une dégradation par les protéases, empêchant ainsi le bon déroulement de la réparation tissulaire (Barritault *et al.* 2017). Comme décrit précédemment (1.5.7.3 HSPGs dans l'ischémie cérébrale), les héparanes sulfate ont un rôle essentiel dans la neuroprotection et la répratation tissulaire. Le RGTA (ReGeneraTing Agent), analogue des HS peut remplacer fonctionnellement les HS détruits suite à la lésion tissulaire (Barritault *et al.* 2017) (figure 36).

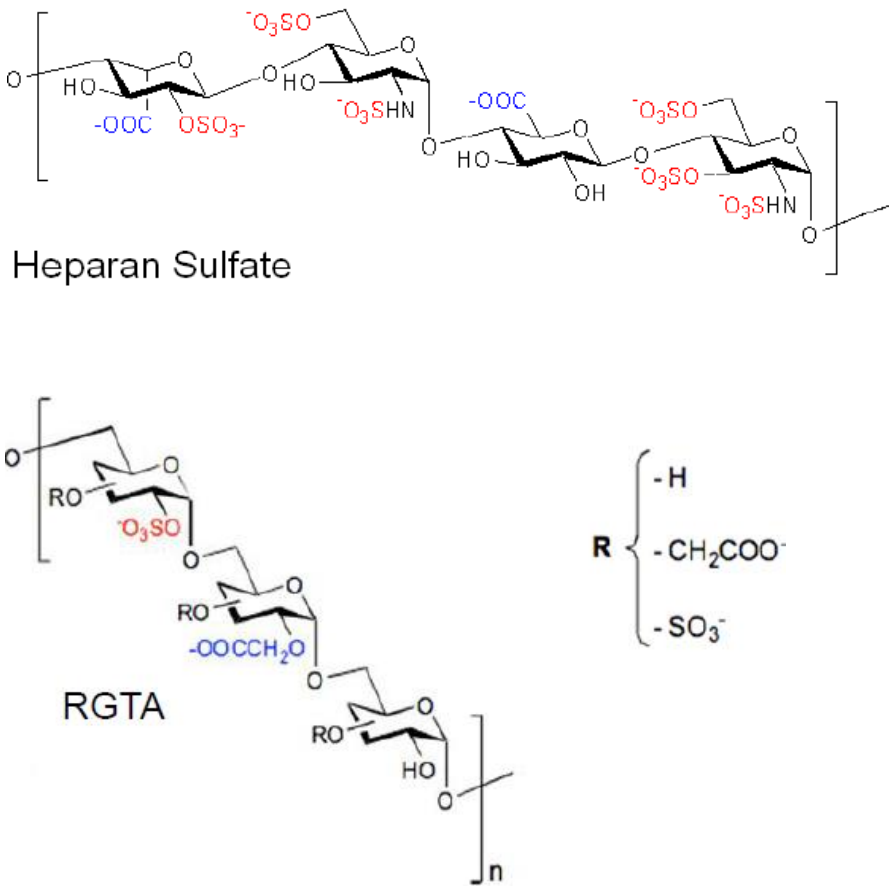


Figure 36 : **Structure des héparanes sulfates et du RGTA** (D'après (Neck *et al.* 2012)

Structure de l'héparane sulfate et du RGTA

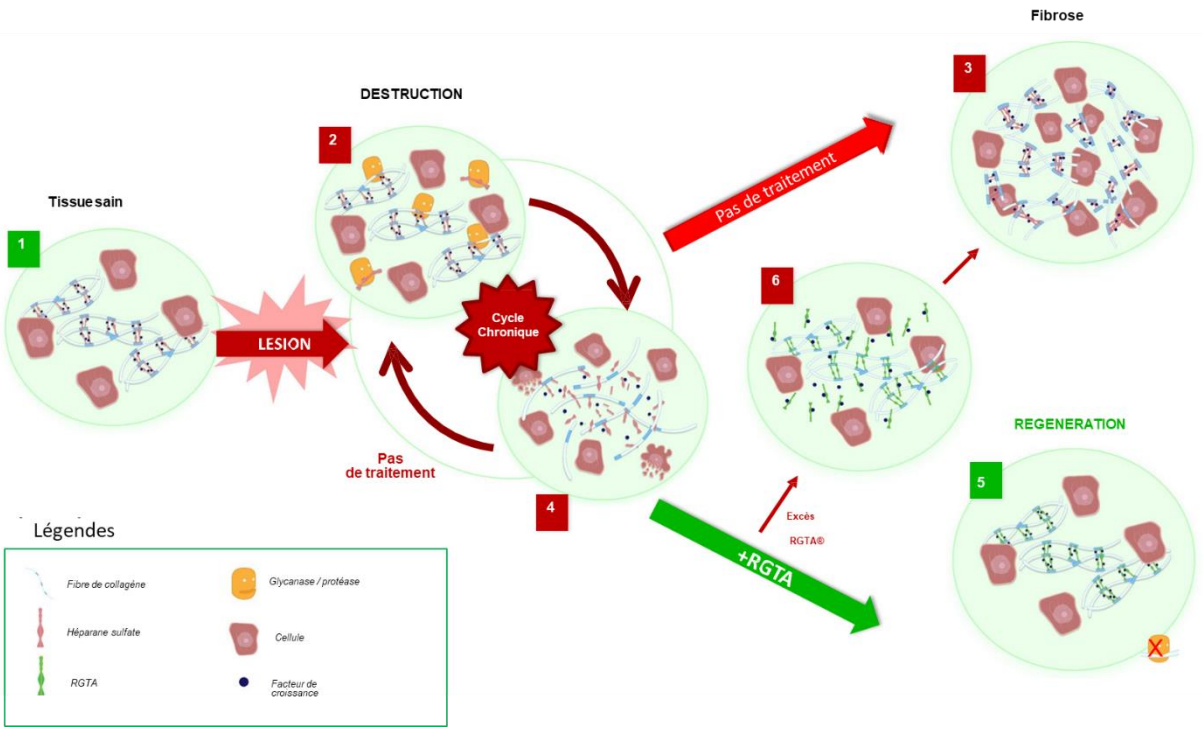


Figure 36 : **Mode d'action du RGTA après une lésion tissulaire**

1. L'organisation de la MEC dans un tissu sain. **2.** Après une lésion la structure matricielle et les HS sont dégradés et l'activation des protéases peut aussi dégrader les facteurs de croissance. **3.** Une réparation rapide est enclenchée menant à une fibrose. **4.** Si l'inflammation n'est pas régulée, l'inflammation chronique mène à un cycle de réparation/destruction de la matrice empêchant la cicatrisation tissulaire. **5.** Le RGTA remplace les HS dégradés permettant la reconstruction et la restauration du microenvironnement cellulaire pour faciliter la régénération tissulaire. **6.** L'excès de RGTA pourrait empêcher le processus de réparation en diminuant la biodisponibilité des facteurs de croissance (modifié d'après (Barritault *et al.* 2017)

Le RGTA est un polymère de disaccharides liés par des liaisons α 1-6, le rendant résistant à la dégradation enzymatique (Neck *et al.* 2012). En effet, les unités de disaccharides composant les HS endogènes sont liées par les liaisons α 1-4 qui sont le site de clivage des différentes

endoglycosidases : chondroitinase ABC, dextranases, hyaluronidases, et les hépranases (Neck *et al.* 2012) (Tableau 5).

Polysaccharide	Heparanases	Chondroitinase ABC	Hyaluronidase	Dextranase
HM4120	–	–	–	–
Heparine	+++	–	–	–
Heparane sulfate	+++	–	–	–
Chondroitine sulfate A	–	+++	+++	–
acide hyaluronique	–	+++	+++	–
Dextrane	–	–	–	+++

Tableau 5 : **Digestion des polysaccharides principaux de la MEC par les endoglycanases.**

--- : digestion incomplète, polysaccharide de départ retrouvé, +++ : complète digestion du Polysaccharide, HM 4120 : RGTA 4120 (D'après Ikeda, Charef et *al.* 2009).

En tant qu'analogue des HS, le RGTA peut se lier aux sites de liaisons de l'héparine, présents notamment sur les protéines de structure formant la MEC : collagènes, fibronectine et laminine. Le RGTA peut aussi lier différentes protéines et facteurs de croissance liant l'héparine tels le FGF-1 et -2, le VEGF, ou le TGF-β (Rouet *et al.* 2005).

Avec sa capacité de résistance aux endoglycosidases, de liaison aux protéines de structures, de liaison et de protection des facteurs de croissances, le RGTA peut remplacer les HS dégradés après une lésion tissulaire, rétablir l'homéostasie et les processus de régénération tissulaire.

Le potentiel de réparation et de régénération tissulaire du RGTA a été testé dans différents modèles précliniques de lésions tissulaires (tissu cutané et cornéen, tissu buccal et tract digestif, tissu osseux et tendineux, tissu musculaire) (Barritault *et al.* 2017). Ce potentiel régénérateur a été confirmé en clinique, en prouvant l'efficacité du RGTA sur 20000 patients traités pour une lésion ulcéreuse cutanée et 5000 patients traités pour une lésion ulcéreuse cornéenne, sans effet secondaire rapporté. Cependant, un effet antalgique inattendu a été rapporté après l'administration du RGTA (Barritault *et al.* 2017). Cette observation, montre la nécessité d'effectuer plus de recherche sur le mécanisme d'action du RGTA et ses interactions.

Dans le contexte de l'ischémie cérébrale, les propriétés du RGTA et ses effets pourraient être bénéfique pour une neuroprotection et une neurorégénération. En effet, les protéoglycanes sont très exprimés dans la MEC du tissu cérébral (Barros *et al.* 2011). Or lors d'une ischémie, la MEC est dégradée empêchant la bonne réparation tissulaire. De plus, le RGTA a montré des effets de réduction de fibrose tissulaire, mais aussi d'amélioration de la microvascularisation dans un tissu ischémié.

En 1999, Desgranges et collègues ont montré l'efficacité du RGTA sur du tissu musculaire squelettique ischémié. En effet, l'administration du RGTA après l'ischémie musculaire, a augmenté la régénération mais aussi la réinervation tissulaire (Desgranges et *al.*, 1999). Dans une étude similaire menée par Yamauchi et collaborateurs, le RGTA a montré son efficacité à la suite d'une ischémie du tissu musculaire du myocarde. Une seule administration de RGTA après une ischémie myocardique chez des cochons, a permis de régénérer les fibres musculaires et leurs fonctions, de réduire de 50% la lésion ischémique, et d'augmenter la vascularisation myocardique (Yamauchi *et al.* 2000). Ces résultats ont été confirmés en 2006 chez le primate non humain : le babouin (Mullangi *et al.* 2006). Dans cette étude, Le RGTA a été utilisé pour le traitement d'une

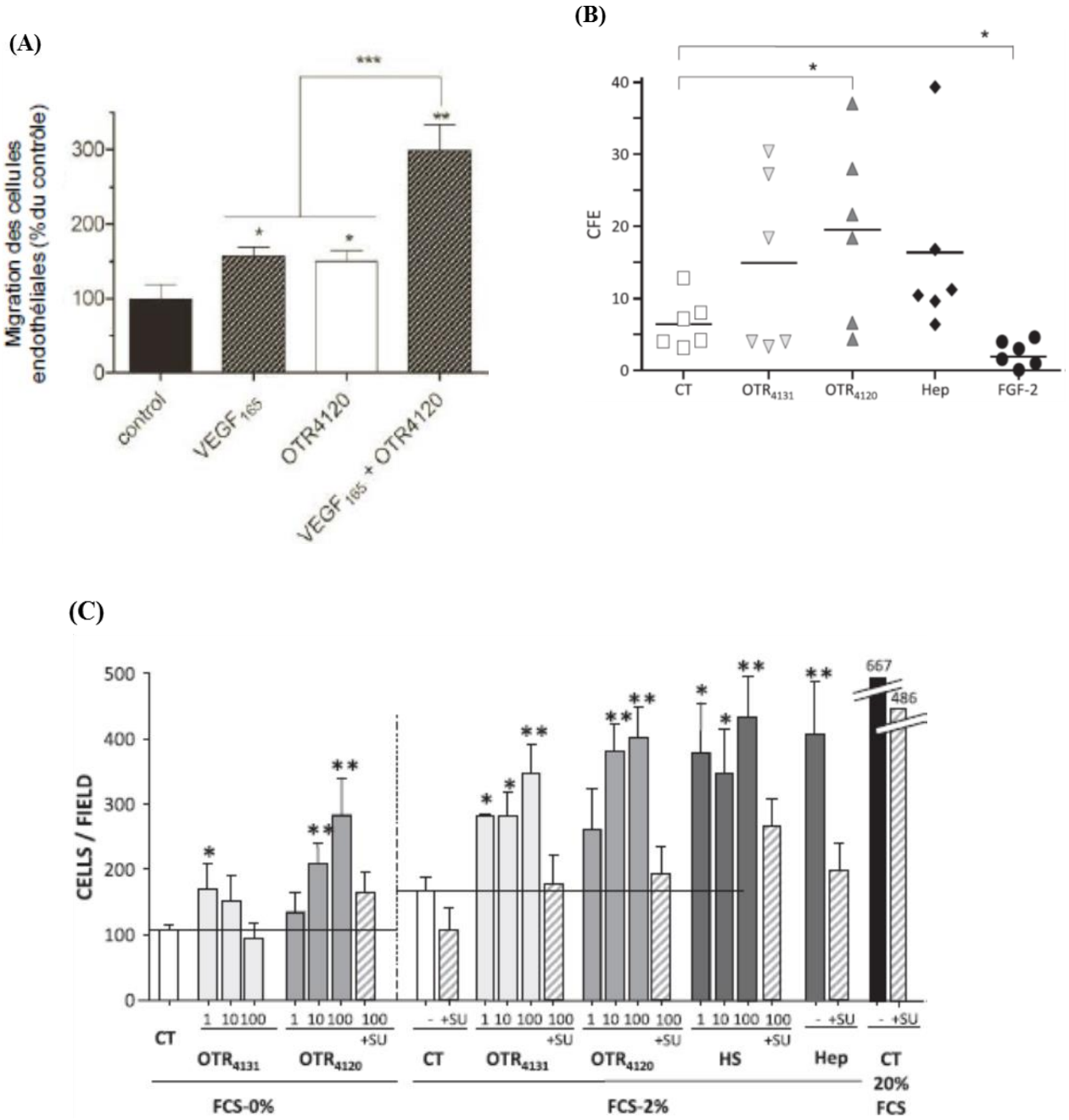
ischémie du myocarde également. Les résultats ont montré qu'une administration de RGTA permet la récupération fonctionnelle du myocarde. En effet, une réduction du volume d'éjection de 12% par rapport à la normale a été montrée dans le groupe traité avec le RGTA, alors que cette réduction était de 24,7% dans le groupe contrôle (Mullangi et *al.*, 2006).

En se basant sur ces observations, par ses effets de : réduction de la lésion ischémique, réduction de la fibrose tissulaire, augmentation du réseau vasculaire et neuronale ; le RGTA pourrait constituer une thérapie alternative et/ou complémentaire à la thrombolyse et la thrombectomie dans le cadre d'un AVC.

1.3.3 Arguments en faveur de l'intérêt de la combinaison des RGTAs et des CSMs dans le traitement de l'ischémie cérébrale

Plusieurs thérapies visant le traitement de l'ischémie cérébrale et l'amélioration de la récupération post-AVC ont combiné les CSMs avec des agents thérapeutiques ou des biomatériaux. Dans une étude menée par Tang et ses collaborateurs en 2014, dans un modèle d'infarctus du myocarde, la co-administration des CSMs avec le VEGF a permis de réduire la perte fonctionnelle comparativement au traitement par des CSMs ou le VEGF seuls, d'augmenter la densité vasculaire, et d'améliorer la différentiation des CSMs (Tang *et al.* 2014). De plus, les capacités d'adhésion, de prolifération et de différentiation des CSMs peuvent être augmentées par leur association avec des protéines mimétiques des protéines de la MEC (J.-H. Kim *et al.* 2014), ou par l'association avec des hydrogels constitués de GAGs enrichis avec des HS (Zhong *et al.* 2010). Le RGTA étant un mimétique des HS, pourrait aussi favoriser un effet synergique avec les CSMs. En effet, le RGTA potentialise le VEGF (Rouet *et al.* 2005), facteur connu pour son effet sur les CSMs, mais aussi d'autres facteurs tel le FGF-2 (Frescaline *et al.* 2012). À travers la potentialisation du FGF-2, le

RGTA augmente la prolifération et la migration des CSMs *in vitro* (Frescaline *et al.* 2012) (figure 37).



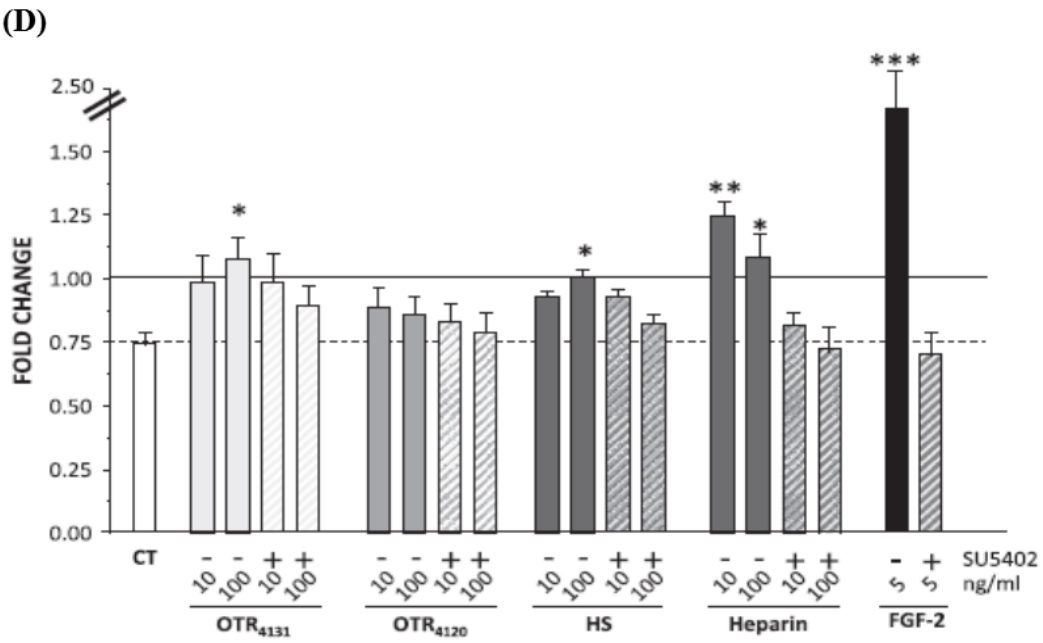


Figure 37 : **Effet du RGTA sur les facteurs de croissance et les CSMs.**

(A) potentialisation de l'effet du VEGF par le RGTA. Effet du RGTA sur **(B)** la clonogicité **(C)** la migration et **(D)** la prolifération des CSMs (d'après Rouet et *al.* 2005,Frescaline et *al.* 2012)

2 Objectifs

Face à la courte fenêtre thérapeutique du rt-PA et l'échec des thérapies pharmacologiques pour la neuroprotection après l'AVC, les recherches se sont penchées sur le développement de thérapies alternatives à visées régénératrices. Ces recherches ont pour but d'améliorer la récupération fonctionnelle des patients. Des thérapies cellulaires ont ainsi fait l'objet de nombreuses études précliniques et cliniques de phase I, II et III (Bang *et al.* 2005). L'utilisation de différents types de biomatériaux permettant de favoriser l'environnement cellulaire et ainsi favoriser la survie des cellules transplantées a également fait l'objet d'études précliniques (pour revue, voir (Wang *et al.* 2012; Boisserand *et al.* 2016)

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés au développement d'une thérapie moléculaire, à base d'un agent ciblant la MEC, le RGTA, combiné ou non à une thérapie cellulaire à base de CSMs.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les effets neuroprotecteurs et régénérateurs du RGTA à la suite d'une ischémie cérébrale. Dans un modèle d'ischémie cérébrale focale transitoire (modèle oACM) chez le rat, l'effet d'une administration systémique de RGTA, à différentes doses et différents temps post-occlusion, a été évalué sur le volume du tissu infarci par IRM, et sur la récupération fonctionnelle par différents tests comportementaux. Par la suite, nous avons étudié la biodistribution du RGTA, ainsi que son effet sur l'organisation de la MEC et sur différentes réactions cellulaires post-ischémiques dont la réaction inflammatoire, la réaction gliale, l'angiogenèse et la neurogenèse.

Comme mentionné dans l'introduction, l'ischémie cérébrale a pour conséquence la destruction de la MEC empêchant la réparation tissulaire. Or la restructuration de la MEC représente une étape

clef pour le processus de communication et de remplacement cellulaire à la suite d'une lésion tissulaire. Nous nous sommes donc proposé, dans un deuxième temps, d'étudier l'effet du RGTA combiné aux CSMs pour le traitement de l'ischémie cérébrale. Nous avons d'abord analysé l'effet de cette thérapie sur les dommages cérébraux ainsi que sur les déficits fonctionnels en utilisant deux voies d'administration des cellules souches. Nous avons ensuite défini la combinaison optimale chez des animaux normotendus avant de la tester chez des rats chroniquement hypertendus; l'hypertension artérielle étant le facteur de risque prédominant dans les AVCs.

3 Matériels et méthodes

3.1 Protocoles des études menées

Les travaux présentés dans cette thèse sont divisés en 2 études. Ces dernières visent à évaluer l'effet du RGTA seul ou combiné aux CSMs sur la neurorprotection, et la récupération fonctionnelle suite à une ischémie cérébrale. Lors de l'étude 1, le RGTA est administré une seule fois après l'oACM à j0 (figure 38). Lors de l'étude 2, une administation de RGTA à j0 est combinée à une administration de CSMs (avec ou sans une deuxième administration de RGTA) à j1. Le protocole des deux études, comprends une mesure du volume de la lésion cérébrale par IRM à j2 et j14, et une batterie de tests comportementaux jusqu'à j54 (figure 38).

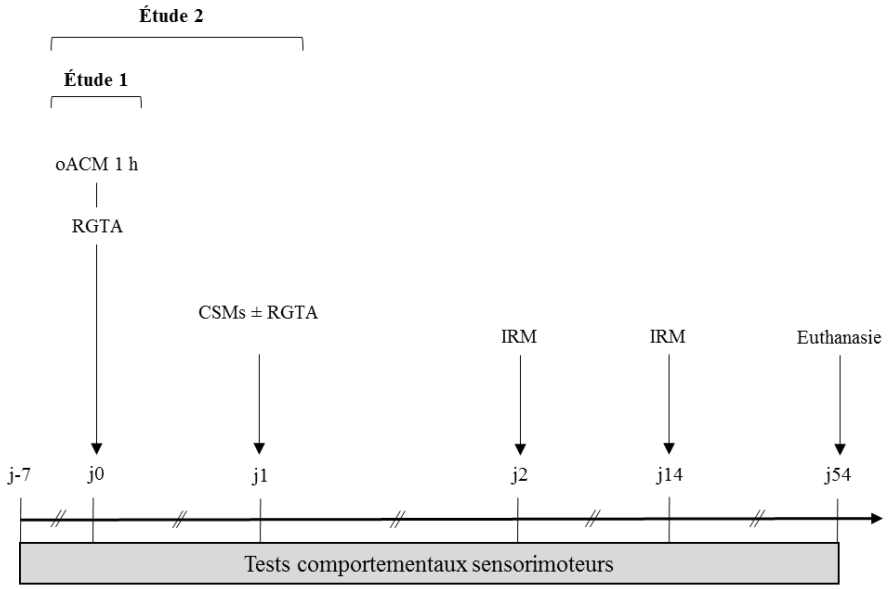


Figure 38 : **Protocole générale des études menées**

Effet du RGTA seul ou associé aux CSMs sur la neuroprotection et la régénération après une ischémie cérébrale.

IRM : imagerie par résonnance magnétique, CSMs : cellules souches mésenchymateuses, RGTA : ReGenraTing Agent

3.2 Animaux

Les animaux utilisés sont des rats mâles de souche Sprague Dawley (SD) (CERJ, France) ; ou *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) (CURB : centre universitaire de ressources biologiques, France). Les protocoles ont été approuvés par le comité d'éthique régional (étude 1 CENOMEXA 1211-03 et APAFiS #3252 ; étude2 CENOMEXA 1211-03 et APAFiS #4410) et sont réalisés au laboratoire d'expérimentation et d'imagerie (GIP Cyceron, autorisation FA-118-001). Les animaux utilisés pesaient environ 300-350 g au moment de l'induction de l'ischémie. Ils ont été maintenus en cycle d'éclairage classique (8-20 h) dans des conditions de température et d'humidité régulées (hygrométrie = 55 ± 10 % ; température = 21,5-22°C), au sein d'une animalerie agrée (CURB, France). Tous les rats ont eu accès à l'eau et à la nourriture *ab libitum* tout au long des protocoles. Pour effectuer les tests comportementaux, les animaux étaient placés au moins 30 minutes avant dans le box dédié à ces tests.

3.3 Induction de l'ischémie cérébrale transitoire

L'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM) est réalisée selon l'approche intraluminale décrite par Longa et collègues (Longa *et al.* 1989), et utilisée au laboratoire dans de nombreuses études (Esneault *et al.* 2008; Quittet *et al.* 2015). Brièvement, après l'anesthésie de l'animal avec de l'isoflurane dans un mélange O2/N2O (ratio 1/3), une incision d'environ 2 cm est effectuée au niveau du cou, puis l'artère carotide commune (ACC) droite est isolée de façon à exposer la bifurcation entre l'artère carotide externe (ACE) et l'artère carotide interne (ACI). L'ACE est électrocoagulée dans sa partie distale et des ligatures temporaires sont placées au niveau proximal de l'ACC ainsi que sur l'ACI. L'ACE est alors incisée de façon à permettre la pénétration d'un filament en nylon dont l'extrémité contient un épaississement de 0.39mm de diamètre et 3-4mm de longueur (Doccole, USA). Une ligature autour de l'embole permet de retirer les clamps

temporaires au niveau de l'ACC et l'ACI. L'ACE est alors sectionnée dans sa partie distale et placée en alignement avec l'ACI. L'embole est délicatement poussé jusqu'à l'obstruction de l'ACM. L'embole est retiré 1 h après pour permettre une reperfusion (figure 39). De la lidocaïne en gel est appliquée sur la plaie, ainsi que 0.02 mg/kg de buprénorphine (Buprécare® 0,3 mg/ml Axience®) sont injectés en intramusculaire dans un but antalgique. Des aliments ramollis sont mis à disposition dans la cage avec une coupelle d'eau afin de faciliter la prise alimentaire et l'hydratation des animaux.

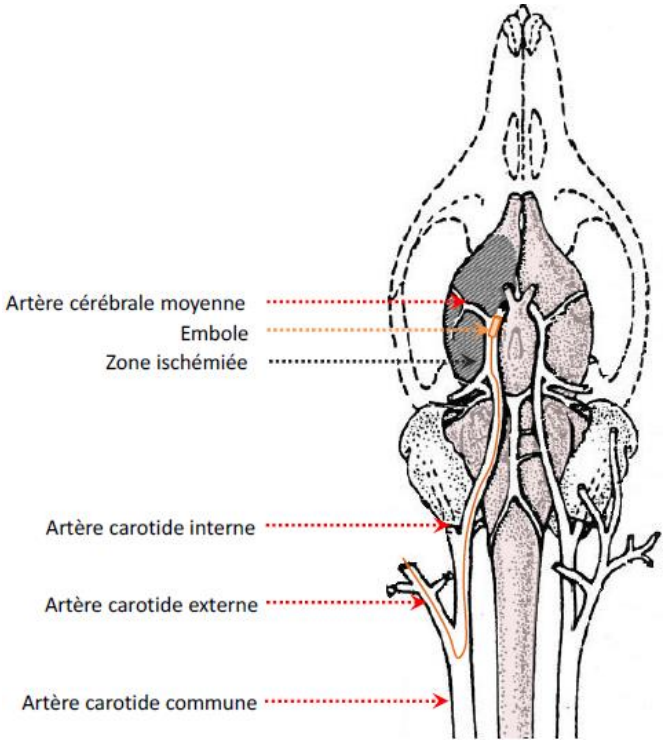


Figure 39 : **Modèle intraluminale d'induction une ischémie cérébrale focale** (modifié d'après (Longa *et al.* 1989)

3.4 Extraction et culture des CSMs

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

Les cellules extraites sont réparties dans des boites de culture (1T75 par patte). Les cellules sont incubées à 5 % de CO2 et 21 % d'O2 à 37 °C. Après 1-2 jours, les T75 sont délicatement secouées, rincées 2 fois avec du PBS puis le milieu est remplacé par du milieu complet complémenté à 20 % de SVF, éliminant ainsi les cellules hématopoïétiques non-adhérentes contrairement aux CSMs. L'opération est renouvelée à J7. Dès que les cellules sont à 90% de confluence, deux rinçages sont réalisés avec du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} puis les cellules sont décollées à l'aide de trypsine (0,25 %-EDTA). Dès le décollement du tapis cellulaire, du milieu complet 10 % SVF (2 fois le volume de trypsine) est ajouté. Les cellules sont récupérées, et centrifugées à 300 g/minutes pendant 5 minutes. Le surnagent est délicatement aspiré et le culot est dilué dans du milieu complet 10 % SVF. Les cellules sont réensemencées à une densité cellulaire de 5.10^5 cellules par T75. Les cellules sont maintenues en culture dans du milieu complet 10 % SVF dans un incubateur à 5 % CO2 et 21 % d'O2 à 37°C. Elles sont utilisées après 3-4 passages.

3.5 Administration du RGTA seul ou en combinaison avec les CSMs

3.5.1 Administration du RGTA

À la suite de la reperfusion, la queue de l'animal est incisée longitudinalement sur 1 à 1,5 cm le long du trajet de l'une des veines caudales. La veine est isolée et l'aval est électrocoagulée. Une incision est pratiquée dans la veine afin d'y introduire un cathéter effilé sur approximativement 2 cm. Après avoir vérifié la bonne position du cathéter dans la veine en administrant du sérum physiologique, 0,1 mL de RGTA sont administrés. Afin de s'assurer du passage de la totalité de la dose de RGTA sans perte dans le cathéter, 0,3 mL de sérum physiologique sont administrés à la suite du RGTA. Le cathéter est délicatement retiré et la veine est électrocoagulée en amont de l'incision. La plaie est suturée et l'animal est replacé dans sa cage d'hébergement.

3.5.2 Administration des CSMs

L'animal est anesthésié 24 h après l'ischémie par inhalation de 5 % d'isoflurane dans un mélange d'O_2/N_2O 1/3 pendant 3 minutes puis maintenu à 2,5 % d'isoflurane pendant la chirurgie.

3.5.2.1 Administration par voie intracérébrale

Le crâne de l'animal est fixé à l'aide d'un cadre stéréotaxique et la boîte crânienne dégagée. Cette dernière est fraisée aux coordonnées suivantes : latéral = 3 mm ; antéropostérieur = 0 mm par rapport au bregma. Les CSMs (3 µL contenant 3.10^5 CSMs dans du PBS glutamine 2 mM) sont injectées à une profondeur de 6 mm au niveau du striatum à l'aide d'une aiguille dentaire de 30 Gauge en 5 minutes suivi d'une pause de 5 minutes. La plaie au niveau de la peau du crane est suturée après application d'un gel de lidocaine (Aguettant®) sur la plaie, et une administration intramusculaire de 0.02 mg/kg de buprénorphine (Buprécare® 0,3 mg/ml Axience®). L'animal est ensuite replacé dans sa cage d'hébergement.

3.5.2.2 Administration par voie Intraveineuse

La queue de l'animal est incisée longitudinalement sur 1 à 1,5 cm le long du trajet de l'une des veines caudales. La veine est isolée et électrocoagulée en aval. Une incision est pratiquée dans la veine afin d'y introduire un cathéter effilé sur approximativement 2 cm. Après avoir vérifié la bonne position du cathéter dans la veine en administrant du sérum physiologique, 0,3 mL d'une solution contenant 3.10^6 de CSMs dans du PBS glutamine 2 mM est administrée. Afin de s'assurer du passage de la totalité des CSMs sans perte dans le cathéter ; 0,1 mL de sérum physiologique est administré à la suite des CSMs. Le cathéter est délicatement retiré et la veine est électrocoagulée. La plaie est suturée, 0,02 mg/kg de buprénorphine (Buprécare® 0,3 mg/ml Axience®) est administrée et l'animal est replacé dans sa cage d'hébergement.

Pour la co-administration du RGTA avec les CSMs, 0,3 mL d'une solution contenant 3.10^6 de CSMs et du RGTA dans du PBS glutamine 2 mM est administrée.

3.6 Analyse IRM

Afin d'évaluer les effets des traitements sur les dommages cérébraux d'origine ischémique, une IRM (7T, PharmaScan, Bruker BioSpin, plateforme CYCERON) est réalisée à 48 h et à 14 jours après l'ischémie. L'anesthésie de l'animal est induite par inhalation d'isoflurane 5 % dans un mélange d'O2 / N2O 1/3 pendant 3 minutes puis maintenue avec 2-2,5 % d'isoflurane. Une séquence T2 anatomique est utilisée selon un mode d'acquisition rapide RARE 8 par écho de spin rapide (RARE, *rapid acquisition with refocused echoes*) avec un temps de répétition de 5000 millisecondes, un temps d'écho de 16,25 millisecondes, un moyennage (NEX, *number of experiments*) = 2, une matrice de 256 x 256 pixels et une taille d'image ou FOV (field of view) de 3,84 x 3,84 cm soit une résolution nominale de 0,15 x 0,15 x 0,75 mm^3. Vingt coupes contiguës,

couvrant la totalité du cerveau, sont acquisess par animal avec un temps total d'acquisition de 4 minutes.

Les images sont analysées grâce au logiciel ImageJ (http://imagej.nih.gov/ij/). Un contour manuel est effectué pour mesurer le volume des hémisphères, des ventricules, et de la lésion cérébrale. Le volume lésionnel est calculé en multipliant l'aire obtenue pour chaque coupe par leur épaisseur (0,75 mm). Au temps précoce, le volume est corrigé de l'œdème présent selon la formule suivante (Gerriets *et al.* 2004)

$$\%\ HLV^{c} = \frac{HV_c - HV_i + LV^{u}}{HV_c} \times 100$$

HLV : Volume d'hémisphère touché par la lésion,

HLV^c : Volume d'hémisphère touché par la lésion corrigé de l'oedème

HVc : Volume de l'hémisphère controlatéral

HVi : Volume de l'hémisphère ipsilatéral

LVu : Volume de lésion non corrigé de l'œdème

Pour l'étude de la perméabilité de la BHE une séquence T1 (Flash, TR/TE = 152/4msec, 30 répétitions, 12 images de 1 mm d'épaisseur; résolution = 0.15 x 0.15 x 1 mm, temps d'acquisition total = 9 mn 46 s) a été réalisée. Pendant l'acquisition à 1 h, 3 h, 24 h, 48 h, et 7 jours après l'ischémie cérébrale, une injection d'un agent de contraste Gd-DOTA (200 µmol/kg, DOTAREM®, Guerbet S.A).

3.7 Analyse de la biodistribution du RGTA

Le RGTA a été couplé au techetium-99m (Tc^{99m}) (platforme FRIM UMS34 Université de Paris Diderot, Paris, France), et administré à 0.5mg/kg (i.v.) 1 h après l'oACM. Les animaux ont été euthanasiés à 3 temps (5 min, 1 h et 3 h après l'oACM). Une perfusion transcardique avec du sérum physiologique hépariné a ensuite été effectuée pour laver le compartiment vasculaire. Après extraction du cerveau, la radioactivité a été mesurée avec compteur gamma dans chaque hémisphère.

3.8 Tests comportementaux sensorimoteurs

Une batterie de tests a été réalisée pour évaluer le déficit sensorimoteur des animaux.

3.8.1 Le score neurologique

Adaptée du score neurologique de Bederson et collègues (1986); l'échelle d'évaluation des réflexes comprends 14 items notés de 0 à 2, (0 : déficit sévère, 1 : déficit modéré, 2 : aucun déficit) (Freret *et al.* 2006; Bederson *et al.* 2016) (figure 40).

(A)

Rat posé sur la surface		
Marche spontanée		
Comportement rotatoire		
Résistance à la poussée latérale		Ipsilatérale
		Controlatérale
Rat suspendu par la queue avec la main droit de l'examinateur		
Flexion du corps		
Flexion de la patte	Antérieure	Ipsilatérale
		Controlatérale
	Postérieure	Ipsilatérale
		Controlatérale
Rat suspendu par la queue avec la main gauche de l'examinateur		
Flexion du corps		
Flexion de la patte	Antérieure	Ipsilatérale
		Controlatérale
	Postérieure	Ipsilatérale
		Controlatérale

(B)

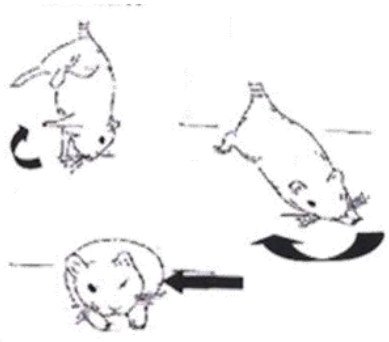


Figure 40 : Score neurologique

(A) Items d'évaluation du score neurologique **(B)** illustration de la flexion du corps après suspension du rat, et de la poussée latérale

Les items sont les suivants :

La marche spontanée : l'animal est placé sur la paillasse face au mur. L'examinateur note le déplacement de l'animal. Un animal sain explore la surface dès qu'il est en contact avec celle-ci.

Le comportement rotatoire : un animal ischémié présente la caractéristique de réaliser des mouvements de rotation sur lui-même, alors que l'animal sain se déplace de façon majoritairement rectiligne

La résistance à la poussée latérale : l'animal est placé sur une surface rugueuse de sorte que ses griffes puissent s'accrocher à la surface. L'examinateur exerce une poussée sur le flanc gauche et droit de l'animal et la résistance de ce dernier est évaluée pour chaque côté.

La suspension par la queue : l'examinateur suspend l'animal par la queue avec chacune de ses mains de sorte que ses 4 pattes ne touchent plus la surface. Dans un premier temps, la rotation du corps est observée. L'examinateur note également le repli des pattes antérieures et postérieures du côté controlatéral et ipsilatéral. Un animal sain gardera son corps étiré vers la surface et ses pattes tendues.

3.8.2 Test du placement de pattes

Ce test évalue les déficits et reflexes des animaux. Il se compose de 12 items évaluant la vision, la sensibilité tactile, la proprioception, et la sensibilité des vibrisses (De Ryck *et al.* 1989).

Pour réaliser ce test, un support surélevé est utilisé, sur lequel l'utilisateur teste les réflexes de l'animal (figure 41).

(A)

Items du test du placement de pattes				
Evaluation de la vision				
Animal approché de la surface avec un angle de 30° et les pattes antérieures libres	Touche la surface avec la patte antérieure ipsilatérale		Touche la surface avec la patte antérieure controlatérale	
Evaluation du touché				
Tête maintenue à 45°, pattes antérieures/ postérieures libres et dos de la main placé en contact avec la surface	Détection de la surface avec les pattes antérieures		Détection de la surface avec les pattes postérieures	
	Ipsilatérale	Controlatérale	Ipsilatérale	Controlatérale
Evaluation de la proprioception				
Rat placé sur la surface et chaque patte placée à tour de rôle dans le vide	Antérieures		Postérieures	
	Côté ipsilatéral	Côté controlatéral	Côté ipsilatéral	Côté controlatéral
Evaluation de la sensibilité des vibrisses				
Rat maintenu avec les pattes antérieures libres et réalisation de mouvements verticaux pour stimuler les vibrisses avec le côté de la surface	Côté ipsilatéral: réaction de la patte antérieure		Côté controlatéral: réaction de la patte antérieure	

(B)

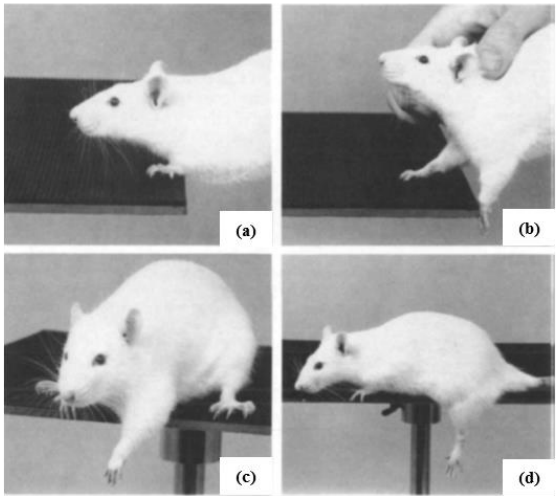


Figure 41: Test de placement de pattes

(A) Items du test de placement de pattes modifé d'après Quittet et *al.* 2015. **(B)** illustration de quelques items: **(a)** L'animal est approché de la surface à 30 -45° **(b)** L'examinateur maintient l'animal et lui positionne le dos des pattes antérieures puis postérieures au niveau du bord de la surface La proprioception est évaluée en plaçant chacune des pattes antérieures **(c)** et postérieures **(d)** dans le vide. L'animal sain replace aussitôt sa patte sur la surface.

À chaque item l'observateur note le réflexe de l'animal à poser ses pattes sur plateforme. (D'après De Ryck et *al.* 1989)

Test de la vision : l'examinateur approche l'animal de la surface avec un angle de 35-40° et note le réflexe de l'animal à placer ses pattes en extension vers la surface.

Sensibilité tactile : Pour réaliser ce test, un support surélevé est utilisé. Dans un premier temps, l'examinateur approche l'animal de la surface avec un angle de 35-40° et note le réflexe de l'animal à placer ses pattes en extension vers la surface. L'examinateur place l'animal de sorte que seul le dos des paumes des pattes antérieures puis des pattes postérieures soit en contact avec la tranche de la surface. Un animal sain dès le contact avec la surface, repositionne ses paumes sur la surface.

Test de la proprioception : l'animal est positionné sur la surface surélevée et chacune de ses pattes est, à tour de rôle, placée dans le vide. L'animal sain repositionnera quasi-instantanément sa patte sur la surface.

Sensibilité des vibrisses : l'animal est approché latéralement de la surface de façon à ce que seules ses vibrisses soient en contact avec cette dernière. Un animal sain, dès le contact avec la surface aura le réflexe de placer sa patte antérieure sur celle-ci.

3.8.3 Test du coin

Ce test se compose de deux planches fixées sur une surface afin de former un angle de 30° entre elles. L'angle n'est pas fermé afin de stimuler l'exploration du coin par l'animal. L'entrée dans le coin stimule les vibrisses des deux côtés de l'animal (Schallert *et al.* 2000).

Le nombre de retournements effectués de chaque côté pour sortir du coin après exploration de ce dernier est comptabilisé au cours de 10 essais. Un intervalle inter essai de 2 minutes est respecté entre deux passages dans l'appareillage (figure 42).

Un retournement est comptabilisé si l'animal explore préalablement le coin (redressement). Ce test fait intervenir de nombreuses fonctions à la fois sensorielles et motrices (sensibilité des vibrisses, utilisation des pattes et attitude posturale) (Schallert *et al.* 2002).

L'index de latéralisation est calculé de la façon suivante (Haelewyn *et al.* 2007).

$$\text{Index de latéralisation} = \frac{\text{Nombre de retournements ipsilatéraux} - \text{nombre de retournements controlatéraux}}{\text{Nombre de retournements totaux}}$$

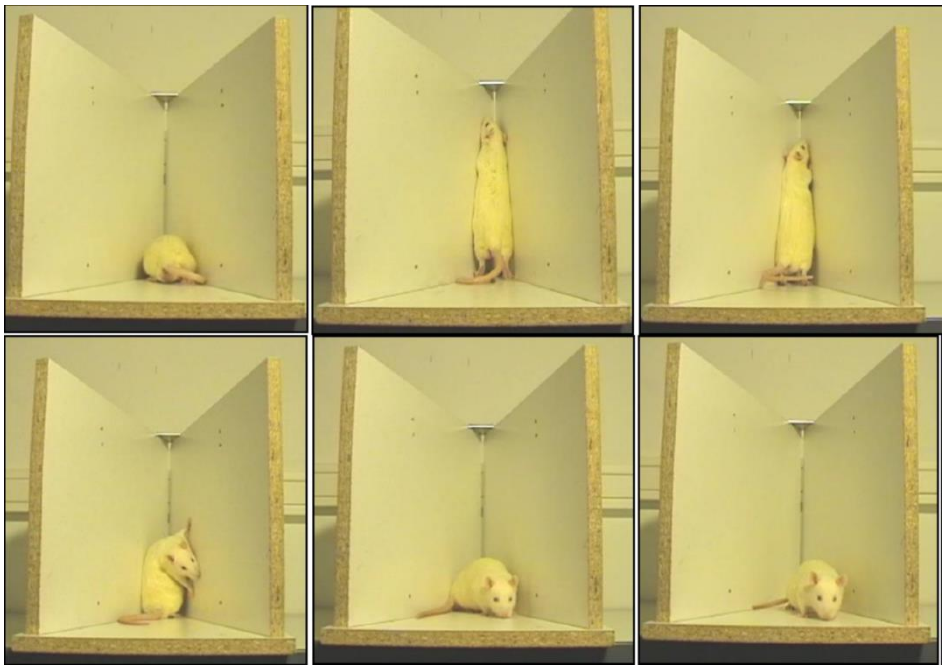


Figure 42: Test de du coin.

3.8.4 Test du cylindre

Ce test consiste à placer l'animal dans un cylindre en plexiglas transparent de 30 cm de haut et 20 cm de diamètre. L'utilisateur inspecte le redressement de l'animal et note la première patte entrant en contact avec la paroi lors de l'exploration par redressement. Un animal sain utilise de façon équivalente la patte gauche et la patte droite. Dans ce test, l'utilisateur comptabilise également les

contacts les contacts bilatéraux, c'est-à-dire que les deux pattes entrent en contact avec la paroi simultanément. Les traces olfactives sont enlevées à l'aide d'alcool entre deux animaux ou entre deux passages du même rat dans le cylindre. Le pourcentage d'utilisation de la patte controlatérale est alors calculé au cours de 20 redressements successifs (figure 43).

Figure 43: Test de du cylindre.

3.8.5 Test du retrait de l'adhésif

Ce test permet d'évaluer la sensitivité ainsi que la coordination motrice de l'animal. Créé par Schallert et collègues en 1982 (Schallert *et al.* 1982), ce test est inspiré de l'évaluation de l'extinction tactile réalisée en clinique chez les patients atteints d'AVC. En clinique, le patient ferme les yeux, puis des pressions du doigt sont exercées sur le dos de chaque main séparément ou simultanément afin de vérifier que la sensibilité soit égale en stimulation simple ou simultanée (item 11 échelle NIHSS). Chez le rat, un morceau d'adhésif d'environ 1 cm x 1 cm (Leukoplast®) est positionné sur chaque paume des pattes antérieures avec une pression égale des deux côtés (figure 44). L'ordre de placement de l'adhésif est aléatoire (gauche/droite) entre chaque animal et entre chaque jour. L'animal est par la suite placé dans une boîte en plexiglas de 20 x 25 x 32 cm transparente. Un miroir incliné permet à l'examinateur d'observer l'animal quand il lui fait dos. Dans un premier temps, le temps de détection de l'adhésif est noté. La détection correspond à un

mouvement rapide de la patte ou à un contact patte-bouche. Ensuite, le temps de retrait est également noté. L'animal devra faire preuve d'une coordination motrice de sa patte et de sa bouche pour permettre un retrait efficace de l'adhésif. La latence maximale de retrait de l'adhésif est de 120 secondes. Chaque animal est entraîné pendant 5 jours, à raison d'un essai par jour, avant la chirurgie pour obtenir des performances optimales avant cette dernière. La moyenne des trois derniers jours des temps de contact et retrait de chaque patte sera utilisée comme référence des performances basales de l'animal. Lors de l'évaluation du déficit post ischémique, le test est réalisé tous les jours pendant 5 jours et la moyenne des temps de contact et de retrait des trois derniers jours est utilisée. Cette évaluation par bloc permet de limiter le biais causé par le réapprentissage du test les deux premiers jours.

Figure 44: Illustration du placement de l'adhesif sur la patte de l'animal.

3.8.6 Test de l'open-field

Ce test permet d'évaluer le niveau d'anxiété et la motricité de l'animal. En tant que proie, le rat a une préférence naturelle pour les espaces sombres et confinés, une surface lumineuse et spacieuse présente donc un aspect anxiogène chez ce dernier. Le test de l'open-field, ou dit du champ ouvert, utilise cette propriété afin d'évaluer le comportement anxieux et le déplacement de l'animal. Le rat est placé pendant 10 minutes dans une enceinte blanche de 1 m x 1 m en plexiglas munie d'un

système de suivi vidéo (caméra infra-rouge) et d'un plancher à détection infra-rouge permettant d'enregistrer les mouvements réalisés à l'aide du déplacement du cône de sustentation du rat. La luminosité appliquée au centre de la surface est d'environ 20 lux. L'examinateur est placé à 1 m de l'appareillage. Le temps passé par le rat au centre de l'appareil (espace fortement éclairé) sera inversement proportionnel à son niveau d'anxiété. Par ailleurs, l'étude de la motricité de l'animal se fait par l'évaluation de la distance parcourue dans l'enceinte au cours du test (figure 45).

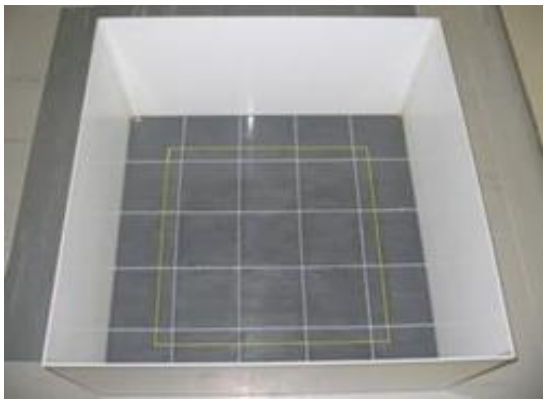


Figure 45 : Dispositif du test de l'open-field

3.8.7 Test de la poutre

Ce test permet d'évaluer les déficits sensorimoteurs de l'animal. Une poutre en bois de 1,65 m est utilisée dont l'une des extrémités mesure 6 cm et l'autre 1,5 cm de large. La poutre est munie de rebords de 2 cm, placés 2 cm sous la poutre pour prévenir toute chute de l'animal. L'appareil est divisé en 4 zones comme décrit dans la figure 46. Les fautes ou les glissements de pattes sont notés en fonction de la zone de survenue de l'erreur. Si l'animal ne commet aucune erreur un score de 0 lui est attribué. Afin d'entraîner les animaux à traverser la poutre, 3 essais par jour pendant 2 jours avant l'ischémie sont réalisés. Pour motiver l'animal à effectuer la traversée de la poutre, une

lumière de 100 lux est appliquée sur la partie large de la poutre alors qu'une intensité de 10 lux est appliquée sur l'extrémité fine. L'examinateur se place du côté large de la poutre et l'extrémité fine est posée sur la cage d'hébergement du rat. Après chaque traversée l'animal est laissé 30 secondes sur la grille de sa cage, afin de créer un renforcement positif (figure 46). Le temps maximal de traversée est fixé à 120 secondes.

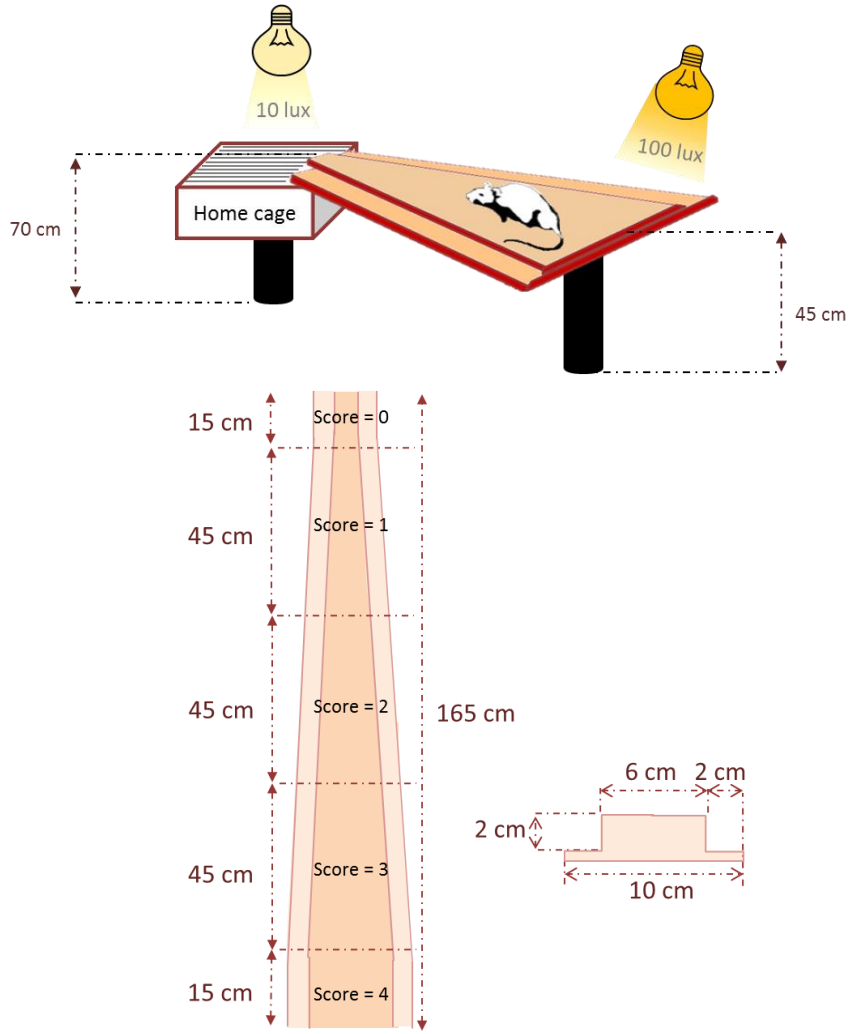


Figure 46 : Test de la poutre.

(A) Dispositif du test de la poutre, avec la traversée de l'animal jusqu'à sa cage. **(B)** Dimension de la poutre, avec la délimitation des zones permettant d'établir un score évaluant les déficits sensorimoteurs de l'animal (modifié d'après Quittet et *al.* 2015)

3.9 Mise à mort des animaux et extraction du cerveau

À la fin des protocoles, les animaux sont mis à mort dans le but de récupérer les cerveaux. Pour ce faire, avant l'euthanasie les animaux recoivent une dose d'analgésie par une administration intramusculaire de 0.02 mg/kg de buprénorphine (Buprécare® 0,3 mg/ml Axience®). Les animaux sont ensuite anesthésiés profondément à l'isoflurane 5 % dans un mélange O2/N2O 1/3 pendant une durée sub-létale d'au moins 5 minutes. La cage thoracique est ouverte et le cœur dégagé des tissus conjonctifs environnants. Le ventricule gauche et l'atrium droit sont sectionnés. Un cathéter est placé dans le ventricule gauche jusqu'à l'aorte et le système vasculaire est rincé en administrant du sérum physiologique hépariné (0,5 ml dans 250 mL soit 10 UI/mL). Les tissus sont par la suite fixés en administrant à l'aide du cathéter du paraformaldéhyde (PFA) 4 % (soit 0,1M) dilué dans du tampon phosphate 1M dont le pH est ajusté à 7. Le cerveau est ensuite extrait de la boîte crânienne puis plongé dans du PFA 4 % pendant 24-48 h à la suite de quoi le PFA est remplacé par du sucrose 30 % dilué dans une solution de tampon phosphate 1 M. Une fois le cerveau imbibé de sucrose, des coupes de 50 µm sont réalisées à l'aide d'un freezing microtome à -23 °C (HM 450 Sliding Microtome, Thermo Scientific™). Les coupes sont par la suite conservées dans du cryoprotectant (50 % PBS 0,1 M (Sigma®), 20 % glycerol (Acros®), 30 % éthylène glycol (Fluka®) à -20 °C.

3.10 Études immunohistochimiques

Pour l'étude de la neurogenèse, les animaux ont été injectés pendant 15 jours après l'ischémie cérébrale de 50 mg/kg de BrdU. L'euthanasie des animaux s'est effectuée à 35 jours après l'induction de l'ischémie cérébrale. Après l'extraction des cerveaux les coupes obtenues sont rincées à 3 reprises pendant 5 minutes dans du PBS 0,1 M puis sont incubées dans un mélange de PBS 0,1 M / 3 % BSA (*bovine serum albumine* Sigma®) / 0,1 % triton (Sigma®) pendant au moins

1 h afin de saturer les sites de liaison non spécifiques. Les coupes sont par la suite placées en contact avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS 0,1 M / BSA 1 % / triton 0,1 % toute la nuit à 4 °C sous agitation douce. Les coupes sont rincées à 3 reprises avec du PBS 0,1 M puis incubées 2 h avec l'anticorps secondaire approprié dilué dans une solution de 0,1 M PBS / 1 % BSA / 0,1 % triton. Les coupes sont encore une fois rincées puis incubées pendant 30 min avec le marqueur nucléaire Hoechst 33342 (1/500, Sigma Aldrich). Enfin après 3 rinçages dans du PBS les coupes sont montées entre lame et lamelle. Des photos sont acquises à l'aide d'un microscope inversé Leica microsystems DMi8 à épifluorescence. Les images ainsi obtenues sont analysées à l'aide du logiciel ImageJ (http://imagej.nih.gov/ij/).

Réaction cellulaire	Anticorps	Fournisseur	Dilution
Neurogenèse	DCX	polyclonal rabbit anti-DCX, Abcam	0.3 µg/ml
	BrdU	polyclonal rat anti-BrdU, Roche	0.2 µg/ml
	NeuN	monoclonal mouse anti-NeuN, Chemicon	1.5 µg/ml
Angiogenèse	RECA-1	monoclonal mouse anti-RECA-1, AbD Serotec	5 µg/ml
	Ki-67	rabbit polyclonal anti-Ki67 antibody, Abcam	5 µg/ml
Inflammation	CD68	polyclonal mouse anti-CD68, DAKO	2 µg/ml
Réaction astrocytaire	GFAP	polyclonal rabbit anti-GFAP, DAKO	5.8 µg/ml

3.11 Analyse statistique

Les données sont analysées à l'aide du logiciel JMP (SAS Institute Inc, cary, NC, USA). Pour la comparaison de moyennes, le test-t de Student a été utilisé dans le cas d'une comparaison de deux moyennes, et dans le cas d'une comparaison de plusieures moyennes les tests de HSD de Tuckey et de Dunnett sont réalisés à la suite d'une ANOVA (analyse of variance). Les données sont exprimées soit en moyenne ± erreur type sur la moyenne (SEM) soit en médiane ± écart interquartile.

4 Résultats

Dans la partie « Résultats », et plus particulièrement dans les articles soumis ou en cours de soumission, le RGTA est nommé HSm pour *heparan sulfate mimetic* (mimétique de l'héparane sulfate), et le composé spécifique utilisé dans nos études, le RGTA-4131 est nommé HSm4131.

Étude 1 : Effet du RGTA sur la neuroprotection et la régénération tissulaire après une ischémie cérébrale

Diverses études ont montré l'intérêt de protéger la MEC d'une dégradation par les différentes protéases produites à la suite d'une ischémie cérébrale (Zalewska *et al.* 2002; Khatri *et al.* 2007; Turner *et al.* 2016). D'autres études ont montré que l'administration de composés de la MEC (collagène, GAGs) protège également le cerveau de l'ischémie cérébrale (Guan *et al.* 2012; Hill *et al.* 2012). Enfin, les biomatériaux analogues à une structure ou une molécule matricielle ont également prouvé leur efficacité dans la réparation de nombreuses lésions tissulaires (R. A. Brown *et al.* 2007; Boughton *et al.* 2013).

Le RGTA est un composé regroupant de nombreux avantages. Tout d'abord, le RGTA résiste aux protéases tissulaires, et favorise la reconstruction de la MEC. Ensuite, c'est un composé analogue des HS mimant leurs fonctions physiologique (communication cellulaire, liaison, stockage et protection des facteurs de croissance, co-récepteur du FGF-2, etc.). Enfin, le RGTA a prouvé son efficacité préclinique et clinique dans la réparation tissulaire suite à des lésions induites par diverses pathologies, sans aucun effet secondaire rapporté (Barritault *et al.* 2017).

En se basant sur ces études nous avons émis l'hypothèse que le RGTA pouvait constituer un agent neuroprotecteur et réparateur à la suite d'une lésion ischémique cérébrale.

Nous avons testé cette hypothèse en utilisant un modèle d'ischémie cérébrale focale transitoire par occlusion de l'ACM pendant 1 h chez le rat (modèle oACM 1h), suivie d'une administration i.v. de RGTA. L'effet de ce traitement a été évalué sur le volume de la lésion ischémique visualisée par IRM à 2 et 14 jours après l'ischémie cérébrale, et sur la récupération fonctionnelle évaluée par des tests sensorimoteurs durant 54 jours après l'oACM. Nous avons aussi analysé (figure 47):

- La fenêtre thérapeutique du RGTA en administrant le produit à 3 temps différents : 1 h ; 2,5 h ; ou 6 h après l'occlusion de l'ACM.
- La dose optimale du RGTA avec l'administration de 3 doses différentes : 0,5 ; 1,5 ; ou 5 mg/kg.
- La biodistribution du RGTA a été évaluée 5 min ; 1 h ; et 3 h après son administration à la suite de la reperfusion.
- La perméabilité de la BHE : 1 h ; 3 h ; 24 h ; 48 h ; et 7 jours après l'oACM
- L'expression de facteurs angiogéniques et neurogéniques (VEGF et Ang-2) évaluée par qRT-PCR 14 jours après l'ischémie cérébrale.
- La distribution des HS par immunohistologie 35 jours après l'ischémie cérébrale.
- Les réactions cellulaires : angiogenèse, neurogenèse, astrogliose et inflammation par immunohistologie 35 jours après l'ischémie cérébrale.

Étude 1: effet du RGTA sur la neuroprotection, la régénération cérébrale et la récupération fonctionnelle

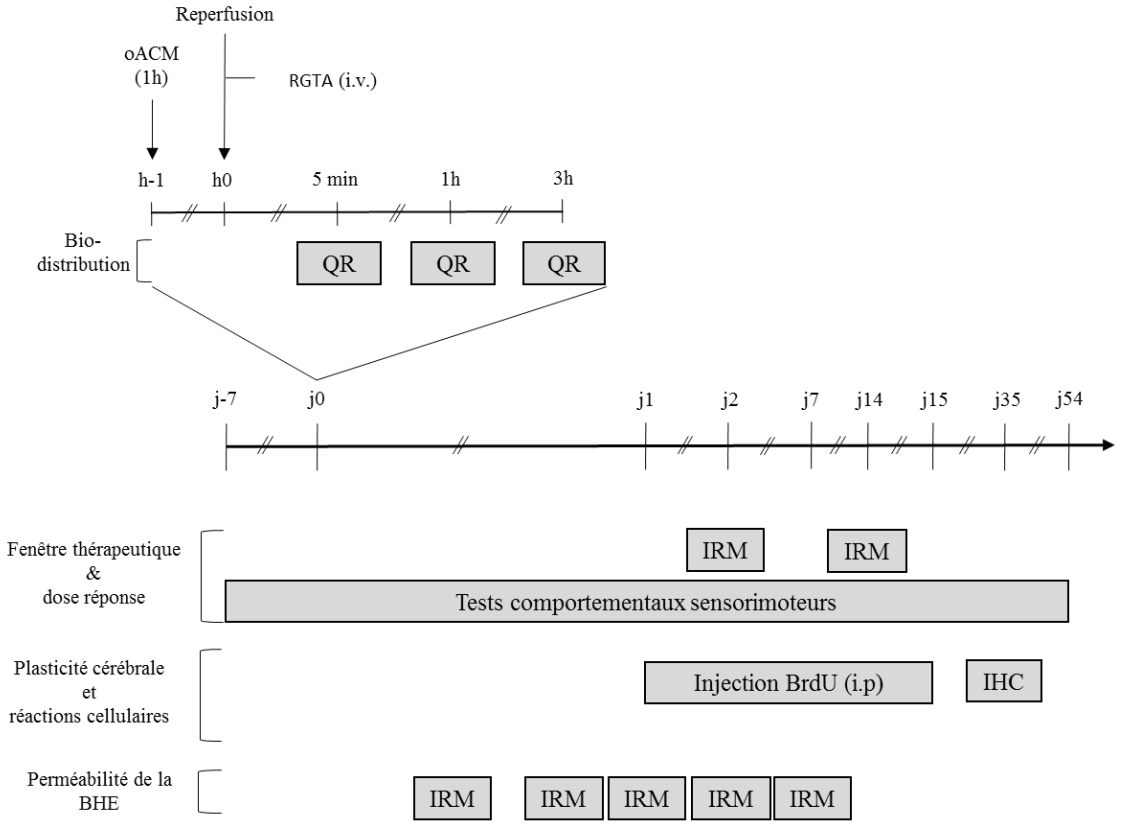


Figure 47 : **Protocole de l'étude 1 : Effet du RGTA sur la neuroprotection et la régénération après une ischémie cérébrale.**

QR : quantification de la radioactivité, IRM : imagerie par résonnance magnétique, CSMs : cellules souches mésenchymateuses, RGTA : ReGenraTing Agent, IHC : immunohistologie

4.1.1 Article de l'Étude 1 : Effet du RGTA sur la neuroprotection et la régénération tissulaire après une ischémie cérébrale

A heparan sulfate-based matrix therapy reduces brain damage and enhances functional recovery following stroke

Yacine KHELIF[1], Jérôme TOUTAIN[1], Marie-Sophie QUITTET[1], Sandrine CHANTEPIE[3], Xavier LAFFRAY[3], Samuel Valable[1], Didier DIVOUX[1], Fernando SINERIZ[2], Emanuelle PASCOLO-REBOUILLAT[2], Dulce PAPY-GARCIA[3], Denis BARRITAULT[2,3], Omar TOUZANI[1*,] Myriam BERNAUDIN[1*]

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

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

[3] CRRET (EA 4397/ERL CNRS 9215), Université Paris-Est, Université Paris Est Créteil, F-94010, Créteil, France.

* Authors contributed equally to the work

Corresponding author: bernaudin@cyceron.fr

Acknowledgements/ funding:

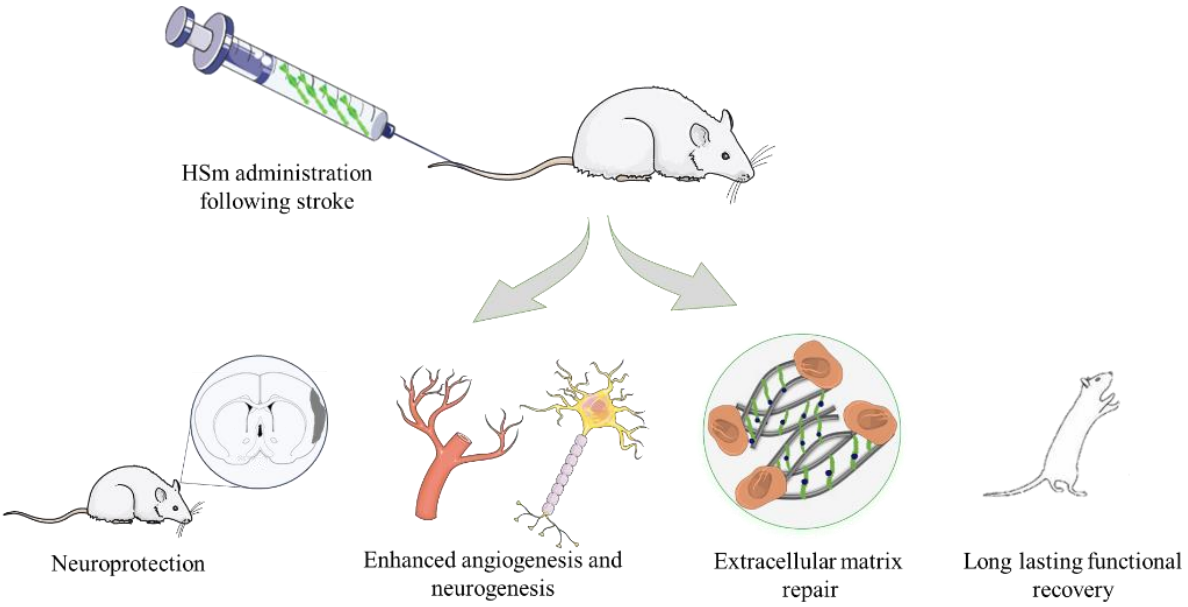
This work was supported by CNRS, the Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche, the University of Normandy, OTR3 S.A.S, the ANR (Agence Nationale de la Recherche, ANR-15-CE18-0029-01-« MAESTRO »), and the Conseil Régional de Normandie. The authors wish to also thank the FRC (Fédération de la Recherche pour le Cerveau) and the site smart.servier.fr for their image bank, which was used for the graphical abstract illustration.

Abstract

The alteration of the extracellular matrix (ECM) is one of the major events in the pathogenesis of brain lesions following ischemic stroke. Heparan Sulfates mimetics (HSm) are synthetic pharmacologically active polysaccharides that promote ECM remodelling and tissue regeneration in various types of lesions. HSm bind growth factors, protect them from enzyme degradation and thus increase their bioavaibility, which promotes tissue repair. Since the ECM is altered during stroke and HSm were shown to restore the ECM, we evaluated the potential of HSm to protect brain tissue and promote regeneration and plasticity, after stroke. Through the use of a pertinent model of stroke and multiple approaches of investigation, we showed that HSm, administered intravenously after the induction of stroke, reached and remained in the ischemic hemisphere. HSm conferred a long lasting neuroprotection and remarkably reduced functional deficits with no alteration of physiological parameters. HSm treatment restored ECM and increased brain plasticity processes in the affected brain hemisphere, ie. angiogenesis and neurogenesis. In conclusion, HSm represent a promising ECM-based therapeutic strategy to protect and repair the brain after stroke and favor functional recovery.

Key words: Neuroprotection, extracellular matrix, functional recovery, stroke, heparan sulfate.

Graphical abstract



Introduction

Stroke remains a major economic and health problem worldwide. Presently, the only pharmacological treatment available during the acute stage of an ischemic stroke is thrombolysis with the recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA). However, this treatment has a very narrow therapeutic window (< 4.5 hours) and is therefore given to a minority of patients (Demaerschalk 2016).

After stroke, several cellular and molecular phenomena occur including extracellular matrix (ECM) destruction, which in turn worsens the stroke lesion. The ECM constitutes the complex environment surrounding and supporting cells. It contains a large amount of signaling and structural proteins that regulate tissue homeostasis. Among these components, heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) are known to be involved in various processes including neurodevelopment/neuroplasticity with the regulation of neural stem cells, and angiomodulatory mechanisms (Smith et *al.*, 2015). HSPGs are also known to bind and regulate the activity of several growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor (TGF)-β and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) (Barritault et *al.*, 2017). Following stroke, HSPGs are enzymatically degraded by an endoproteoglycanase, named heparanase, which results in an alteration of the ECM's structure and the reduction in the bioavailability of growth factors that normally bind the HSPGs at the lesion site (Li et *al.*, 2011, Takahashi et *al.*, 2007). Therefore, this degradation of HSPGs prevents the regeneration of the affected tissue. Growing evidence suggests an essential role of the ECM in brain tissue repair after ischemic stroke. For example, ECM was shown to be crucial for the endogenous repair response by stimulating neural and oligodendrocyte progenitor recruitment (Ghuman et *al.*, 2016).

To promote the regeneration of the ECM after a lesion, a novel pharmacologically active molecule was developed: a heparan sulfate (HS) mimetic named RGTA-4131® (for ReGeneraTive Agent). These HS mimetics (HSm) are synthetic polysaccharides that bind to extracellular structural proteins such as collagen and act as a reservoir of growth factors (Barritault et *al.*, 2016). Indeed, it was shown that HSm can bind different growth factors such as VEGF, FGF (-1 and -2) and TGF-β (Rouet et *al.*, 2005, Tong *et al.*, 2008, Blanquaert et *al.*, 1999). The molecular structure of HSm prevents their enzymatic degradation during tissue destruction and ECM remodeling (Ikeda et *al.*, 2011). In this manner, HSm bind the heparin binding growth factors (HBGFs), protecting them from degradation and increasing their bioavailability (Mangoni et *al.*, 2009). These HBGFs, especially VEGF, are known to play an essential role in tissue repair mechanisms and brain plasticity (Hermann et *al.*, 2009). Furthermore, HSm are already used for human wound repair in several pathologies, particularly for the treatment of chronic skin wounds and corneal lesions.

In the present paper, we hypothesized that HSm4131 could serve as a novel therapy for stroke by protecting brain tissue and promoting plasticity and functional recovery.

Material and methods

Animals

All experimental procedures were approved by the regional committee on animal ethics (APAFiS#3252). Experimental procedures were performed at the CYCERON platform (Caen, France, agreement number: FA-118-001). Male Sprague-Dawley (CERJ, France) weighing 300-350g were used. Data are reported according to ARRIVE guidelines (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments). All experiments and data analyses were performed in a blind and randomized manner.

Induction of brain ischemia

Transient cerebral ischemia was induced by intraluminal occlusion of the middle cerebral artery (MCAo) as previously described (Chuquet et *al.*, 2002, Quittet et *al.*, 2015). Briefly, rats were anesthetized with isoflurane (2-2.5 %) with a mixture of O2/N2O (30%/70%). During surgery, animals' temperature was monitored by a rectal probe and maintained at 37°C with a heating blanket. A nylon filament (0.18 mm diameter) with a distal cylinder (0.39 mm diameter x 3 mm length) (Doccol, Sharon, MA, USA) was introduced into the lumen of the right external carotid, advanced through the internal carotid, and gently pushed up to the origin of the middle cerebral artery (MCA). One hour following the occlusion, rats were re-anesthetized and the filament was withdrawn to allow reperfusion. Concomitantly, physiological serum or HSm4131 were injected (300 µl) through the tail vein. After reperfusion, the rats were returned to their home cage after an analgesic treatment (tolfedine 4%, 10 mg/kg, i.m.) associated with rehydration (5 ml of saline, i.p.), which was maintained for 3 days after MCAo.

HSm4131 administration

HSm4131 was obtained from OTR3 (OTR3 S.A.S., Paris, France). To study the therapeutic time window of HSm4131, the compound was administered intravenously (i.v.) 1 h, 2.5 h or 6 h after MCAo (figure 1). To evaluate the dose response, HSm4131 was administered (i.v.) 1 h after MCAo at different doses: 0.5 mg/kg, 1.5 mg/kg, or 5 mg/kg (figure 1). In all the other studies, HSm4131 was administered (i.v.) 1 h after MCAo at the dose of 0.5 mg/kg. The control group of all these experiments received physiological serum (300 µl, i.v.).

Measurement of physiological parameters

To examine the effect of HSm4131 administration on physiological parameters, arterial blood pressure, heart rate, blood gases and blood pH were measured in rats subjected to MCAo and treated with HSm4131.

MRI examinations

At days 2 and 14 following the induction of brain ischemia, each animal was anaesthetized as described above and underwent magnetic resonance imaging (MRI) examinations (7T, PharmaScan®, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany at the CYCERON imaging platform, Caen, France). After a scout view, T2w imaging was performed for each group with a rapid acquisition with refocused echoes (RARE) sequence (RARE factor of 8; TR/TE = 5000/16.25 ms; number of experiments (NEX) = 2; 20 contiguous slices of 0.75 mm; acquisition time = 4 min; nominal resolution = 0.15 x 0.15 x 0.75 mm3).

All MRI images were analyzed with ImageJ® software (Wayne Rasband, NIMH, Maryland, USA) (Schneider et *al.*, 2012). At days 2 and 14 post-MCAo, the lesion was manually delineated on each MR image and the volume of infarction was corrected for edema as described by Gerriets and colleagues (Gerriets et *al.*, 2004).

HSm4131 biodistribution

HSm4131 was coupled to technetium-99m (Tc^{99m}) (FRIM platform UMS34 University Paris Diderot, Paris, France) and administered at 0.5 mg/kg (i.v) 1 h after MCAo. Animals were euthanized at different time points (5 min, 1 h, and 3 h after MCAo). After washing the vascular compartment through a transcardiac perfusion of saline solution, radioactivity was measured in each hemisphere using a gamma counter.

Behavioral tests

Neurological score

The neurological score was performed following 14 items based on the modified version of the method described by Bederson and colleagues (Bederson et *al.*, 1986). A maximal score of 28 indicated normal sensorimotor response (Freret et *al.*, 2006). Each item was scored on a scale of 2: 0 (severe deficit), 1 (minor deficit), 2 (no deficit).

Limb placing test

The limb placing test was performed as described by De Ryck and colleagues (De Ryck et *al.*, 1989). A score of 0 (major deficit), 1 (minor deficit) or 2 (no deficit) was applied for each item. The maximal score obtained with a healthy rat was 24 (Freret et *al.*, 2006).

Corner test

The corner test was performed as described by Schallert and collaborators (Schallert et *al.*, 1982) to evaluate the sensorimotor and postural asymmetries. The rearing and reversing in either of the directions (ipsilateral or contralateral to the ischemic lesion) after the corner exploration were noted. The test was repeated 10 times with an inter-trial interval of 2 min. The index of lateralization (LI) was calculated according to Haelewyn and collaborators (Haelewyn et *al.*, 2007).

Cylinder or limb-use asymmetry test

To assess forelimb use asymmetry, the use of the ipsilateral, contralateral or bilateral forelimbs to explore the cylinder by rearing was noted for 20 times according to Schallert and collaborators (Schallert et *al.*, 2002).

Adhesive removal test

The adhesive removal test was employed to assess somatosensory deficits and motor coordination (Bouet et *al.*, 2009). Animals were placed in a transparent Plexiglass box (20×25×32 cm) after a habituation period of 60 s; two adhesive tapes (1×1cm) were randomly applied with equal pressure on each forepaw. The time spent to remove the adhesive were measured (maximum: 120 s).

Reverse transcription and real-time quantitative PCR

Total RNA of cells or tissues were extracted and purified using RNeasy Micro Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). RNA concentration was measured with the NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) and reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) with AMV® reverse transcriptase (Promega). PCR amplification and analysis were achieved using the Applied Biosystems QuantStudio™ 6 & 7 Flex Real-Time PCR System (Thermofisher scientific, USA). Amplification reactions were performed using Takyon™ Low Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Belgium) with primers designed by Eurogentec (Table 1, supplementary data). Cyclophin-A was used as an endogenous RNA control (housekeeping gene) in the samples. Primer sequences related to vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and angiopoetin-2 (Ang-2) were purchased from Eurogentec, Belgium. The expression level was calculated using the comparative Ct method ($2^{-\Delta Ct}$) after normalization to the housekeeping gene (Cyclophilin-A). Samples were run in triplicate with an amplification profile as follows: an activation stage at 95°C for 3 min following by 40 cycles at 95°C, 3s and 60°C, 30s. Expression levels were represented as the mean values.

Immunohistochemistry

Rats were injected with BrdU (50 mg/kg, i.p.) from day 1 to day 15 post-MCAo and were euthanized at day 35. Briefly, under deep anesthesia with 5% isoflurane in a mixture of O_2/N_2O (30%/70%) animals underwent a transcardiac perfusion of a heparinized (10 IU/mL) physiological serum followed by a 4% paraformaldehyde (PFA) perfusion (Sigma, France). Brains were then placed in 4 % PFA for 48 h and put into a solution of phosphate-buffered saline (PBS) with 30 % sucrose. 50 µm cryosections were obtained in the coronal plane using a microtome (HM 450 Sliding Microtome, Thermo Scientific™).

To assess neurogenesis, sections were incubated with the immature neuronal marker doublecortin (DCX) (polyclonal rabbit anti-DCX, Abcam 0.3 µg/ml) or the mature neural NeuN marker (polyclonal rabbit anti-NeuN, Abcam 1.5 µg/ml) in association with the proliferative BrdU marker (polyclonal rat anti-BrdU, Roche 0.2 µg/ml).

To analyze angiogenesis, the rat endothelial cell antigen marker (RECA-1) (monoclonal mouse anti-RECA-1, AbD Serotec 5 µg/ml) in association with the proliferative marker Ki67 (rabbit polyclonal anti-Ki67 antibody, Abcam 5 µg/ml) were used. Glial and inflammatory reactions were assessed with the astrocytic marker glial fibrillary acidic protein (polyclonal rabbit anti-GFAP, DAKO 5.8 µg/ml) and the CD68 marker (polyclonal mouse anti-CD68, Abcam 2 µg/ml), respectively.

Briefly, the sections were washed in PBS solution and saturated in a solution of PBS containing bovine serum albumin (BSA) (3%) (Sigma) and Triton (0.1%) (Sigma), before overnight incubation with the primary antibody in PBS with BSA (1%) and Triton (0.1%) at 4°C. Sections were washed again with PBS followed by 2 h of incubation with the appropriate secondary antibodies (Alexa Fluor® 555, 488, 4µg/ml, Invitrogen) and the nuclear marker, Hoechst 33342

(1/500, Sigma Aldrich) at room temperature. Sections were washed with PBS and placed on the slide before the application of the coverslip.

After image acquisition with an appropriate microscope (Leica microsystems DMi8), all images were analyzed with ImageJ® software (Wayne Rasband, NIMH, Maryland, USA) [17]. DCX, GFAP and CD68 were quantified by measuring the area of pixels in the ipsilateral (ischemic) hemisphere, which have a statistically higher intensity than the control homologous area in the contralateral (non-ischemic) hemisphere (p value < 0.001; Student-t distribution table (mean + 3.291*SD)). Angiogenesis was quantified by counting the RECA-1+/Ki-67+ cells expressed as a percentage of Ki-67+ cells.

To study HS distribution following MCAo, tissue cryosections (50 µm) were washed and incubated for 2 min with 50 mM NH_4Cl in PBS and washed again. Sections were saturated with 3% BSA/PBS for 1 h. HS were then stained with the 10E4 antibody (1:100). HS staining was revealed using a donkey anti-mouse secondary antibody conjugated to the Alexa-488 fluoroprobe (Molecular Probes, 1:200). Tissue sections were then incubated with DAPI (1 µg/mL) for 5 min and rinsed. HS identity was confirmed by treating tissue with a heparitinase cocktail (heparitinase I/II/III 2/0.2/0.2 U/mL) for 6 h at room temperature and then washing before HS staining. Images were obtained using a spinning disk inverted confocal microscope (IX81 DSU Olympus, 60 N.A. 1.35) coupled to an Orca Hamamatsu RCCD camera (Olympus®). Image processing and analysis were done using ImageJ® software (Wayne Rasband, NIMH, Maryland, USA) (Schneider *et al.*, 2012).

Statistical analyses

Data were analyzed using a two-tailed Student-t test or an analysis of variance (one or two-way ANOVA) followed by a Dunnett's or a Tukey HSD test (JMP® program, SAS Institute, Cary, NC, USA) when appropriate. Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) or median ± interquartile range (IQR). In all analyses, statistical significance was set at the p-value < 0.05.

Results

The HS mimetic is neuroprotective

HSm4131 administered 1 h after stroke onset (1.5 mg/kg, i.v.) resulted in a reduction of lesion volume up to 30% compared to the control (Student-t test $p < 0.05$) (figure 2A). This reduction of lesion volume remained at day 14 after stroke (Student-t test $p < 0.05$) (figure 2A).

Sensorimotor deficits were evaluated with limb placing and corner tests. The HSm4131-treated group showed a significant faster recovery between day 2 and week 2 post-MCAo compared to the vehicle group (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test $p < 0.05$) (figure 2B). The administration of HSm4131 at 1 h post-MCAo prevented the lateralization of the animals as shown by the corner test (one-way ANOVA followed by Dunnett's test $p < 0.05$) (figure 2C). Functional recovery at the chronic stage was assessed using the adhesive test, which highlighted that HSm4131-treated animals showed a better sensorimotor recovery 5 weeks after ischemia. These animals removed the adhesive on the contralateral side faster than the vehicle animals (Student-t test $p=0.06$) (figure 2D).

Therapeutic time window

To evaluate the therapeutic time window, we administered the compound 1 h, 2.5 h or 6 h post-MCAo (figure 1). We showed that HSm4131 (1.5 mg/kg) was effective in reducing infarction volume when administered at 1 h post-MCAo (figures 3A). Quantification of the lesion volume by MRI confirmed a significant 30% reduction of lesion volume at day 2 post-MCAo when HSm4131 was administered 1 h after MCAo, while no significant effect was visible if HSm4131 was administered at 2.5 or 6 h after stroke induction (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test, $p < 0.05$) (figure 3A and 3B). At day 14 post-MCAo, in the HSm4131 (1.5 mg/kg)-treated groups,

the volume lesion was still reduced compared to the vehicle group (one-way ANOVA followed by Tukey HSD, p = 0.08) (figure 3A and 3C).

These data indicate that the optimal time window which confers better neuroprotection was 1 h after ischemia. Thus, this time of administration was used for the following studies.

Optimal dose of HSm4131

In order to determine the optimal neuroprotective dose of HSm4131, we tested 3 doses of the compound, 0.5, 1.5, and 5 mg/kg (figure 1). Irrespective of the dose injected, HSm4131 induced a significant reduction of lesion volume when quantified 2 days after the induction of ischemia (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test $p < 0.05$) (figure 4A, 4B). However, animals treated with 0.5 mg/kg of HSm4131 conferred a more significant neuroprotection with a reduction up to 42% of the lesion volume at day 2 after MCAo compared to the vehicle group (one-way ANOVA followed by a Tukey HSD test $p<0.001$) (figure 4A). Interestingly, this neuroprotection was maintained at the chronic stage, i.e. 14 days after stroke (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test $p < 0.05$) (figure 4B).

The assessment of sensorimotor deficits using the neurological score demonstrated a greater recovery of animals treated with 0.5 mg/kg of HSm4131 at day 10 compared to days 2 and 4 (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test $p < 0.05$), whereas vehicle animals showed no significant improvement during the test period (figure 4D).

This sensorimotor recovery persisted at least 5 weeks after ischemia in the animal group treated with 0.5 mg/kg of HSm4131. Treated animals detected the adhesive faster compared to the vehicle group (one-way ANOVA $p = 0.07$). More importantly, only animals treated with 0.5 mg/kg of

HSm4131 removed the adhesive on the contralateral side significantly faster than the control group (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test $p < 0.05$) (figure 4E).

Collectively, these results demonstrate that HSm4131 administered at 1 h following stroke at the dose of 0.5 mg/kg confers the best neuroprotection and recovery. Therefore, this dose and timing were used for the following studies.

HSm4131 does not alter physiological parameters

Blood pressure, pH, $paCO_2$, paO_2, and body temperature did not show any significant variation following HSm4131 administration (Table 2). Moreover, no significant difference was found between the treated and the vehicle groups (two-way ANOVA $p > 0.05$) before and after HSm4131 administration.

HSm4131 -Tc^{99m} penetrates the ipsilateral hemisphere

Animals treated intravenously with HSm4131-Tc^{99m} showed a significant increase of radioactivity in the ipsilateral hemisphere between 5 min and 1 h following MCAo (figure 5). Moreover, no significant difference was detected between 1 h and 3 h in the ipsilateral hemisphere.

The radioactivity count was significantly higher in the ipsilateral hemisphere compared to the contralateral hemisphere 1 h following MCAo (two-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey HSD test $p < 0.05$) (figure 5).

HSm4131 restores HS distribution

HS distribution was analyzed 35 days after MCAo through the use of the HS marker, 10E4. In the ipsilateral hemisphere, along the ischemic boundary zone, the tissue displayed a higher cell density and a better matrix structure in animals treated with HSm4131 compared to vehicle animals (figure 6A). The specific staining of HS was confirmed by the use of a condition in which the brain slices were treated by a heparitinase (figure 6B).

HSm4131 improves brain plasticity

HSm4131 enhances angiogenic factor gene expression

The gene expression of the well-known angiogenic factors VEGF-A and Ang-2, also known as neurogenic factors (Marti *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2017, Liu *et al.*, 2009), was analyzed 14 days after MCAo. Both VEGF-A and Ang-2 gene expression increased in the ipsilateral hemisphere in animals treated with HSm4131 compared to those treated with saline ($p < 0.05$ Student-t test) (Figure 7). These results suggest that HSm4131 treatment favors post-ischemic brain plasticity such as angiogenesis and neurogenesis.

HSm4131 enhances post-ischemic angiogenesis

Post-ischemic angiogenesis was quantified 35 days after stroke by counting the RECA-1/Ki-67 double positive cells in the peri-infarct regions (indicated by white arrowheads in figure 8) and expressed as the percentage of Ki-67 positive cells. The number of RECA-1/Ki-67 double positive cells was significantly higher in animals treated with HSm4131 compared to the vehicle group (Student-t test $p<0.05$) (figure 8).

HSm4131 enhances post-ischemic neurogenesis

Post-ischemic neurogenesis was quantified in the ipsilateral hemisphere 35 days after MCAo by quantifying the immature neuronal marker i.e. the DCX labelled area and by counting the mature neurons i.e. BrdU/NeuN double-positive cells. The DCX staining area in the sub-ventricular zone (SVZ) and around the lateral ventricle (LV) increased in animals treated with HSm4131 compared to the vehicle group (Student-t test $p<0.05$) (figure 9A). Similarly, the number of BrdU/NeuN double positive cells (indicated by white arrowheads in figure 9B) in the ipsilateral (ischemic)

hemisphere increased in animals treated with HSm4131 compared to control animals (Student-t test $p < 0.05$) (figure 9B).

HSm4131 does not modify astroglial and immune reactions

The astroglial and the immune reactions evaluated in the ipsilateral hemisphere by GFAP and CD68 immunostaining showed no significant difference between vehicle and treated animals at 35 days post-MCAo (supplementary data S1 & S2).

Discussion

In the present study, we have shown that a cellular matrix-based therapy using HSm4131 has a great long-lasting potential for neuroprotection. This was attested by improved functional recovery and brain plasticity (neurogenesis, angiogenesis).

Intravenous administration of HSm4131, 1 h after brain ischemia, has shown the best effect with a significant reduction of the infarct volume 2 days after brain ischemia. More importantly, this effect was accompanied by an improved sensorimotor recovery, highlighting the clinical translational potential of HSm4131 treatment.

The persistence of the dose response effect of HSm4131 has shown that administration of a dose of 0.5 mg/kg confers the best long lasting neuroprotective effect both at the acute (2 days) and the chronic (14 days) stages after brain ischemia compared to the vehicle group. These results underline the long lasting neuroprotective effects of HSm4131, which were accompanied with a significant functional recovery. These results are also in accordance with those of Hill et *al.*, (2012) (Hill et *al.*, 2012) showing that a treatment with an HSPG improves functional recovery in neurological scoring and cylinder test after a 1 h MCAo in the rat. The fewer benefits obtained with a higher dose of HSm4131 could be explained by the wash-out theory; HSm4131 in excess may carry out the HBGFs and may be eliminated by the blood circulation, resulting in a narrow bell shaped dose-dependent effect, as previously described for an analogue compound of HSm4131 that was used to stimulate muscle regeneration after total crushing (Meddahi et *al.*, 2002).

To elucidate the mechanism underlying HSm4131-induced neuroprotection, regeneration and functional recovery after ischemic stroke, we analyzed the biodistribution of HSm4131 in the affected hemisphere, and its actions on animals' physiological parameters as well as on some

indices of brain plasticity, namely angiogenesis and neurogenesis. The neuroprotection elicited by HSm4131 does not seem to be produced by a modification of the physiological parameters following its intravenous administration. Moreover, the analysis of HSm4131-Tc^{99m} biodistribution showed a significant and persistent penetration of the compound into the ipsilateral (ischemic) hemisphere following MCAo. These data clearly indicate that the compound is able to reach the lesion site. We then hypothesized that the beneficial effect of HSm4131 could also be explained by a direct interaction between the compound and the lesion tissue environment.

To understand how HSm4131 provides beneficial effects after ischemic stroke, we first analyzed HS distribution. HS labeling showed improved matrix organization and higher cell density in the ischemic hemisphere when animals were treated with HSm4131. This result supports the precedent findings showing that HSm restores or protects the ECM, and protects growth factors leading to tissue regeneration and cell proliferation (Barritault et *al.*, 2017).

Since HSm have been shown to protect some well-known angiogenic and neurogenic factors such as VEGF (Rouet et *al.*, 2005), we investigated the effects of HSm4131 on post-ischemic brain reactions including angiogenesis and neurogenesis. First, we showed that HSm4131 enhanced VEGF-A and Ang-2 gene expression 14 days after MCAo. These results support a beneficial effect of HSm4131 on post-ischemic brain plasticity, in particular cellular reactions such as angiogenesis and neurogenesis. Indeed, both VEGF-A and Ang-2 have been previously shown to enhance angiogenesis and neurogenesis (Marti et *al.*, 2000, Li et *al.*, 2017, Liu et *al.*, 2009). Furthermore, and based on immunohistochemistry results, we showed that HSm4131 enhanced angiogenesis in the peri-infarct region. These results are in accordance with the study of Desgranges and colleagues (Desgranges et *al.*, 1997) which reported that an analogue HS improves neovascularization. Similarly, Rouet and co-workers (Rouet et *al.*, 2005) have showed that an HS mimetic analogue

modulates angiogenesis by interacting with VEGF. Therefore, one might speculate that HSm4131's effects on post-ischemic angiogenesis may be mediated through the potentiation of VEGF in the ischemic brain hemisphere.

Likewise, post-ischemic neurogenesis was found to be higher in the animal group treated with the HSm4131 compared to the control group. Neurogenesis after ischemic stroke has been largely reported (Lindvall et *al.,* 2015, Wiltrout et *al.,* 2007). However, the exact role of the ECM in this phenomenon is still not well known. HSPGs are thought to affect proliferation, differentiation and maintenance of the stem-cell niches (Bishop et *al.*, 2007) which could explain the significant increase of immature and mature neuron generation in animals treated with HSm4131. Moreover, this effect may be achieved by the interaction of HSm4131 with FGF2 and/or VEGF, two well-known growth factors involved in post-ischemic neurogenesis(Lanfranconi et *al.*, 2011, Wang et *al.*, 2007). Indeed, VEGF has a key role in post-stroke recovery since it has been shown to promote in vivo angiogenesis and neurogenesis following ischemic stroke (Marti et *al.*, 2000).

Since HSm4131 demonstrates a great neuroprotection and improvement of functional recovery at both the acute and chronic stages, we hypothesized that HSm4131 could also act on inflammation and gliosis after stroke. Immune and glial reactions were therefore evaluated by CD68 and GFAP staining, respectively. Regarding the inflammatory reaction, multiple reports focusing on innate immune inflammation have shown its role in tissue repair and remodeling during the chronic stage following stroke onset (Kim et *al.*, 2014). Thus, suppressing inflammation and microglial activation stimulate the accumulation of new neurons in the injured striatum following ischemic stroke in adult rats (Hoehn *et al.*, 2005). HSPGs and an HS mimetic analogue of HSm4131 in particular were shown to bind chemokines of the TGF-β family (Barritault et *al.*, 2017), which are known to play an important role as anti-inflammatory chemokines by suppressing macrophage

cytokine production (Zhang et *al.,* 2007). However, other studies showed that inflammation could participate in the regeneration of the central nervous system by clearing cell debris and secreting multiple growth factors (Aurora et *al.,* 2014). Our analysis focused on the CD68+ cell population and showed no significant difference between the HSm4131-treated and the vehicle-treated groups. Considering the complexity of the inflammatory reaction, HSm4131 could have specific effects on distinct cells (neutrophils, macrophages/microglia or leukocytes) or could even influence cell phenotype and behavior. Indeed, in a periodontitis model, an HS mimetic analogue of HSm4131 has been shown to reduce inflammation by decreasing polymorphonuclear leukocyte migration to the lesion site (Escartin et *al.,* 2003). Moreover, following stroke, brain tissue inflammation reaches its greatest level within the first 24 hours following brain ischemia (Shichita et *al.,* 2012), while in our study we evaluated inflammation 35 days following stroke onset, which could have been too late to detect a difference in inflammation. Therefore, further investigation needs to be conducted at earlier time points after stroke onset.

Regarding the glial reaction, quantification of GFAP staining showed no significant difference between HSm4131-treated and the vehicle-treated groups. Many studies have reported that gliosis decrease is associated with the reduction of the infarct size (Barreto et *al.,* 2011). Despite this association, the exact role of astrocytes during stroke is still under major investigation. The role of the glial scar in the central nervous system after injury is still largely debated. Indeed, previous studies have shown that glial scars serve to prevent the overwhelming inflammatory response, limit cellular degeneration and prevent healthy tissue from uncontrolled tissue damage (Faulkner et *al.,* 2004, Bush et *al.,* 1999). Accordingly, other studies have shown that after the attenuation of TGF-β1 and TGF-β2 using antibodies, glial scarring is reduced (Moon et *al.,* 2001). In another study, FGF-2 showed to have a role in the induction of the glial scar by interacting with IFN-γ (Silver et

al., 2004). As HSPGs have been shown to bind and regulate FGF-2 and TGF-β activity (Barbosa et *al.*, 2005), we can hypothesize that HSm4131 protects growth factors in the injured tissue and promotes their activity.

Conclusion

This study explores for the first time, in a rat model, the potential of HSm4131 as a novel protective and regenerative therapy for ischemic stroke. HSm4131 shows a promising beneficial effect after stroke that is quite encouraging, given the current lack of treatment after the narrow therapeutic window of t-PA. HSm have proven their efficacy in tissue repair in many pathologies, including tendon injuries, ischemic muscles, periodontitis, inflammatory diseases, and bone defects (Barritault et *al.*, 2017). More importantly, HSm have proven their regenerative effects in more than 20000 patients with chronic skin wounds and 5000 patients with corneal ulcers without any reported side effects (Barritault et *al.*, 2017). The improvement of functional recovery and brain plasticity in the acute and chronic stages of stroke reveals HSm4131 as a promising treatment for ischemic stroke.

Abbreviations

Ang-2: angiopoetin-2 ; GFAP : astrocytic marker glial fibrillary acidic protein ; BSA : bovine serum albumin ; DCX : doublecortin ; ECM : extracellular matrix ; FGF-2 : fibroblast growth factor-2 ; HSPGs : heparan sulfate proteoglycans ; HSm : Heparan Sulfates mimetics ; HBGFs : heparin binding growth factors ; LV : lateral ventricle ; MRI : magnetic resonance imaging ; MCA : middle cerebral artery ; NEX : number of experiments ; MCAo : occlusion of the middle cerebral artery ; PFA : paraformaldehyde ; PBS : phosphate-buffered saline ; RARE : rapid acquisition with refocused echoes ; RECA-1 : rat endothelial cell antigen marker ; rt-PA : recombinant tissue plasminogen activator ; HSm : RGTA® ; HSm4131 : RGTA-4131® ; SVZ : sub-ventricular zone ; Tc^{99m} : technetium-99m ; TGF-β : transforming growth factor ; VEGF : vascular endothelial growth factor

Competing interests

This study was in part supported by OTR3 S.A.S, the manufacturer of RGTA® (HSm4131). Authors F.Sineriz, E.Pascolo-Rebouillat, are employees of OTR3, D.Barritault is a significant OTR3 shareholder and RGTA patents inventor and co-owner. All provided technical guidance for these experiments as members of the project steering committee. However, the funding body had no influence on data acquisition, evaluation or presentation.

References

ABOU-CHEBL ALEX 2011 Intra-Arterial Therapy for Acute Ischemic Stroke. Neurotherapeutics, 8 (3): 400–413. doi: 10.1007/s13311-011-0059-8.

ALEXANDRU RĂZVAN, ELENA OANA TERECOASĂ, OVIDIU ALEXANDRU BĂJENARU, *et al.*,2017 Etiologic Classification of Ischemic Stroke: Where Do We Stand? Clinical Neurology and Neurosurgery, 159: 93–106. doi: 10.1016/j.clineuro.2017.05.019.

ASTRUP J, B K SIESJÖ and L SYMON1981Thresholds in Cerebral Ischemia - the Ischemic Penumbra. Stroke, 12 (6), 1 de November: 723–5. doi: 10.1161/01.STR.12.6.723.

AURORA ARIN B and ERIC N OLSON 2014 Immune Modulation of Stem Cells and Regeneration. Cell Stem Cell, 15 (1), 3 de July: 14–25. doi: 10.1016/j.stem.2014.06.009.

BARBOSA ISABELLE, CHRISTOPHE MORIN, STEPHANIE GARCIA, *et al.*,2005 A Synthetic Glycosaminoglycan Mimetic (RGTA) Modifies Natural Glycosaminoglycan Species during Myogenesis. Journal of Cell Science, 118 (1), 1 de January: 253–264. doi: 10.1242/jcs.01607.

BARRETO GEORGE, ROBIN E WHITE, YIBING OUYANG, *et al.*,2011 Astrocytes: Targets for Neuroprotection in Stroke. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry, 11 (2), 1 de June: 164–73. <

BARRETT KEVIN M. and JAMES F. MESCHIA2014 Genetic Stroke Syndromes. CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology, 20 (2): 399–411. doi: 10.1212/01.CON.0000446109.20539.68.

BARRITAULT DENIS, PASCAL DESGRANGES, ANNE MEDDAHI-PELLE, *et al.*,2017 RGTA®-Based Matrix Therapy – A New Branch of Regenerative Medicine in Locomotion. Joint Bone Spine, 84 (3): 283–292. doi: 10.1016/j.jbspin.2016.06.012.

BECK FRANÇOIS and JEAN BAPTISTE RICHARD2014 La Consommation D'alcool En France. Presse Medicale, 43 (10): 1067–1079. doi: 10.1016/j.lpm.2014.02.027.

BEDERSON, J B, L H PITTS, M TSUJI, *et al.*,1986 Rat Middle Cerebral Artery Occlusion: Evaluation of the Model and Development of a Neurologic Examination. Stroke, 17 (3): 472–6.

BEJOT YANNICK, EMMANUEL TOUZE, AGNES JACQUIN, *et al.*,2009 Épidémiologie Des Accidents Vasculaires Cérébraux Définition Des AVC. Medecine/Sciences, 25 (25): 8–9. doi: 10.1051/medsci/2009258-9727.

BISHOP JOSEPH R., MANUELA SCHUKSZ and JEFFREY D. ESKO 2007 Heparan Sulphate Proteoglycans Fine-Tune Mammalian Physiology. Nature, 446 (7139), 26 de April: 1030–1037. doi: 10.1038/nature05817.

BLANQUAERT F, D BARRITAULT and J P CARUELLE 1999 Effects of Heparan-like Polymers Associated with Growth Factors on Osteoblast Proliferation and Phenotype Expression. Journal of Biomedical Materials Research, 44 (1), January: 63–72.

BONAFE A., V. COSTALAT, P. MACHI, *et al.*,2013 Place de La Thrombectomie Mécanique Dans Le Traitement de L'accident Vasculaire Cérébral À La Phase Aiguë. Pratique Neurologique - FMC, 4 (2): 93–96. doi: 10.1016/j.praneu.2013.01.005.

BOUET VALENTINE, MICHEL BOULOUARD, JEROME TOUTAIN, *et al.*,2009 The Adhesive Removal Test: A Sensitive Method to Assess Sensorimotor Deficits in Mice. Nature Protocols, 4 (10), January: 1560–1564. doi: 10.1038/nprot.2009.125.

BUSH TOBY G, NARMAN PUVANACHANDRA, CATHERINE H HORNER, *et al.*,1999 Leukocyte Infiltration, Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice. Neuron, 23 (2): 297–308. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80781-3.

CARDOSO FILIPA LOURENÇO, DORA BRITES and MARIA ALEXANDRA BRITO 2010 Looking at the Blood-Brain Barrier: Molecular Anatomy and Possible Investigation Approaches. Brain Research Reviews, 64 (2): 328–363. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.05.003.

CHATURVEDI MAYANK and LESZEK KACZMAREK2014 MMP-9 Inhibition: A Therapeutic Strategy in Ischemic Stroke. Molecular Neurobiology, 49 (1): 563–573. doi: 10.1007/s12035-013-8538-z.

CHUQUET JULIEN, KARIM BENCHENANE, JÉRÔME TOUTAIN, *et al.*,2002 Selective Blockade of Endothelin-B Receptors Exacerbates Ischemic Brain Damage in the Rat. Stroke, 33 (12), 31 de October: 3019–3025. doi: 10.1161/01.STR.0000039401.48915.9F.

CRUZ, YOLANDA KARLA A. CANTÚ-SALDAÑA and ANTONIO IBARRA 2016 Immune System Involvement in the Degeneration, Neuroprotection, and Restoration after Stroke, in Ischemic Stroke - Updates. InTech. doi: 10.5772/64318.

DEB, PRABAL SUASH SHARMA and K. M. HASSAN 2010 Pathophysiologic Mechanisms of Acute Ischemic Stroke: An Overview with Emphasis on Therapeutic Significance beyond Thrombolysis. Pathophysiology, 17 (3): 197–218. doi: 10.1016/j.pathophys.2009.12.001.

DEMAERSCHALK BART M2016 Alteplase Treatment in Acute Stroke: Incorporating Food and Drug Administration Prescribing Information into Existing Acute Stroke Management Guide. Current Atherosclerosis Reports. Current Atherosclerosis Reports. doi: 10.1007/s11883-016-0602-5.

DEQUATRE-PONCHELLE N., H. TOUZANI, A. BANH, *et al.*,2014 Rate of Intravenous Thrombolysis for Acute Ischaemic Stroke in the North-of-France Region and Evolution over Time. Journal of Neurology, 261 (7): 1320–1328. doi: 10.1007/s00415-014-7344-5.

DESGRANGES P, D BARRITAULT, J P CARUELLE, *et al.*,1997 Transmural Endothelialization of Vascular Prostheses Is Regulated in Vitro by Fibroblast Growth Factor 2 and Heparan-like Molecule. The International ournal of Artificial Organs, 20 (10), October: 589–98.

DIRNAGL ULRICH and MATTHIAS ENDRES2014 Found in Translation: Preclinical Stroke Research Predicts Human Pathophysiology, Clinical Phenotypes, and Therapeutic Outcomes. Stroke, 45 (5): 1510–1518. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.004075.

DIRNAGL ULRICH, COSTANTINO IADECOLA and MICHAEL A. MOSKOWITZ1999 Pathobiology of Ischaemic Stroke: An Integrated View. Trends in Neurosciences, 22 (9), 1 de September: 391–397. doi: 10.1016/S0166-2236(99)01401-0.

DORRANCE ANNE M.2016 The Effects of Hypertension and Stroke on the Cerebral Vasculature, in Hypertension and Stroke. Springer International Publishing. Cham: 81–108. doi: 10.1007/978-3-319-29152-9_5.

ELDRUP, NIKOLAJ, MARIE-LOUISE MOES GRØNHOLDT, HENRIK SILLESEN, *et al.*,2006 Elevated Matrix Metalloproteinase-9 Associated with Stroke or Cardiovascular Death in Patients with Carotid Stenosis. Circulation, 114 (17): 1847–54. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.593483.

ESCARTIN Q, C LALLAM-LAROYE, B BAROUKH, *et al.*,2003 A New Approach to Treat Tissue Destruction in Periodontitis with Chemically Modified Dextran Polymers. The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 17 (6): 644–651. doi: 10.1096/fj.02-0708com.

FAULKNER J. R., JULIA E HERRMANN, MICHAEL J WOO, *et al.*,2004 Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. Journal of Neuroscience, 24 (9), 3 de March: 2143–2155. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004.

FRERET THOMAS, SAMUEL VALABLE, LAURENT CHAZALVIEL, *et al.*,2006 Delayed Administration of Deferoxamine Reduces Brain Damage and Promotes Functional Recovery after Transient Focal Cerebral Ischemia in the Rat. European Journal of Neuroscience, 23 (7), April: 1757–1765. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04699.x.

FUKUDA S., CATHERINE A FINI, TAKUMA MABUCHI, *et al.*,2004 Focal Cerebral Ischemia Induces Active Proteases That Degrade Microvascular Matrix. Stroke, 35 (4), 26 de February: 998–1004. doi: 10.1161/01.STR.0000119383.76447.05.

GERRIETS T., E STOLZ, M WALBERER, *et al.*,2004 Noninvasive Quantification of Brain Edema and the Space-Occupying Effect in Rat Stroke Models Using Magnetic Resonance Imaging. Stroke, 35 (2), 1 de February: 566–571. doi: 10.1161/01.STR.0000113692.38574.57.

GHUMAN HARMANVIR, ANDRE R MASSENSINI, JULIA DONNELLY, *et al.*,2016 Biomaterials ECM Hydrogel for the Treatment of Stroke : Characterization of the Host Cell in Fi Ltrate. Biomaterials, 91: 166–181. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.03.014.

GIDDAY JEFFREY M, YVAN G GASCHE, JEAN-C COPIN, *et al.*,2005 Leukocyte-Derived Matrix Metalloproteinase-9 Mediates Blood-Brain Barrier Breakdown and Is Proinflammatory after Transient Focal Cerebral Ischemia, 63110: 558–568. doi: 10.1152/ajpheart.01275.2004.

GUSTAVSSON, ANDERS, MIKAEL SVENSSON, FRANK JACOBI, *et al.*,2011 Cost of Disorders of the Brain in Europe 2010. European Neuropsychopharmacology, 21 (10): 718–779. doi: 10.1016/j.euroneuro.2011.08.008.

HAELEWYN B, T FRERET, E PACARY, *et al.*,2007 Long-Term Evaluation of Sensorimotor and Mnesic Behaviour Following Striatal NMDA-Induced Unilateral Excitotoxic Lesion in the Mouse. Behavioural Brain Research, 178 (2), 28 de March: 235–243. doi: 10.1016/j.bbr.2006.12.023.

HERMANN DIRK MATTHIAS and ANIL ZECHARIAH2009 Implications of Vascular Endothelial Growth Factor for Postischemic Neurovascular Remodeling. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 29 (10): 1620–1643. doi: 10.1038/jcbfm.2009.100.

HILL JUSTIN J, KUNLIN JIN, XIAO OU MAO, *et al.*,2012 Intracerebral Chondroitinase ABC and Heparan Sulfate Proteoglycan Glypican Improve Outcome from Chronic Stroke in Rats. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109 (23), 5 de June: 9155–60. doi: 10.1073/pnas.1205697109.

HOEHN, BENJAMIN D., THEO D. PALMER and GARY K. STEINBERG2005 Neurogenesis in Rats After Focal Cerebral Ischemia Is Enhanced by Indomethacin. Stroke, 36 (12).

HU XIAOMING, PEIYING LI, YANLING GUO, *et al.*,2012 Microglia/macrophage Polarization Dynamics Reveal Novel Mechanism of Injury Expansion after Focal Cerebral Ischemia. Stroke, 43 (11): 3063–3070. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.659656.

HUANG JUDY, URVASHI M. UPADHYAY and RAFAEL J. TAMARGO2006 Inflammation in Stroke and Focal Cerebral Ischemia. Surgical Neurology, 66 (3): 232–245. doi: 10.1016/j.surneu.2005.12.028.

IKEDA YASUNORI, SAÏD CHAREF, MOHAND OUIDIR OUIDJA, *et al.*,2011Synthesis and Biological Activities of a Library of Glycosaminoglycans Mimetic Oligosaccharides. Biomaterials, 32 (3): 769–776. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.09.043.

IZZARD ASHLEY S., SARAH HORTON, EGIDIUS H. HEERKENS, *et al.*,2006 Middle Cerebral Artery Structure and Distensibility during Developing and Established Phases of Hypertension in the Spontaneously Hypertensive Rat. Journal of Hypertension, 24 (5): 875–880. doi: 10.1097/01.hjh.0000222757.54111.06.

JUNG SIMON, MARC GILGEN, JOHANNES SLOTBOOM, *et al.*,2013 Factors That Determine Penumbral Tissue Loss in Acute Ischaemic Stroke. Brain : A Journal of Neurology, 136 (Pt 12): 3554–3560. doi: 10.1093/brain/awt246.

KAKUDA WATARU, MAARTEN G LANSBERG, VINCENT N THIJS, *et al.*,2008 Optimal Definition for PWI/DWI Mismatch in Acute Ischemic Stroke Patients. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 28 (5), 9 de May: 887–891. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600604.

KATO GREGORY J., FRÉDÉRIC B. PIEL, CLARICE D. REID, *et al.*,2018 Sickle Cell Disease. Nature Reviews Disease Primers, 4: 1–22. doi: 10.1038/nrdp.2018.10.

KAUR JASPREET, ZONGHANG ZHAO, GARY M. KLEIN, *et al.*,2004 The Neurotoxicity of Tissue Plasminogen Activator? Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 24 (9): 945–963. doi: 10.1097/01.WCB.0000137868.50767.E8.

KHATRI POOJA, LAWRENCE R. WECHSLER and JOSEPH P. BRODERICK 2007 Intracranial Hemorrhage Associated with Revascularization Therapies. Stroke, 38 (2): 431–440. doi: 10.1161/01.STR.0000254524.23708.c9.

KIM J Y, M KAWABORI and M A YENARI2014 Innate Inflammatory Responses in Stroke: Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. Current Medicinal Chemistry, 21 (18): 2076–97.

KIM JEONG-HYEON, HYEONG-MIN BYUN, EUI-CHEOL CHUNG, *et al.*,2013 Loss of Integrity: Impairment of the Blood-Brain Barrier in Heavy Metal-Associated Ischemic Stroke. Toxicological Research, 29 (3), September: 157–64. doi: 10.5487/TR.2013.29.3.157.

KUMAR SUDHIR 2016 Hypertension and Ischemic Stroke. Hypertension Journal, 2 (March): 39–43. doi: 10.5005/jp-journals-10043-0028.

LANFRANCONI S, F LOCATELLI, S CORTI, *et al.*,2011 Growth Factors in Ischemic Stroke. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 15 (8), August: 1645–87. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00987.x.

LEE M., J. L. SAVER, B. CHANG, *et al.*,2011 Presence of Baseline Prehypertension and Risk of Incident Stroke: A Meta-Analysis. Neurology, 77 (14): 1330–1337. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182315234.

LEE SEUNG-HOON2017 Pathophysiology of Ischemic Stroke, in Acute Ischemic Stroke. Springer Singapore. Singapore: 3–25. doi: 10.1007/978-981-10-0965-5_1.

LI CE, BEI ZHANG, YULIAN ZHU, *et al.*,2017 Post-Stroke Constraint-Induced Movement Therapy Increases Functional Recovery, Angiogenesis, and Neurogenesis with Enhanced Expression of HIF-1α and VEGF. Current Neurovascular Research, 14 (4): 368–377. doi: 10.2174/1567202614666171128120558.

LI JIMEI, JIN-PING LI, XIAO ZHANG, *et al.*,2011 Expression of Heparanase in Vascular Cells and Astrocytes of the Mouse Brain after Focal Cerebral Ischemia. Brain Research, 1433: 137–144. doi: 10.1016/j.brainres.2011.11.032.

LINDVALL OLLE and ZAAL KOKAIA2015 Neurogenesis Following Stroke Affecting the Adult Brain. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 7 (11), 2 de November: a019034. doi: 10.1101/cshperspect.a019034.

LIU XIAN SHUANG, MICHAEL CHOPP, RUI LAN ZHANG, *et al.*,2009 Angiopoietin 2 Mediates the Differentiation and Migration of Neural Progenitor Cells in the Subventricular Zone after Stroke. The Journal of Biological Chemistry, 284 (34), 21 de August: 22680–9. doi: 10.1074/jbc.M109.006551.

LONGA E Z, P R WEINSTEIN, S CARLSON, *et al.*,1989 Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion without Craniectomy in Rats. Stroke, 20 (1), 1 de January: 84–91. doi: 10.1161/01.str.20.1.84.

MACRAE IM 2011 Preclinical Stroke Research - Advantages and Disadvantages of the Most Common Rodent Models of Focal Ischaemia. British Journal of Pharmacology, 164 (4): 1062–1078. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01398.x.

MANGONI MONICA, XIAOLI YUE, CHRISTOPHE MORIN, *et al.*,2009 Differential Effect Triggered by a Heparan Mimetic of the RGTA Family Preventing Oral Mucositis without Tumor Protection. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 74 (4), 15 de July: 1242–50. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.03.006.

MARTI H J, M BERNAUDIN, A BELLAIL, *et al.*,2000 Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression Precedes Neovascularization after Cerebral Ischemia. The American Journal of Pathology, 156 (3), March: 965–76. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64964-4.

MATTA JOANE, MARIE ZINS, ANNE LAURE FERAL-PIERSSENS, *et al.*,2016 Prévalence Du Surpoids, de L'obésité et Des Facteurs de Risque Cardio-Métaboliques Dans La Cohorte Constances. Beh (35–36): 640–646.

MEDDAHI ANNE, FRANÇOISE BREE, DULCE PAPY-GARCIA, *et al.*,2002 Pharmacological Studies of RGTA 11 , a Heparan Sulfate Mimetic Polymer, Efficient on Muscle Regeneration. Journal of Biomedical Materials Research, 62 (4), 15 de December: 525–531. doi: 10.1002/jbm.10283.

MERGENTHALER PHILIPP, UTE LINDAUER, GERALD A DIENEL, *et al.*,2013 Sugar for the Brain: The Role of Glucose in Physiological and Pathological Brain Function. Trends in Neurosciences, 36 (10), October: 587–97. doi: 10.1016/j.tins.2013.07.001.

MONTANER JOAN J ALVAREZ-SABÍN, CARLOS MOLINA, *et al.*,2001 Matrix Metalloproteinase Expression after Human Cardioembolic Stroke: Temporal Profile and Relation to Neurological Impairment. Stroke, 32 (8): 1759–66. doi: 10.1161/01.STR.32.8.1759.

MOON L. D. F. and J. W. FAWCETT 2001 Reduction in CNS Scar Formation without Concomitant Increase in Axon Regeneration Following Treatment of Adult Rat Brain with a Combination of Antibodies to TGF? 1 and ? 2. European Journal of Neuroscience, 14 (10), 1 de November: 1667–1677. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01795.x.

MORGAN, MICHAEL J and ZHENG-GANG LIU2011 Crosstalk of Reactive Oxygen Species and NF-κB Signaling. Cell Research, 21 (1): 103–115. doi: 10.1038/cr.2010.178.

MOZAFFARIAN, DARIUSH, EMELIA J. BENJAMIN, ALAN S. GO, *et al.*,2015 Heart Disease and Stroke Statistics???2016 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation. doi: 10.1161/CIR.0000000000000350.

MUKHERJEE DEBRAJ and CHIRAG G. PATIL2011 Epidemiology and the Global Burden of Stroke. World Neurosurgery, 76 (6): S85–S90. doi: 10.1016/j.wneu.2011.07.023.

O'DONNELL MARTIN2016 44 – Cryptogenic Stroke, in Stroke: 707–715. doi: 10.1016/B978-0-323-29544-4.00044-X.

OPPENHEIM, C and JF MEDER2002 IRM de Diffusion Du Parenchyme Cérébral Ischémique Aigu. Correspondance En Neurologie Vacsulaire, II (figure 1): 82–86.

PATEL ANITA R., RODNEY RITZEL, LOUISE D. MCCULLOUGH, *et al.*,2013 Microglia and Ischemic Stroke: A Double-Edged Sword. International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology, 5 (2): 73–90.

PATRA JAYADEEP, BENJAMIN TAYLOR, HYACINTH IRVING, *et al.*,2010 Alcohol Consumption and the Risk of Morbidity and Mortality for Different Stroke Types - A Systematic Review and Meta-Analysis. BMC Public Health, 10. doi: 10.1186/1471-2458-10-258.

DE PERETTI, CHRISTINE, OLIVIER GRIMAUD, PHILIPPE TUPPIN, *et al.*,2012 Prévalence Des Accidents Vasculaires Cérébraux et de Leurs Séquelles et Impact Sur Les Activités de La Vie Quotidienne : Apports Des Enquêtes Déclaratives Handicap-Santé-Ménages et Handicap-Santé-Institution 2008-2009. Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire: 2008–2009.

PERRINE ANNE-LAURE 2018 L'ypertension artérielle en France: prévalence, traitement et contrôle en 2015 et évolutions depuis 2006 / hypertension in France: prevalence, treatment and management in 2015 and temporal trends since 2006: 170–179.

PFEFFERKORN THOMAS and GARY A. ROSENBERG 2003 Closure of the Blood-Brain Barrier by Matrix Metalloproteinase Inhibition Reduces rtPA-Mediated Mortality in Cerebral Ischemia with Delayed Reperfusion. Stroke, 34 (8): 2025–2030. doi: 10.1161/01.STR.0000083051.93319.28.

PIRES PAULO W., SAAVIA S. GIRGLA, JONATHON L. MCCLAIN, *et al.*,2013 Improvement in Middle Cerebral Artery Structure and Endothelial Function in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats after Macrophage Depletion. Microcirculation, 20 (7), October: 650–661. doi: 10.1111/micc.12064.

QUITTET MARIE-SOPHIE, OMAR TOUZANI, LAURENCE SINDJI, *et al.*,2015 Effects of Mesenchymal Stem Cell Therapy, in Association with Pharmacologically Active Microcarriers Releasing VEGF, in an Ischaemic Stroke Model in the Rat. Acta Biomaterialia, 15 (January), March: 77–88. doi: 10.1016/j.actbio.2014.12.017.

RAMA RAMON and JULIO CESAR GARCIA RODRIGUEZ2012 Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke, in Acute Ischemic Stroke. InTech. doi: 10.5772/28300.

RAMOS-CABRER PEDRO, FRANCISCO CAMPOS, TOMÁS SOBRINO, *et al.*,2011 Targeting the Ischemic Penumbra. Stroke, 42 (SUPPL. 1). doi: 10.1161/STROKEAHA.110.596684.

ROLDAN-VALADEZ E and M LOPEZ-MEJIA2014 Current Concepts on Magnetic Resonance Imaging (MRI) Perfusion-Diffusion Assessment in Acute Ischaemic Stroke: A Review & an Update for the Clinicians. Indian Journal of Medical Research, 140 (DEC): 717–728.

ROUET, VINCENT, YAMINA HAMMA-KOURBALI, EMMANUEL PETIT, *et al.*,2005 A Synthetic Glycosaminoglycan Mimetic Binds Vascular Endothelial Growth Factor and Modulates Angiogenesis. Journal of Biological Chemistry, 280 (38): 32792–32800. doi: 10.1074/jbc.M504492200.

DE RYCK M, J VAN REEMPTS, M BORGERS, *et al.*,1989 Photochemical Stroke Model: Flunarizine Prevents Sensorimotor Deficits after Neocortical Infarcts in Rats. Stroke, 20 (10), October: 1383–90.

SCHALLERT T, M UPCHURCH, N LOBAUGH, *et al.*,1982 Tactile Extinction: Distinguishing between Sensorimotor and Motor Asymmetries in Rats with Unilateral Nigrostriatal Damage. Pharmacology, Biochemistry, and Behavior, 16 (3), March: 455–62.

SCHALLERT T, M T WOODLEE, S M FLEMING, *et al.*,2002 Disentangling Multiple Types of Recovery from Brain Injury Recovery of Function. Pharmacology of Cerebral Ischemia (January 2002): 201–216. <http://homepage.psy.utexas.edu/HomePage/Group/SchallertLAB/Marburg.pdf>.

SCHIFFRIN ERNESTO L. 2004 Remodeling of Resistance Arteries in Essential Hypertension and Effects of Antihypertensive Treatment. American Journal of Hypertension, 17 (12): 1192–1200. doi: 10.1016/j.amjhyper.2004.05.023.

SCHNEIDER CAROLINE A, WAYNE S RASBAND and KEVIN W ELICEIRI2012 NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. Nature Methods, 9 (7), July: 671–5.

SHICHITA TAKASHI, RYOTA SAKAGUCHI, MAYU SUZUKI, *et al.*,2012 Post-Ischemic Inflammation in the Brain. Frontiers in Immunology, 3, 31 de May: 132. doi: 10.3389/fimmu.2012.00132.

SILVER JERRY and JARED H. MILLER2004 Regeneration beyond the Glial Scar. Nature Reviews Neuroscience, 5 (2), 1 de February: 146–156. doi: 10.1038/nrn1326.

SMITH PATRICE D, VIVIEN J COULSON-THOMAS, SIMONA FOSCARIN, *et al.*,2015 " GAG-Ing with the Neuron " : The Role of Glycosaminoglycan Patterning in the Central Nervous System. Experimental Neurology, 274: 100–114. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.08.004.

SUK S.-H., R. L. SACCO, B. BODEN-ALBALA, *et al.*,2003 Abdominal Obesity and Risk of Ischemic Stroke: The Northern Manhattan Stroke Study. Stroke, 34 (7): 1586–1592. doi: 10.1161/01.STR.0000075294.98582.2F.

TAKAHASHI HISAAKI, HIROAKI MATSUMOTO, YOSHIAKI KUMON, *et al.*,2007 Expression of Heparanase in Nestin-Positive Reactive Astrocytes in Ischemic Lesions of Rat Brain after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion. Neuroscience Letters, 417 (3), 7 de May: 250–254. doi: 10.1016/j.neulet.2007.02.075.

TONG MIAO, MARIKEN M. ZBINDEN, INEKE J. M. HEKKING, *et al.*,2008 RGTA OTR 4120, a Heparan Sulfate Proteoglycan Mimetic, Increases Wound Breaking Strength and Vasodilatory Capability in Healing Rat Full-Thickness Excisional Wounds. Wound Repair and Regeneration, 16 (2), March: 294–299. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00368.x.

TOYODA K., M. IDA and K. FUKUDA 2001 Fluid-Attenuated Inversion Recovery Intraarterial Signal: An Early Sign of Hyperacute Cerebral Ischemia. American Journal of Neuroradiology, 22 (6): 1021–1029.

TURNER RENÉE J and FRANK R SHARP 2016 Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. Frontiers in Cellular Neuroscience, 10: 56. doi: 10.3389/fncel.2016.00056.

WANG Q, X TANG and M YENARI 2007 The Inflammatory Response in Stroke. Journal of Neuroimmunology, 184 (1–2), March: 53–68. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.11.014.

WANG YAOMING, KUNLIN JIN, XIAO OU MAO, *et al.*,2007 VEGF-Overexpressing Transgenic Mice Show Enhanced Post-Ischemic Neurogenesis and Neuromigration. Journal of Neuroscience Research, 85 (4), March: 740–747. doi: 10.1002/jnr.21169.

WILTROUT CHARLES, BRADLEY LANG, YIPING YAN, *et al.*,2007 Repairing Brain after Stroke: A Review on Post-Ischemic Neurogenesis. Neurochemistry International, 50 (7): 1028–1041. doi: 10.1016/j.neuint.2007.04.011.

WON SOONMI, JIN HWAN LEE, BUSHRA WALI, *et al.*,2013 Progesterone Attenuates Hemorrhagic Transformation after Delayed tPA Treatment in an Experimental Model of Stroke in Rats : Involvement of the VEGF – MMP Pathway, 34 (1): 72–80. doi: 10.1038/jcbfm.2013.163.

XING C., X. WANG, C. CHENG, *et al.*,2014 Neuronal Production of Lipocalin-2 as a Help-Me Signal for Glial Activation. Stroke, 45 (7), 1 de July: 2085–2092. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.005733.

XING CHANGHONG, KEN ARAI, ENG H LO, *et al.*,2012 Pathophysiologic Cascades in Ischemic Stroke. International Journal of Stroke : Official Journal of the International Stroke Society, 7 (5), July: 378–85. doi: 10.1111/j.1747-4949.2012.00839.x.

YANG YI and GARY A. ROSENBERG 2015 Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Targets for Stroke. Brain Research, 1623: 30–38. doi: 10.1016/j.brainres.2015.04.024.

ZHANG JUN-MING and JIANXIONG AN 2007 Cytokines, Inflammation, and Pain. International Anesthesiology Clinics, 45 (2): 27–37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e.

ZHAO X., H. WANG, G. SUN, *et al.*,2015 Neuronal Interleukin-4 as a Modulator of Microglial Pathways and Ischemic Brain Damage. Journal of Neuroscience, 35 (32): 11281–11291. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1685-15.2015.

Figures

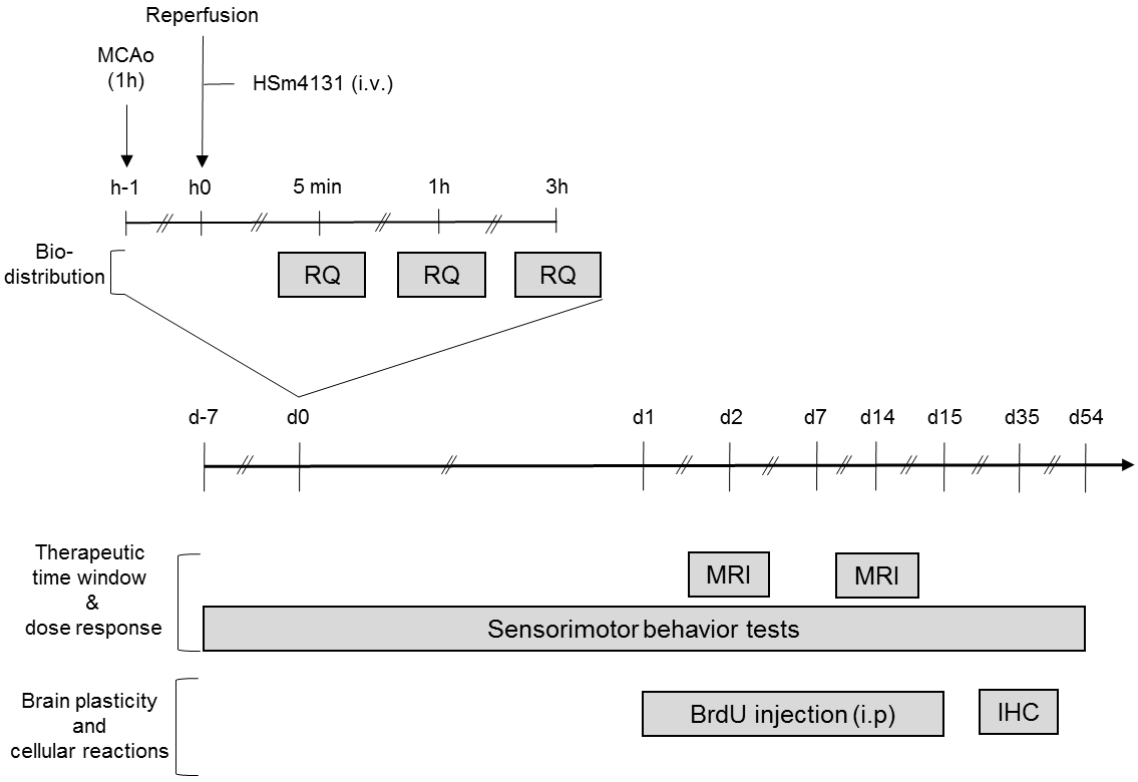


Figure 1: Experimental protocols.

Experimental protocols designed to evaluate: the therapeutic time window and the dose response of HSm4131, the brain plasticity induced by HSm4131; and the biodistribution of HSm4131-Tc^{99m} after MCAo. BrdU: Bromodeoxyuridine; IHC: Immunohistochemistry; MCAo: middle cerebral artery occlusion; MRI: magnetic resonance imaging; RQ: radioactivity quantification.

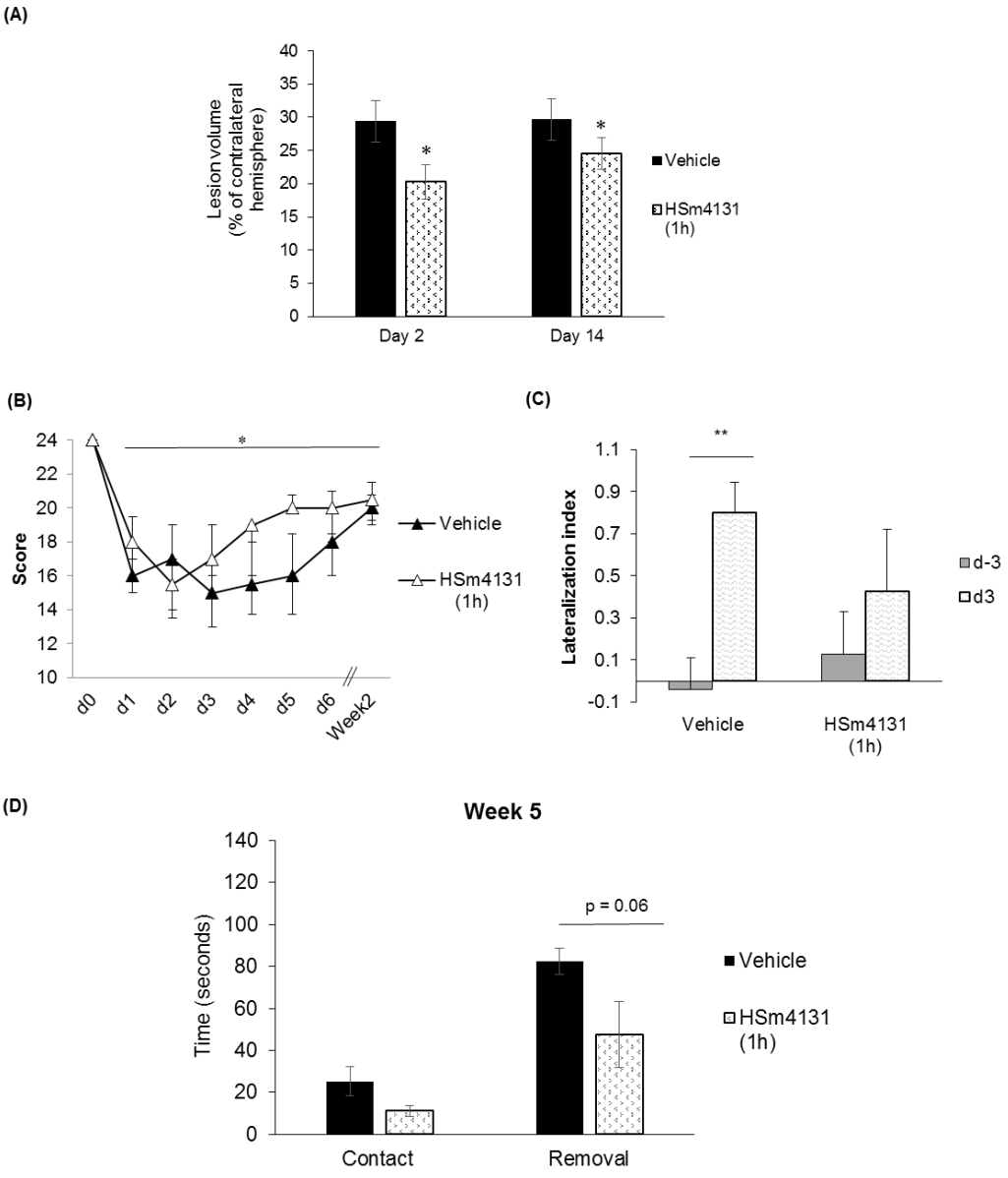


Figure 2: Effect of HSm4131 on lesion volume and functional recovery.

(A) HSm4131-induced neuroprotective effects after MCAo (Vehicle n= 12, HSm4131 n= 7) at days 2 and 14 post-MCAo (*Student-t test, $p< 0.05$). **(B)** Limb placing test (median ± IQR) (n= 8-10). * Week 2 different from d2 in the HSm4131-treated group (one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey HSD test $p< 0.05$). **(C)** Lateralization index (LI) evaluated in the corner test at day -3 and day +3 (mean ± SEM) (**one-way ANOVA followed by a post-hoc Dunnett's test $p< 0.01$). **(D)** Assessment of motor coordination with the adhesive removal test at fifth week post-MCAo. The treated group removed the adhesive on the contralateral forepaw faster than the control group (mean ± SEM) (vehicle n=8, HSm4131 n=8) (Student-t test).

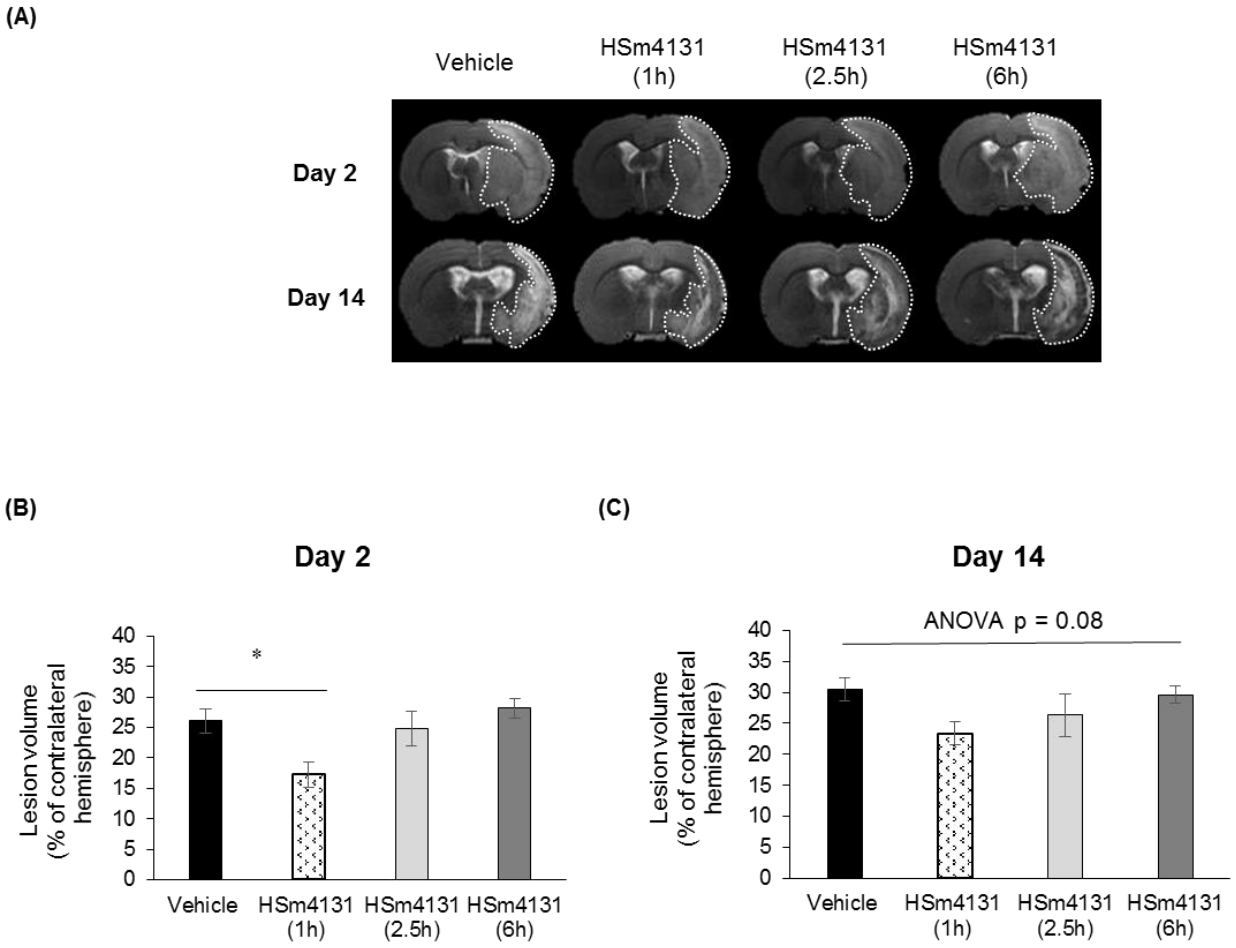


Figure 3: Therapeutic time window of HSm4131.

(A) Representative MRI at day 2 and 14 post-MCAo. **(B)** Infarct volumes at day 2 and **(C)** day 14 (mean ± SEM) (vehicle n=21, 1 h n=15, 2.5 h n=10, and 6 h n=6). *Statistically different from other groups (one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey HSD test $p < 0.05$).

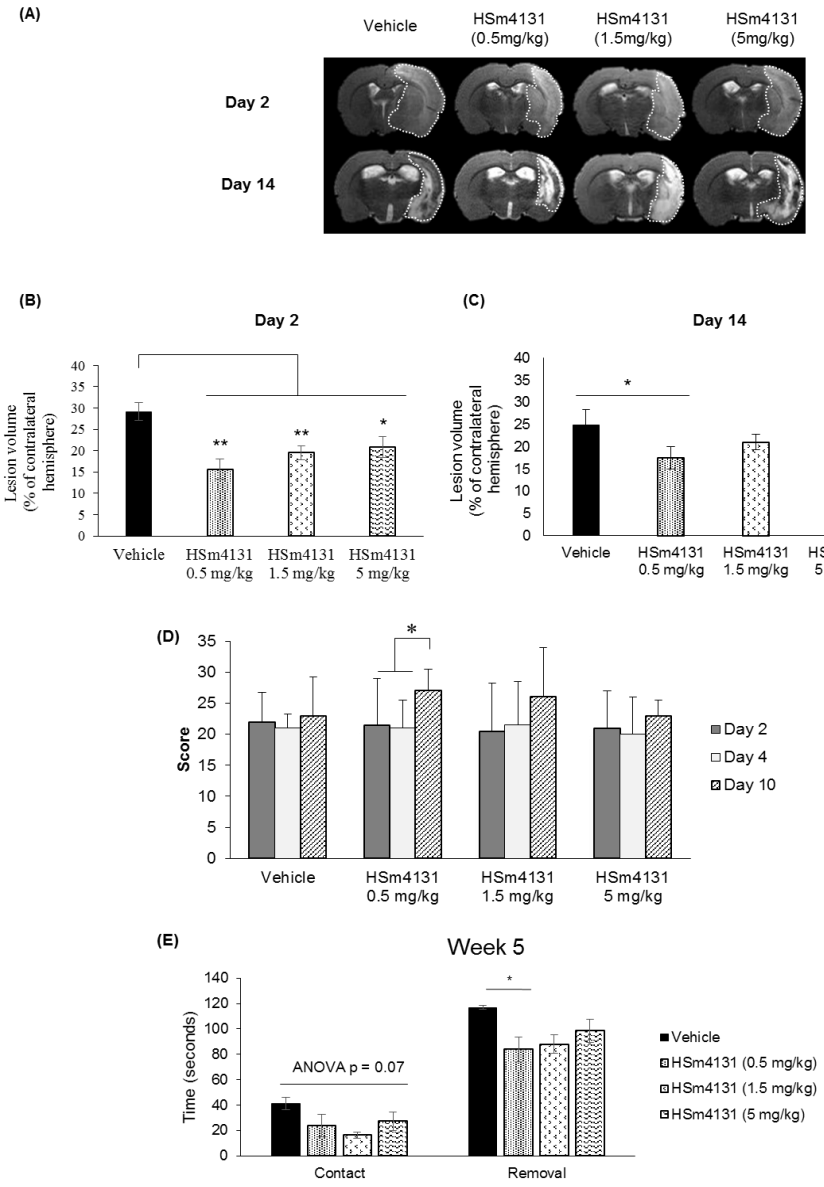


Figure 4: Dose response study of the HSm4131 effect after MCAo.

(A) Representative MRI of the lesions at days 2 and 14 (n= 7-10) **(B)** Infarct volumes at day 2 (n=7-10) (Mean ± SEM). One-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey HSD test ** p< 0.01, * p< 0.05). **(C)** Infarct volumes at day 14 (n= 7-10) (Mean ± SEM) (*one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey HSD test p< 0.05). **(D)** Evolution of the neurological score. The maximal score for normal responses is 28; (n= 7-10). (Median ± IQR) (*one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey HSD test p<0.05). **(E)** Adhesive removal test at the fifth week post MCAo. The times to detect (contact) and to remove (removal) the adhesive were measured in seconds for the contralateral side. (Mean ± SEM) (n= 7-10). *p<0.05, **p< 0.01 statistically different from other groups (one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey HSD test).

		Pre MCAo	1 h MCAo	Post MCAo
Mean arterial pressure (mmHg)	Vehicle	87 ± 6	81 ± 5	74 ± 4
	HSm4131	91 ± 4	81 ± 4	73 ± 2
Heart rate (bpm)	Vehicle	361 ± 21	366 ± 21	372± 19
	HSm4131	407 ± 9	405 ± 17	407 ± 21
pH	Vehicle	7.43 ± 0.04	7.40 ± 0.03	7.39 ± 0.04
	HSm4131	7.50 ± 0.03	7.44 ± 0.02	7.43 ± 0.01
paCO2 (mmHg)	Vehicle	40.9 ± 3.0	42.9 ± 5.1	44.8 ± 6.3
	HSm4131	36.1 ± 1.9	42.2 ± 2.9	42.5 ± 2.8
paO2 (mmHg)	Vehicle	151.8 ± 17.5	144.6 ± 17.5	135.3 ± 17.2
	HSm4131	149.8 ± 16.1	132.2 ± 10.6	120.0 ± 8.4
Hct	Vehicle	44.3 ± 0.7	44.42 ± 0.7	43.2 ± 0.8
	HSm4131	44.5 ± 0.3	43.5 ± 0.2	42.7 ± 0.5
Temperature (C°)	Vehicle	37.6 ± 0.1	38 ± 0.1	37.9 ± 0.1
	HSm4131	37.7 ± 0.1	37.9 ± 0.1	37.9 ± 0.1

Table 2: Assessment of the animals' physiological parameters.

Assessment of blood pressure, pH, CO_2 pressure, O_2 pressure, and body temperature before, during, and after MCAo (Mean ± SEM) (vehicle n=6, HSm4131 n=4).

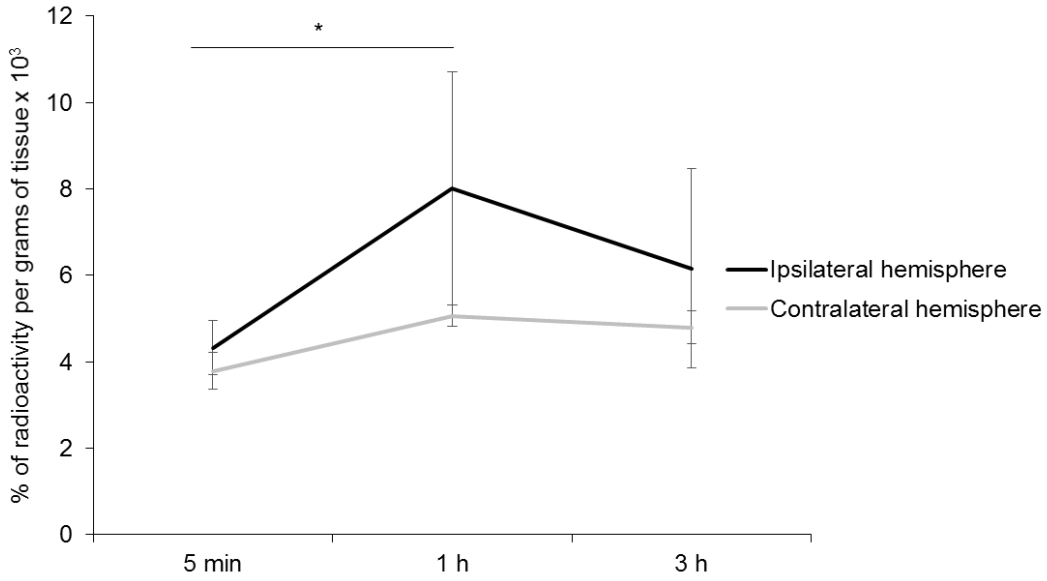


Figure 5: HSm4131-Tc^{99m} biodistribution in ipsilateral and contralateral hemispheres.

Percentage of Hsm4131-Tc^{99m} biodistribution radioactivity per gram of tissue in the ipsilateral and the contralateral hemispheres. Radioactivity of HSm4131 -Tc^{99m} in the brain tissue was quantified at different time points: 5 min (n=7), 1 h (n=8), and 3 h (n=6) after MCAo (Mean ± SEM). * 1h in the ipsilateral hemisphere different from 5min in the ipsilateral hemisphere, and from 1h in the contralateral hemisphere. (Two-way ANOVA (hemisphere p=0.06; time p=0.01; hemisphere * time p=0.04) followed by a post-hoc Tukey HSD test).

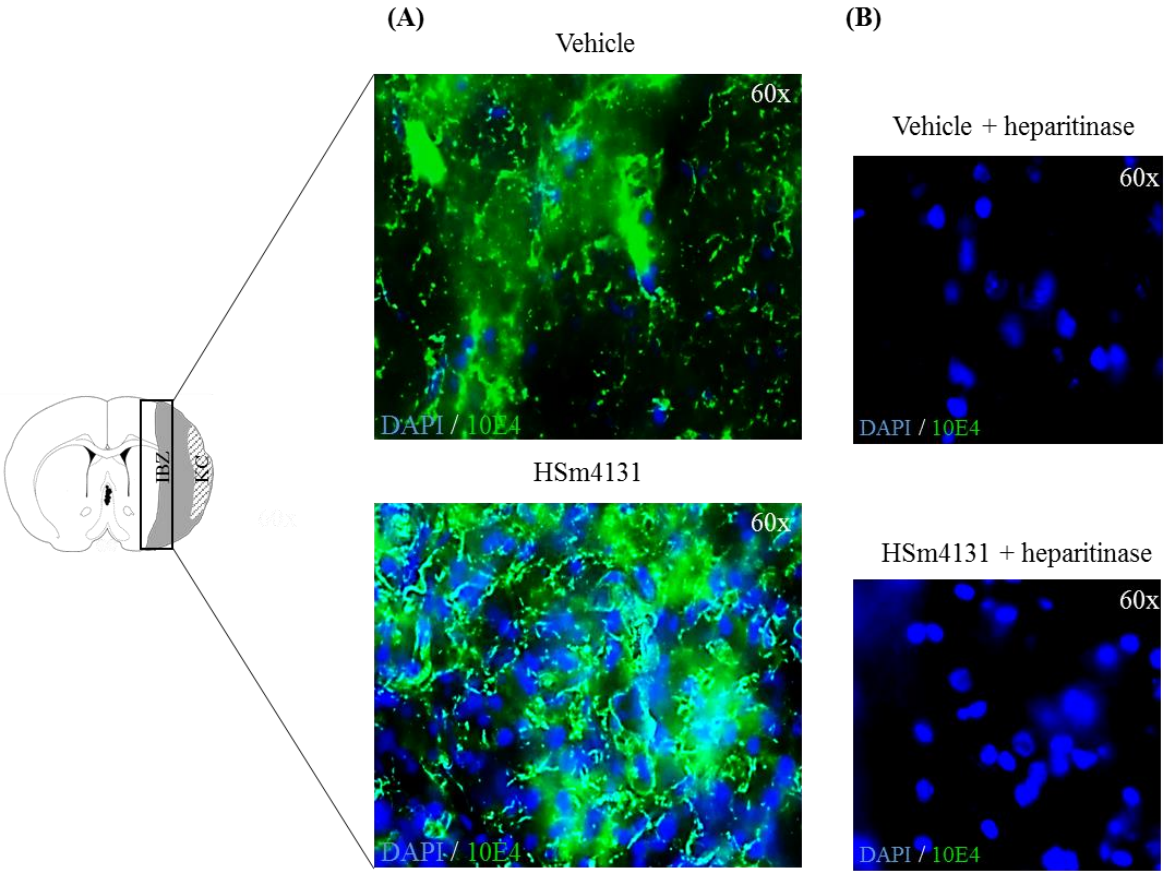


Figure 6: Post-ischemic HS distribution analysis.

(A) Representative images of HS distribution in the ipsilateral hemisphere, in the vehicle and HSm4131-treated groups (vehicle n=9, HSm4131 n=6). **(B)** Representative slices illustrating the complete disappearance of the green staining following the treatment with a heparitinase

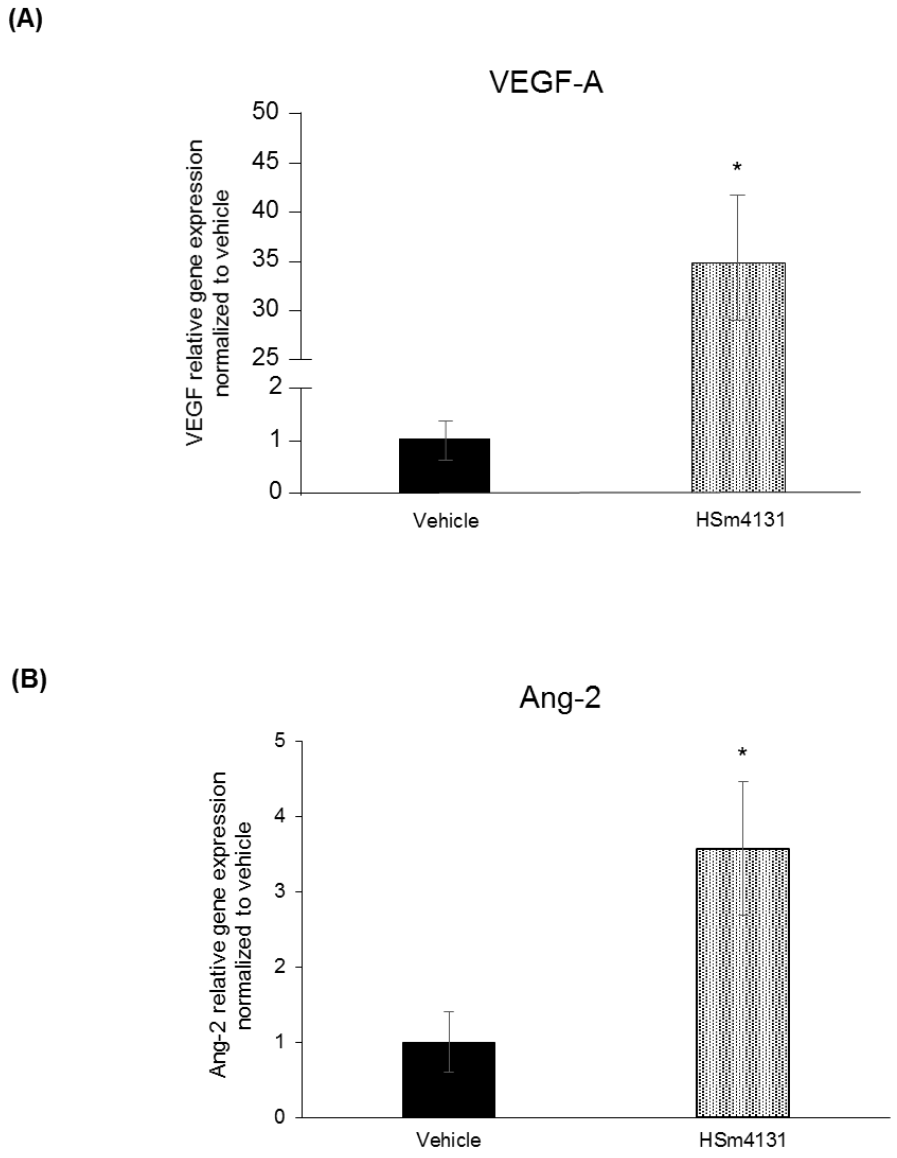


Figure 7: Effect of HSm4131 on gene expression of angiogenic factors.

(A) VEGF-A and **(B)** Ang-2 gene expression at day 14 after MCAo in the ipsilateral hemisphere. Results are expressed as relative gene expression to the cyclophilin-A housekeeping gene (mean ± SEM) (Vehicle n=3, HSm4131 n=3) (*Student t-test $p<0.05$)

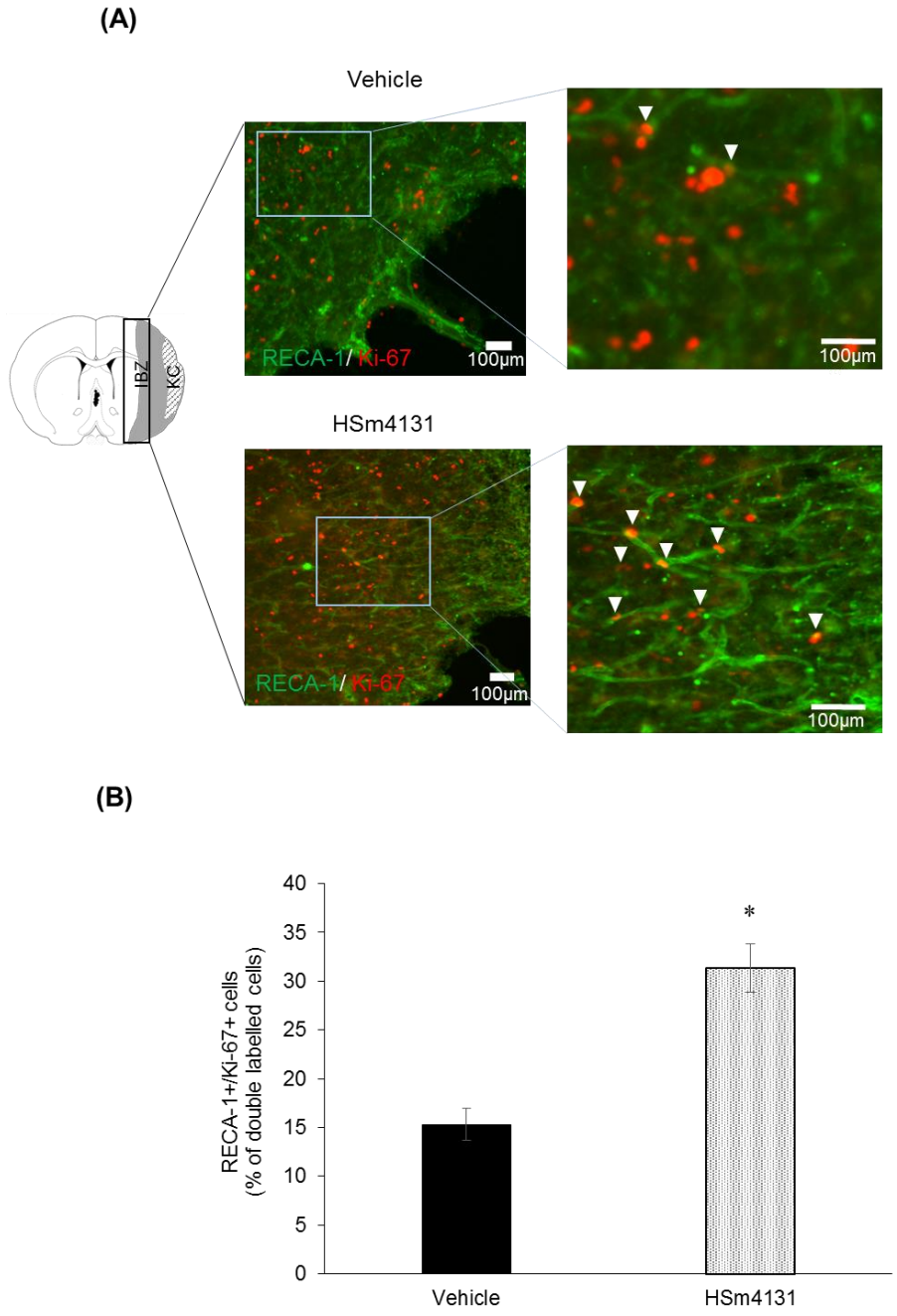
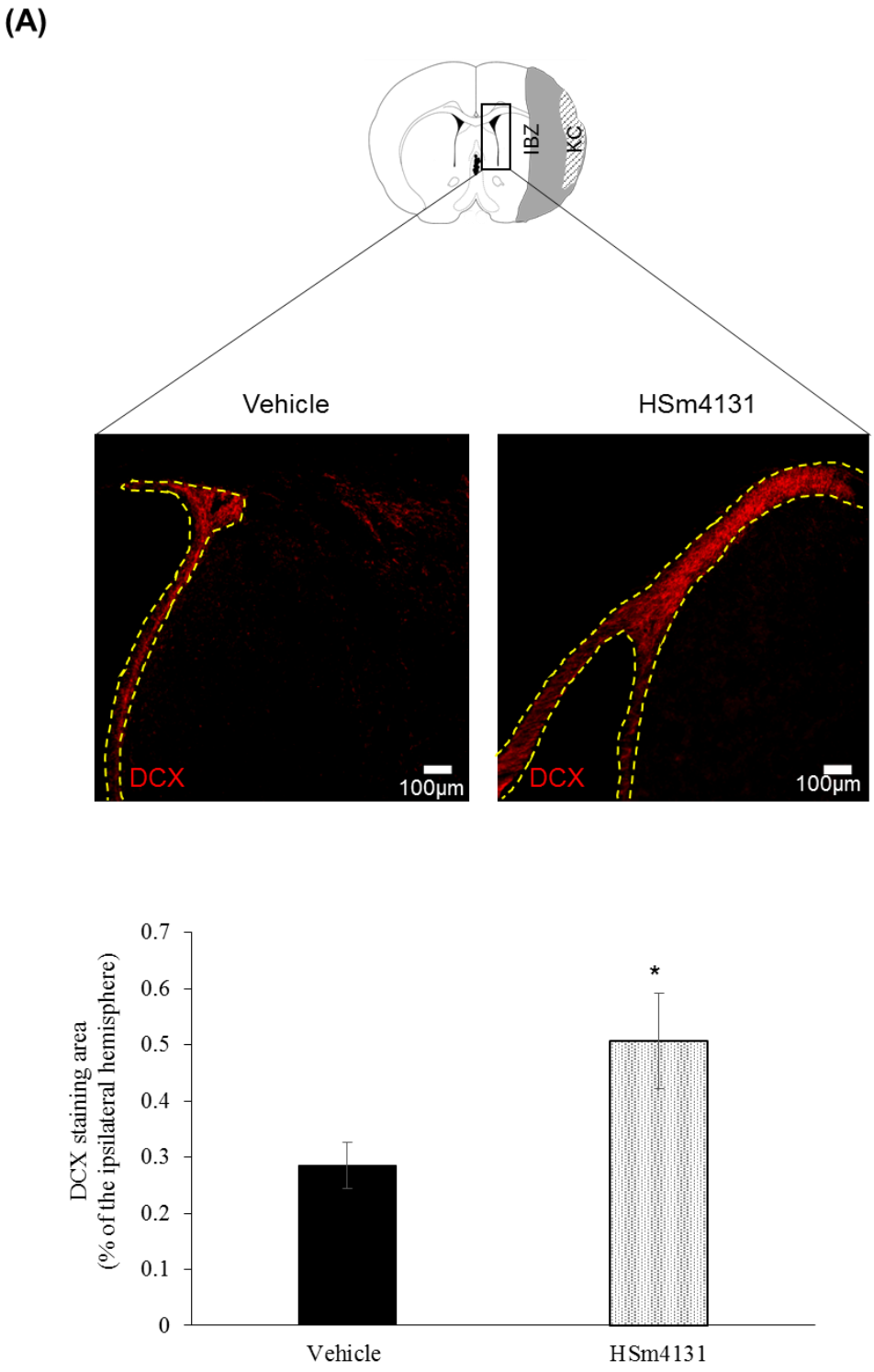


Figure 8: Analysis of post-ischemic angiogenesis.

(A) Representative images of RECA-1^{+}/Ki-67^{+} cells marked by white arrowheads and **(B)** the number of RECA-1^{+}/Ki-67^{+} cells expressed as the percentage of Ki-67^{+} cells in the peri-infarct area (mean ± SEM). (Vehicle n=4, HSm4131 n=4). * Student-t test $p<0.05$. KC: Kystic cavity; IBZ: Infarct boundary zone.


(A)
IBZ
KC
Vehicle
HSm4131
DCX
100µm
DCX
100µm
DCX staining area
(% of the ipsilateral hemisphere)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
*
Vehicle
HSm4131

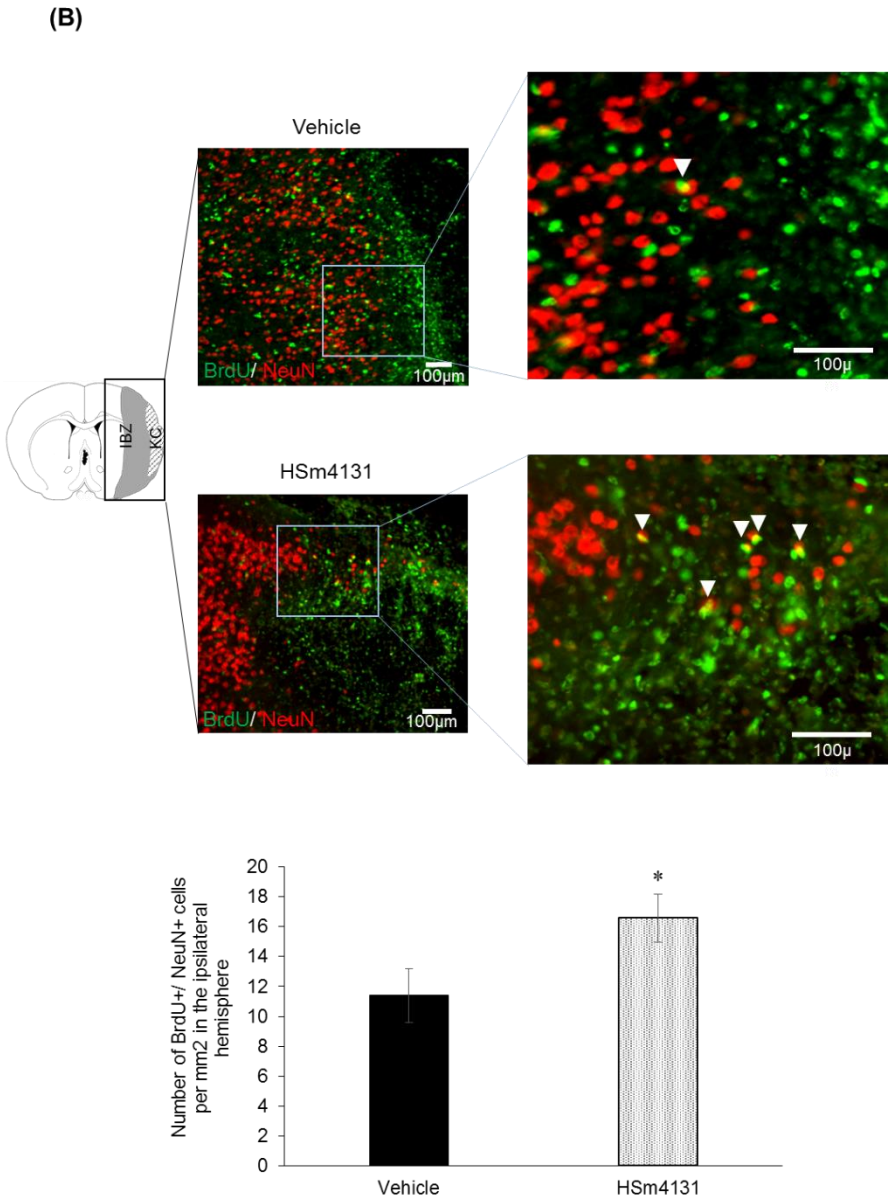


Figure 9: Analysis of post-ischemic neurogenesis.

(A) Representative images of DCX^+ cells and corresponding area of DCX staining measured around the lateral ventricle expressed as a percentage of the ipsilateral hemisphere (mean ± SEM) (vehicle n=9, HSm4131 n=7). **(B)** Representative images of $BrdU^+/NeuN^+$ cells (indicated by white arrow heads) and the number of $BrdU^+/NeuN^+$ cells per mm^2 in the ipsilateral hemisphere (mean ± SEM) (vehicle n=9, HSm4131 n=6). * Student-t test $p<0.05$. KC: Kystic cavity; IBZ: Infarct boundary zone.

Supplementary Data

Gene Full Name	NM accession number	Primers sequences
Cyclophilin-A	Nm_6014064	F=5' TACATGGTCGGGGTGTTGA 3'
	Nm_6014065	R=5' CTAAGGCCAACCGTGAAAAG 3'
VEGF-A	Nm_459576	F=5' CGTCTACCAGCGCAGCTATTG 3'
	Nm_459677	R=5' GCACTCCAGGGCTTCATCATT 3'
Ang-2	Nm_459669	F=5' GCTGAACTGGGAAGGCA 3'
	Nm_459668	R=5' CTGGTTGGCTGATGCTACTGATT 3'

Table 1: **Primers sequencers used for RT-qPCR.**

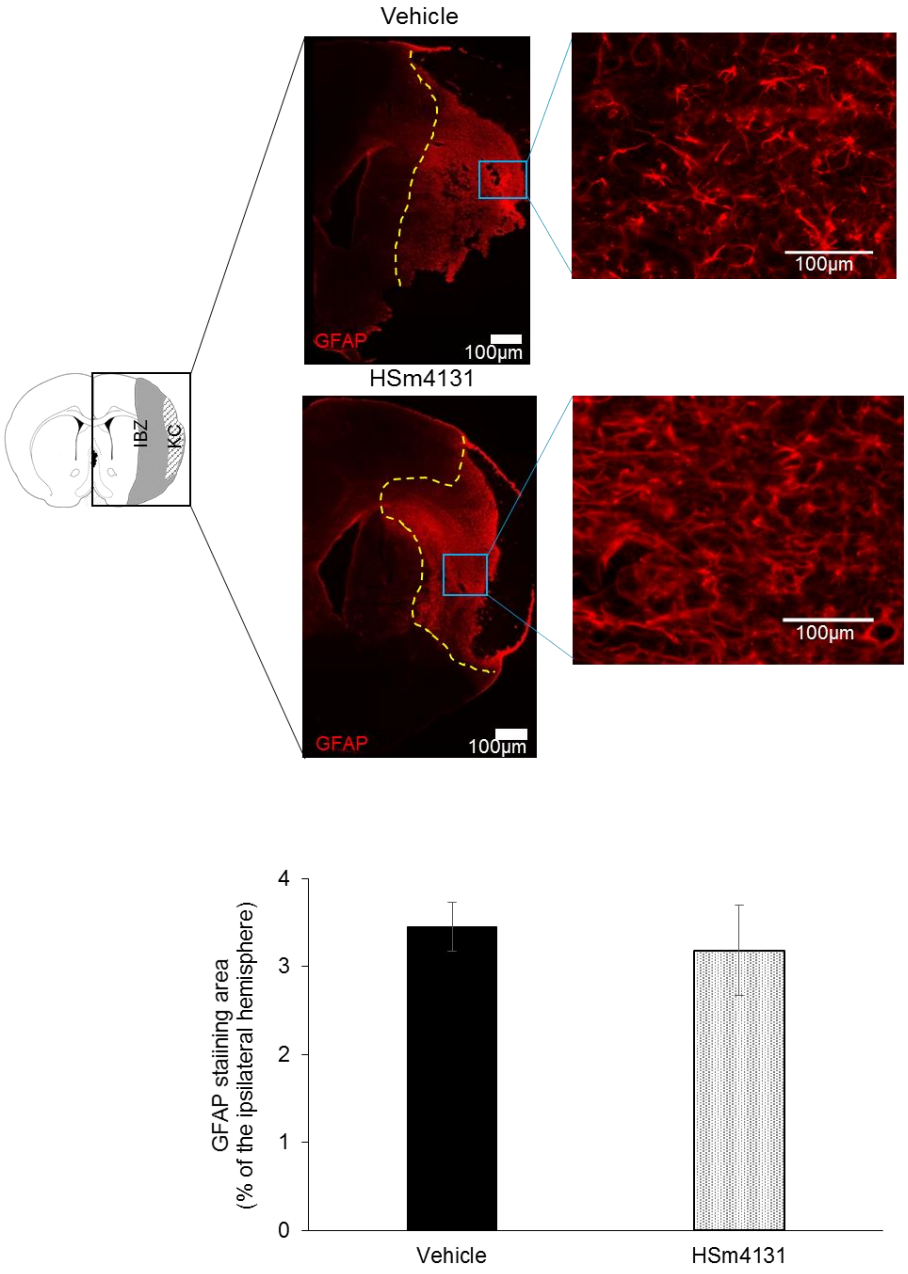


Figure S1: **Immunohistochemistry study of the glial reaction.**

Representative images of GFAP labeled cells and the percentage of the ratio of GFAP staining to the ipsilateral hemisphere (mean ± SEM) (vehicle n=4. HSm4131 n=5). KC: Kystic cavity; IBZ: Infarct boundary zone.

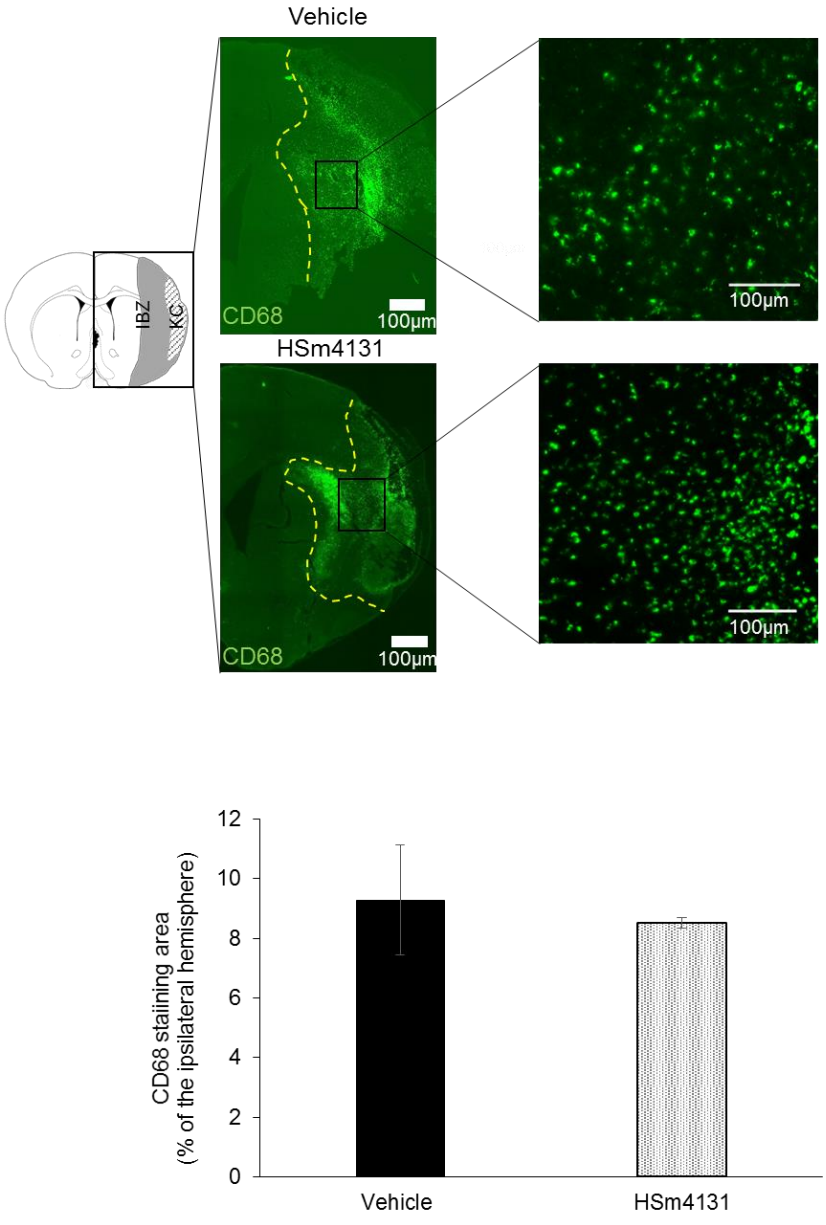


Figure S2: **Immunohistochemistry study of the inflammatory reaction.**

Representative images of CD68 labeled cells and the percentage of the ratio of CD68 staining to the ipsilateral hemisphere (mean ± SEM) (vehicle n=4, HSm4131 n=5). KC: Kystic cavity; IBZ: Infarct boundary zone.

4.1.2 Résultats complémentaires

L'effet du RGTA sur la BHE après une ischémie cérébrale

L'intégrité de la BHE a été étudiée en évaluant sa perméabilité par IRM après une injection d'un agent de contraste, le DOTAREM®, à différents temps : 1 h ; 3 h ; 24 h ; 48 h ; et 7 jours après l'ischémie cérébrale. À une heure et trois heures après l'ischémie cérébrale, aucun signal n'a été détecté dans l'hémisphère ipsilatéral dans le groupe contrôle et traité avec du RGTA. En accord avec l'étude de Garrigue et collègues (Garrigue et *al*., 2016), le signal IRM détecté à 24 h, 48 h, et 7 jours après l'ischémie, montre une perméabilité significativement accrue chez les rats ischémiés 24 h et 48 h post-ischémie. Cette augmentation de perméabilité est significativement réduite à 24 et 48 h post-ischémie dans le groupe des animaux traités avec du RGTA (0.5 mg/kg, administré 1 h après l'ischémie cérébrale) par rapport aux rats du groupe ischémié ayant reçu la solution contrôle (ANOVA suivie d'un test post-hoc HSD de Tukey $p < 0.05$) (Figure 48).

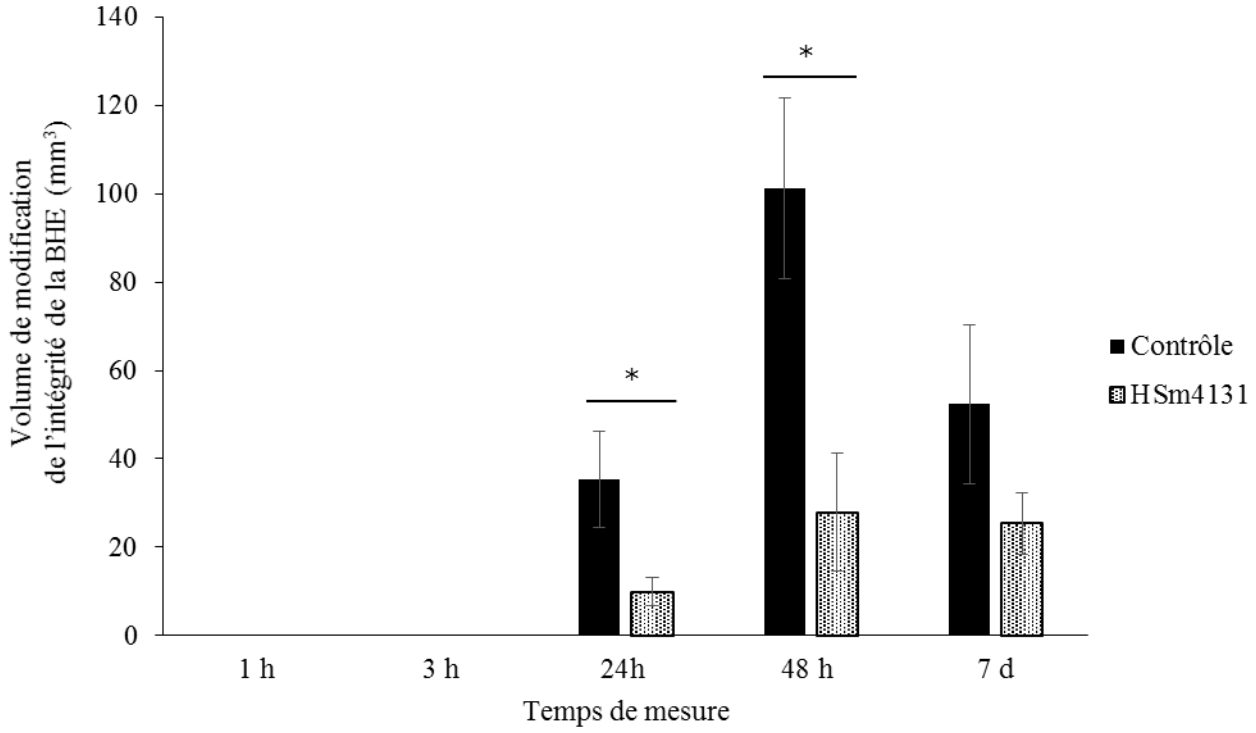


Figure 48 : Étude de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) à différents temps après une ischémie cérébrale focale transitoire chez le rat (modèle OACM 1h).

Évolution de la perméabilité de la BHE dans les régions d'intérêt étudiée par IRM : 1 h, 3 h, 24 h, 48 h, et 7 jours après l'ischémie cérébrale (n= 4-5). * Contrôle vs RGTA à chaque temps, ANOVA suivie d'un test post-hoc de HSD de Tukey $p < 0.05$

4.1.3 Résultats et conclusions de l'étude 1 concernant l'effet du RGTA sur la neuroprotection et la régénération tissulaire après une ischémie cérébrale

Au cours de cette étude nous avons démontré un effet neuroprotecteur durable du RGTA. Nous avons aussi pu déterminer la fenêtre thérapeutique (1 h après l'oCAM) et la dose (0,5 mg/kg) de RGTA offrant la neuroprotection optimale. Cette neuroprotection est accompagnée d'une récupération fonctionnelle persistante des animaux traités, au moins jusqu'à 54 jours après l'oACM.

L'analyse des paramètres physiologiques jusqu'à 1 h après l'injection du RGTA, n'a montré aucune différence entre les animaux traités et contrôle. Ce résultat suggère que l'effet neuroprotecteur du RGTA ne passe pas par la modification de ces paramètres physiologiques. Par ailleurs, l'étude de la biodistribution cérébrale du RGTA réalisée à la suite d'une ischémie cérébrale par le marquage du RGTA au Tc^{99m} a révélé que le composé pénètre l'hémisphère lésé atteignant un pic 1 h après son administration. L'effet neuroprotecteur de l'administration du RGTA pourrait ainsi passer par une interaction directe du composé avec le tissu ischémié.

L'effet neuroprotecteur de l'administration du RGTA pourrait aussi passer par une réduction de la perméabilité de la BHE accrue par l'ischémie cérébrale. Concernant la perméabilité de la BHE, chez les animaux contrôle, l'altération de la BHE croit dès 24 h après l'ischémie cérébrale, atteignant un pic à 48 h. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Garrigue et collègues (2016) qui ont démontré une évolution similaire de l'ouverture de la BHE à 24 h, 48 h et 7 jours après une ischémie cérébrale, avec un maximum de perméabilité à 48 h (Garrigue *et al.* 2016).

En effet, nos résultats montrent que l'augmentation de la perméabilité de la BHE induite par l'ischémie est moindre en présence d'une administration de RGTA en particulier 24 h et 48 h post-occlusion.

Il a été montré que la membrane basale composée de collagène et de protéoglycanes est altérée après une ischémie cérébrale menant à une perméabilité accrue de la BHE (Baeten *et al.* 2011). D'autre part, le RGTA est connu pour protéger et restaurer la MEC (Barritault *et al.* 2017). On peut alors émettre l'hypothèse que le RGTA protège la BHE en protégeant l'intégrité de la lame de basale de cette dernière. Cependant, d'autres études restent à mener pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'effet du RGTA sur la BHE.

L'étude de la distribution des HS par IHC dans la région périlésionnelle, a révélé une meilleure structure matricielle dans l'hémisphère ipsilatéral des animaux traités au RGTA par rapport aux animaux contrôle. Le RGTA par sa fonction de remplacement des HS dégradés dans le site lésionnel a déjà montré son efficacité dans le remodelage et préservation de la structure matricielle dans différents modèles de lésion tissulaire (Barritault *et al.* 2017).

L'analyse de l'expression génique au sein du l'hémisphère ipsilatéral, a montré une augmentation des facteurs angiogéniques et neurogéniques (VEGF-A et Ang-2) à 14 jours après l'oACM, chez les animaux traités au RGTA. De plus, l'analyse immunohistologique a montré que les animaux traités au RGTA présentent à 35 jours après l'ischémie cérébrale, une augmentation de l'angiogenèse dans la région péri-lésionnelle. Parallèlement, une augmentation de la genèse de neurones immatures a dans la ZSV et la ZSG, ainsi que des neurones matures dans l'hémisphère ipsilatéral.

L'étude de la réaction inflammatoire et gliale n'a montré aucun effet du RGTA. Il est a noter que ces analyses ont été effectuées 35 jours après l'ischémie cérébrale. Or, le pic de la réaction inflammatoire a lieu lors des premiers jours suivant l'ischémie (J. Huang *et al.* 2006; Jin *et al.* 2010). Des études complémentaires pourraient être effectuées pour étudier l'inflammation à des temps plus précoces, ou en ciblant des populations cellulaires précises. En effet, dans un modèle

de parodontite, le RGTA a réduit l'inflammation tissulaire en diminuant la migration des granulocytes dans le site lésionnel.

Par ailleurs, des études ont montré que la réaction inflammatoire à la phase chronique de l'AVC participe à la plasticité cérébrale (Jin *et al.* 2010). Ainsi, l'inflammation observée par le marquage des cellules $CD68^+$ à 35 jours après l'ischémie pourrait participer à la plasticité cérébrale.

Concernant la réaction gliale, son rôle lors dans l'ischémie cérébrale n'est pas clairement établi. En effet, des études ont montré que la réaction gliale était délétère pour la plasticité cérébrale, empêchant la repousse axonale (Sofroniew 2009). Cependant, la cicatrice gliale protège le tissu sain contre l'extension de la lésion, la réaction inflammatoire, et prévient la dégénérescence cellulaire.

En conclusion, cette étude réalisée sur un modèle d'ischémie cérébrale focale transitoire chez le rat montre que le RGTA administré au moment de la reperfusion et à une dose de 0,5 mg/kg offre une neuroprotection optimale et persistante du tissu cérébrale parallèlement à une augmentation des processus de plasticité cérébrale que sont l'angiogenèse et la neurogenèse. De façon importante, ces effets s'accompagnent d'une meilleure récupération fonctionnelle et durable des animaux ayant subi une ischémie cérébrale.

4.2 Étude 2 : Effet du RGTA combiné aux cellules souches mésenchymateuses sur la neuroprotection et la régénération tissulaire après une ischémie cérébrale chez des rats normotendus et hypertendus

Devant la fenêtre thérapeutique limitée du rt-PA et l'échec des nombreuses thérapies pharmacologiques visant la neuroprotection après l'AVC, les recherches se sont penchées sur le développement de thérapies cellulaires utilisant notamment les CSMs. Les thérapies cellulaires à base de CSMs, ont montré des résultats prometteurs dans la neuroprotection *in vivo* à la suite d'une ischémie cérébrale. La majorité des études s'accorde à dire que ce résultat passerait essentiellement par la sécrétion de divers facteurs trophiques par les cellules transplantées (H. J. Kim *et al.* 2017) Plusieurs études cliniques ont montré des résultats encourageants avec l'absence de toxicité et de tumorigénicité des CSMs (Bang *et al.* 2005).

Cependant, de nombreuses études restent à mener pour optimiser l'effet des CSMs en déterminant la voie d'administration optimale des cellules, en augmentant leur survie et leur ancrage tissulaire. Cet ancrage cellulaire est permis par la MEC. Elle représente l'échafaudage tissulaire, permettant la communication cellulaire et l'homéostasie tissulaire (Barritault *et al.* 2017). À la suite d'une lésion, induite par une ischémie cérébrale par exemple, la MEC est détruite et sa reconstruction peut-être altérée empêchant la réparation tissulaire endogène (Hill *et al.* 2012). En effet, l'activation de l'héparanase est maintenue jusqu'au 14ème jour après l'ischémie cérébrale (Takahashi *et al.* 2007; J. Li *et al.* 2012). Or, cette dernière dégrade les HS nécessaires à la réparation tissulaire et de la plasticité cérébrale (Hill *et al.* 2012).

Dans l'étude précédente, nous avons démontré que le RGTA favorise une meilleure organisation matricielle à la suite d'une ischémie cérébrale. *In vitro*, le RGTA augmente la survie, la prolifération et la migration des CSMs (Frescaline *et al.* 2012). De plus, le RGTA lie, stocke et

protège plusieurs facteurs de croissance connus pour leurs effets sur la réparation tissulaire, tels le VEGF, le FGF-2 qui sont notamment connus pour être secrétés par les CSMs (Drago *et al.* 2013).

Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse qu'une administration de RGTA pourrait potentialiser l'effet bénéfique des CSMs à la suite d'une ischémie cérébrale et ce, même en présence du facteur de risque et aggravant majeur de l'AVC, qu'est l'hypertension artérielle chronique (figure 49).

Pour cela nous avons évalué les points suivants :

- L'effet de l'association du RGTA, administré (i.v.) au moment de la reperfusion, et des CSMs administrées par voie intracérébrale 24 h après, sur la neuroprotection et la récupération fonctionnelle après ischémie cérébrale.
- L'optimisation de l'effet de la thérapie combinée en associant du RGTA (i.v.), et des CSMs co-administrées en intraveineux avec du RGTA 24 h après, sur la neuroprotection et la récupération fonctionnelle après ischémie cérébrale.
- L'effet de la combinaison optimale (RGTA + CSM) sur la neuroprotection et la récupération fonctionnelle à la suite d'une ischémie cérébrale chez des rats hypertendus (SHR).
- L'effet du RGTA sur l'expression du facteur SDF-1, facteur chimiotattractant largement reconnu pour attirer les CSMs (Drago *et al.* 2013).

Étude 2: l'effet du RGTA combiné aux CSMs sur la neurorprotection, et la récupération fonctionnelle suite à une ischémie cérébrale

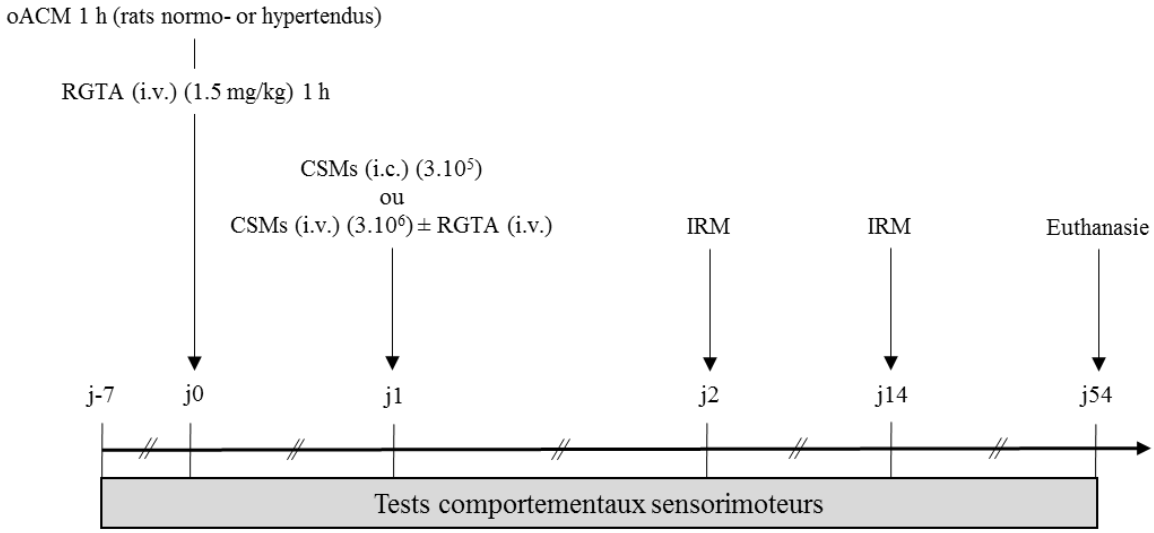


Figure 49 : **Protocole de l'étude 2 : Effet du RGTA associé aux CSMs sur la neuroprotection et la récupération fonctionnelle après une ischémie cérébrale.**

IRM : imagerie par résonnance magnétique, CSMs : cellules souches mésenchymateuses, RGTA : ReGenraTing Agent, IHC : immunohistologie

4.2.1 Article de l'étude 2 concernant l'effet du RGTA combiné aux CSMs sur la neurorprotection, et la récupération fonctionnelle suite à une ischémie cérébrale.

A heparan sulfate mimetic potentiates the beneficial effects of mesenchymal stem cells neuroprotective potential afterfollowing ischemic stroke

Yacine KHELIF[1], Rozenn LEGAL[1*], Jérôme TOUTAIN[1*], , Marie-Sophie QUITTET[1], Carole BRUNAUD[1], Laurent CHAZAVIEL[1], Didier DIVOUX[1], Fernando SINERIZ[2], #…, Emanuelle PASCOLO-REBOUILLAT[2], Denis BARRITAULT[2], Omar TOUZANI[1*], Myriam BERNAUDIN[1*]

[1] Normandie Univ, UNICAEN, CNRS, CEA, ISTCT/CERVOxy group, GIP CYCERON, 14000 Caen, France
[2] Société OTR3, 4 rue Française, 75001 PARIS, France.
* Authors contributed equally to the work

La liste des auteurs n'est pas encore definitive

Corresponding author: bernaudin@cyceron.fr

Key words: Neuroprotection, regeneration, functional recovery, stroke, mesenchymal stem cells, heparan sulfate

Funding:

This work was supported by CNRS, the Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche, the University of Normandy, OTR3 S.A.S, the Conseil Régional de Normandie. The authors wish to also thank the FRC (Fédération de la Recherche pour le Cerveau) and the site smart.servier.fr for their image bank, which was used for the figures illustrations.

Introduction

Stroke is one of the most devastating neurological disease with 56 million of deaths occurring per year worldwide (Mukherjee et *al.,* 2011). Aside from thrombolysis with rt-PA, there are no available pharmacological treatments for ischemic stroke. Due to its narrow therapeutic window (< 4.5 hours), and several side effects and contraindications, only 5% of the patients are treated with rt-PA (Demaerschalk et *al.,* 2016). It is therefore of a high necessity to develop new treatments for ischemic stroke.

The extracellular matrix (ECM) is a complex macromolecules network supporting the surrounding cells, among which are heparan sulfates proteoglycans (HSPGs). HSPGs are known to be involved in tissue homeostasis, the regulation of cell communications in stem cells niches including MSCs' niches (Papy-Garcia et *al.,* 2017).

The ECM degradation following ischemic stroke, leads to HSPGs degradation, preventing the tissue repair and functional recovery. HSPGs are composed of heparan sulfates (HS) i.e disaccharides polymers chains linked to a core protein. To promote the ECM regeneration after a tissue lesion, an HS mimetic (HSm) was designed, named RGTA (ReGeneraTive Agent)-4131 (HSm4131). RGTA are synthetic polymers of disaccharides that act as the endogenous HS. Indeed, just like endogenous HS, RGTA have been proven to bind ECM's proteins, and several growth factors serving as a reservoir and protecting them from proteolysis. Moreover, RGTA are resistant to proteases degradation. Thereby in lesioned tissue, RGTA can restore the ECM architecture, and tissue homeostasis by protecting and regulating the bioavailabity of heparin binding growth factors (HBGF). Such growth factors (VEGF, TGF-β, FGF-2…) are known to be secreted by mesenchymal stem cells (MSCs) (Vizoso et *al.,* 2017).

MSCs are multipotent cells found in nearly all tissues (Hass et *al.*, 2011). These cells are under investigation for their neuroprotection and regeneration potential in ischemic stroke at both preclinical (Zinkova et *al.*, 2007; Kim et *al.*, 2017) and clinical trials (Bang 2016). MSCs secrete neuroprotective factors that play a key role in immunodulation, and brain plasticity after ischemic stroke (Drago et *al.*, 2013). However in a disease such as ischemic stroke, the tissue is in a great inflammatory state where the ECM is degraded which could reduce the MSCs survival and therefore their neuroprotective and/or regenerative potential. Indeed, it has been shown that MSCs survival is limited in the lesioned tissue due to the loss of cell adhesion and the inflammatory environment (Lee et *al.*, 2015). Since HSm has been shown to restore ECM architecture by increasing the bioavailability of growth factors, and MSCs have shown their regenerative potential after stroke mainly by secreting neuroprotective, neurotrophic and regenerative growth factors (Chen et *al.*, 2001) , we hypothesized that HSm4131 could potentiate the beneficial MSCs effects on brain tissue and animals functional recovery after stroke.

The aim of this study was first to investigate whether the HSm4131 could potentiate MSCs effects on neuroprotection and functional recovery in a preclinical model of transient ischemic stroke in normotensive rats. HSm4131 was administered at the time of the reperfusion (1 h after the occlusion), i.e. during the potential therapeutical neuroprotective window and MSCs were administered (intracerebrally (i.c.) or intravenously (i.v.)) 24 h after stroke with or without a second administration of HSm4131. To perceive a potentiated effect, we deliberately used a sub-efficient dose of HSm4131 (1.5 mg/kg, i.v.) previously described by our group to have acute (at day 2 post-ischemia) neuroprotective effects with no sustain effect at day 14 and on functional recovery compared to other doses (Khelif et al 2018). Then our goal was to investigate whether the HSm4131-MSCs co-administration could also have beneficial effects in an ischemic stroke model

that include the major risk factor of stroke, i.e. chronic arterial hypertension (CAH) (Lackland et *al.*, 2015). Moreover CAH is an aggravating risk factor, since patients with hypertension have a greater ischemic lesions (Kumar 2016), effects also observed at the preclinical levels (Letourneur et *al.*, 2011).

Material and methods

Animals

All experimental procedures were approved by the Regional Committee on animal ethics (CENOMEXA 1211-03 and APAFiS#4410), and were performed at the CYCERON platform (Caen, France, agreement number: FA- 118-001) on 300-350g weighing male Sprague Dawley (SD) rats (CERJ, France) or male spontaneous hypertensive rats (SHR) (CURB, France). All experiments and data analysis were performed in a blind and randomized manner according to ARRIVE guidelines.

Induction of brain ischemia

During the surgical procedure, animals' temperature was measured and maintained at 37°C by a rectal probe. Anesthesia was maintained with isoflurane (2-2.5%) in a mixture of 30% of O_2 and 70% of N_2O.

Transient cerebral ischemia was induced by intraluminal occlusion of the middle cerebral artery (MCAo) (Chuquet et *al*., 2002, Quittet et *al*., 2015). Briefly, a nylon filament (0.18 mm diameter) with a distal cylinder (0.39 mm diameter x 3 mm length) (Doccol, Sharon, MA, USA) was introduced into the lumen of the right external carotid, advanced through the internal carotid, and gently pushed up to the origin of the middle cerebral artery (MCA). One hour following the occlusion, rats were reanesthetized and the filament was withdrawn to allow reperfusion. A 20 µg/kg analgesic buprenorphine treatment (buprecare 0.3 mg/ml, s.c.) associated with rehydratation (8 ml of saline i.p), was delivered every day for three day after the surgical procedure.

HSm4131 administration

HSm4131 was obtained from OTR3 (OTR3 S.A.S., Paris, France). In all studies HSm4131 was administered intravenously (i.v.) at a dose of 1.5 mg/kg. The control group received physiological serum (300 µl, i.v.) (figure 1).

Cell culture and administration

MSCs were extracted and cultured from bone marrow of SD male rats, after their euthanasia under deep anesthesia. The femoral and tibial bone marrow was extracted and cultured during the first 24-48h in a 20% fetal calf serum (FCS) supplemented-alpha medium modification of Eagle's minimal essential medium (αMEM) and complemented with 2 mM of glutamine and 1% of penicillin/streptomycine. The culture medium was then replaced by a complemented medium supplemented with 10 % of FCS. MCSs were incubated at 37 °C in 5% CO_2. After 3 passages, cells were trypsinized and counted, and conditioned in a tampon phosphate saline (PBS) complemented with 2 mM glutamine.

In the experiment where MSCs were administered by an intracerebral (i.c.) route, 3 µl containing 3.10^5 cells were infused into the striatum over 5 minutes via a dental needle (30G) connected to a Hamilton syringe. Four groups were performed: vehicle/vehicle, HSm4131 (i.v.)/vehicle, vehicle/MSCs (i.c.), and HSm4131 (i.v.)/MSCs (i.c.) (figure 1).

When MSCs were infused intravenously (i.v.), 300 µl containing 3.10^6 cells were administered through the tail vein, alone or combined with HSm4131 (i.v). Six groups were performed: vehicle/vehicle, HSm4131 (i.v.)/vehicle, HSm4131 (i.v.)/vehicle + HSm4131 (i.v.), vehicle/MSCs (i.v.), HSm4131 (i.v.)/MSCs (i.v.), and HSm4131 (i.v.)/MSCs (i.v.) + HSm4131 (i.v.) (figure 1).

Quantification of brain damage with MRI

Two and fourteen days after ischemia induction, animals were anaesthetized as described before, and underwent magnetic resonance imaging (MRI) examinations (7T, PharmaScan®, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany at the CYCERON imaging platform, Caen, France). After a scout view, T2w imaging was performed with a rapid acquisition with refocused echoes (RARE) sequence (RARE factor of 8; TR/TE = 5000/16.25 ms; number of experiments (NEX) = 2; 20 contiguous slices of 0.75 mm; acquisition time = 4 min; nominal resolution = 0.15 x 0.15 x 0.75 mm^3). All MRI images were analyzed with ImageJ® software (Wayne Rasband, NIMH, Maryland, USA). The lesion was manually delineated on MR images and the volume of infarction was corrected for edema as described by Gerriets and colleagues (Guerrites et *al.*, 2004).

Behavioral tests

Limb placing test

The limb placing test was performed as described by De Ryck and colleagues (De Ryck et al 1989). A score of 0 (major deficit), 1 (minor deficit) or 2 (no deficit) was applied for each item. A healthy rat obtains a maximal score of 24 (Freret et *al.*, 2006)

Corner test

To evaluate the sensorimotor and postural asymmetries, the corner test was performed as described by Schallert and collaborators (Schallert et *al.*, 1989).The rearing and reversing in either of the directions (ipsilateral or contralateral to the ischemic lesion) after the corner exploration were noted. Each rat was submitted to 10 trials with a 2 min minimum inter-trial interval. The index of lateralization (LI) was calculated according to Haelewyn and collaborators (Haelewyn et *al.*, 2007)

Cylinder or limb-use asymmetry test

The forelimb use asymmetry were assessed according to (Schallert et *al.,* 2002). The use of the ipsilateral, contralateral or bilateral forelimbs to explore the cylinder by rearing was noted 20 times (Schallert et *al.,* 2002).

Adhesive removal test

According to Bouet and collaborators (Bouet et al 2009), the adhesive removal test was performed to assess somatosensory deficits, asymmetries and motor coordination. Animals were placed in a transparent Plexiglass box (20×25×32 cm) after a habituation period of 60 s; two adhesive tapes (1×1 cm) were randomly applied with equal pressure on each forepaw. The time spent to remove the adhesive was measured (maximum: 120 s).

Reverse transcription and real-time quantitative PCR

Using RNeasy Micro Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) total RNA of cells or tissues were extracted and purified. RNA concentration was measured with the NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) and reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) with AMV® reverse transcriptase (Promega). PCR amplification and analysis were achieved using the Applied Biosystems QuantStudio™ 6 & 7 Flex Real-Time PCR System (Thermofisher scientific, USA). Amplification reactions were performed using Takyon™ Low Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Belgium) with primers designed by Eurogentec (Table 1, supplementary data). Cyclophin-A was used as an endogenous RNA control (housekeeping gene) in the samples. Primer sequences related to vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), angiopoetin-2 (Ang-2), and the SDF-1 were purchased from Eurogentec, Belgium. The expression level was calculated using the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) after normalization to the housekeeping gene (Cyclophilin-A). Each sample were run in triplicate with

the following amplification sequences: an activation stage at 95°C for 3 min following by 40 cycles at 95°C, 3 s and 60°C, 30 s. Results were represented as the mean values.

Statistical analyses

Data were analyzed using a two-tailed Student t test or an analysis of variance (one or two-way ANOVA) followed by a Tukey HSD test or a Dunnett's test (JMP® program, SAS Institute, Cary, NC, USA) when appropriate. Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) or median ± interquartile range (IQR). In all analyses, statistical significance was set at the p-value < 0.05.

Results

The association of HSm4131 with MSCs offers a sustained neuroprotection after stroke

Association of intravenous administration of HSm4131 with intracerebral administration of MSCs

Intravenous administration of HSm4131 alone or combined with an intracerebral administration of MSCs resulted in a significant reduction of lesion volumes 39% and 42%, respectively, compared to vehicle group, 2 days after cerebral ischemia (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test $p < 0.05$) (figure 2A, 2B). Fourteen days after the induction of stroke, a significant reduction in lesion volume was detected in both groups: vehicle/MSCs (i.c.) and HSm4131 (i.v.)/MSCs (i.c.). Interestingly, the neuroprotection observed 2 days after MCAo in the HSm4131 (i.v.)/MSCs (i.c.) group, remained 14 days after cerebral ischemia (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test $p < 0.05$) (figure 2A, 2C).

To assess functional recovery, sensorimotor deficits were evaluated with limb placing, the corner and the adhesive removal tests. The limb placing were performed during 11 days following cerebral ischemia where only the HSm4131 (i.v.)/MSCs (i.c.) group showed a better functional recovery over the test period compared to control animals (Two way ANOVA: group effect $p=0.007$; time effect $p< 0.0001$; time * group effect $p=0.997$; followed by HSD of Tukey $p < 0.05$) (figure 3A). The group of animals treated with HSm4131/MSCs showed no lateralization in the corner test, 3 days following ischemic stroke compared to the measured baseline 3 days before ischemia induction (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test $p < 0.05$) (figure 3B). In the adhesive removal test, while no statistically significant difference was detected between the vehicle group

and treated animals, these lasts demonstrated a better motor coordination by removing the adhesive faster (supplementary data 1).

These data indicate that a co-administration of HSm4131 with MSCs offers a long lasting neuroprotection, and better functional sensorimotor recovery compared to vehicle animals or treatments alone.

Association of intravenous administration of HSm4131 with intravenous administration of MSCs

HSm4131 was administered intravenously 1 h after MCAo, MSCs were administered intravenously 24 h following MCAo, in association or not with a supplemental intravenousHSm4131 administration (figure 1).

HSm4131 alone, either administrated at 1 h after MCAo or at 1 h and 24 h after MCAo did not confer a significant reduction in ischemic lesion size (figure 4A, 4B).

Fourteen days after cerebral ischemia, all groups treated with MSCs demonstrated a reduction in the ischemic lesion volume compared to the vehicle group (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test $p < 0.05$) (figure 4A, 4C).

However, only the HSm4131/MSCs+HSm4131 group demonstrated a robust early neuroprotection with an infarct volume reduction of 58% compared to the vehicle group (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test $p < 0.05$) at both day 2 after cerebral ischemia. This neuroprotection was maintained 14 days after MCAo, with a reduction of the infarct volume up to 48% compared to the vehicle group (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test $p < 0.05$) (figure 4A, 4B, 4C).

Animals' sensorimotor deficits were assessed using the corner, cylinder and adhesive removal tests. All groups treated with MSCs demonstrated a prevention of animals' lateralization in the corner

test, since there were no difference in their lateralization index before and after cerebral ischemia. Vehicle and HSm4131 treated animals (1 h ± 24 h after MCAo) did show a significant increase in the lateralization index after MCAo, compared to their baseline score obtained before ischemia induction (One way ANOVA followed by Tukey HSD test $p < 0.05$) (figure 5A).

The use of the contralateral forepaw was assessed by the cylinder test during 6 weeks after MCAo. The overall percentage of contralateral forelimb use during the test period was significantly higher only in the HSm4131/ MSCs+HSm4131 group compared to vehicle animals compared to the vehicle group (Two way ANOVA: group effect $p = 0.0091$; time effect $p < 0.0001$; time * group effect $p = 0.2798$; followed by HSD of Tukey $p < 0.05$) (supplementary data 2, figure 5B).

Finally, in the adhesive removal test no significant difference were measured in the time to remove the adhesive from the contralateral forepaw, before and after MCAo, in the HSm4131/MSCs+vehicle and HSm4131/MSCs+HSm4131 treated groups, demonstrating a preserved sensorimotor abilities in these animals (supplementary data 3, figure 5C).

While in the vehicle and other treated animals, the time to remove the adhesive significantly increased after MCAo induction test period (one-way ANOVA followed by Tukey HSD test $p < 0.05$) (supplementary data 3, figure 5C).

Altogether these results highlight the great potentiation of MSCs-induced effects by HSm4131 co-administration. The HSm4131/MSCs+HSm4131 group demonstrated the best long lasting neuroprotection, and the best functional recovery in multiple sensorimotor tests. Thus, the HSm4131/MSCs association was used in the following studies.

The association of HSm4131 with MSCs is also neuroprotective in hypertensive animals

To analyze if the beneficial actions of the combined MSCs+HSm4131 treatments is sustained even in presence of CAH, the effects of HSm4131, administered alone or in association with MSCs were evaluated in hypertensive animals (figure 1).

Mean arterial blood pressure values in hypertensive and normotensive rats were 200 ± 5 mmHg and 120 ± 8 mmHg, respectively (supplementary data 5).

MR images did not show any neuroprotection of the single administration of HSm4131 compared to the vehicle group (figure 6A, 6B, 6C). However, the hypertensive animals treated by HSm and MSCs (HSm4131/ MSCs+HSm4131 group) demonstrated a persistent reduction in the lesion volume of 19% and 18% at 2 and 14 days after cerebral ischemia, respectively, compared to the vehicle group (Student t test $p < 0.05$) (figure 6D, 6E, 6F).

Sensorimotor deficits were assessed after cerebral ischemia by the corner, the cylinder and the adhesive removal tests.

Hypertensive rats treated only with HSm4131 did not show an increase of the contralateral forepaw use in the cylinder test (figure 7A). In contrary, treated animals with the HSm4131 and MSCs displayed a higher rate of the contralateral forepaw use in the cylinder compared the vehicle group over the test period (Two way ANOVA group effect $p = 0.0241$; time effect $p < 0.2235$; time * group effect $p = 0.8356$) (figure 7B).

The lateralization of the animals, assessed by the corner test, was significantly increased in control animal after cerebral ischemia compared to the baseline measure before MCAo induction (figure 7C, 7D). Interstingly, the lateralization reduced in rats treated with HSm4131 administered alone or in association with MSCs (HSm4131/ MSCs+HSm4131) (figure 7C, 7D).

Neither HSm4131 nor HSm4131/ MSCs+HSm4131 treated animals' demonstrated an improvement in motor coordination in the adhesive removal test (supplementary data 4A, 4B).

HSm4131 enhances post-ischemic growth factors expression

Cell therapy using an intravenous administration of MSCs is limited by the poor cell survival, and cell migration to the lesion site (Brenneman et *al.*, 2010).

As observed in our previous study (Khelif et *al.*, 2018), both Ang-2 and VEGF-A; growth factors have been shown to potentiate MSCs effects (Kim et *al.*, 2014; Tang et *al.*,2014); gene expression was enhanced in the ipsilateral hemisphere of animals treated with HSm4131 compared to vehicle-treated group. The gene expression of SDF-1, known to enhance cell migration (Liu et *al.*, 2011), was also investigated at 14 days after MCAo. HSm4131 increased (2.5 fold) the SDF-1 gene expression in the ipsilateral hemisphere 14 days after cerebral ischemia compared to the vehicle group (figure 8).

Discussion

In the present study, we have shown that a systemic (i.v.) administration of the heparan sulfate mimetic HSm4131, potentiates the beneficial effects of a MSCs treatment in an ischemic stroke model in rats. This effect was retrieved whenever the administration route of MSCs (i.c.) or (i.v.) at both acute (day 2) and chronic (day 14) stage on neuroprotection and functional recovery (until at least 42 days). Moreover, the co-administration (i.v.) of MSCs with HSm4131 results in a better neuroprotection and functional recovery not only in normotensive but also in hypertensive animals. Finally, the HSm4131 increases the expression of neurogenic, angiogenic, and cell migration factors.

HSm have proven their efficacy in the healing of many tissue lesions, including myocardial and brain tissue ischemia-induced lesions (Barritault et *al.*, 2017, Khelif et *al.*, 2018). In a precedent study (Khelif et al, 2018), we have shown that i.v. administration HSm4131 (1.5 mg/kg) 1 h after cerebral ischemia (i.e. concomitantly with the reperfusion) induced an acute neuroprotection after cerebral ischemia. In this same study, we have shown that HSm4131 induced a long lasting neuroprotection and functional recovery at a dose of 0.5 mg/kg (i.v.). However, in the present study and to highlight the potential MSCs' potentiation effect with HSm4131, we have used the 1.5 mg/kg dose of HSm4131 which was shown to be a sub-efficient dose on neuroprotection and functional recovery (Khelif et *al.*, 2018).

HSm are thought to favor tissue repair by the reconstruction of the degraded ECM, the binding, the protection, and the potentiation of multiple growth factors (Barritault et *al.*, 2017). On the other hand many studies have shown the potential of MSCs to protect the brain tissue against ischemic lesion, inflammation, cell death, and to improve tissue healing and (Drago et *al.*, 2013; Péron et *al.*, 2015; Stonesifer et *al.*, 2017). MSCs protection and repair mechanisms involve the secretion

of neurotrophic factors, the promotion of angiogenesis, neurogenesis, synaptic plasticity, the modulation of immune response, and even cell replacement by their differentiation in neurons (Sammali et *al.,* 2017; Zhang et *al.,* 2017). Despite many studies on the MSCs' neuroprotective and regenerative roles in ischemic stroke, both in animals and humans, many controversy points have not been elucidated yet, such as the optimal time and route for the MSCs administration as well as their poor survival in a hostile microenvironment such as that of brain after stroke.

In our study, MSCs have been administered 24 h after ischemic stroke induction. This time window has been proven to be efficient in reducing ischemic infarct volume and sensorimotor deficits after cerebral ischemia in rodents in many preclinical studies (de Vasconcelos dos Santos *et al.,* 2010; Komatsu et *al.,* 2010; Lee et *al.,* 2015; Toyoshima et *al.,* 2015). MSCs also displayed angiogenesis, cell migration to the infarcted cortex and upregulation of trophic factors secretion such as SDF-1 and bFGF (Drago et *al.,* 2013). Regarding the delivery route of MSCs, we showed in the present study, that both i.c. and i.v. MSCs administrations, and more specifically with the associated administration of HSm4131 resulted in a long lasting neuroprotection and functional recovery. These results are in accordance with those obtained by Zhang and collaborators (Zhang et *al.,* 2018). Indeed, in Zhang's study, MSCs were administered by an i.v, i.c or intra-arterial route. Results showed that irrespective of delivery route, MSCs induced functional recovery and increased brain plasticity after a transient focal cerebral ischemia (Zhang et *al.,* 2018).

Even if the optimal time and delivery route of MSCs are still under investigation, many preclinical studies have shown their neuroprotective effect (Kim et *al.,* 2017). However, MSCs neuroprotective potential can be expanded. Indeed, in this study we have shown that HSm4131 associated to MSCs results in a better neuroprotection and functional recovery. It could be explained, in part at least, by an increase of MSCs' proliferation and/or survival induced by

HSm4131. In 2012, Frescaline and collaborators (Frescaline et *al.*, 2012), have shown, in vitro, that an HSm analogue of the HSm4131, can enhance the proliferation, migration and the differentiation of MSCs. In another study, Zhong and collaborators (Zhong et *al.*, 2010), have co-transplanted (i.c.) progenitor neural cells with an ECM based biopolymer hydrogel crosslinked with heparin sulfate, in a model of photothrombotic stroke model. Their results have shown that the HS crosslinked biopolymer promoted the survival of neural stem cells in vitro and in vivo following stroke induction (Zhong et *al.*, 2010).

In this study, we have also shown that the combination of HSm4131 with MSCs protects the brain against cerebral ischemia in hypertensive rats. Albeit the combination of HSm4131 and MSCs reduced the infarct volume in hypertensive rats, the neuroprotection in normotensive rats was greater. This result could be explained by the smaller volume of penumbra following ischemic stroke in hypertensive rats compared to normotensive rats, since penumbra is the target of neuroprotection treatments (Letourneur et *al.*, 2011). Few studies take into account stroke risk factors, particularly CAH which is an aggravating risk factor increasing the infarct volume (Kumar 2016). Similar Results have been obtained by Relton and collaborators, who studied the effect of a neuroprotective treatment, the TA-2, in normotensive and hypertensive rats after stroke (Relton et *al.*, 2001). These lasts have shown that after MCAo TA-2 reduced the infarct volume by 56 % and 35 % in normotensive and hypertensive rats respectively.

The higher benefits; in brain tissue neuroprotection, and functional recovery; obtained by the co-administration of HSm4131 with MSCs could be explained by an increased MSCs survival. Indeed, it has been described that after MSCs administration, 90% of the cells die within the first hours due to ischemia and apoptosis (Liu et *al.*, 2011). Since, HSm have been shown to enhance cell survival up to 80% under cell stress conditions (Alexakis et *al.*, 2004), the co-administration of HSm4131

with MSCs' could increase cell survival, thereby increasing their homing to the lesion site, and their neuroprotection effect.

We also investigated the HSm4131 effect on the gene expression of growth factors known to be chemoattractant, neurotrophic, angiogenic and/or neurogenic. As already described in a previous work (khelif et *al.,* 2018) VEGF-A and Ang-2 gene expression increased in the ipsilateral hemisphere following HSm4131 administration after cerebral ischemia. Moreover, we showed here that SDF-1 gene expression, well known to be involved in cell homing (Liu et *al.,* 2011) is also increased following HSm4131 administration after ischemic stroke induction cerebral ischemia.

Interestingly, SDF-1 binding to its receptor CXCR4, activates signaling pathways involved in MSC survival, migration and cytokine secretion (Liu et *al.,* 2011). Indeed, in a model of ischemic stroke in rodents, SDF-1 increases MSCs homing following their administration (i.v.) (Lee et *al.,* 2015). The MSCs migration process is partly dependent on MSCs survival, which was also increased by SDF-1/CXCR-4 signaling after ischemic stroke through the Akt/Erk pro-survival signaling pathway and the up-regulation of Bcl-2 anti-apoptotic factor. Finally, SDF-1 stimulates the VEGF production and secretion participating in the previously VEGF's positive feedback loop (Liu et *al.,* 2011).

Using a rat model of cerebral ischemia, this study explores the potential of the HSm4131 and MSCs co-administration as a novel therapy for ischemic stroke. In a previous study, HSm4131 demonstrated a neuroprotective and regenerative effect accompanied by functional recovery, in rat stroke model (Khelif et *al.,* 2018). MSCs have been widely used in several studies demonstrating their neuroprotective potential in preclinical models of ischemic stroke. Moreover, MSCs car be

potentiated by combining them with growth factors (Esneault et *al.*, 2008) or biomolecules functionalized with growth factors (Quittet et *al.*, 2015).

Here we clearly showed the potential interest of the co-administration of HSm and MSCs, with sustain effect in the time at both neuroprotective and functional recovery levels. HSm have been used to heal chronic skin wounds in over 20000 patients, and to heal corneal ulcers in over 5000 patients, without any reported side effect (Barritault et *al.*, 2017). On the other hand, several clinical studies have proven the safety and the feasibility of MSCs based therapy for ischemic stroke (Bang 2016). Since both HSm and MSCs undergo already clinical trials or use, the use of Hsm in combination with MSCs may be transfer to stroke patients without major issues. The long lasting ischemic volume reduction and the improvement of functional recovery oberved in both normotensive and hyptertensive rats uncover the association of HSm and MSCs as a novel promising therapy for ischemic stroke.

References

ALEXAKIS, CATHERINE, PATRICIA MESTRIES, STÉPHANIE GARCIA, *et al.*,2004 Structurally Different RGTAs Modulate Collagen-Type Expression by Cultured Aortic Smooth Muscle Cells via Different Pathways Involving Fibroblast Growth Factor-2 or Transforming Growth Factor-beta1. The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 18 (10): 1147–1149. doi: 10.1096/fj.03-1126fje.

BANG OH YOUNG 2016 Clinical Trials of Adult Stem Cell Therapy in Patients with Ischemic Stroke. Journal of Clinical Neurology, 12 (1): 14. doi: 10.3988/jcn.2016.12.1.14.

BANG OH YOUNG, GYEONG JOON MOON, DONG HEE KIM, *et al.*,2017 Stroke Induces Mesenchymal Stem Cell Migration to Infarcted Brain Areas Via CXCR4 and C-Met Signaling. Translational Stroke Research, 8 (5), 25 de October: 449–460. doi: 10.1007/s12975-017-0538-2.

BARRITAULT DENIS, PASCAL DESGRANGES, ANNE MEDDAHI-PELLÉ, *et al.*,2017 RGTA®-Based Matrix Therapy – A New Branch of Regenerative Medicine in Locomotion. Joint Bone Spine, 84 (3): 283–292. doi: 10.1016/j.jbspin.2016.06.012.

BOUET VALENTINE, MICHEL BOULOUARD, JÉRÔME TOUTAIN, *et al.*,2009 The Adhesive Removal Test: A Sensitive Method to Assess Sensorimotor Deficits in Mice. Nature Protocols, 4 (10), January: 1560–1564. doi: 10.1038/nprot.2009.125.

BRENNEMAN MIRANDA, SUSHIL SHARMA, MATTHEW HARTING, *et al.*,2010 Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells Enhance Recovery after Acute Ischemic Stroke in Young and Middle-Aged Rats. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 30 (1): 140–149. doi: 10.1038/jcbfm.2009.198.

CHEN J, Y LI, L WANG, *et al.*,2001 Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells after Cerebral Ischemia in Rats. Stroke, 32 (4), 1 de April: 1005–11. doi: 10.1161/01.str.32.4.1005.

DEMAERSCHALK BART M, ANDREW M DEMCHUK, JENNIFER E FUGATE, *et al.*,2016 AHA / ASA Scientific Statement Scientific Rationale for the Inclusion and Exclusion Criteria for Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke. doi: 10.1161/STR.0000000000000086.

DRAGO DENISE, CHIARA COSSETTI, NUNZIO IRACI, *et al.*,2013 The Stem Cell Secretome and Its Role in Brain Repair. Biochimie, 95 (12), December: 2271–2285. doi: 10.1016/j.biochi.2013.06.020.

ESNEAULT ELISE, EMILIE PACARY, DAUPHOU EDDI, *et al.*,2008 Combined Therapeutic Strategy Using Erythropoietin and Mesenchymal Stem Cells Potentiates Neurogenesis after Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 28 (9), 14 de September: 1552–1563. doi: 10.1038/jcbfm.2008.40.

FRERET THOMAS, SAMUEL VALABLE, LAURENT CHAZALVIEL, *et al.*,2006 Delayed Administration of Deferoxamine Reduces Brain Damage and Promotes Functional Recovery after Transient Focal Cerebral Ischemia in the Rat. European Journal of Neuroscience, 23 (7): 1757–1765. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04699.x.

FRESCALINE GUILHEM, THIBAULT BOUDERLIQUE, MINH BAO HUYNH, *et al.*,2012 Glycosaminoglycans Mimetics Potentiate the Clonogenicity, Proliferation, Migration and Differentiation Properties of Rat Mesenchymal Stem Cells. Stem Cell Research, 8 (2), March: 180–192. doi: 10.1016/j.scr.2011.09.005.

GERRIETS T., E STOLZ, M WALBERER, *et al.*,2004 Noninvasive Quantification of Brain Edema and the Space-Occupying Effect in Rat Stroke Models Using Magnetic Resonance Imaging. Stroke, 35 (2), 1 de February: 566–571. doi: 10.1161/01.STR.0000113692.38574.57.

HAELEWYN BENOÎT, THOMAS FRERET, EMILIE PACARY, *et al.*,2007 Long-Term Evaluation of Sensorimotor and Mnesic Behaviour Following Striatal NMDA-Induced Unilateral Excitotoxic Lesion in the Mouse. Behavioural Brain Research, 178 (2): 235–243. doi: 10.1016/j.bbr.2006.12.023.

HASS RALF, CORNELIA KASPER, STEFANIE BÖHM, *et al.*, 2011 Different Populations and Sources of Human Mesenchymal Stem Cells (MSC): A Comparison of Adult and Neonatal Tissue-Derived MSC. Cell Communication and Signaling : CCS, 9, 14 de May: 12. doi: 10.1186/1478-811X-9-12.

KIM HEE JUNG and JEONG-SOO PARK 2017 Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-Based Therapy: Advantages and Disadvantages. Development & Reproduction, 21 (1), March: 1–10. doi: 10.12717/DR.2017.21.1.001.

KIM JI-HYUN, DONG WOOK JEKARL, MYUNGSHIN KIM, *et al.*, 2014 Effects of ECM Protein Mimetics on Adhesion and Proliferation of Chorion Derived Mesenchymal Stem Cells. International Journal of Medical Sciences, 11 (3): 298–308. doi: 10.7150/ijms.6672.

KOMATSU KATSUYA, OSAMU HONMOU, JUNPEI SUZUKI, *et al.*, 2010 Therapeutic Time Window of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow after Cerebral Ischemia. Brain Research, 1334: 84–92. doi: 10.1016/j.brainres.2010.04.006.

KUMAR SUDHIR 2016 Hypertension and Ischemic Stroke. Hypertension Journal, 2 (March): 39–43. doi: 10.5005/jp-journals-10043-0028.

LACKLAND DANIEL T. and MICHAEL A. WEBER 2015 Global Burden of Cardiovascular Disease and Stroke: Hypertension at the Core. Canadian Journal of Cardiology, 31 (5): 569–571. doi: 10.1016/j.cjca.2015.01.009.

LEE SOO HYUN, KYUNG SIL JIN, OH YOUNG BANG, *et al.*,2015 Differential Migration of Mesenchymal Stem Cells to Ischemic Regions after Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. PLoS ONE, 10 (8): 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0134920.

LETOURNEUR ANNELISE, SIMON ROUSSEL, JÉRÔME TOUTAIN, *et al.*,2011 Impact of Genetic and Renovascular Chronic Arterial Hypertension on the Acute Spatiotemporal Evolution of the Ischemic Penumbra: A Sequential Study with MRI in the Rat. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 31 (2): 504–513. doi: 10.1038/jcbfm.2010.118.

LIU XIAOLEI, BIYAN DUAN, ZHAOKANG CHENG, *et al.*,2011 SDF-1/CXCR4 Axis Modulates Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Apoptosis, Migration and Cytokine Secretion. Protein & Cell, 2 (10): 845–854. doi: 10.1007/s13238-011-1097-z.

MUKHERJEE DEBRAJ and CHIRAG G. PATIL 2011 Epidemiology and the Global Burden of Stroke. World Neurosurgery, 76 (6): S85–S90. doi: 10.1016/j.wneu.2011.07.023.

PAPY-GARCIA DULCE and PATRICIA ALBANESE 2017 Heparan Sulfate Proteoglycans as Key Regulators of the Mesenchymal Niche of Hematopoietic Stem Cells. Glycoconjugate Journal, 34 (3): 377–391. doi: 10.1007/s10719-017-9773-8.

PÉRON SOPHIE and BENEDIKT BERNINGER 2015 Imported Stem Cells Strike against Stroke. Cell Stem Cell, 17 (5): 501–502. doi: 10.1016/j.stem.2015.10.006.

QUITTET MARIE SOPHIE, OMAR TOUZANI, LAURENCE SINDJI, *et al.*,2015 Effects of Mesenchymal Stem Cell Therapy, in Association with Pharmacologically Active Microcarriers Releasing VEGF, in an Ischaemic Stroke Model in the Rat. Acta Biomaterialia, 15: 77–88. doi: 10.1016/j.actbio.2014.12.017.

RELTON JANE K, KEVIN E SLOAN, ERICA M FREW, *et al.*,2001 Inhibition of a4 Integrin Protects Against Transient Focal Cerebral Ischemia in Normotensive and Hypertensive Rats. Stroke, 4: 199–206.

DE RYCK M, J VAN REEMPTS, M BORGERS, *et al.*,1989 Photochemical Stroke Model: Flunarizine Prevents Sensorimotor Deficits after Neocortical Infarcts in Rats. Stroke, 20 (10), October: 1383–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2799870>. Accessed December 14, 2016.

SAMMALI ELIANA, CLAUDIA ALIA, GLORIA VEGLIANTE, *et al.*,2017 Intravenous Infusion of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Promotes Functional Recovery and Neuroplasticity after Ischemic Stroke in Mice. Scientific Reports, 7 (1): 1–13. doi: 10.1038/s41598-017-07274-w.

SCHALLERT T, M UPCHURCH, N LOBAUGH, *et al.*,1982 Tactile Extinction: Distinguishing between Sensorimotor Analysis of Inter-Hemispheric Receptor Asymmetries in Neostriatum. Pharmacol. Biochem. Behav., 18: 753–759.

SCHALLERT T, M T WOODLEE, S M FLEMING, *et al.*,2002 Disentangling Multiple Types of Recovery from Brain Injury Recovery of Function. Pharmacology of Cerebral Ischemia (January 2002): 201–216.

STONESIFER CONNOR, SYDNEY COREY, SHAILA GHANEKAR, *et al.*,2017 Stem Cell Therapy for Abrogating Stroke-Induced Neuroinflammation and Relevant Secondary Cell Death Mechanisms. Progress in Neurobiology, 158: 94–131. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.07.004.

TANG YUAN, XIAOLIANG GAN, RABE'E CHEHELTANI, *et al.*,2014 Targeted Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor Improves Stem Cell Therapy in a Rat Myocardial Infarction Model. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 10 (8): 1711–1718. doi: 10.1016/j.nano.2014.06.001.

TOYOSHIMA ATSUHIKO, TAKAO YASUHARA, MASAHIRO KAMEDA, *et al.*,2015 Intra-Arterial Transplantation of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Mounts Neuroprotective Effects in a Transient Ischemic Stroke Model in Rats: Analyses of Therapeutic Time Window and Its Mechanisms. PLoS ONE, 10 (6): 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0127302.

DE VASCONCELOS DOS SANTOS ANDRÉIA, JULIANA DA COSTA REIS, BRUNO DIAZ PAREDES, *et al.*,2010 Therapeutic Window for Treatment of Cortical Ischemia with Bone Marrow-Derived Cells in Rats. Brain Research, 1306, 8 de January: 149–158. doi: 10.1016/J.BRAINRES.2009.09.094.

VIZOSO FRANCISCO J, NOEMI EIRO, SANDRA CID, *et al.*,2017 Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. International Journal of Molecular Sciences, 18 (9), 25 de August. doi: 10.3390/ijms18091852.

ZHANG HONG LIAN, XU FANG XIE, YING QIONG XIONG, *et al.*,2018 Comparisons of the Therapeutic Effects of Three Different Routes of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Cerebral Ischemic Rats. Brain Research, 1680: 143–154. doi: 10.1016/j.brainres.2017.12.017.

ZHANG LEI, LIN-MEI WANG, WEI-WEI CHEN, *et al.*,2017 Neural Differentiation of Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves the Recovery of Neurological Function after Transplantation in Ischemic Stroke Rats. Neural Regeneration Research, 12 (7): 1103. doi: 10.4103/1673-5374.211189.

ZHONG JIN, ALBERT CHAN, LEERON MORAD, *et al.*,2010 Hydrogel Matrix to Support Stem Cell Survival After Brain Transplantation in Stroke. Neurorehabilitation and Neural Repair, 24 (7), 27 de September: 636–644. doi: 10.1177/1545968310361958.

ZINKOVA N., E. G. GILEROVITCH, I. B. SOKOLOVA, *et al.*,2007 Dynamics of Morphological Changes after Transplantation of Mesenchymal Stem Cells in Rat Brain Provoked by Stroke. Cell and Tissue Biology, 1 (6), December: 482–490. doi: 10.1134/S1990519X0706003X.

Figures

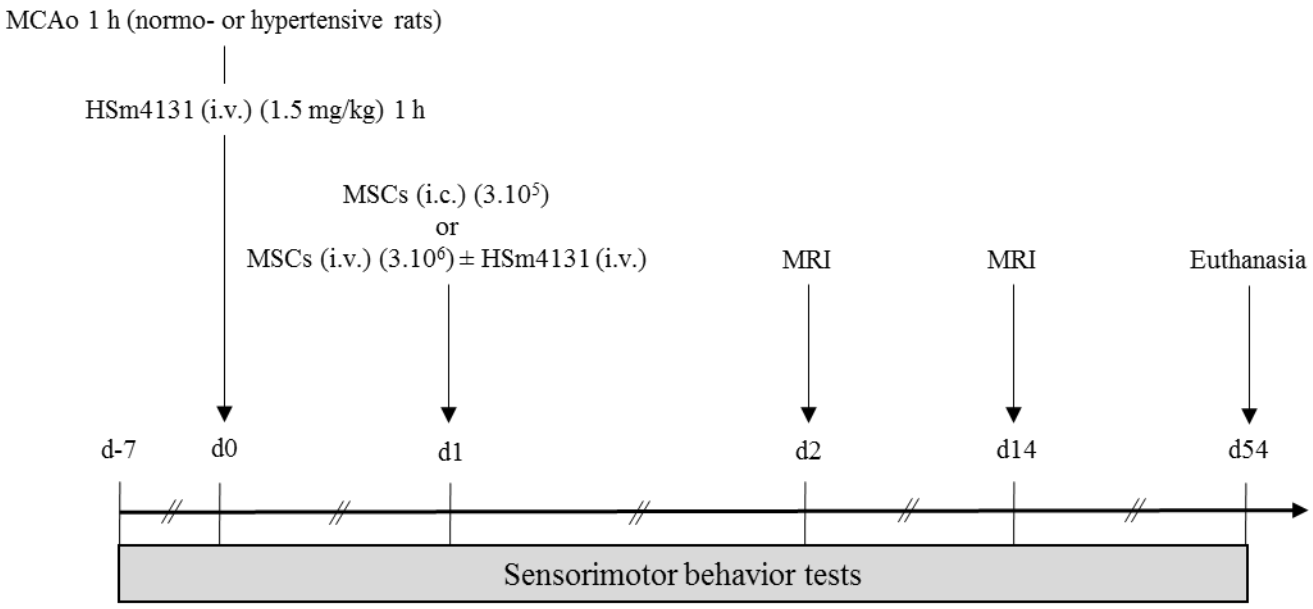


Figure 1: Experimental protocol.

Experimental protocol designed to examine the effect of the association of HSm4131 with MSCs on the brain tissue neuroprotection, functional recovery and cellular reactions, in normotensive and hypertensive rats. i.v.: intravenous, i.c.: intracerebral, MCAo: middle cerebral artery occlusion, MRI: magnetic resonance imaging.

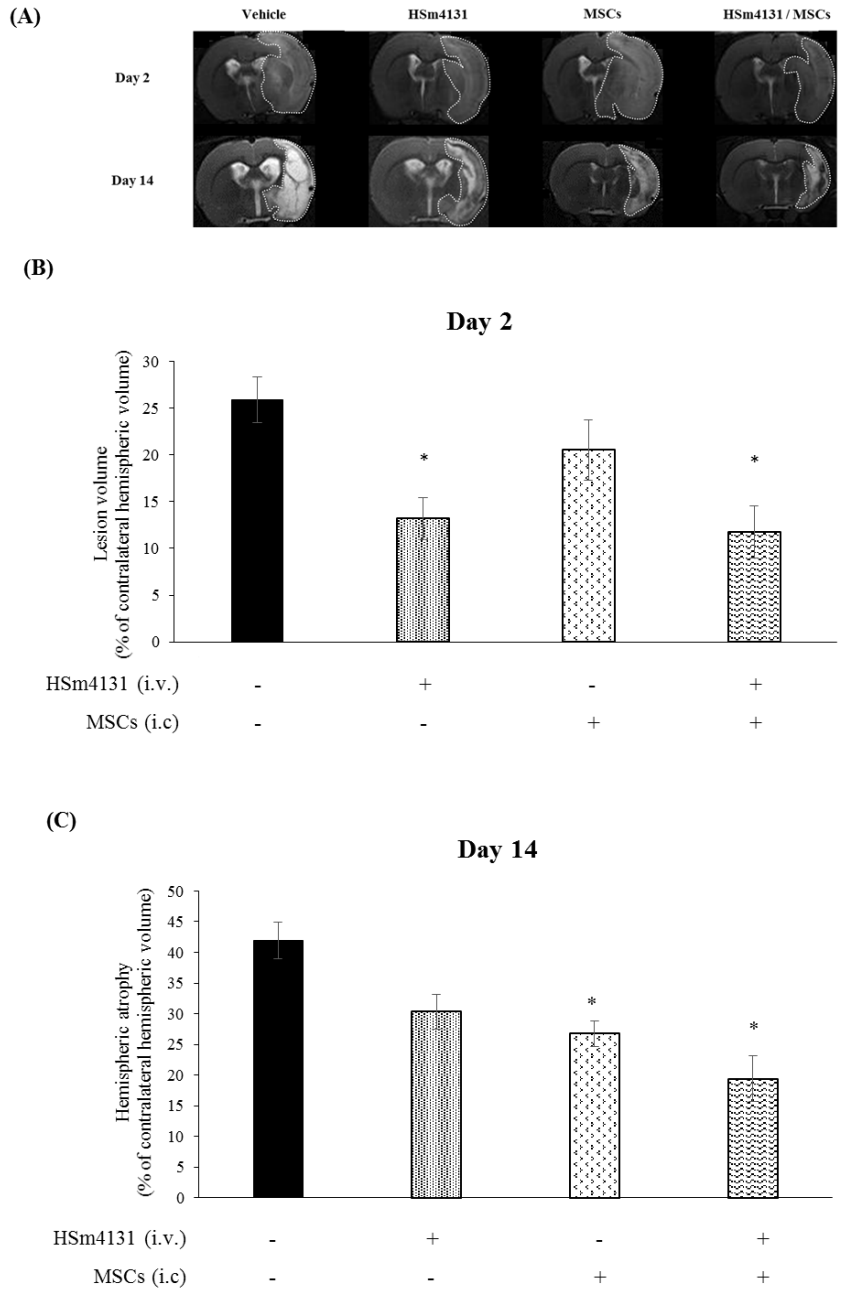


Figure 2: Effects of the association of HSm4131 (i.v.) and MSCs (i.c.) administrations on ischemic lesion volume.

(A) Representative MRI at day 2 and 14 post-MCAo. **(B)** Infarct volumes at day 2 post-MCAo **(C)** at day 14 post-MCAo (mean ± SEM) (vehicle/ vehicle n=5, HSm4131/ vehicle n=7, vehicle/ MSCs n=9, and HSm4131/ MSCs n=6). *Statistically different from other groups (one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey HSD test $p< 0.05$).

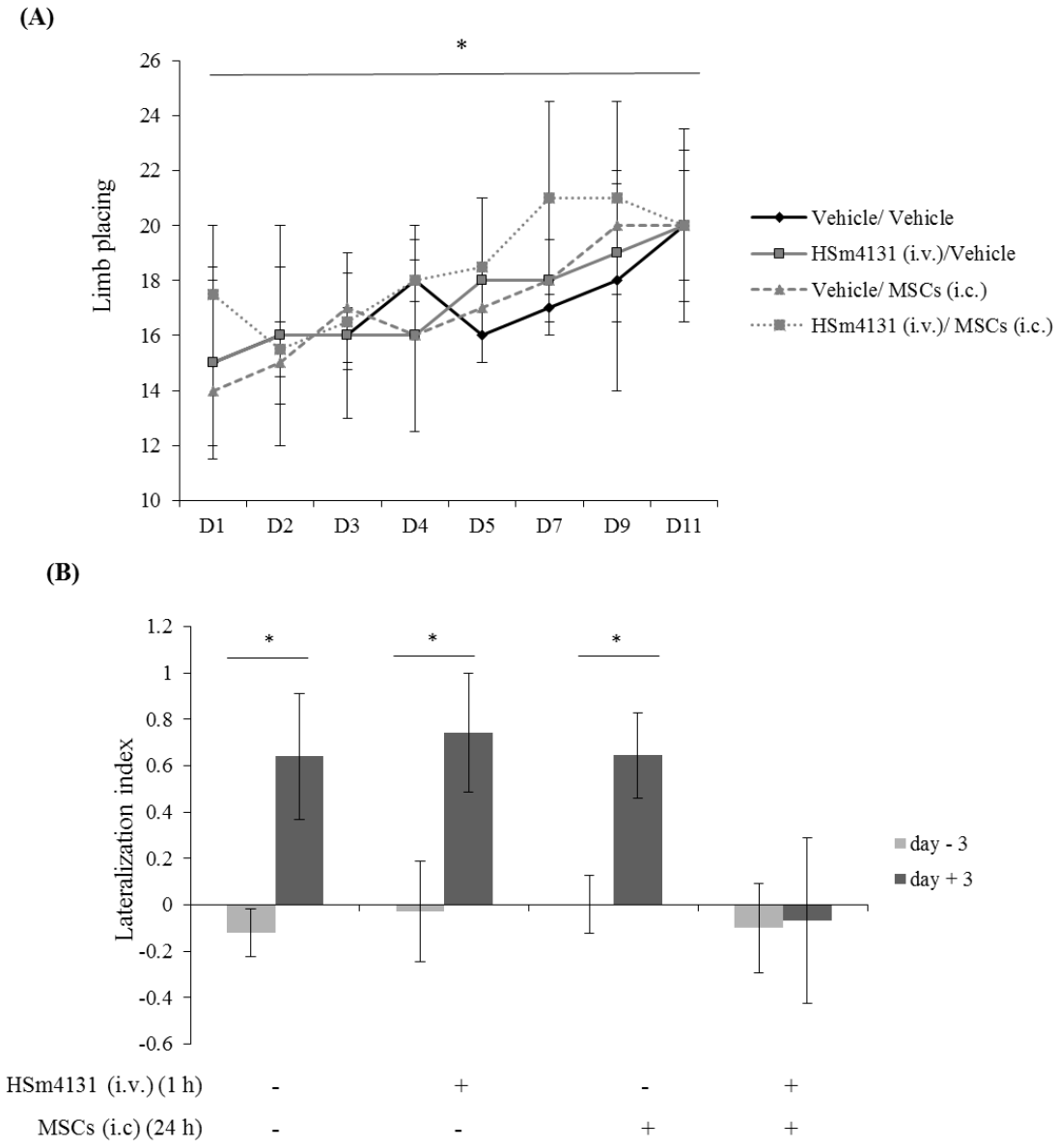


Figure 3: Effects of the association of HSm4131 (i.v.) and MSCs (i.c.) administrations on functional recovery.

(A) Limb placing test (median ± IQR) * HSm4131/ MSCs+ HSm4131 treated group different from vehicle/ vehicle group over the test period (two-way ANOVA, time $p < 0.0001$, group $p = 0.0091$, time*group $p = 0.2798$ followed by a post-hoc Tukey HSD test $p< 0.05$).

(B) Lateralization index (LI) evaluated in the corner test at day -3 and day +3 (mean ± SEM) (*one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey HSD test $p< 0.05$).

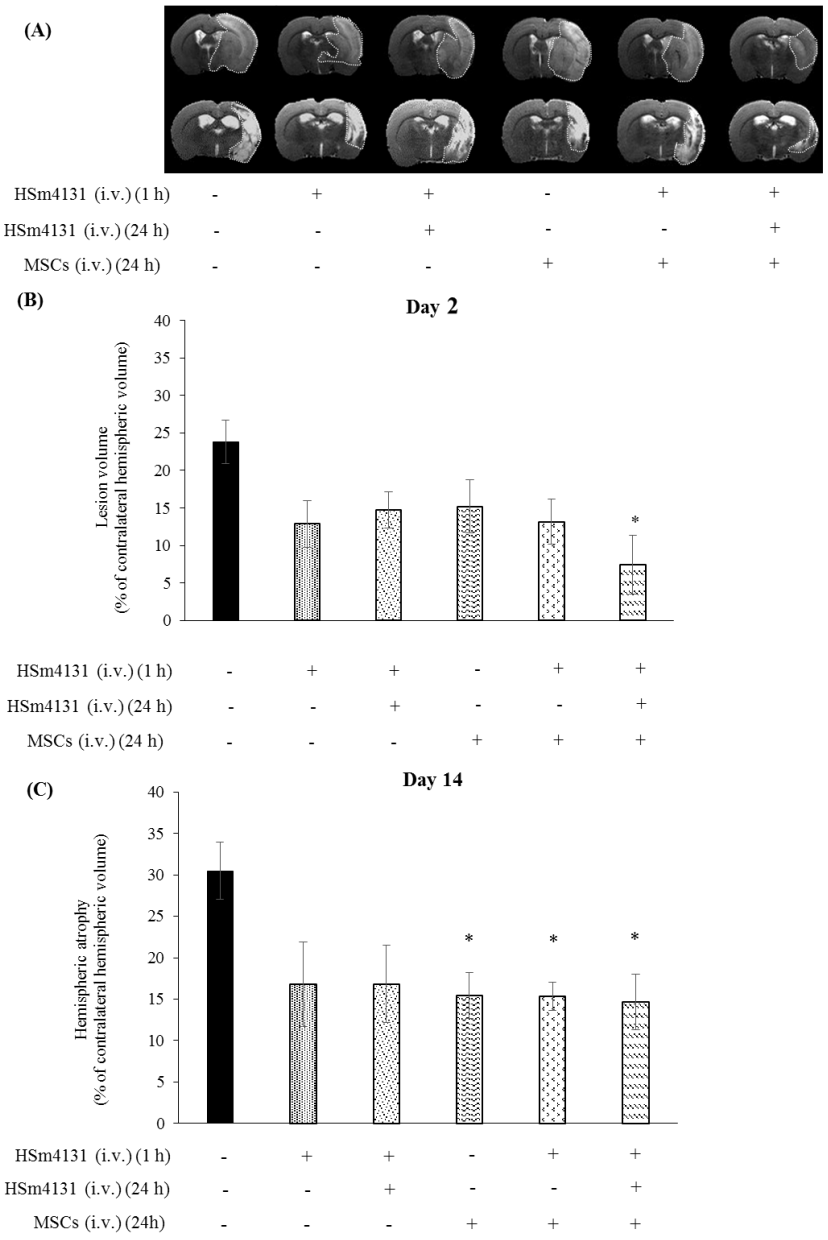
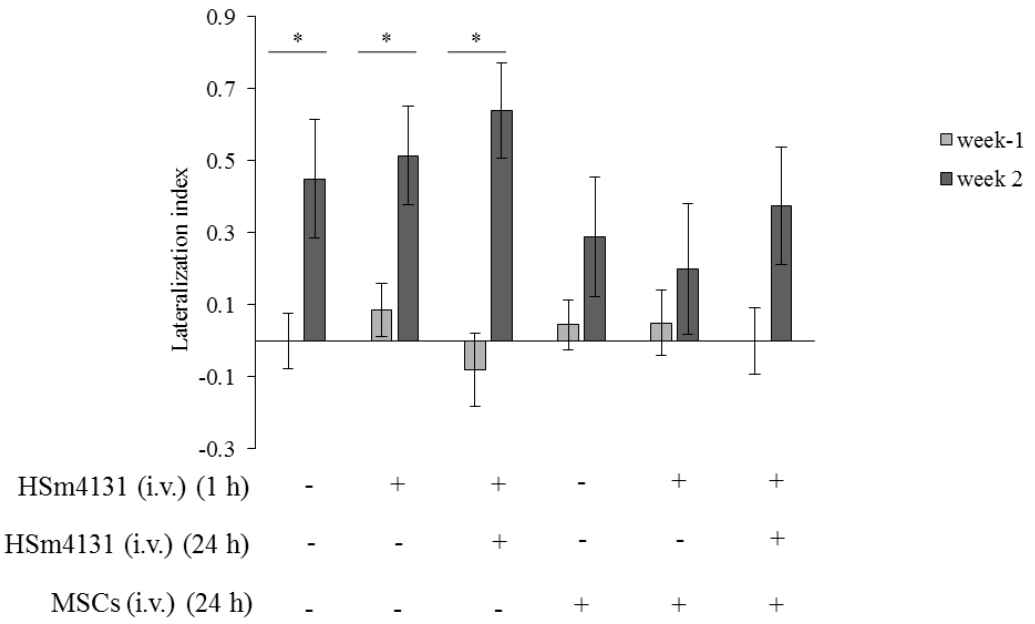


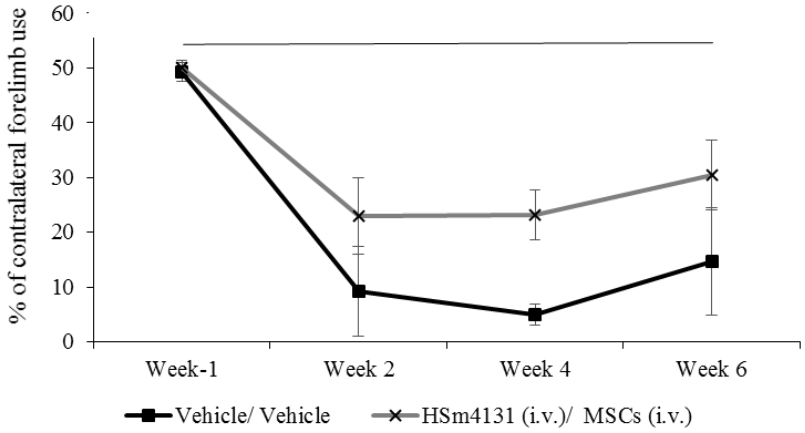
Figure 4: Effects of the association of HSm4131 (i.v.) and MSCs (i.v.) administrations on lesion volume.

(A) Representative MRI at day 2 and 14 post-MCAo. **(B)** Infarct volumes at day 2 post-MCAo **(C)** at day 14 post-MCAo (mean ± SEM) (mean ± SEM) (vehicle/ vehicle n=6, HSm4131/ vehicle n=7, HSm4131/ vehicle+ HSm4131 n=5, vehicle/ MSCs n=9, HSm4131/ MSCs n=7 and HSm4131/ MSCs+ HSm4131 n=8). *Statistically different from other groups (one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey HSD test $p < 0.05$

(A)


0.9
0.7
0.5
0.3
0.1
-0.1
-0.3
Lateralization index
*
*
*
week-1
week 2
HSm4131 (i.v.) (1 h) - + + - + +
HSm4131 (i.v.) (24 h) - - + - - +
MSCs (i.v.) (24 h) - - - + + +

(B)


60
50
40
30
20
10
0
% of contralateral forelimb use
Week-1
Week 2
Week 4
Week 6
Vehicle/ Vehicle
HSm4131 (i.v.)/ MSCs (i.v.)

(C)

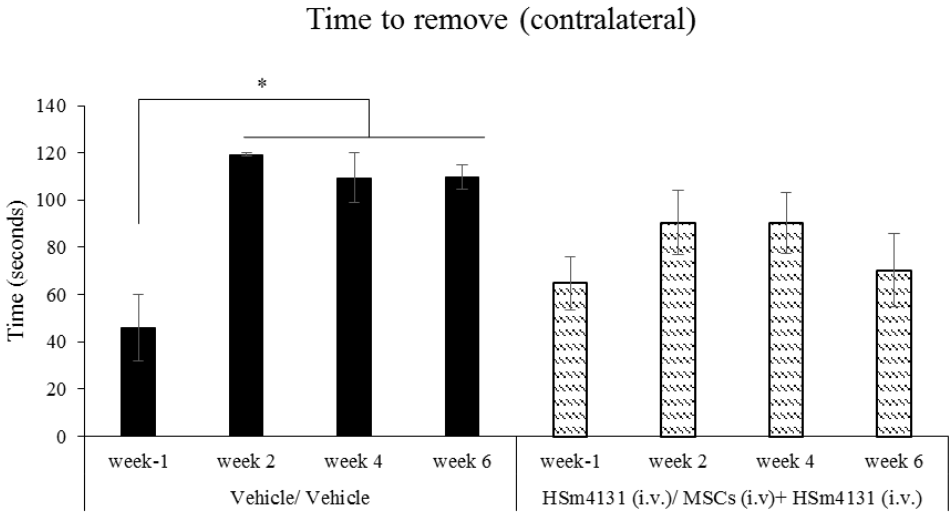

Time to remove (contralateral)
*
140
120
100
80
60
40
20
0
Time (seconds)
week-1
week 2
week 4
week 6
Vehicle/ Vehicle
week-1
week 2
week 4
week 6
HSm4131 (i.v.)/ MSCs (i.v.)+ HSm4131 (i.v.)

Figure 5: Effects of the association of HSm4131 (i.v.) and MSCs (i.v.) administrations on functional recovery

(A) Lateralization index (LI) evaluated by the corner test (mean ± SEM) (*one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey HSD test $p< 0.05$). **(B)** Limb placing test (median ± IQR) * HSm4131/ MSCs treated group different from vehicle/ vehicle group over the test period (two-way ANOVA, time $p < 0.0001$, group $p = 0.0072$, time*group $p = 0.9970$ followed by a post-hoc Tukey HSD test $p< 0.05$). **(C)** The time to remove the adhesive was measured in seconds for the contralateral side (Mean ± SEM) (vehicle/ vehicle n=6, HSm4131/ vehicle n=7, HSm4131/ vehicle+ HSm4131 n=5, vehicle/ MSCs n=9, HSm4131/ MSCs n=7 and HSm4131/ MSCs+ HSm4131 n=8). *Statistically different from other groups (one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey HSD test $p< 0.05$).

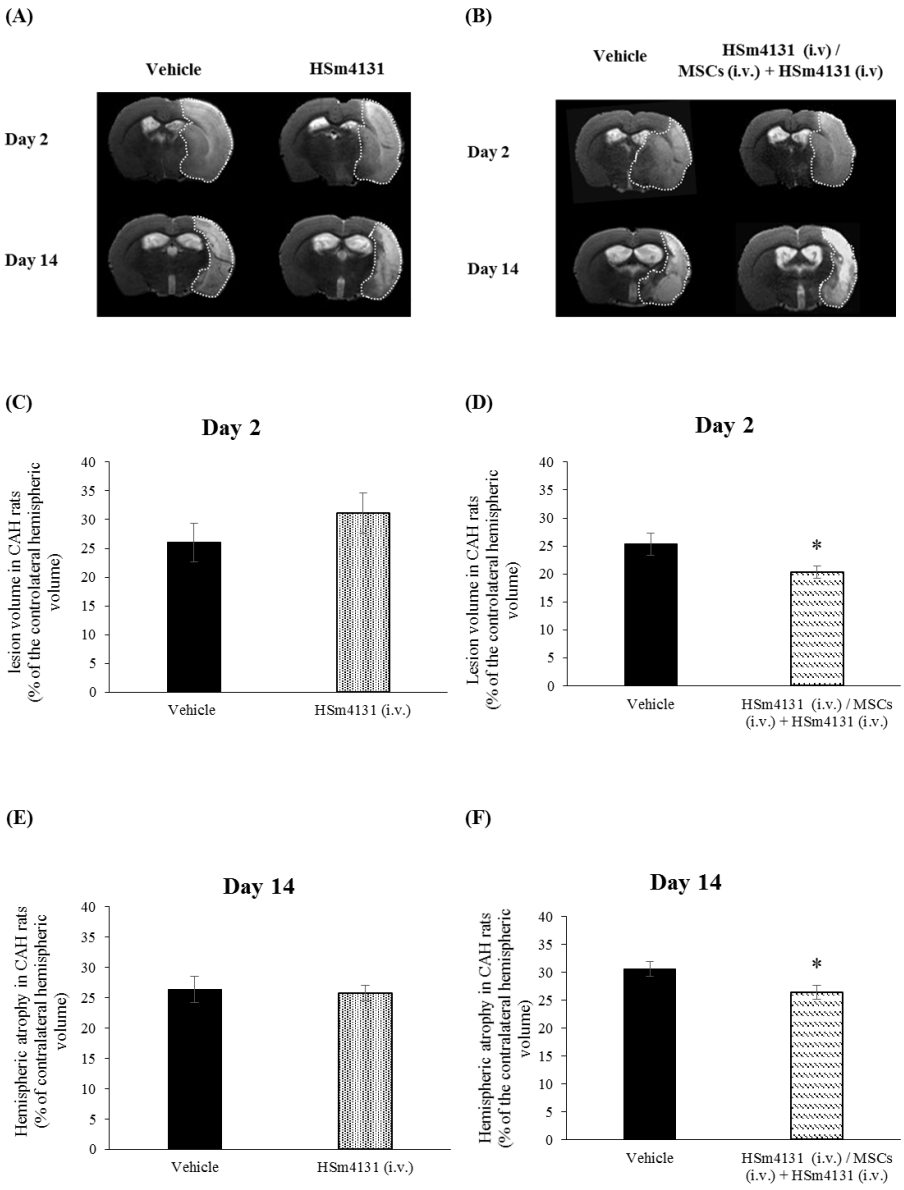


Figure 6: Effects of the association of HSm4131 (i.v.) and MSCs (i.v.) administrations on lesion volume in hypertensive rats

(A) and **(B)** Representative MRI at day 2 and 14 post-MCAo. Infarct volumes at day 14 post-MCAo **(C)** vehicle n=13, HSm4131 n=14 **(D)** vehicle n=12, HSm4131/ MSCs+ HSm4131 n=9 (mean ± SEM). Infarct volumes at day 14 post-MCAo **(E)** vehicle n=13, HSm4131 n=14 **(F)** vehicle n=12, HSm4131/ MSCs+ HSm4131 n=9 (mean ± SEM). *Statistically different from other groups (Student t test $p< 0.05$).

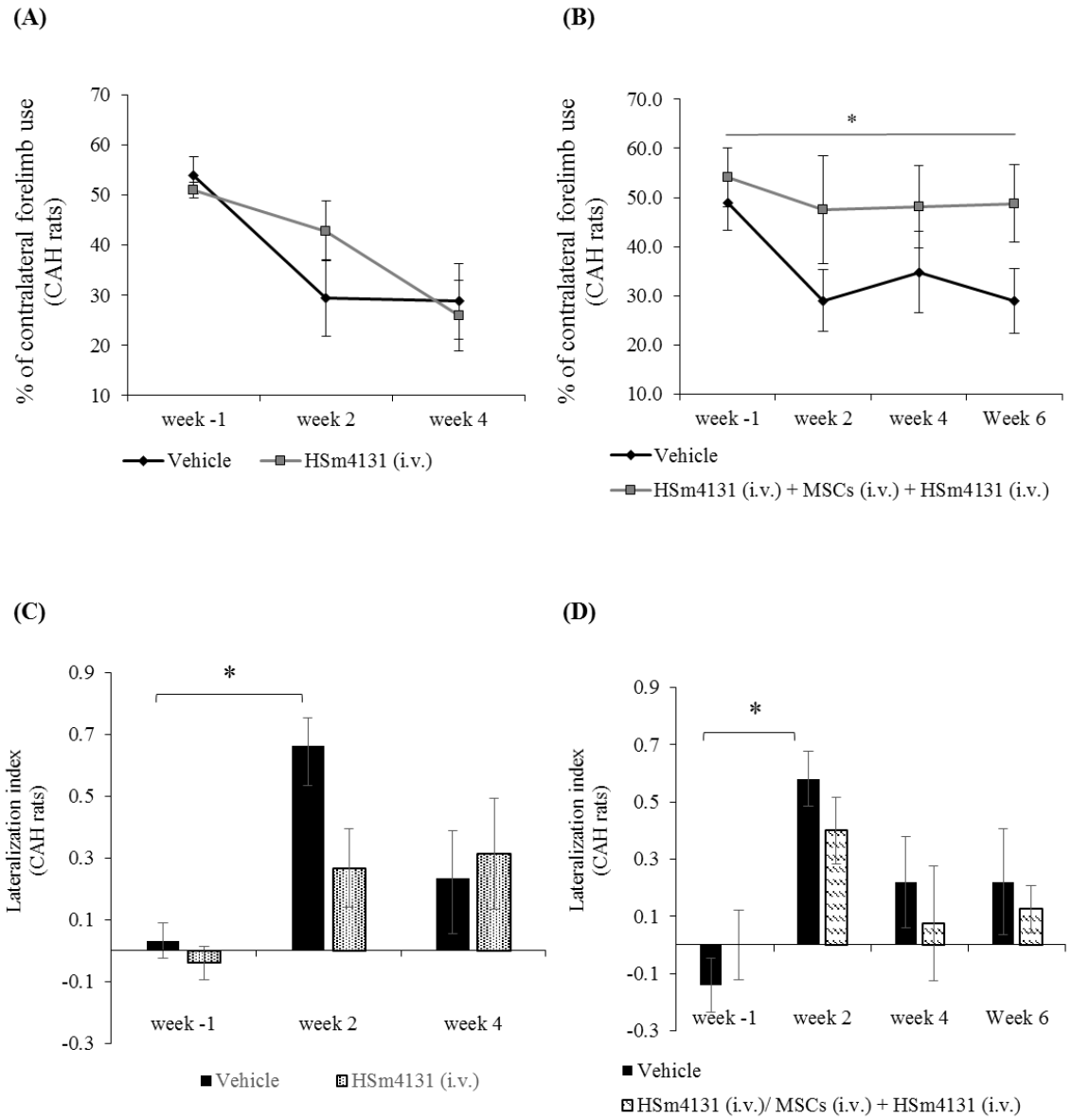


Figure 7: Effects of the association of HSm4131 (i.v.) and MSCs (i.v.) administrations on functional recovery in hypertensive rats

Limb placing test (median ± IQR) **(A)** vehicle n=13, HSm4131 n=14 **(B)** vehicle n=12, HSm4131/ MSCs+ HSm4131 n=9 (mean ± SEM) *HSm4131/ MSCs+ HSm4131treated group different from vehicle group over the test period (two-way ANOVA, time p = 0.2235, group p = 0.0241, time*group p = 0.8356 followed by a post-hoc Dunnett's test p< 0.05). Lateralization index (LI) evaluated by the corner test (mean ± SEM) **(C)** vehicle n=13, HSm4131 n=14 **(D)** vehicle n=12, HSm4131/ MSCs+ HSm4131 n=9 (mean ± SEM) *one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey HSD test p < 0.05).

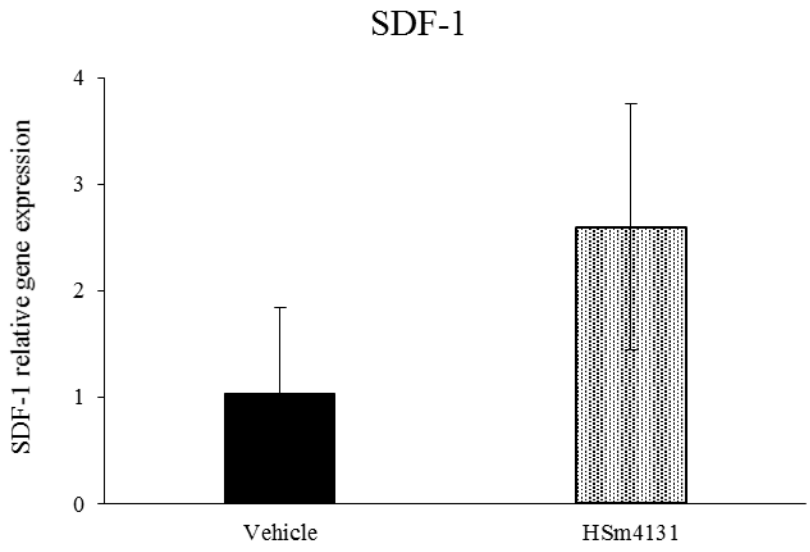
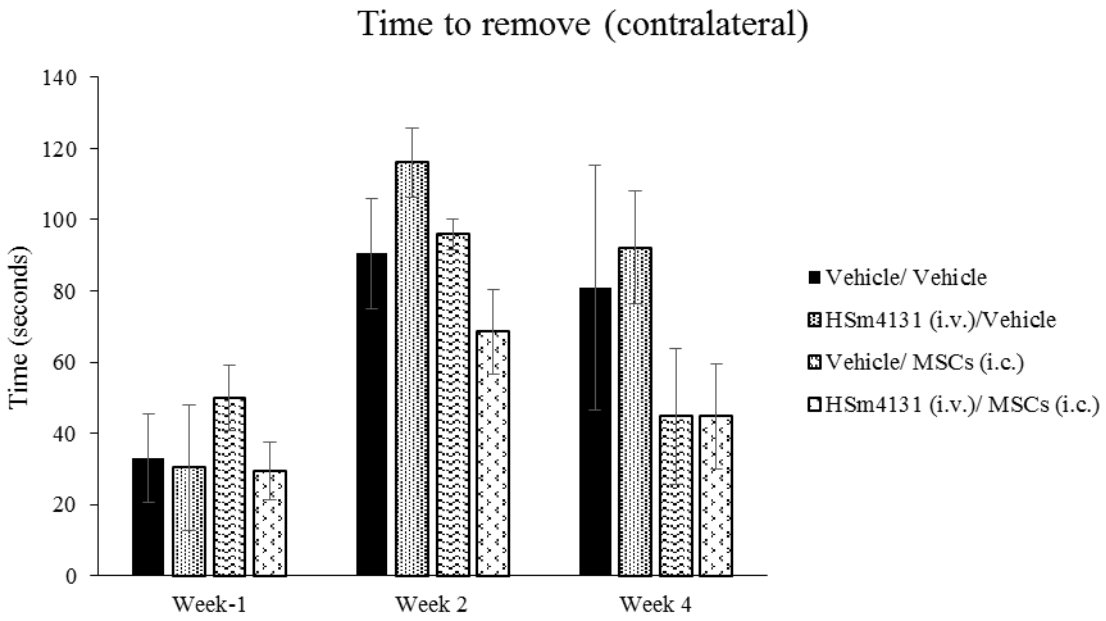


Figure 8: Effect of HSm4131 administration (i.v.) on SDF-1 gene expression

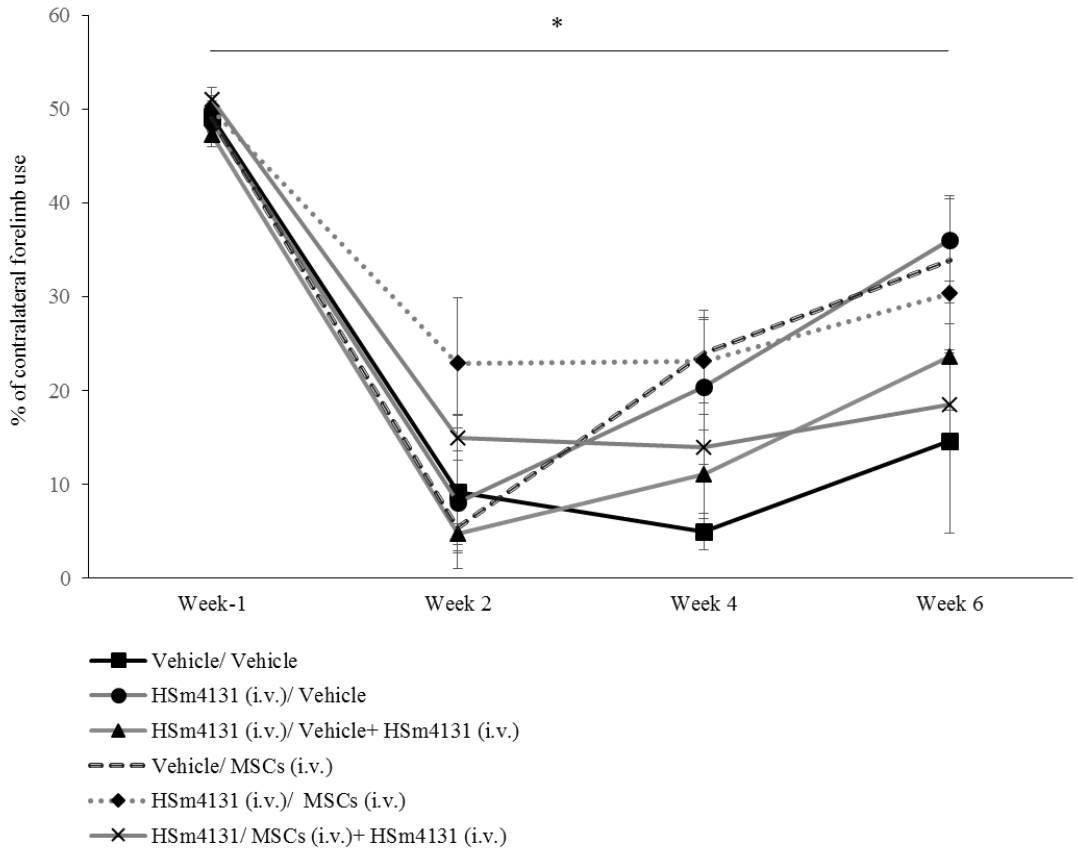
SDF-1 gene expression at day 14 after MCAo in the ipsilateral hemisphere. Results are expressed as relative gene expression to the cyclophilin-A housekeeping gene (mean ± SEM) (*Student t-test $p<0.05$) (Vehicle n = 3, HSm4131 n = 3)

Supplementary data



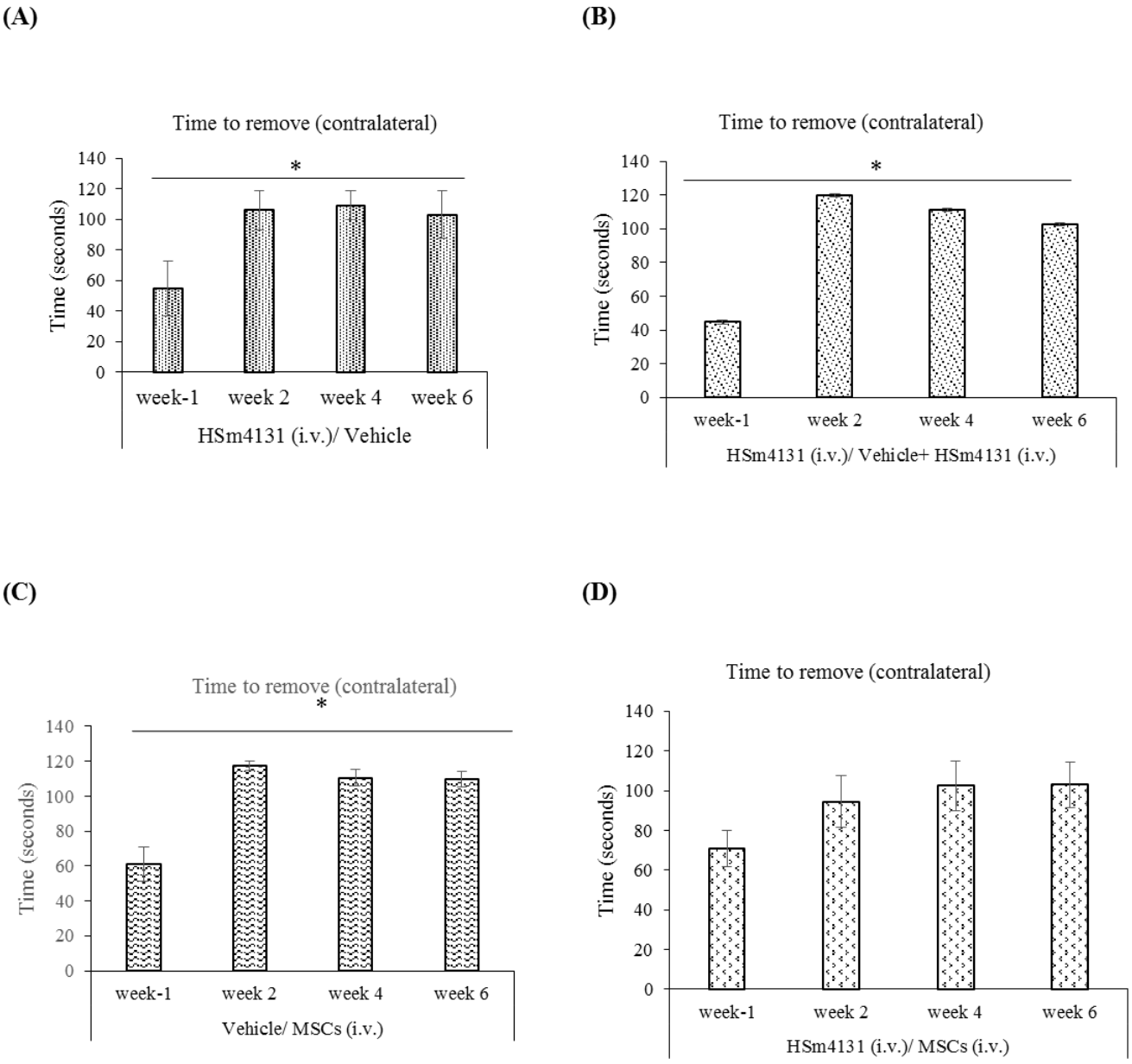
Supplementary data 1: Effects of the association of HSm4131 (i.v.) and MSCs (i.c.) on functional recovery.

The time to remove the adhesive was measured in seconds for the contralateral side. (Mean ± SEM) (Vehicle/ vehicle n=3, HSm4131/ vehicle n=4, vehicle/ MSCs n=5, and HSm4131/ MSCs n=4-5)



Supplementary data 2: Effects of the association of HSm4131 (i.v.) and MSCs (i.v.) on functional recovery.

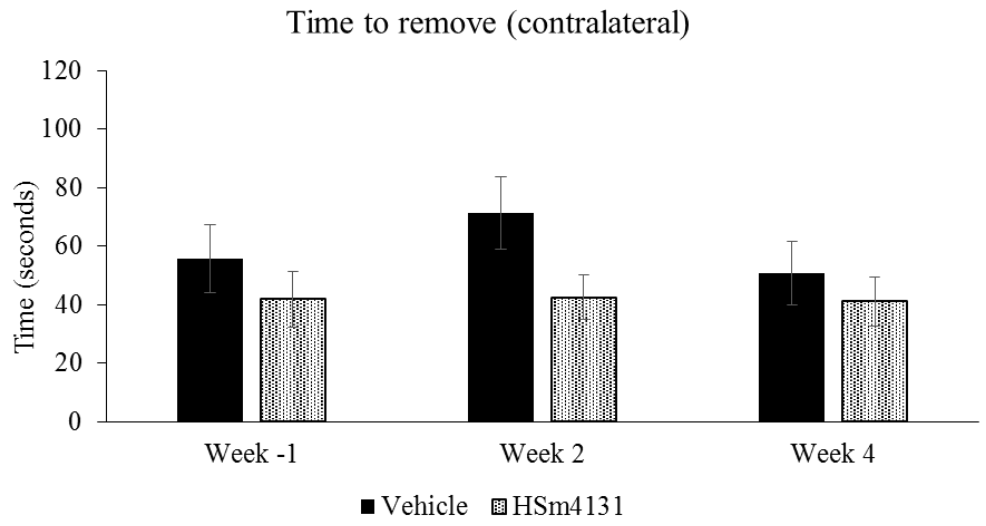
Percentage of the contralateral forepaw use assessed by the limb placing test (median ± IQR) (vehicle/ vehicle n=6, HSm4131/ vehicle n=7, HSm4131/ vehicle+ HSm4131 n=5, vehicle/ MSCs n=9, HSm4131/ MSCs n=7 and HSm4131/ MSCs+ HSm4131 n=8).



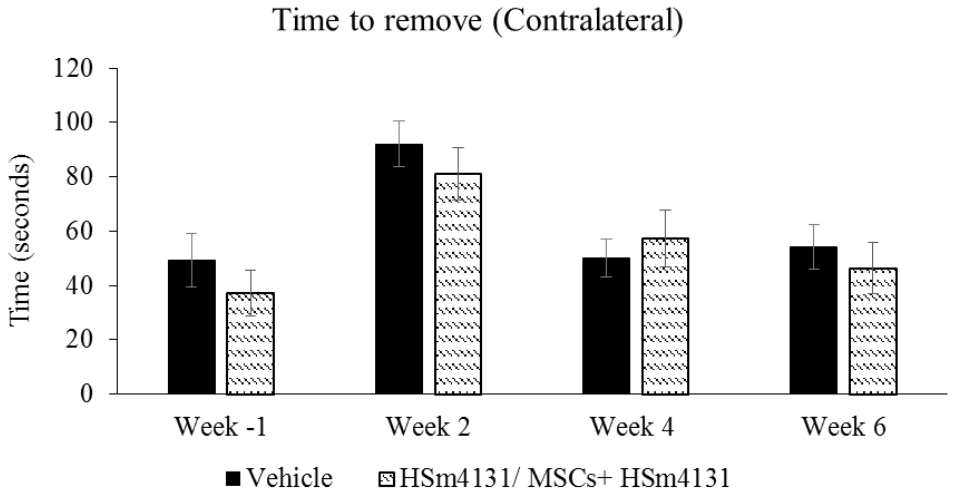
Supplementary data 3: Effects of the association of HSm4131 (i.v.) and MSCs (i.v.) on functional recovery.

The time to remove the adhesive was measured in seconds for the contralateral side. (Mean ± SEM). (Vehicle/ vehicle n=6, Sm4131/ vehicle n=7, HSm4131/ vehicle+ HSm4131 n=5, vehicle/ MSCs n=9, HSm4131/ MSCs n=7 and HSm4131/ MSCs+ HSm4131 n=8).

(A)

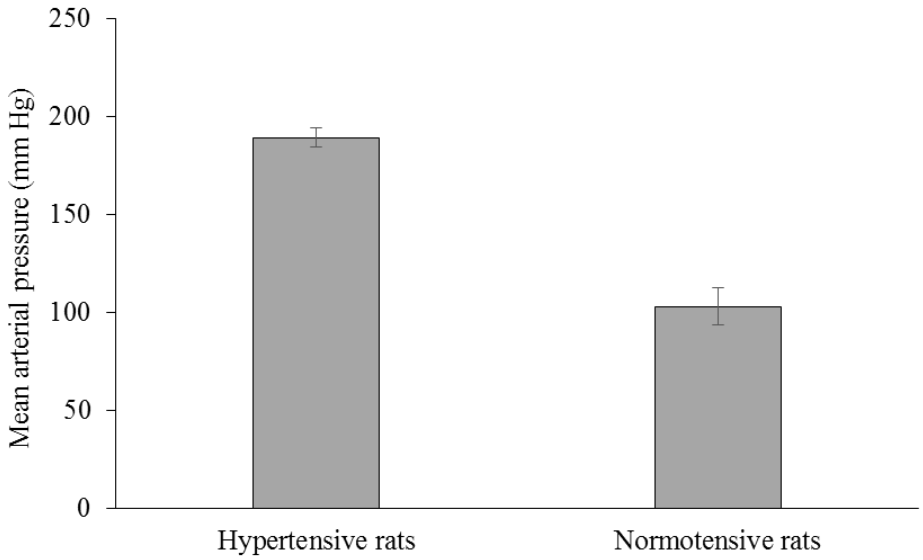


(B)



Supplementary data 4: Effects of the association of HSm4131 (i.v.) and MSCs (i.v.) on functional recovery on hypertensive rats

The time to remove the adhesive was measured in seconds for the contralateral side. (Mean ± SEM) **(A)** (vehicle n=13, HSm4131 n=14) **(B)** (vehicle n=12, HSm4131/ MSCs+ HSm4131 n=9).



Supplementary data 5: Measure of the mean arterial pressure

Measure of the mean arterial pressure (Mean ± SEM) (hypertensive n=12, normotensive n=12)

4.2.2 Résultats et conclusions de l'étude 2 concernant l'effet du RGTA combiné aux CSMs sur la neurorprotection, et la récupération fonctionnelle suite à une ischémie cérébrale.

Dans la première étude concernant l'effet du RGTA sur la neuroprotection et la régénération tissulaire après une ischémie cérébrale nous avons démontré que l'administration du RGTA 1 h après l'ischémie cérébrale à la dose optimale de 0,5 mg/kg offre la meilleure neuroprotection et récupération fonctionnelle des animaux. Dans la présente étude, nous avons utilisé une dose de RGTA de 1,5 mg/kg, qui confère des effets sur la neuroprotection et la récupération fonctionnelle proches de ceux obtenus avec la dose optimale. Elle a donc été utilisée dans cette étude pour mettre en évidence la potentialisation des CSMs par le RGTA.

Les résultats de cette étude 2 concernant l'effet du RGTA combiné aux CSMs sur la neurorprotection, et la récupération fonctionnelle suite à une ischémie cérébrale, ont montré dans un premier temps que le RGTA administré 1 h après l'occlusion potentialise l'effet bénéfique des CSMs, administrées directement en intra-cerébral dans le site de la lésion 24 h après l'induction de l'ischémie, avec une réduction du volume lésionnel dès 2 jours après le début du traitement. Ce résultat a été également retrouvé avec une administration des CSMs par voie intraveineuse qui est cliniquement plus pertinente que la voie intracérébrale. De plus, cette neuroprotection s'accompagne d'une meilleure récupération fonctionnelle à long terme (4 à 6 semaines).

Les résultats prometteurs de la combinaison du RGTA aux CSMs peuvent être expliqués par leurs effets complémentaires. En effet, le potentiel de réparation tissulaire du RGTA passe par sa capacité à restaurer la MEC, les communications cellulaires et l'homéostasie tissulaire (Barritault *et al.* 2017). Ceci est permis, au moins en partie, par la capacité du RGTA à ancrer les facteurs de croissance, tels que le FGF-2, le VEGF, et le TGF-β, jouant des rôles bénéfiques dans la réparation tissulaire (Barritault *et al.* 2017). De plus, la liaison du RGTA à ces facteurs potentialise leur effet,

notamment dans un contexte de lésion tissulaire, où les enzymes protéolytiques activées par l'inflammation, dégradent ces facteurs libérés dans le milieu extracellulaire (Barritault *et al.* 2017). Par ailleurs, les études démontrant l'effet neuroprotecteur des CSMs à la suite d'une ischémie cérébrale, suggèrent que leurs effets passent principalement par une sécrétion de facteurs pléiotropes. Cette suggestion a été émise car d'une part, suite à l'administration intraveineuse des CSMs, celles-ci sont principalement filtrées par le premier passage pulmonaire (Brenneman *et al.* 2010). D'autre part, quand les CSMs se retrouvent dans le site infarci (suite à une administration intracérébrale par exemple), le nombre de cellules décroit rapidement dès les premières heures, indiquant une mort rapide des CSMs (Brenneman et *al.*, 2010). Associé aux CSMs, le RGTA pourrait potentialiser leurs actions en augmentant la survie, la prolifération et la migration des CSMs comme décrit *in vitro* (Frescaline *et al.* 2012). De plus le RGTA peut aussi lier le SDF-1, facteur chimioattractant des CSMs (Friand *et al.* 2009). Il est intéressant de noter que notre étude montre que l'administration du RGTA augmente l'expression de facteurs de croissance tels que le VEGF, l'Ang-2 et le SDF-1 dans l'hémisphère ischémié. Ainsi, le RGTA pourrait favoriser et augmenter la migration des CSMs vers le site lésionnel en augmentant l'expression de SDF-1. Ces observations pourraient expliquer l'effet synergique du RGTA et des CSMs. De façon intéressante, le pouvoir potentialisateur d'une co-administration des CSMs et du RGTA sur la neuroprotection a été retrouvé chez les rats hypertendus avec une diminution de la lésion de l'ordre de 18 % à 2 et 14 jours après l'ischémie cérébrale. Cette diminution du volume lésionnel moins importante chez les rats hypertendus que les normotendus peut être expliquée par une zone de pénombre ischémique moins étendue chez les rats hypertendus. En effet, la pénombre ischémique représente la cible des thérapies de neuroprotection. Or cette région est réduite à la suite d'une ischémie cérébrale chez les rats hypertendus comparativement aux rats normotendus (Letourneur *et al.* 2011).Tout comme chez les rats normotendus, la réduction du volume ischémique chez les SHR s'accompagne d'une

meilleure récupération fonctionnelle des animaux et ce, au moins jusqu'à 6 semaines suivant l'ischémie cérébrale.

En conclusion, l'association du RGTA aux CSMs pourrait constituer une thérapie prometteuse pour le traitement de l'ischémie cérébrale. Par ses effets bénéfiques tant sur la neuroprotection et la récupération fonctionnelle sensorimotrice que ce soit chez les sujet normotendus et hypertendus, cette thérapie pourrait bénéficier à un grand nombre de patients atteints d'AVC ischémique.

5 Discussion générale et perspectives

L'arsenal thérapeutique pour le traitement de l'AVC reste très limité malgré les nombreuses recherches précliniques et cliniques. La thrombectomie par approche endovasculaire a augmenté la fenêtre thérapeutique jusqu'à 6 h qui était alors limitée à 4h30 avec un traitement thrombolytique seul (Abou-Chebl 2011). Malgré cette extension de la fenêtre thérapeutique, l'AVC reste la première cause d'handicap acquis chez l'adulte dans les pays industrialisés.

Jusqu'à ce jour, les thérapies visant à protéger le tissu cérébral ischémique validées sur des tests précliniques se sont révélées être un échec en clinique. Devant ce constat, plusieurs autres approches restent en développement, pour non seulement améliorer la neuroprotection, mais aussi pour favoriser la réparation tissulaire et la récupération fonctionnelle à long terme. Parmi ces nouvelles thérapies on trouve les recherches développant les biomatériaux et les thérapies cellulaires (Detante et *al.*,2014).

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux effets neuroprotecteurs et régénérateurs d'un biomatériau, le RGTA, en combinaison ou non avec les CSMs.

Le RGTA est un polymère de disaccharides liés par des liaisons α 1-6, le rendant résistant à la dégradation enzymatique. En tant qu'analogue des HS, le RGTA peut se lier aux sites de liaisons de l'héparine, présents notamment sur les protéines de structure formant la MEC : collagènes, fibronectine et laminine. Le RGTA peut aussi lier différentes protéines et facteurs de croissance liant l'héparine tels le FGF-1 et -2, le VEGF, ou le TGF-β. Par sa capacité d'augmentation de la biodisponibilité de ces facteurs de croissance, le RGTA a déjà été démontré comme un agent de régénération tissulaire dans divers modèles de lésion: gingivale, osseuse, cutanée, oculaire, musculaire et tendineuse (Barritault *et al.* 2017). De façon intéressante, le RGTA a prouvé son efficacité dans la réparation du tissu myocardique suite à un infarctus chez le babouin (Yamauchi

et al. 2000). En effet, dans cette étude, le RGTA a permis une réduction de 50% du volume de la lésion ischémique avec une récupération fonctionnelle significative de l'activité myocardique.

Au regard de ces résultats prometteurs du RGTA dans la réparation d'un tissu ischémié, nous avons étudié son effet dans la protection et la réparation tissulaire dans un contexte d'ischémie cérébrale. Les résultats préliminaires ont montré une efficacité du RGTA dans la neuroprotection du tissu cérébral suivant une ischémie, accompagnée d'une meilleure récupération fonctionnelle à long terme des animaux. Les résultats de l'optimisation de la fenêtre thérapeutique et de la dose du RGTA ont montré que les effets optimaux ont été obtenus avec une administration 1 h après l'ischémie cérébrale à une dose de 0,5 mg/kg sans altération des paramètres physiologiques tels que la pression artérielle, la tempêtrature ou le pH, montrant ainsi une sécurité quant à l'utilisation de ce produit par voie intraveineuse.

Comparativement au traitement de référence, le rt-PA, une méta-analyse étudiant la fenêtre thérapeutique du rt-PA chez le rongeur a montré que ce dernier n'offrait une neuroprotection que s'il est administré entre 20 et 40 minutes après une ischémie cérébrale comparativement à une administration plus tardive entre 180 et 240 minutes (Orset *et al.* 2016). Avec une fenêtre thérapeutique de 20 à 40 min chez le rongeur, le rt-PA a montré son efficacité de neuroprotection chez l'Homme jusqu'à 4h30 après la survenue de l'AVC. Étant donné que le RGTA offre une neuroprotection chez le rongeur jusqu'à 1 h après l'ischémie cérébrale, on peut alors supposer que la fenêtre thérapeutique du RGTA dans une utilisation clinique pourrait être supérieure à 4h30 après la survenue de l'AVC. De plus, le RGTA est neuroprotecteur avec une dose de 0,5 mg/kg. L'étude de la toxicité du RGTA n'a montré aucun effet du composé avec une administration ponctuelle chez des souris mâles et femelles allant jusqu'à 100 mg/kg (Charef *et al.* 2010), soit une dose 200 fois supérieure à la dose optimale utilisée dans notre étude. En clinique, aucun effet secondaire n'a été rapporté suite à l'utilisation du RGTA chez plus de 25 000 patients (Barritault

et al. 2017). Cependant, ces résultats cliniques sont obtenus avec un traitement topique par des doses faibles de RGTA. Or, dans notre étude, le RGTA pourrait présenter un risque plus élevé de toxicité et d'effets secondaires suite à une administration d'une dose plus importante par voie intraveineuse.

Le faible taux de patients bénéficiant d'une thrombolyse est notamment dû à la fenêtre thérapeutique limitée du rt-PA au-delà de laquelle le traitement présente un risque élevé de transformation hémorragique (Chaturvedi *et al.* 2014). Dans cette optique, par l'absence de toxicité notable, une thérapie à base de RGTA semble cliniquement pertinente chez les patients atteints d'un AVC ischémique. En effet, le RGTA sans induire d'effets secondaires ni d'effets anticoagulants, pourrait être administré rapidement à un plus grand nombre de patients sans caractérisation par imagerie du type d'AVC et sans la connaissance de l'heure de survenue de l'AVC.

Des travaux supplémentaires restent à mener pour déterminer la toxicité du RGTA dans un contexte d'ischemie cérébrale, et sa possible intéraction avec le traitement de référence actuel, la thrombolyse par le rt-PA.

Dans la suite de notre étude nous nous sommes intéressés à la biodistribution et aux effets du RGTA. Nos résultats ont montré que le RGTA atteint l'hémisphère ischémié dans lequel il s'accumule jusqu'à 1 h après son administration. En parallèle, l'étude de la BHE a montré, que l'administration du RGTA diminue son ouverture protégeant ainsi le tissu cérébral d'une aggravation lésionnelle.

En effet, la perméablité de la BHE participe à l'œdème vasogénique suivant l'ischémie cérébrale, augmentant ainsi la pression intracranienne qui peut avoir des conséquences vitales. De plus, cette perméabilité exacerbe la réaction inflmmatoire par une migration plus importante des leukocytes au niveau du tissu cérébrale qui a été montrée comme délètre lors la phase aigue de l'ischémie

cérébrale. Les cellules inflitrées sécretent les facteurs proinflammatoires qui vont augmenter la perméabilité de la BHE et peuvent même avoir pour conséquence une transformation hémorragique (Venkat *et al.* 2017).

D'autre part, les études d'expressions géniques et immunohistochimiques, ont montré que le RGTA augmente l'expression de facteurs de croissance (VEGF et Ang-2), améliore la structure matricielle, et la plasticité cérébrale (angiogenèse et neurogenèse). L'augmentation de l'expression du VEGF et de l'Ang-2 a été précedemment démontrée à l'origine d'une augmentation de l'angiogènese et la neurogènese (Marti *et al.* 2000; X. S. Liu *et al.* 2009; C. Li *et al.* 2017). Desgranges et collègues (1997) ont montré que le RGTA augmente la néovascularisation (Desgranges *et al.* 1997). Plus tard, Rouet et ses collègues ont démontré que le RGTA augmente l'angiogènese par son intéraction avec le VEGF (Rouet *et al.* 2005).

Comme décrit dans l'introduction (1.5.6.1) l'angiogenèse et la neurogenèse sont des processus primordiaux et complémentaires pour la plasticité cérébrale et la récupération fonctionnelle suite à l'ischémie cérébrale. Dans notre étude, une augmentation du VEGF est observée chez les animaux traités au RGTA chez qui nous avons observé un volume de lésion réduit, et une récupération fonctionnelle jusqu'à 54 après l'ischémie cérébrale. L'augmentation du VEGF a été corrélée avec une récupération des patients après un AVC ischémique (Krupinski *et al.* 1994; Slevin *et al.* 2000). Cependant, dans notre laboratoire Valable et ses collègues (2005) ont montré qu'une administration du VEGF lors de la phase aiguë de l'AVC augmente le taux des enzymes MMP-9 qui sont associées à une perméabilisation de la BHE (Valable *et al.* 2005). D'autres études restent nécessaires pour élucider les mécanismes par lesquels le RGTA régule les différents facteurs de croissance tel le VEGF dans un contexte d'ischémie cérébrale menant à la protection et la plasticité du tissu cérébrale.

Au regard des effets bénéfiques du RGTA, sur la MEC et l'environnement cellulaire, nous avons émis l'hypothèse que le RGTA pourrait favoriser et potentialiser une thérapie cellulaire à base de CSMs.

Les études précliniques utilisant les CSMs ont montré plusieurs limites à l'utilisation de ces thérapies cellulaires dans le contexte de l'ischémie cérébrale. En effet, après une administration de CSMs par voie intraveineuse, celles-ci se retrouvent pour la plupart au niveau pulmonaire (Brenneman *et al.* 2010). L'utilisation d'une voie intra-artérielle ou intracérébrale a pour avantage, un dépôt cellulaire directement à proximité du site lésionnel. Cependant, la survie des CSMs dans un environnement ischémique est très limitée, ou le taux de survie est estimé à 1% 24 h après leur administration (Song *et al.* 2010). Malgré une survie réduite après l'administration des CSMs, plusieurs études ont monté que ces cellules procurent un effet neuroprotecteur après une ischémie cérébrale (Nakajima *et al.* 2017).

L'hypothèse actuelle est que cette neuroprotection est dûe à un effet paracrine des CSMs, qui sécrètent des facteurs pléiotropes modulant l'inflammation tissulaire, et stimulant la plasticité cérébrale. Les CSMs sont aussi connues pour secréter des vésicules extracellulaires (VEs), qui modulent l'inflammation, le stress oxydatif et la fibrose tissulaire (Börger *et al.* 2017).

Pour tester notre hypothèse, nous avons évalué l'effet neuroprotecteur d'une co-administration du RGTA avec les CSMs injectées soit par voie intracérébrale soit par voie intraveineuse. Indépendamment, de la voie d'administration des CSMs, leur association avec le RGTA, a donné une plus grande réduction du volume lésionnel et une meilleure récupération fonctionnelle. Ce résultat a même été confirmé en utilisant des rats hypertendus. Cependant, nous constatons qu'en présence d'hypertension artérielle la diminution du volume lésionnel par rapport au groupe contrôle est inférieure chez les rats hypertendus que chez les rats normotendus. Cette baisse de

neuroprotection est explicable par le fait que l'hypertension est un facteur aggravant de l'ischémie cérébrale (Kumar 2016). Chez les rats hypertendus le ratio zone infarcie / pénombre ischémique est augmenté par rapport aux rats normotendus (Letourneur *et al.* 2011). La pénombre ischémique étant la cible des traitements neuroprotecteurs, l'augmentation de l'étendu de la zone infarcie peut diminuer l'effet de ces traitements. En 2001, Relton et collègues (2001) ont étudié en préclinique un traitement neuroprotecteur, le TA-2, un inhibiteur des α-intégrines (Relton *et al.* 2001). Dans cette étude, l'administration du TA-2, 24 h avant une oACM de 1 h, a réduit le volume lésionnel de 56% chez les rats normotendus Sprague Dawley et uniquement de 35% chez les rats SHR hypertendus. Cette diminution de la neuroprotection chez les rats hypertendus pourrait expliquer les nombreux échecs thérapeutiques chez l'Homme puisque 60 à 80 % des patients ayant subi un AVC sont hypertendus dont 50 % ne le savaient pas encore au moment de l'AVC (B. J. Kim *et al.* 2016; Perrine 2018) En effet, les études précliniques utilisent souvent de jeunes rats normotendus, et la neuroprotection obtenues est soit réduite soit inexistante chez les rats hypertendus. Or les études épidémiologiques montrent une plus forte incidence de l'AVC chez des personnes âgées et hypertendues (Perrine 2018).

Plusieurs raisons pourraient expliquer la potentialisation de l'effet bénéfique des CSMs par le RGTA après une ischémie cérébrale. Ce dernier pourrait palier aux principales limites de la thérapie à base de CSMs, à savoir leur migration et leur survie cellulaire dans la zone lésée. En effet, le RGTA augmente l'expression du SDF-1 dans l'hémisphère ischémié, connu pour être chimioattractant pour les CSMs, par son interaction avec son récepteur cellulaire le CXCR4 (Liu et *al.*,2011). De ce fait, le RGTA pourrait favoriser la migration cellulaire des CSMs vers le site lésionnel ce qui augmenterait leur effet neuroprotecteur. Pour confirmer cette hypothèse, une étude plus détaillée de la migration des CSMs est en cours de réalisation.

À la migration pourrait s'ajouter un prolongement de la survie cellulaire médiée par le RGTA. Après une administration des CSMs, celles-ci enclenchent un programme apoptotique à cause de la perte d'adhésion cellulaire à un support matriciel, et du stress environnant. Dans notre étude le RGTA est injecté directement après la reperfusion et les CSMs sont injectées 24 h après avec ou sans ré-administration de RGTA. Or, nous avons montré que le RGTA favorise le maintien de la structure matricielle qui pourrait prolonger la survie cellulaire à leur arrivée sur le site lésionnel. De plus, *in vitro* la survie des CSMs soumis à un stress est significativement augmentée quand les cellules sont associées au RGTA (Frescaline *et al.* 2012). Encore, nous avons montré que le RGTA augmente l'expression du VEGF, or le RGTA potentialise l'action de ce dernier (Rouet *et al.* 2005), qui est aussi connu pour augmenter la survie des CSMs (Penna *et al.* 2013).

Enfin, le mode d'action du RGTA passe par sa capacité à lier les facteurs de croissance, les protégeant d'une dégradation enzymatique augmentant leur biodisponibilité (Barritault *et al.* 2017). Le RGTA pourrait lier les facteurs de croissance sécrétés par les CSMs, et ainsi augmenter leur biodisponibilité et les potentialiser procurant un effet neuroprotecteur optimal.

L'utilisation des CSMs dans une thérapie cellulaire présente de nombreux avantages, elles sont facilement accessibles à partir de nombreux tissus, et ne soulèvent que très peu de questions éthiques. Cependant, en clinique, l'utilisation des CSMs pourrait présenter des désavantages. Pour avoir une quantité suffisante, ces cellules nécessitent une expansion cellulaire préalable à leur administration qui pourrait diminuer leur effet neuroprotecteur. En effet, ces dernières peuvent changer de phénotype et ainsi on pourrait voir leur effet modifié suite à leur mise en culture (Bara *et al.* 2014). De plus, après une administration tardive des CSMs, ces dernières pourraient ne pas franchir la BHE qui se serait alors, au moins, en partie reconstituée et bloquerait ainsi le passage des cellules. Par ailleurs, il existe d'autres facteurs à prendre en compte dans une thérapie cellulaire. De par leur qualité de cellules souches, les CSMs ne présentent pas un risque nul de tumorigenèse,

et l'injection d'un bolus de cellules en intra-artériel pourrait lui-même présenter un risque d'occlusions vasculaires (Detante *et al.* 2014).

Face à ce désavantage, une alternative dans la recherche de futures thérapies serait l'utilisation du milieu de culture des CSMs ou de l'utilisation directe des vésicules secrétées par les CSMs qui contiennent différents facteurs de croissance, ou facteurs immunomodulateurs. L'utilisation de ces dernières pourrait ainsi pallier à toutes les problématiques citées précédemment tout en ayant le même effet neuroprotecteur et neuroréparateur que les CSMs, comme il a été démontré dans plusieurs études précliniques (Xin *et al.* 2013). En clinique, chez des patients ayant déclaré un AVC, il a été montré une augmentation des VEs issues des CSMs (S. J. Kim *et al.* 2012). Des études cliniques de phase 1 et 2 sont déjà en cours, pour la détermination de l'inocuité du traitement. Les résultats de ce travail de thèse confortent le fait que les CSMs représentent une stratégie prometteuse pour le traitement de l'ischémie cérébrale. Cette thérapie cellulaire semble tout particulièrement intéressante si elle est combinée au RGTA. Comme démontré dans nos résultats, cette thérapie combinée présente des propriétés bénéfiques importantes notamment en termes de protection et de récupération fonctionnelle. En accord avec les recommandations STAIR, des études complémentaires restent cependant à entreprendre pour valider l'effet neuroprotecteur et régénérateur du RGTA et de sa combinaison avec des CSMs sur des primates. Le RGTA et les CSMs, ont montré une efficacité clinique, sans induire de toxicité et d'effets indésirables. La thérapie combinée du RGTA et des CSMs en clinique est donc prometteuse.

6 Références

ABOU-CHEBL, ALEX2011 Intra-Arterial Therapy for Acute Ischemic Stroke. *Neurotherapeutics*, 8 (3): 400–413. doi: 10.1007/s13311-011-0059-8.

ABROUS, D N, M KOEHL and MOAL M.L.2005 Adult Neurogenesis: From Precursers to Network and Physiology. *Physiological Reviews*, 85 (322): 523–569. doi: 10.1152/physrev.00055.2003.

ALEXANDRU, RĂZVAN, ELENA OANA TERECOASĂ, OVIDIU ALEXANDRU BĂJENARU, *et al.*2017 Etiologic Classification of Ischemic Stroke: Where Do We Stand? *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 159: 93–106. doi: 10.1016/j.clineuro.2017.05.019.

ALTMAN, JOSEPH1962 Are New Neurons Formed in the (January): 0–1.

ARVIDSSON, ANDREAS, TOVE COLLIN, DENIZ KIRIK, *et al.*2002 Neuronal Replacement from Endogenous Precursors in the Adult Brain after Stroke. *Nature Medicine*, 8 (9), 5 de August: 963–970. doi: 10.1038/nm747.

ASTRUP, J, B K SIESJÖ and L SYMON1981 Thresholds in Cerebral Ischemia - the Ischemic Penumbra. *Stroke*, 12 (6), 1 de November: 723–5. doi: 10.1161/01.STR.12.6.723.

BAETEN, KIM M and KATERINA AKASSOGLOU2011 Extracellular Matrix and Matrix Receptors in Blood-Brain Barrier Formation and Stroke. *Developmental Neurobiology*, 71 (11), November: 1018–39. doi: 10.1002/dneu.20954.

BANG, OH YOUNG2016 Clinical Trials of Adult Stem Cell Therapy in Patients with Ischemic Stroke. *Journal of Clinical Neurology*, 12 (1): 14. doi: 10.3988/jcn.2016.12.1.14.

BANG, OH YOUNG, JIN SOO LEE, PHIL HYU LEE, *et al.*2005 Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Stroke Patients. *Annals of Neurology*, 57 (6), June: 874–82. doi: 10.1002/ana.20501.

BAO, YI, LUYE QIN, EUNHEE KIM, *et al.*2012 CD36 Is Involved in Astrocyte Activation and Astroglial Scar Formation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32 (8), August: 1567–77. doi: 10.1038/jcbfm.2012.52.

BARA, JENNIFER J., R. GEOFF RICHARDS, MAURO ALINI, *et al.*2014 Concise Review: Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Change Phenotype Following In Vitro Culture: Implications for Basic Research and the Clinic. *STEM CELLS*, 32 (7), July: 1713–1723. doi: 10.1002/stem.1649.

BARRETT, KEVIN M. and JAMES F. MESCHIA2014 Genetic Stroke Syndromes. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*, 20 (2): 399–411. doi:

10.1212/01.CON.0000446109.20539.68.

BARRITAULT, DENIS, MARIE GILBERT-SIRIEIX, KIM LEE RICE, *et al.*2017 RGTA®or ReGeneraTing Agents Mimic Heparan Sulfate in Regenerative Medicine: From Concept to Curing Patients. *Glycoconjugate Journal*, 34 (3): 325–338. doi: 10.1007/s10719-016-9744-5.

BARROS, CLAUDIA S, SANTOS J FRANCO and ULRICH MU2011 Extracellular Matrix : Functions in the Nervous System. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*: 1–25. doi: 10.1101/cshperspect.a005108.

BECK, FRANÇOIS and JEAN BAPTISTE RICHARD2014 La Consommation D'alcool En France. *Presse Medicale*, 43 (10): 1067–1079. doi: 10.1016/j.lpm.2014.02.027.

BECK, HEIKE and KARL H. PLATE2009 Angiogenesis after Cerebral Ischemia. *Acta Neuropathologica*, 117 (5): 481–496. doi: 10.1007/s00401-009-0483-6.

BEDERSON, J B, L H PITTS, M TSUJI, *et al.*2016 Rat Middle Cerebral Artery Occlusion: Evaluation of the Model and Development of a Neurologic Examination. *Stroke*, 17 (3): 472–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3715945>. Accessed December 14, 2016.

BEJOT, YANNICK, EMMANUEL TOUZE, AGNES JACQUIN, *et al.*2009 Épidémiologie Des Accidents Vasculaires Cérébraux Définition Des AVC. *Medecine/Sciences*, 25 (25): 8–9. doi: 10.1051/medsci/2009258-9727.

BENOWITZ, LARRY I and YUQIN YIN2007 Combinatorial Treatments for Promoting Axon Regeneration in the CNS: Strategies for Overcoming Inhibitory Signals and Activating Neurons' Intrinsic Growth State. *Developmental Neurobiology*, 67 (9), August: 1148–65. doi: 10.1002/dneu.20515.

BISHOP, JOSEPH R., MANUELA SCHUKSZ and JEFFREY D. ESKO2007 Heparan Sulphate Proteoglycans Fine-Tune Mammalian Physiology. *Nature*, 446 (7139), 26 de April: 1030–1037. doi: 10.1038/nature05817.

BOISSERAND, LIGIA S. B., TOMONOBU KODAMA, JÉRÉMIE PAPASSIN, *et al.*2016 Biomaterial Applications in Cell-Based Therapy in Experimental Stroke. *Stem Cells International*, 2016: 1–14. doi: 10.1155/2016/6810562.

BOLDRINI, MAURA, CAMILLE A. FULMORE, ALEXANDRIA N. TARTT, *et al.*2018 Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, 22 (4): 589–599.e5. doi: 10.1016/j.stem.2018.03.015.

BONAFE, A., V. COSTALAT, P. MACHI, *et al.*2013 Place de La Thrombectomie Mécanique Dans Le Traitement de L'accident Vasculaire Cérébral À La Phase Aiguë. *Pratique Neurologique - FMC*, 4 (2): 93–96. doi: 10.1016/j.praneu.2013.01.005.

BÖRGER, VERENA, MICHEL BREMER, RITA FERRER-TUR, *et al.*2017 Mesenchymal Stem/stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Potential as Novel Immunomodulatory Therapeutic Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (7). doi: 10.3390/ijms18071450.

BOUGHTON, E. and S. V. MCLENNAN2013 *Biomimetic Scaffolds for Skin Tissue and Wound Repair*. *Biomimetic Biomaterials: Structure and Applications*. Woodhead Publishing Limited. doi: 10.1533/9780857098887.2.153.

BRENNEMAN, MIRANDA, SUSHIL SHARMA, MATTHEW HARTING, *et al.*2010 Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells Enhance Recovery after Acute Ischemic Stroke in Young and Middle-Aged Rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30 (1): 140–149. doi: 10.1038/jcbfm.2009.198.

BROWN, CRAIG E. and TIMOTHY H. MURPHY2008 Livin' on the Edge: Imaging Dendritic Spine Turnover in the Peri-Infarct Zone during Ischemic Stroke and Recovery. *Neuroscientist*, 14 (2): 139–146. doi: 10.1177/1073858407309854.

BROWN, ROBERT A. and JAMES B. PHILLIPS2007 Cell Responses to Biomimetic Protein Scaffolds Used in Tissue Repair and Engineering. *International Review of Cytology*, 262 (7): 75–150. doi: 10.1016/S0074-7696(07)62002-6.

CAPLAN, AI2009 Why Are MSCs Therapeutic? New Data: New Insight. *The Journal of Pathology*, 217 (2), January: 318–324. doi: 10.1002/path.2469.

CARDOSO, FILIPA LOURENÇO, DORA BRITES and MARIA ALEXANDRA BRITO2010 Looking at the Blood-Brain Barrier: Molecular Anatomy and Possible Investigation Approaches. *Brain Research Reviews*, 64 (2): 328–363. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.05.003.

CAREY, JAMES R., KRISTINE R. GREER, TIFFANY K. GRUNEWALD, *et al.*2006 Primary Motor Area Activation during Precision-Demanding versus Simple Finger Movement. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 20 (3): 361–370. doi: 10.1177/1545968306289289.

CARMICHAEL, S. THOMAS, IVONNE ARCHIBEQUE, LINSLEE LUKE, *et al.*2005 Growth-Associated Gene Expression after Stroke: Evidence for a Growth-Promoting Region in Peri-Infarct Cortex. *Experimental Neurology*, 193 (2): 291–311. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.01.004.

CASTILLO-MELENDEZ, MARGIE, TAMARA YAWNO, GRAHAM JENKIN, *et al.*2013 Stem Cell Therapy to Protect and Repair the Developing Brain: A Review of Mechanisms of Action of Cord Blood and Amnion Epithelial Derived Cells. *Frontiers in Neuroscience*, 7 (7 OCT): 1–14. doi: 10.3389/fnins.2013.00194.

CENTONZE, DIEGO, SILVIA ROSSI, ANNA TORTIGLIONE, *et al.*2007 Synaptic Plasticity during Recovery from Permanent Occlusion of the Middle Cerebral Artery. *Neurobiology*

of Disease, 27 (1): 44–53. doi: 10.1016/j.nbd.2007.03.012.

CHAREF, SAID, MICHEL TULLIEZ, LILIANE ESMILAIRE, *et al.*2010 Toxicological Evaluation of RGTA OTR4120, a Heparan Sulfate Mimetic. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (7): 1965–1968. doi: 10.1016/j.fct.2010.04.045.

CHATURVEDI, MAYANK and LESZEK KACZMAREK2014 MMP-9 Inhibition: A Therapeutic Strategy in Ischemic Stroke. *Molecular Neurobiology*, 49 (1): 563–573. doi: 10.1007/s12035-013-8538-z.

CHEN, XIAOGUANG, YI LI, LEI WANG, *et al.*2002 Ischemic Rat Brain Extracts Induce Human Marrow Stromal Cell Growth Factor Production. *Neuropathology : Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 22 (4): 275–279. doi: 10.1046/j.1440-1789.2002.00450.x.

CHO, YU JIN, HYEON SUK SONG, SUKHO BHANG, *et al.*2012 Therapeutic Effects of Human Adipose Stem Cell-Conditioned Medium on Stroke. *Journal of Neuroscience Research*, 90 (9): 1794–1802. doi: 10.1002/jnr.23063.

CHUA, CERES C., NADER RAHIMI, KIMBERLY FORSTEN-WILLIAMS, *et al.*2004 Heparan Sulfate Proteoglycans Function as Receptors for Fibroblast Growth Factor-2 Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2. *Circulation Research*, 94 (3): 316–323. doi: 10.1161/01.RES.0000112965.70691.AC.

CRAMER, STEVEN C.2008 Repairing the Human Brain after Stroke: I. Mechanisms of Spontaneous Recovery. *Annals of Neurology*, 63 (3): 272–287. doi: 10.1002/ana.21393.

CRUZ, YOLANDA, KARLA A. CANTÚ-SALDAÑA and ANTONIO IBARRA2016 Immune System Involvement in the Degeneration, Neuroprotection, and Restoration after Stroke, in *Ischemic Stroke - Updates*. InTech. doi: 10.5772/64318.

DEB, PRABAL, SUASH SHARMA and K. M. HASSAN2010 Pathophysiologic Mechanisms of Acute Ischemic Stroke: An Overview with Emphasis on Therapeutic Significance beyond Thrombolysis. *Pathophysiology*, 17 (3): 197–218. doi: 10.1016/j.pathophys.2009.12.001.

DEQUATRE-PONCHELLE, N., H. TOUZANI, A. BANH, *et al.*2014 Rate of Intravenous Thrombolysis for Acute Ischaemic Stroke in the North-of-France Region and Evolution over Time. *Journal of Neurology*, 261 (7): 1320–1328. doi: 10.1007/s00415-014-7344-5.

DESGRANGES, P, D BARRITAULT, J P CARUELLE, *et al.*1997 Transmural Endothelialization of Vascular Prostheses Is Regulated in Vitro by Fibroblast Growth Factor 2 and Heparan-like Molecule. *The International Journal of Artificial Organs*, 20 (10), October: 589–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9422495>. Accessed January 18, 2017.

DETANTE, O., A. JAILLARD, A. MOISAN, *et al.*2014 Biotherapies in Stroke. *Revue*

Neurologique, 170 (12): 779–798. doi: 10.1016/j.neurol.2014.10.005.

DIENER, HANS CHRISTOPH, KENNEDY R. LEES, PATRICK LYDEN, *et al.*2008 NXY-059 for the Treatment of Acute Stroke: Pooled Analysis of the SAINT I and II Trials. *Stroke*, 39 (6): 1751–1758. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.503334.

DIJKHUIZEN, RICK M, ANEESH B SINGHAL, JOSEPH B MANDEVILLE, *et al.*2003 Correlation between Brain Reorganization, Ischemic Damage, and Neurologic Status after Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats: A Functional Magnetic Resonance Imaging Study. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23 (2): 510–517. doi: 23/2/510 [pii].

DIRNAGL, U, C IADECOLA and M A MOSKOWITZ1999 Pathobiology of Ischaemic Stroke: An Integrated View. 4441. *Trends in Neurosciences*, 22 (9): 391–397. doi: 10.1016/S0166-2236(99)01401-0.

DIRNAGL, ULRICH and MATTHIAS ENDRES2014 Found in Translation: Preclinical Stroke Research Predicts Human Pathophysiology, Clinical Phenotypes, and Therapeutic Outcomes. *Stroke*, 45 (5): 1510–1518. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.004075.

DIRNAGL, ULRICH, COSTANTINO IADECOLA and MICHAEL A. MOSKOWITZ1999 Pathobiology of Ischaemic Stroke: An Integrated View. *Trends in Neurosciences*, 22 (9), 1 de September: 391–397. doi: 10.1016/S0166-2236(99)01401-0.

DORRANCE, ANNE M.2016 The Effects of Hypertension and Stroke on the Cerebral Vasculature, in *Hypertension and Stroke*. Springer International Publishing. Cham: 81–108. doi: 10.1007/978-3-319-29152-9_5.

DRAGO, DENISE, CHIARA COSSETTI, NUNZIO IRACI, *et al.*2013 The Stem Cell Secretome and Its Role in Brain Repair. *Biochimie*, 95 (12), December: 2271–2285. doi: 10.1016/j.biochi.2013.06.020.

ECKERT, MARK A, QUYNH VU, KATE XIE, *et al.*2013 Evidence for High Translational Potential of Mesenchymal Stromal Cell Therapy to Improve Recovery from Ischemic Stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33 (9): 1322–1334. doi: 10.1038/jcbfm.2013.91.

EGASHIRA, YUSUKE, SOU SUGITANI, YUKIYA SUZUKI, *et al.*2012 The Conditioned Medium of Murine and Human Adipose-Derived Stem Cells Exerts Neuroprotective Effects against Experimental Stroke Model. *Brain Research*, 1461: 87–95. doi: 10.1016/j.brainres.2012.04.033.

ELALI, AYMAN and NOËMIE JEAN LEBLANC2016 The Role of Monocytes in Ischemic Stroke Pathobiology: New Avenues to Explore. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8 (FEB): 1–7. doi: 10.3389/fnagi.2016.00029.

ELDRUP, NIKOLAJ, MARIE-LOUISE MOES GRØNHOLDT, HENRIK SILLESEN, *et al.*2006

Elevated Matrix Metalloproteinase-9 Associated with Stroke or Cardiovascular Death in Patients with Carotid Stenosis. *Circulation*, 114 (17): 1847–54. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.593483.

ESNEAULT, ELISE, EMILIE PACARY, DAUPHOU EDDI, *et al.*2008 Combined Therapeutic Strategy Using Erythropoietin and Mesenchymal Stem Cells Potentiates Neurogenesis after Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28: 1552–1563. doi: 10.1038/jcbfm.2008.40.

FITCH, MICHAEL T. and JERRY SILVER2008 CNS Injury, Glial Scars, and Inflammation: Inhibitory Extracellular Matrices and Regeneration Failure. *Experimental Neurology*, 209 (2), February: 294–301. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.05.014.

FRERET, THOMAS, SAMUEL VALABLE, LAURENT CHAZALVIEL, *et al.*2006 Delayed Administration of Deferoxamine Reduces Brain Damage and Promotes Functional Recovery after Transient Focal Cerebral Ischemia in the Rat. *European Journal of Neuroscience*, 23 (7): 1757–1765. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04699.x.

FRESCALINE, GUILHEM, THIBAULT BOUDERLIQUE, MINH BAO HUYNH, *et al.*2012 Glycosaminoglycans Mimetics Potentiate the Clonogenicity, Proliferation, Migration and Differentiation Properties of Rat Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Research*, 8 (2): 180–192. doi: 10.1016/j.scr.2011.09.005.

FRIAND, VERONIQUE, OUALID HADDAD, DULCE PAPY-GARCIA, *et al.*2009 Glycosaminoglycan Mimetics Inhibit SDF-1?CXCL12-Mediated Migration and Invasion of Human Hepatoma Cells. *Glycobiology*, 19 (12): 1511–1524. doi: 10.1093/glycob/cwp130.

FUKUDA, S., CATHERINE A FINI, TAKUMA MABUCHI, *et al.*2004 Focal Cerebral Ischemia Induces Active Proteases That Degrade Microvascular Matrix. *Stroke*, 35 (4), 26 de February: 998–1004. doi: 10.1161/01.STR.0000119383.76447.05.

GAGE, F H, P W COATES, T D PALMER, *et al.*1995 Survival and Differentiation of Adult Neuronal Progenitor Cells Transplanted to the Adult Brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (25): 11879–11883. doi: 10.1073/pnas.92.25.11879.

GAO, F, S M CHIU, D A L MOTAN, *et al.*2016 Mesenchymal Stem Cells and Immunomodulation: Current Status and Future Prospects. *Cell Death and Disease*, 7 (1): e2062. doi: 10.1038/cddis.2015.327.

GARRIGUE, PHILIPPE, LAURA GIACOMINO, CHIARA BUCCI, *et al.*2016 Single Photon Emission Computed Tomography Imaging of Cerebral Blood Flow, Blood–brain Barrier Disruption, and Apoptosis Time Course after Focal Cerebral Ischemia in Rats. *International Journal of Stroke*, 11 (111): 117–126. doi: 10.1177/1747493015607516.

GERRIETS, TIBO, E. STOLZ, M. WALBERER, *et al.*2004 Noninvasive Quantification of Brain Edema and the Space-Occupying Effect in Rat Stroke Models Using Magnetic Resonance Imaging. *Stroke*, 35 (2): 566–571. doi: 10.1161/01.STR.0000113692.38574.57.

GIDDAY, JEFFREY M, YVAN G GASCHE, JEAN-C COPIN, *et al.*2005 Leukocyte-Derived Matrix Metalloproteinase-9 Mediates Blood-Brain Barrier Breakdown and Is Proinflammatory after Transient Focal Cerebral Ischemia, 63110: 558–568. doi: 10.1152/ajpheart.01275.2004.

GORUP, DUNJA, IVAN BOHAČEK, TENA MILIČEVIĆ, *et al.*2015 Increased Expression and Colocalization of GAP43 and CASP3 after Brain Ischemic Lesion in Mouse. *Neuroscience Letters*, 597: 176–182. doi: 10.1016/j.neulet.2015.04.042.

GOSSEAUME, ALEXANDRA, PASCAL LEJEUNE, OLIVIER DE MARCO, *et al.*2016 Mise Au Point Sur Les Accidents Vasculaires Cérébraux. *Revue Francophone d'Orthoptie*, 9 (2): 71–76. doi: 10.1002/14651858.CD000197.pub2.

GREEN, A. R.2008 Pharmacological Approaches to Acute Ischaemic Stroke: Reperfusion Certainly, Neuroprotection Possibly. *British Journal of Pharmacology*, 153 (SUPPL. 1): 325–338. doi: 10.1038/sj.bjp.0707594.

GREENBERG, DAVID and KUNLIN JIN2013 Vascular Endeothelial Growth Factros (VEGFs) and Stroke. *Cellular and Molecular Life Sciences Mol Life Sciences*, 70 (10): 1753–1761. doi: 10.1007/s00018-013-1282-8.Vascular.

GUAN, JIAN, WEIMIN TONG, WENYONG DING, *et al.*2012 Neuronal Regeneration and Protection by Collagen-Binding BDNF in the Rat Middle Cerebral Artery Occlusion Model. *Biomaterials*, 33 (5): 1386–1395. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.073.

GURNIK, STEFANIE, KAVI DEVRAJ, JADRANKA MACAS, *et al.*2016 Angiopoietin-2-Induced Blood–brain Barrier Compromise and Increased Stroke Size Are Rescued by VE-PTP-Dependent Restoration of Tie2 Signaling. *Acta Neuropathologica*, 131 (5): 753–773. doi: 10.1007/s00401-016-1551-3.

GUSTAVSSON, ANDERS, MIKAEL SVENSSON, FRANK JACOBI, *et al.*2011 Cost of Disorders of the Brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology*, 21 (10): 718–779. doi: 10.1016/j.euroneuro.2011.08.008.

HACKETT, M. L. and C. S. ANDERSON2005 Predictors of Depression after Stroke: A Systematic Review of Observational Studies. *Stroke*, 36 (10), 1 de October: 2296–2301. doi: 10.1161/01.STR.0000183622.75135.a4.

HAELEWYN, BENOÎT, THOMAS FRERET, EMILIE PACARY, *et al.*2007 Long-Term Evaluation of Sensorimotor and Mnesic Behaviour Following Striatal NMDA-Induced Unilateral Excitotoxic Lesion in the Mouse. *Behavioural Brain Research*, 178 (2), 28 de March: 235–243. doi: 10.1016/j.bbr.2006.12.023.

HASS, RALF, CORNELIA KASPER, STEFANIE BÖHM, *et al.*2011 Different Populations and Sources of Human Mesenchymal Stem Cells (MSC): A Comparison of Adult and Neonatal Tissue-Derived MSC. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 9, 14 de May: 12. doi: 10.1186/1478-811X-9-12.

HAYASHI, TAKESHI, KOJI ABE and YASUTO ITOYAMA1998 Reduction of Ischemic Damage by Application of Vascular Endothelial Growth Factor in Rat Brain After Transient Ischemia. *Ournal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 18: 887–895.

HILL, JUSTIN J, KUNLIN JIN, XIAO OU MAO, *et al.*2012 Intracerebral Chondroitinase ABC and Heparan Sulfate Proteoglycan Glypican Improve Outcome from Chronic Stroke in Rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (23): 9155–60. doi: 10.1073/pnas.1205697109.

HOUKIN, KIYOHIRO, KOJI ABE and SATOSHI KURODA2017 Cell Therapy against Cerebral Stroke: Comprehensive Reviews for Translational Researches and Clinical Trials. *Cell Therapy against Cerebral Stroke: Comprehensive Reviews for Translational Researches and Clinical Trials*: 1–156. doi: 10.1007/978-4-431-56059-3.

HU, XIAOMING, PEIYING LI, YANLING GUO, *et al.*2012 Microglia/macrophage Polarization Dynamics Reveal Novel Mechanism of Injury Expansion after Focal Cerebral Ischemia. *Stroke*, 43 (11): 3063–3070. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.659656.

HUANG, JUDY, URVASHI M. UPADHYAY and RAFAEL J. TAMARGO2006 Inflammation in Stroke and Focal Cerebral Ischemia. *Surgical Neurology*, 66 (3): 232–245. doi: 10.1016/j.surneu.2005.12.028.

HUANG, LIJIE, ZHE-BAO WU, QICHUAN ZHUGE, *et al.*2014 Glial Scar Formation Occurs in the Human Brain after Ischemic Stroke. *International Journal of Medical Sciences*, 11 (4): 344–8. doi: 10.7150/ijms.8140.

HUANG, LIJIE, ZHE BAO WU, QICHUAN ZHUGE, *et al.*2014 Glial Scar Formation Occurs in the Human Brain after Ischemic Stroke. *International Journal of Medical Sciences*, 11 (4): 344–348. doi: 10.7150/ijms.8140.

HYNES, RICHARD O. and ALEXANDRA NABA2012 Overview of the Matrisome-An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4 (1): 1–16. doi: 10.1101/cshperspect.a004903.

IQBAL, S.2013 A Comprehensive Study of the Anatomical Variations of the Circle of Willis in Adult Human Brains. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7 (11): 2423–2427. doi: 10.7860/JCDR/2013/6580.3563.

IZZARD, ASHLEY S., SARAH HORTON, EGIDIUS H. HEERKENS, *et al.*2006 Middle Cerebral Artery Structure and Distensibility during Developing and Established Phases of Hypertension in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Journal of Hypertension*, 24 (5): 875–880. doi: 10.1097/01.hjh.0000222757.54111.06.

JAILLARD, ASSIA, BERNADETTE NAEGELE, SANDRA TRABUCCO-MIGUEL, *et al.*2009 Hidden Dysfunctioning in Subacute Stroke. *Stroke*, 40 (7): 2473–2479. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.541144.

JIN, R., G. YANG and G. LI2010 Inflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Role of Inflammatory Cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 87 (5): 779–789. doi: 10.1189/jlb.1109766.

JOHNSTONE, BRIAN H and KEITH L MARCH2015 Cell Therapy for Brain Injury. doi: 10.1007/978-3-319-15063-5.

JUNG, SIMON, MARC GILGEN, JOHANNES SLOTBOOM, *et al.*2013 Factors That Determine Penumbral Tissue Loss in Acute Ischaemic Stroke. *Brain : A Journal of Neurology*, 136 (Pt 12): 3554–3560. doi: 10.1093/brain/awt246.

KAKUDA, WATARU, MAARTEN G LANSBERG, VINCENT N THIJS, *et al.*2008 Optimal Definition for PWI/DWI Mismatch in Acute Ischemic Stroke Patients. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 28 (5), 9 de May: 887–891. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600604.

KARSY, MICHAEL, ANDREA BROCK, JIAN GUAN, *et al.*2017 Neuroprotective Strategies and the Underlying Molecular Basis of Cerebrovascular Stroke. *Neurosurgical Focus*, 42 (4): E3. doi: 10.3171/2017.1.FOCUS16522.

KATO, GREGORY J., FRÉDÉRIC B. PIEL, CLARICE D. REID, *et al.*2018 Sickle Cell Disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 4: 1–22. doi: 10.1038/nrdp.2018.10.

KAUR, JASPREET, ZONGHANG ZHAO, GARY M. KLEIN, *et al.*2004 The Neurotoxicity of Tissue Plasminogen Activator? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 24 (9): 945–963. doi: 10.1097/01.WCB.0000137868.50767.E8.

KHATRI, POOJA, LAWRENCE R. WECHSLER and JOSEPH P. BRODERICK2007 Intracranial Hemorrhage Associated with Revascularization Therapies. *Stroke*, 38 (2): 431–440. doi: 10.1161/01.STR.0000254524.23708.c9.

KIM, BEOM JOON, HEE-JOON BAE and LAWRENCE K. S. WONG2016 Pathophysiology and Mechanisms Whereby Hypertension May Cause Stroke, in *Hypertension and Stroke*. Springer International Publishing. Cham: 109–128. doi: 10.1007/978-3-319-29152-9_6.

KIM, HEE JUNG and JEONG-SOO PARK2017 Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-Based Therapy: Advantages and Disadvantages. *Development & Reproduction*, 21 (1), March: 1–10. doi: 10.12717/DR.2017.21.1.001.

KIM, JEONG-HYEON, HYEONG-MIN BYUN, EUI-CHEOL CHUNG, *et al.*2013 Loss of Integrity: Impairment of the Blood-Brain Barrier in Heavy Metal-Associated Ischemic Stroke. *Toxicological Research*, 29 (3), September: 157–64. doi: 10.5487/TR.2013.29.3.157.

KIM, JI-HYUN, DONG WOOK JEKARL, MYUNGSHIN KIM, *et al.*2014 Effects of ECM Protein Mimetics on Adhesion and Proliferation of Chorion Derived Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Medical Sciences*, 11 (3): 298–308. doi: 10.7150/ijms.6672.

KIM, SUK JAE, GYEONG JOON MOON, YEON HEE CHO, *et al.*2012 Circulating Mesenchymal Stem Cells Microparticles in Patients with Cerebrovascular Disease. *PLoS ONE*, 7 (5), January: e37036. doi: 10.1371/journal.pone.0037036.

KOKAIA, ZAAL, PAR THORED, ANDREAS ARVIDSSON, *et al.*2006 Regulation of Stroke-Induced Neurogenesis in Adult Brain-Recent Scientific Progress. *Cerebral Cortex*, 16 (SUPPL. 1). doi: 10.1093/cercor/bhj174.

KOMATSU, KATSUYA, OSAMU HONMOU, JUNPEI SUZUKI, *et al.*2010 Therapeutic Time Window of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow after Cerebral Ischemia. *Brain Research*, 1334: 84–92. doi: 10.1016/j.brainres.2010.04.006.

KOVACS, Z., K. IKEZAKI, K. SAMOTO, *et al.*1996 VEGF and Flt: Expression Time Kinetics in Rat Brain Infarct. *Stroke*, 27 (10), 1 de October: 1865–1873. doi: https://doi.org/10.1161/01.STR.31.8.1863.

KRUPINSKI, J., J. KALUZA, P KUMAR, *et al.*1994 Role of Angiogenesis in Patients with Cerebral Ischemic Stroke. *Stroke*, 25 (9): 1794–1798. doi: 10.1161/01.STR.25.9.1794.

KUMAR, SUDHIR2016 Hypertension and Ischemic Stroke. *Hypertension Journal*, 2 (March): 39–43. doi: 10.5005/jp-journals-10043-0028.

LAU, LORRAINE W., ROWENA CUA, MICHAEL B. KEOUGH, *et al.*2013 Pathophysiology of the Brain Extracellular Matrix: A New Target for Remyelination. *Nature Reviews Neuroscience*, 14 (10): 722–729. doi: 10.1038/nrn3550.

LECOFFRE, CAMILLE, CHRISTINE DE PERETTI, MAURICE GIROUD , AMELIE GABET , OLIVIER GRIMAUD , FRANCE WOIMANT, 5, *et al.*2017 SOMMAIRE // Contents.

LEE, M., J. L. SAVER, B. CHANG, *et al.*2011 Presence of Baseline Prehypertension and Risk of Incident Stroke: A Meta-Analysis. *Neurology*, 77 (14): 1330–1337. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182315234.

LEE, SEUNG-HOON2017 Pathophysiology of Ischemic Stroke, in *Acute Ischemic Stroke*. Springer Singapore. Singapore: 3–25. doi: 10.1007/978-981-10-0965-5_1.

LEE, SOO HYUN, KYUNG SIL JIN, OH YOUNG BANG, *et al.*2015 Differential Migration of Mesenchymal Stem Cells to Ischemic Regions after Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *PLoS ONE*, 10 (8): 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0134920.

LETOURNEUR, ANNELISE, SIMON ROUSSEL, JÉRÔME TOUTAIN, *et al.*2011 Impact of Genetic and Renovascular Chronic Arterial Hypertension on the Acute Spatiotemporal

Evolution of the Ischemic Penumbra: A Sequential Study with MRI in the Rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31 (2): 504–513. doi: 10.1038/jcbfm.2010.118.

LI, CE, BEI ZHANG, YULIAN ZHU, *et al.*2017 Post-Stroke Constraint-Induced Movement Therapy Increases Functional Recovery, Angiogenesis, and Neurogenesis with Enhanced Expression of HIF-1α and VEGF. *Current Neurovascular Research*, 14 (4): 368–377. doi: 10.2174/1567202614666171128120558.

LI, JIMEI, JIN-PING LI, XIAO ZHANG, *et al.*2012 Expression of Heparanase in Vasculature Cells and Astrocytes of the Mouse Brain after Focal Cerebral Ischemia. *Brain Research*, 1433: 137–144. doi: 10.1016/j.brainres.2011.11.032.Expression.

LI, YAN, FENG LIN and WASHINGTON DC2014 Mesenchymal Stem Cells Are Injured by Complement after Their Contact with Serum Mesenchymal Stem Cells Are Injured by Complement after Their Contact with Serum, 120 (17): 3436–3443. doi: 10.1182/blood-2012-03-420612.

LI, YI, MICHAEL CHOPP, JIELI CHEN, *et al.*2000 Intrastriatal Transplantation of Bone Marrow Nonhematopoietic Cells Improves Functional Recovery After Stroke in Adult Mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 20 (9), September: 1311–1319. doi: 10.1097/00004647-200009000-00006.

LIU, XIAN SHUANG, MICHAEL CHOPP, RUI LAN ZHANG, *et al.*2009 Angiopoietin 2 Mediates the Differentiation and Migration of Neural Progenitor Cells in the Subventricular Zone after Stroke. *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (34), 21 de August: 22680–9. doi: 10.1074/jbc.M109.006551.

LIU, XIAOLEI, BIYAN DUAN, ZHAOKANG CHENG, *et al.*2011 SDF-1/CXCR4 Axis Modulates Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Apoptosis, Migration and Cytokine Secretion. *Protein & Cell*, 2 (10), 6 de October: 845–854. doi: 10.1007/s13238-011-1097-z.

LLOYD-JONES, DONALD, ROBERT J. ADAMS, TODD M. BROWN, *et al.*2010 Heart Disease and Stroke Statistics--2010 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 121 (7), 23 de February: e46–e215. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192667.

LONGA, E Z, P R WEINSTEIN, S CARLSON, *et al.*1989 Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion without Craniectomy in Rats. *Stroke*, 20 (1), 1 de January: 84–91. doi: 10.1161/01.str.20.1.84.

MACRAE, IM2011 Preclinical Stroke Research - Advantages and Disadvantages of the Most Common Rodent Models of Focal Ischaemia. *British Journal of Pharmacology*, 164 (4): 1062–1078. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01398.x.

MANOONKITIWONGSA, PANYA S., ROBERT L. SCHULTZ, DOUGLAS B. MCCREERY, *et al.*2004 Neuroprotection of Ischemic Brain by Vascular Endothelial Growth Factor Is

Critically Dependent on Proper Dosage and May Be Compromised by Angiogenesis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 24 (6): 693–702. doi: 10.1097/01.WCB.0000126236.54306.21.

MARTI, HUGO J.H., MYRIAM BERNAUDIN, ANITA BELLAIL, *et al.*2000 Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression Precedes Neovascularization after Cerebral Ischemia. *The American Journal of Pathology*, 156 (3), March: 965–976. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64964-4.

MATTA, JOANE, MARIE ZINS, ANNE LAURE FERAL-PIERSSENS, *et al.*2016 Prévalence Du Surpoids, de L'obésité et Des Facteurs de Risque Cardio-Métaboliques Dans La Cohorte Constances. *Beh* (35–36): 640–646.

MERGENTHALER, PHILIPP, UTE LINDAUER, GERALD A DIENEL, *et al.*2013 Sugar for the Brain: The Role of Glucose in Physiological and Pathological Brain Function. *Trends in Neurosciences*, 36 (10), October: 587–97. doi: 10.1016/j.tins.2013.07.001.

MIHOV, DEYAN and MARTIN SPIESS2015 Glycosaminoglycans: Sorting Determinants in Intracellular Protein Traffic. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 68: 87–91. doi: 10.1016/j.biocel.2015.08.019.

MINNERUP, JENS, BRAD A. SUTHERLAND, ALASTAIR M. BUCHAN, *et al.*2012 Neuroprotection for Stroke: Current Status and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (12): 11753–11772. doi: 10.3390/ijms130911753.

MONTANER, JOAN, J ALVAREZ-SABÍN, CARLOS MOLINA, *et al.*2001 Matrix Metalloproteinase Expression after Human Cardioembolic Stroke: Temporal Profile and Relation to Neurological Impairment. *Stroke*, 32 (8): 1759–66. doi: 10.1161/01.STR.32.8.1759.

MORGAN, MICHAEL J and ZHENG-GANG LIU2011 Crosstalk of Reactive Oxygen Species and NF-κB Signaling. *Cell Research*, 21 (1): 103–115. doi: 10.1038/cr.2010.178.

MOZAFFARIAN, DARIUSH, EMELIA J. BENJAMIN, ALAN S. GO, *et al.*2015 *Heart Disease and Stroke Statistics???2016 Update: A Report From the American Heart Association*. *Circulation*. doi: 10.1161/CIR.0000000000000350.

MUKHERJEE, DEBRAJ and CHIRAG G. PATIL2011 Epidemiology and the Global Burden of Stroke. *World Neurosurgery*, 76 (6): S85–S90. doi: 10.1016/j.wneu.2011.07.023.

MULLANGI, C, R PARHAR, S KHARABSEH, *et al.*2006 New Agent, Regenerating Agent (RGTA) and Bone Marrow Derived CD34+ Lineage Stem Cells Transplantation for the Treatment of Acute Myocardial Infarction. *Indian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 71 (22): 2006.

NAKAJIMA, MASATAKA, CHIKAKO NITO, KOTA SOWA, *et al.*2017 Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Interleukin-10 Promote Neuroprotection in Experimental Acute

Ischemic Stroke. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 6 (September): 102–111. doi: 10.1016/j.omtm.2017.06.005.

NAVARRO-SOBRINO, MÍRIAM, ANNA ROSELL, MAR HERNÁNDEZ-GUILLAMON, *et al.*2011 A Large Screening of Angiogenesis Biomarkers and Their Association with Neurological Outcome after Ischemic Stroke. *Atherosclerosis*, 216 (1): 205–211. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.030.

NECK, JOHAN VAN, BASTIAAN TUK, DENIS BARRITAULT, *et al.*2012 Heparan Sulfate Proteoglycan Mimetics Promote Tissue Regeneration : An Overview. *Tissue Regeneration - From Basic Biology to Clinical Application* (Martin 1997): 69–92. doi: 10.5772/1334.

O'DONNELL, MARTIN J, DENIS XAVIER, LISHENG LIU, *et al.*2010 Risk Factors for Ischaemic and Intracerebral Haemorrhagic Stroke in 22 Countries (the INTERSTROKE Study): A Case-Control Study. *Lancet (London, England)*, 376 (9735), 10 de July: 112–23. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60834-3.

OBY, EMILY and DAMIR JANIGRO2006 The Blood-Brain Barrier and Epilepsy. *Epilepsia*, 47 (11): 1761–1774. doi: 10.1111/j.1528-1167.2006.00817.x.

OPPENHEIM, C and JF MEDER2002 IRM de Diffusion Du Parenchyme Cérébral Ischémique Aigu. *Correspondance En Neurologie Vacsulaire*, II (figure 1): 82–86.

ORSET, CYRILLE, BENOIT HAELEWYN, STUART M. ALLAN, *et al.*2016 Efficacy of Alteplase in a Mouse Model of Acute Ischemic Stroke: A Retrospective Pooled Analysis. *Stroke*, 47 (5): 1312–1318. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.012238.

PATEL, ANITA R., RODNEY RITZEL, LOUISE D. MCCULLOUGH, *et al.*2013 Microglia and Ischemic Stroke: A Double-Edged Sword. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 5 (2): 73–90.

PATRA, JAYADEEP, BENJAMIN TAYLOR, HYACINTH IRVING, *et al.*2010 Alcohol Consumption and the Risk of Morbidity and Mortality for Different Stroke Types - A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Public Health*, 10. doi: 10.1186/1471-2458-10-258.

PELLEGRINI, L., Y. BENNIS, B. GUILLET, *et al.*2013 La Thérapie Cellulaire de L'accident Vasculaire Cér Ébral Ischémique : Du Mythe À La Réalité. *Revue Neurologique*, 169 (4): 291–306. doi: 10.1016/j.neurol.2012.08.009.

PENNA, CLAUDIA, MARIA GIULIA PERRELLI, JEAN PIERRE KARAM, *et al.*2013 Pharmacologically Active Microcarriers Influence VEGF-A Effects on Mesenchymal Stem Cell Survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17 (1): 192–204. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01662.x.

DE PERETTI, CHRISTINE, OLIVIER GRIMAUD, PHILIPPE TUPPIN, *et al.*2012 Prévalence Des Accidents Vasculaires Cérébraux et de Leurs Séquelles et Impact Sur Les Activités de

La Vie Quotidienne : Apports Des Enquêtes Déclaratives Handicap-Santé-Ménages et Handicap-Santé-Institution , 2008-2009. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire*: 2008–2009.

PERRINE, ANNE-LAURE2018 L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE EN FRANCE : PRÉVALENCE, TRAITEMENT ET CONTRÔLE EN 2015 ET ÉVOLUTIONS DEPUIS 2006 / HYPERTENSION IN FRANCE: PREVALENCE, TREATMENT AND MANAGEMENT IN 2015 AND TEMPORAL TRENDS SINCE 2006: 170–179.

PFEFFERKORN, THOMAS and GARY A. ROSENBERG2003 Closure of the Blood-Brain Barrier by Matrix Metalloproteinase Inhibition Reduces rtPA-Mediated Mortality in Cerebral Ischemia with Delayed Reperfusion. *Stroke*, 34 (8): 2025–2030. doi: 10.1161/01.STR.0000083051.93319.28.

PIRES, PAULO W., SAAVIA S. GIRGLA, JONATHON L. MCCLAIN, *et al.*2013 Improvement in Middle Cerebral Artery Structure and Endothelial Function in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats after Macrophage Depletion. *Microcirculation*, 20 (7), October: 650–661. doi: 10.1111/micc.12064.

QUITTET, MARIE-SOPHIE, OMAR TOUZANI, LAURENCE SINDJI, *et al.*2015 Effects of Mesenchymal Stem Cell Therapy, in Association with Pharmacologically Active Microcarriers Releasing VEGF, in an Ischaemic Stroke Model in the Rat. *Acta Biomaterialia*, 15: 77–88. doi: 10.1016/j.actbio.2014.12.017.

RAMA, RAMON and JULIO CESAR GARCIA RODRIGUEZ2012 Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke, in *Acute Ischemic Stroke*. InTech. doi: 10.5772/28300.

RAMOS-CABRER, PEDRO, FRANCISCO CAMPOS, TOMÁS SOBRINO, *et al.*2011 Targeting the Ischemic Penumbra. *Stroke*, 42 (SUPPL. 1). doi: 10.1161/STROKEAHA.110.596684.

RELTON, JANE K, KEVIN E SLOAN, ERICA M FREW, *et al.*2001 Inhibition of a4 Integrin Protects Against Transient Focal Cerebral Ischemia in Normotensive and Hypertensive Rats. *Stroke*, 4: 199–206.

REYNOLDS, B A and S WEISS1992 Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Science (New York, N.Y.)*, 255 (5052), 27 de March: 1707–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1553558>. Accessed July 10, 2018.

RICHARDS, L J, T J KILPATRICK and P F BARTLETT1992 De Novo Generation of Neuronal Cells from the Adult Mouse Brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (18): 8591–5. doi: 10.1073/pnas.89.18.8591.

RIECKER, AXEL, KLAUS GRÖSCHEL, HERMANN ACKERMANN, *et al.*2010 The Role of the Unaffected Hemisphere in Motor Recovery after Stroke. *Human Brain Mapping*, 31 (7): 1017–1029. doi: 10.1002/hbm.20914.

RIKSSON, P ETER S E, E KATERINA P ERFILIEVA, T HOMAS B JÖRK RIKSSON, *et al.*1998 Neurogenesis in the Adult Human Hippocampus, 4 (11): 1313–1317.

ROBERTS, JILL, MICHAEL P. KAHLE and GREGORY J. BIX2012 Perlecan and the Blood-Brain Barrier: Beneficial Proteolysis? *Frontiers in Pharmacology*, 3 AUG (August): 1–5. doi: 10.3389/fphar.2012.00155.

ROLDAN-VALADEZ, E and M LOPEZ-MEJIA2014 Current Concepts on Magnetic Resonance Imaging (MRI) Perfusion-Diffusion Assessment in Acute Ischaemic Stroke: A Review & an Update for the Clinicians. *Indian Journal of Medical Research*, 140 (DEC): 717–728. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L603922774>.

ROSKOSKI, ROBERT2012 ERK1/2 MAP Kinases: Structure, Function, and Regulation. *Pharmacological Research*, 66 (2): 105–143. doi: 10.1016/j.phrs.2012.04.005.

ROUET, VINCENT, YAMINA HAMMA-KOURBALI, EMMANUEL PETIT, *et al.*2005 A Synthetic Glycosaminoglycan Mimetic Binds Vascular Endothelial Growth Factor and Modulates Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (38): 32792–32800. doi: 10.1074/jbc.M504492200.

DE RYCK, M, J VAN REEMPTS, M BORGERS, *et al.*1989 Photochemical Stroke Model: Flunarizine Prevents Sensorimotor Deficits after Neocortical Infarcts in Rats. *Stroke*, 20 (10), October: 1383–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2799870>. Accessed December 14, 2016.

SARRAZIN, STEPHANE, WILLIAM C LAMANNA and JEFFREY D ESKO2011 Heparan Sulfate Proteoglycans: 1–33. doi: 10.1101/cshperspect.a004952.

SAVITZ, SEAN I.2007 A Critical Appraisal of the NXY-059 Neuroprotection Studies for Acute Stroke: A Need for More Rigorous Testing of Neuroprotective Agents in Animal Models of Stroke. *Experimental Neurology*, 205 (1): 20–25. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.03.003.

SCHAECHTER, JUDITH D., CHRISTOPHER I. MOORE, BRENDAN D. CONNELL, *et al.*2006 Structural and Functional Plasticity in the Somatosensory Cortex of Chronic Stroke Patients. *Brain*, 129 (10): 2722–2733. doi: 10.1093/brain/awl214.

SCHALLERT, T, M UPCHURCH, N LOBAUGH, *et al.*1982 Tactile Extinction: Distinguishing between Sensorimotor Analysis of Inter-Hemispheric Receptor Asymmetries in Neostriatum. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 18: 753–759.

SCHALLERT, T, M T WOODLEE, S M FLEMING, *et al.*2002 Disentangling Multiple Types of Recovery from Brain Injury Recovery of Function. *Pharmacology of Cerebral Ischemia* (December): 201–216. <http://homepage.psy.utexas.edu/HomePage/Group/SchallertLAB/Marburg.pdf>.

SCHALLERT, TIMOTHY, SHEILA M. FLEMING, J. LEIGH LEASURE, *et al.*2000 CNS Plasticity and Assessment of Forelimb Sensorimotor Outcome in Unilateral Rat Models of Stroke, Cortical Ablation, Parkinsonism and Spinal Cord Injury. *Neuropharmacology*, 39 (5): 777–787. doi: 10.1016/S0028-3908(00)00005-8.

SCHIFFRIN, ERNESTO L.2004 Remodeling of Resistance Arteries in Essential Hypertension and Effects of Antihypertensive Treatment. *American Journal of Hypertension*, 17 (12): 1192–1200. doi: 10.1016/j.amjhyper.2004.05.023.

SHAH, REENA S and JOHN W COLE2010 Smoking and Stroke: The More You Smoke the More You Stroke. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 8 (7), 10 de July: 917–932. doi: 10.1586/erc.10.56.

SHARIF, ARIANE, GIULIANA PELLEGRINO, CLAIRE TRUBERT, *et al.*2017 Une Niche de Cellules Souches Dans L'hypothalamus Humain Adulte ? *Morphologie*, 101 (335), December: 255. doi: 10.1016/j.morpho.2017.07.038.

SHARP, FRANK R. and GLEN C. JICKLING2014 Modeling Immunity and Inflammation in Stroke: Differences between Rodents and Humans? *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 45 (9): e179–e180. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.005639.

SILVER, JERRY and JARED H. MILLER2004 Regeneration beyond the Glial Scar. *Nature Reviews Neuroscience*, 5 (2), 1 de February: 146–156. doi: 10.1038/nrn1326.

SIST, BERNICE, SAM JOSHVA, BASKAR JESUDASAN, *et al.*2011 Adaptive Plasticity After Focal Ischemic Stroke: 1–29.

SLEVIN, M, J KRUPINSKI, A SLOWIK, *et al.*2000 Serial Measurement of Vascular Endothelial Growth Factor and Transforming Growth Factor-beta1 in Serum of Patients with Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 31 (8): 1863–1870. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10926948>.

SOFRONIEW, MICHAEL V.2009 Molecular Dissection of Reactive Astrogliosis and Glial Scar Formation. *Trends in Neurosciences*, 32 (12): 638–647. doi: 10.1016/j.tins.2009.08.002.

SONG, HEESANG, MIN-JI CHA, BYEONG-WOOK SONG, *et al.*2010 Reactive Oxygen Species Inhibit Adhesion of Mesenchymal Stem Cells Implanted into Ischemic Myocardium via Interference of Focal Adhesion Complex. *STEM CELLS*, 28 (3), 31 de March: N/A-N/A. doi: 10.1002/stem.302.

SORRELLS, SHAWN F., MERCEDES F. PAREDES, ARANTXA CEBRIAN-SILLA, *et al.*2018 Human Hippocampal Neurogenesis Drops Sharply in Children to Undetectable Levels in Adults. *Nature*, 555 (7696): 377–381. doi: 10.1038/nature25975.

SOUSA, BRUNA R., RICARDO C. PARREIRA, EMERSON A FONSECA, *et al.*2014 Human

Adult Stem Cells from Diverse Origins: An Overview from Multiparametric Immunophenotyping to Clinical Applications. *Cytometry Part A*, 85 (1), 1 de January: 43–77. doi: 10.1002/cyto.a.22402.

SPEES, JEFFREY L., CARL A. GREGORY, HARPREET SINGH, *et al.*2004 Internalized Antigens Must Be Removed to Prepare Hypoimmunogenic Mesenchymal Stem Cells for Cell and Gene Therapy. *Molecular Therapy*, 9 (5): 747–756. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.02.012.

SUK, S.-H., R. L. SACCO, B. BODEN-ALBALA, *et al.*2003 Abdominal Obesity and Risk of Ischemic Stroke: The Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke*, 34 (7): 1586–1592. doi: 10.1161/01.STR.0000075294.98582.2F.

SUN, YUNJUAN, KUNLIN JIN, LIN XIE, *et al.*2003 VEGF-Induced Neuroprotection, Neurogenesis, and Angiogenesis after Focal Cerebral Ischemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 111 (12), 15 de June: 1843–51. doi: 10.1172/JCI17977.

TAKAHASHI, HISAAKI, HIROAKI MATSUMOTO, YOSHIAKI KUMON, *et al.*2007 Expression of Heparanase in Nestin-Positive Reactive Astrocytes in Ischemic Lesions of Rat Brain after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion. *Neuroscience Letters*, 417 (3): 250–254. doi: 10.1016/j.neulet.2007.02.075.

TALWAR, TANU and MADAKASIRA VASANTHA PADMA SRIVASTAVA2014 Role of Vascular Endothelial Growth Factor and Other Growth Factors in Post-Stroke Recovery. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 17 (1), January: 1–6. doi: 10.4103/0972-2327.128519.

TANG, YUAN, XIAOLIANG GAN, RABE'E CHEHELTANI, *et al.*2014 Targeted Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor Improves Stem Cell Therapy in a Rat Myocardial Infarction Model. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10 (8): 1711–1718. doi: 10.1016/j.nano.2014.06.001.

TOYODA, K., M. IDA and K. FUKUDA2001 Fluid-Attenuated Inversion Recovery Intraarterial Signal: An Early Sign of Hyperacute Cerebral Ischemia. *American Journal of Neuroradiology*, 22 (6): 1021–1029.

TSAI, MAY-JYWAN, SHEN-KOU TSAI, BO-RUEI HU, *et al.*2014 Recovery of Neurological Function of Ischemic Stroke by Application of Conditioned Medium of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Derived from Normal and Cerebral Ischemia Rats. *Journal of Biomedical Science*, 21 (1): 5. doi: 10.1186/1423-0127-21-5.

TURNER, RENÉE J and FRANK R SHARP2016 Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10: 56. doi: 10.3389/fncel.2016.00056.

VALABLE, SAMUEL, JOAN MONTANER, ANITA BELLAIL, *et al.*2005 VEGF-Induced BBB Permeability Is Associated with an MMP-9 Activity Increase in Cerebral Ischemia: Both

Effects Decreased by Ang-1. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25 (11): 1491–1504. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600148.

DE VASCONCELOS DOS SANTOS, ANDRÉIA, JULIANA DA COSTA REIS, BRUNO DIAZ PAREDES, *et al.*2010 Therapeutic Window for Treatment of Cortical Ischemia with Bone Marrow-Derived Cells in Rats. *Brain Research*, 1306, 8 de January: 149–158. doi: 10.1016/J.BRAINRES.2009.09.094.

VENKAT, POORNIMA, MICHAEL CHOPP and JIELI CHEN2017 Blood-Brain Barrier Disruption, Vascular Impairment, and Ischemia/ Reperfusion Damage in Diabetic Stroke. *Journal of the American Heart Association*, 6 (6): 1–11. doi: 10.1161/JAHA.117.005819.

WANG, Q, X TANG and M YENARI2007 The Inflammatory Response in Stroke. *Journal of Neuroimmunology*, 184 (1–2), March: 53–68. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.11.014.

WANG, TY, JS FORSYTHE, CL PARISH, *et al.*2012 Biofunctionalisation of Polymeric Scaffolds for Neural Tissue Engineering. *Journal of Biomaterials Applications*, 27 (4), 5 de November: 369–390. doi: 10.1177/0885328212443297.

WEBER, RALPH, PEDRO RAMOS-CABRER, CARLOS JUSTICIA, *et al.*2008 Early Prediction of Functional Recovery after Experimental Stroke: Functional Magnetic Resonance Imaging, Electrophysiology, and Behavioral Testing in Rats. *The Journal of Neuroscience*, 28 (5): 1022–1029. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4147-07.2008.

WILGUS, TRACI A.2012 Growth Factor–Extracellular Matrix Interactions Regulate Wound Repair. *Advances in Wound Care*, 1 (6): 249–254. doi: 10.1089/wound.2011.0344.

WINSHIP, IAN R. and TIMOTHY H. MURPHY2009 Remapping the Somatosensory Cortex after Stroke: Insight from Imaging the Synapse to Network. *Neuroscientist*, 15 (5): 507–524. doi: 10.1177/1073858409333076.

WON, SOONMI, JIN HWAN LEE, BUSHRA WALI, *et al.*2013 Progesterone Attenuates Hemorrhagic Transformation after Delayed tPA Treatment in an Experimental Model of Stroke in Rats : Involvement of the VEGF – MMP Pathway, 34 (1): 72–80. doi: 10.1038/jcbfm.2013.163.

XIN, HONGQI, YI LI, YISHENG CUI, *et al.*2013 Systemic Administration of Exosomes Released from Mesenchymal Stromal Cells Promote Functional Recovery and Neurovascular Plasticity after Stroke in Rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33 (11): 1711–1715. doi: 10.1038/jcbfm.2013.152.

XING, C., X. WANG, C. CHENG, *et al.*2014 Neuronal Production of Lipocalin-2 as a Help-Me Signal for Glial Activation. *Stroke*, 45 (7), 1 de July: 2085–2092. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.005733.

XING, CHANGHONG, KEN ARAI, ENG H LO, *et al.*2012 Pathophysiologic Cascades in

Ischemic Stroke. *International Journal of Stroke : Official Journal of the International Stroke Society*, 7 (5), July: 378–85. doi: 10.1111/j.1747-4949.2012.00839.x.

YAMADA, TAIHEI, AURELIEN KEREVER, YUSUKE YOSHIMURA, *et al.*2017 Heparan Sulfate Alterations in Extracellular Matrix Structures and Fibroblast Growth Factor-2 Signaling Impairment in the Aged Neurogenic Niche. *Journal of Neurochemistry*, 142 (4): 534–544. doi: 10.1111/jnc.14081.

YAMAUCHI, H, P DESGRANGES, L LECERF, *et al.*2000 New Agents for the Treatment of Infarcted Myocardium. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14 (14): 2133–4. doi: 10.1096/fj.99-0565fje.

YANG, YI and GARY A. ROSENBERG2015 Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Targets for Stroke. *Brain Research*, 1623: 30–38. doi: 10.1016/j.brainres.2015.04.024.

YANO, SHUNSUKE, SATOSHI KURODA, HIDEO SHICHINOHE, *et al.*2005 Do Bone Marrow Stromal Cells Proliferate after Transplantation into Mice Cerebral Infarct? - A Double Labeling Study. *Brain Research*, 1065 (1–2): 60–67. doi: 10.1016/j.brainres.2005.10.031.

YASHIRO, MASAKAZU and TASUKU MATSUOKA2016 Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling as Therapeutic Targets in Gastric Cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22 (8): 2415–2423. doi: 10.3748/wjg.v22.i8.2415.

ZALEWSKA, TERESA, MAŁGORZATA ZIEMKA-NAŁĘCZ, ANNA SARNOWSKA, *et al.*2002 Involvement of MMPs in Delayed Neuronal Death after Global Ischemia. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 62 (2): 53–61.

ZAREMBA, J and J LOSY2001 Early TNF-Alpha Levels Correlate with Ischaemic Stroke Severity. *Acta Neurologica Scandinavica*, 104 (5): 288–95. doi: 053 [pii].

ZHAO, X., H. WANG, G. SUN, *et al.*2015 Neuronal Interleukin-4 as a Modulator of Microglial Pathways and Ischemic Brain Damage. *Journal of Neuroscience*, 35 (32): 11281–11291. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1685-15.2015.

ZHONG, JIN, ALBERT CHAN, LEERON MORAD, *et al.*2010 Hydrogel Matrix to Support Stem Cell Survival After Brain Transplantation in Stroke. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 24 (7), 27 de September: 636–644. doi: 10.1177/1545968310361958.

7 Annexe : étude Drepagreffe

L'étude Drepgreffe est une étude prospective multicentrique nationale comparant les résultats de l'allogreffe génoidentique au programme transfusionnel chez les enfants drépanocytaires avec vasculopathie cérébrale détectée par le Doppler transcrânien.

Comme mentionné dans l'introduction, la drépanocytose, est un facteur de risque de l'ischémie cérébrale. En effet, par une greffe de moelle osseuse cette étude vise à réduire le risque de survenue des complications liées à la drépanocytose et particulièrement l'AVC ischémique. Les échantillons plasmatiques des patients ont aussi été analysés pour caractériser plusieurs biomarqueurs de l'efficacité thérapeutique tels que le VEGF, ou l'Ang-2 pour mettre en évidence une corrélation entre l'expression des facteurs analysés avec l'efficacité thérapeutique.

Les résultats de cette étude sont en cours d'analyse.

Contemporary Clinical Trials 62 (2017) 91–104

Contents lists available at ScienceDirect

Contemporary Clinical Trials

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

Design of the DREPAGREFFE trial: A prospective controlled multicenter study evaluating the benefit of genoidentical hematopoietic stem cell transplantation over chronic transfusion in sickle cell anemia children detected to be at risk of stroke by transcranial Doppler (NCT 01340404)

Sylvie Chevret[a,*], Suzanne Verlhac[b,t], Elisabeth Ducros-Miralles[c], Jean-Hugues Dalle[d], Regis Peffault de Latour[e], Mariane de Montalembert[f], Malika Benkerrou[g], Corinne Pondarré[h,c], Isabelle Thuret[i], Corinne Guitton[j], Emmanuelle Lesprit[k], Maryse Etienne-Julan[l], Gisèle Elana[m], Jean-Pierre Vannier[n], Patrick Lutz[o], Bénédicte Neven[p], Claire Galambrun[i], Catherine Paillard[o], Camille Runel[q], Charlotte Jubert[q], Cécile Arnaud[c], Annie Kamdem[c], Valentine Brousse[f], Florence Missud[g], Marie Petras[l], Lydia Doumdo-Divialle[l], Claire Berger[r], Françoise Fréard[c], Olivier Taieb[s], Elise Drain[s], Monique Elmaleh[t], Manuela Vasile[t], Yacine Khelif[u], Myriam Bernaudin[u], Philippe Chadebech[v], France Pirenne[v], Gérard Socié[e], Françoise Bernaudin[c]

[a] Statistical, Methodology Department, Paris-St-Louis Hospital, Paris-Diderot University, France
[b] Medical Imaging Department, Referral Center for Sickle Cell Disease, Créteil-CHIC Hospital, Créteil, France
[c] Pediatric Department, Referral Center for Sickle Cell Disease, Créteil-CHIC Hospital, Paris-Est University, Créteil, France
[d] Pediatric Hematology Department, Paris-Debré Hospital, Paris-Diderot University, France
[e] Hematology Department, Paris-St-Louis Hospital, Paris-Diderot University, France
[f] Pediatric Department, Referral Center for Sickle Cell Disease, Paris-Necker Hospital, Paris-Descartes University, France
[g] Pediatric Department, Referral Center for Sickle Cell Disease, Paris-Debré Hospital, Paris-Diderot University, France
[h] Pediatric Hematology Department, Lyon Léon Bérard Center, Lyon, France
[i] Pediatric Hematology Department, Marseille-la Timone Hospital, Aix-Marseille University, France
[j] Pediatric Department, Referral Center for Sickle Cell Disease, Bicêtre Hospital, Paris-Sud University, France
[k] Pediatric Department, Referral Center for Sickle Cell Disease, Paris-Trousseau Hospital, Paris-Diderot University, France
[l] Referral Center for Sickle Cell Disease, Pointe à Pitre Hospital, Antilles University, Guadeloupe, France
[m] Pediatric Department, Referral Center for Sickle Cell Disease, Fort de France Hospital, Antilles University, Martinique, France
[n] Pediatric Hematology Department, Rouen-Charles-Nicolle Hospital, Rouen University, France
[o] Pediatric Onco-Hematology Department, Strasbourg-Hautepierre Hospital, Strasbourg University, France
[p] Pediatric Immuno-Hematology Department, Paris-Necker Hospital, Paris-Descartes University, France
[q] Pediatric Hematology Department, Bordeaux-Hospital, Bordeaux University, France
[r] Onco-Hematology Department, St-Etienne Hospital, St-Etienne University, France
[s] Ethno-Psychiatry Department, Avicenne-Hospital, Paris-13 University, France
[t] Pediatric Imaging Department, Robert-Debré Hospital, Paris-Diderot University, France
[u] Normandie Univ, UNICAEN, CEA, CNRS, ISTCT/CERVOxy group, 14000 Caen, France
[v] EFS Ile de France, IMRB INSERM U955 équipe 2 (Créteil), GR-Ex (Paris) and Paris-Est-Créteil University, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Sickle cell anemia
Transcranial Doppler

ABSTRACT

Background: Children with sickle cell anemia (SCA) have an 11% risk of stroke by the age of 18. Chronic transfusion applied in patients detected to be at risk by transcranial Doppler allows a significant reduction of stroke risk. However, chronic transfusion exposes to several adverse events, including alloimmunization and iron

* Corresponding author.
E-mail addresses: sylvie.chevret@paris7.jussieu.fr (S. Chevret), suzanne.verlhac@chicreteil.fr (S. Verlhac), ducros.miralles@free.fr (E. Ducros-Miralles), jean-hugues.dalle@aphp.fr (J.-H. Dalle), regis.peffaultdelatour@aphp.fr (R.P. de Latour), mariane.demontal@aphp.fr (M. de Montalembert), malika.benkerrou@aphp.fr (M. Benkerrou), corinne.pondarre@chicreteil.fr (C. Pondarré), Isabelle.THURET@ap-hm.fr (I. Thuret), corinne.guitton@aphp.fr (C. Guitton), emmanuelle.lesprit@aphp.fr (E. Lesprit), maryse.etienne-julan@chu-guadeloupe.fr (M. Etienne-Julan), gisele.elana@chu-fortdefrance.fr (G. Elana), Jean-Pierre.Vannier@chu-rouen.fr (J.-P. Vannier), Patrick.Lutz@chru-strasbourg.fr (P. Lutz), Benedicte.neven@aphp.fr (B. Neven), Claire.GALAMBRUN@ap-hm.fr (C. Galambrun), catherine.paillard@chru-strasbourg.fr (C. Paillard), camille.runel@chu-bordeaux.fr (C. Runel), charlotte.jubert@chu-bordeaux.fr (C. Jubert), cecile.arnaud@chicreteil.fr (C. Arnaud), annie.kamdem@chicreteil.fr (A. Kamdem), valentine.brousse@chicreteil.fr (V. Brousse), florence.missud@aphp.fr (F. Missud), eleonore.petras@chu-guadeloupe.fr (M. Petras), lydia-divialle.doumdo@chu-guadeloupe.fr (L. Doumdo-Divialle), claire.berger@chu-st-etienne.fr (C. Berger), francoise.freard@wanadoo.fr (F. Fréard), olivier.taieb@aphp.fr (O. Taieb), elise.drain@aphp.fr (E. Drain), monique.elmaleh@aphp.fr (M. Elmaleh), Manuela.Vasile@chicreteil.fr (M. Vasile), khelif@cyceron.Fr (Y. Khelif), bernaudin@cyceron.Fr (M. Bernaudin), philippe.chadebech@efs.sante.fr (P. Chadebech), france.pirenne@efs.sante.fr (F. Pirenne), gerard.socie@aphp.fr (G. Socié), Francoise.Bernaudin@chicreteil.fr (F. Bernaudin).

http://dx.doi.org/10.1016/j.cct.2017.08.008
Received 31 March 2017; Received in revised form 9 August 2017; Accepted 14 August 2017
Available online 15 August 2017
1551-7144/ © 2017 Published by Elsevier Inc.

Cerebral vasculopathy
Chronic transfusion
Hematopoietic stem cell transplantation
Genetic randomization

overload, and is not curative. Hematopoietic stem cell transplantation allows termination of the transfusion program, but its benefit has not been demonstrated.
Design: DREPAGREFFE (NCT01340404) is a multicenter, prospective trial enrolling SCA children younger than 15 years receiving chronic transfusion due to a history of abnormal transcranial Doppler (velocities ≥ 200 cm/s). Only those with at least one non-SCA sibling and parents accepting HLA-typing and transplantation with a genoidentical donor were eligible. Chronic transfusion was pursued in patients with no available donor, whereas others were transplanted. Comparison between the 2 arms (transfusion vs transplantation) was analyzed using both genetic randomization and propensity-score matching as a sensitivity analysis. The primary end-point was the velocity measure at 1 year. Secondary endpoints were the incidence of stroke, silent cerebral infarcts and stenoses, cognitive performance in comparison with siblings, allo-immunization, iron-overload, phosphatidylserine, angiogenesis/hypoxia, brain injury-related factor expression, quality of life and cost.
Objectives: To show that genoidentical transplantation decreases velocities significantly more than chronic transfusion in SCA children at risk of stroke.
Discussion: DREPAGREFFE is the first prospective study to evaluate transplantation in SCA children. It compares the outcome of cerebral vasculopathy following genoidentical transplantation versus chronic transfusion using genetic randomization and causal inference methods.

1. Introduction

In sickle cell anemia (SCA), an inherited blood disorder, more severe complications during infancy are overt stroke, a provider of motor and cognitive sequelae. Before the systematic screening of cerebral velocities with transcranial Doppler (TCD), there was 11–12.8% stroke risk by age 20 [1,2]. Non-invasive TCD, introduced in the 1990s, allows the detection of patients at risk of clinical stroke [3–7]. Abnormal TCD defined by a time-averaged mean velocity (TAMV) ≥ 200 cm/s predicts a 40% stroke risk within 3 years, whereas the risk is lower than 2% in patients with normal TCD (TAMV < 170 cm/s) [8]. The randomized STOP-1 study clearly demonstrated that long-term chronic transfusions maintaining HbS% below 30%, allowed a significant reduction of the risk of stroke by 91% in patients with abnormal velocities [9].

Detection of patients at risk of stroke by TCD led to the reduction of the incidence of first stroke in Californian SCA children from 0.88/100 person-years from 1991 to 1998 to 0.17/100 person-years in 2000 [10]. Bernaudin et al. reported in the Créteil-newborn-cohort that early TCD screening and rapid initiation of transfusions in patients detected at risk reduced the risk of stroke by age 18–20 years from 11 to 12.8% as previously reported to only 1.9% [11]. However, we also showed that the cumulative risk of abnormal TCD was high, reaching a plateau of 30% by age 9 and raising concerns about the number of SCA children requiring chronic transfusions [11].

Considering the risk of severe side effects associated with chronic transfusions such as iron overload and erythroid alloimmunization, the STOP-2 study (1998–2005) assessed whether transfusions after at least 30 months could be safely suspended in patients with normalized TCD and no stenosis, showed that stopping transfusions resulted in reversion to abnormal TCD and stroke occurrence and concluded that it was not safe to stop chronic transfusions in patients with a history or abnormal TCD [12].

Otherwise, we have reported an important improvement in the results of geno-identical hematopoietic stem cell transplantation (SCT) offering > 95% chances of cure in patients transplanted since year 2000 [13]. No stroke and no new silent infarcts were observed in patients who were successfully engrafted, and the velocities were significantly reduced. Moreover, we observed rapid post-transplant velocity normalization in 4 children who still had abnormal velocities despite long-term chronic transfusion [13]. These satisfactory results encourage earlier transplantation to avoid neurological and cognitive sequelae.

However, the risks of this procedure are not negligible, including treatment-related mortality, post-transplant neurological worsening, graft-versus-host disease (GvHD) and gonadal dysfunction, although they are quite reduced when transplantation is performed before the age of 15 [13–19].

These results must be evaluated in a multicenter and prospective manner. Thus, we aimed to prospectively evaluate the benefit of genoidentical transplantation over chronic transfusion in SCA children with cerebral vasculopathy. We hypothesize that genoidentical transplantation, despite unquestionable toxicity but limited at this age of life, allows better prevention or stabilization of cerebral vasculopathy in SCA children.

2. Patients and methods

2.1. Study design

DREPAGREFFE is a national French multicenter prospective interventional controlled non-randomized trial but is defined by the random availability of a genoidentical donor.

2.2. Study objectives

The overall hypothesis is that transplantation, despite unquestionable toxicity but limited at this age of life, will allow better prevention or stabilization of cerebral vasculopathy.

Our primary hypothesis is that genoidentical SCT allows significantly decreasing velocities (i.e., TAMV) at 1 year compared with the chronic transfusion program.

Our secondary hypothesis is that TCD will be normalized (TAMV < 170 cm/s) in a greater proportion of transplanted patients than in those receiving chronic transfusion.

Other hypotheses are that following transplantation, the cerebral vasculopathy will be better stabilized than during chronic transfusion as shown by the following:

- A reduction in the number of silent cerebral infarct new occurrence or recurrence
- A reduction in the number of new stenosis and better stabilization or improvement of pre-existing anatomical stenosis

Abbreviations: SCD, Sickle Cell Disease; SCA, Sickle Cell Anemia; HSCT, Hematopoietic Stem Cell Transplantation; BMT, Bone Marrow Transplantation; CBT, Cord Blood Transplantation; TCD, transcranial Doppler; TCDI, transcranial Doppler Imaging; MRI, Magnetic Resonance Imagery; MRA, Magnetic Resonance Angiography; RBCs, Red Blood Cells; MTX, Methotrexate; CSA, Cyclosporine-A; GvHD, Graft-vs-Host-Disease; MCV, Mean Corpuscular Volume; LDH, Lactate Dehydrogenase; G6PD, Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase; MCA, Middle Cerebral Artery; ACA, Anterior Cerebral Artery; ICA, Internal Carotid Artery; eICA, Extracranial Internal Carotid Artery; FSIQ, Full Scale Intelligence Quotient; IDMC, Independent Data Monitoring Committee; TAMV, Time-averaged mean of the maximum velocity; AFSSAPS, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé; ANSM, Agence Nationale de Sécurité du Médicament

- Neurocognitive performance in SCA children and non-SCA siblings

Moreover, we also test the hypotheses that

- Iron overload will be significantly decreased post-transplant compared with chronic transfusion
- Quality of life will be significantly improved following transplantation

As ancillary studies, we will also perform a comparative study of

- Allo-immunization
- Phosphatidylserine (PS) externalization on red blood cell (RBC) membranes
- Hypoxia/angiogenesis and brain injury-related factor expression
- Costs

2.3. Study organization

The study group for the DREPAGREFFE trial consists of several units: a clinical coordinating center and central imaging center located in Créteil (CHIC hospital), a statistical and data coordinating center in Paris (St. Louis hospital), 13 university teaching hospitals taking care of SCA patients (Créteil, Necker, Robert-Debré, Armand-Trousseau in Paris, Bicêtre, Strasbourg, Rouen, St-Etienne, Lyon, Marseille, Bordeaux, Martinique, Guadeloupe) and 8 stem-cell-transplant units for the realization of transplantations (St. Louis, Robert-Debré, Necker in Paris, Strasbourg, Rouen, Bordeaux, Marseille, Lyon).

An independent external Data Monitoring Committee (DMC) performs periodic, interim safety assessments of the DREPAGREFFE.

2.4. Study population

The eligibility criteria used were as follows:
Inclusion criteria

- SCA children (homozygous SS or sickle/β^0 thalassemia)
- Age < 15 years
- Placed on long-term chronic transfusion due to a history of abnormal TCDI (transcranial Doppler Imaging) (TAMV ≥ 200 cm/s)
- Having at least one non-SCA sibling from the same parental couple who agree to HLA typing and transplantation when available genoidentical donor or extended chronic transfusion for one year in the absence of an available donor
- Informed consent of parents, patients, donors and siblings. Written consent of parents, patients, donors and siblings when aged > 7 years

Exclusion criteria

- Non-SCA disease (not homozygous SS or sickle/β^0 thalassemia)
- Age > 15 years
- No history of abnormal TCDI (TAMV ≥ 200 cm/s)
- Impossibility of receiving transfusions because of alloimmunization
- Lacking non-SCA siblings from the same parental couple
- Parental refusal of HLA typing and transplantation in the case of a genoidentical donor or 1-year extension of chronic transfusion
- No affiliation with a social security scheme

Exclusion criteria for donors

- Positive HIV serology
- P24-positive antigen
- HCV-positive serology
- HBs-positive antigen

2.5. Ethical approvals

Ethical permission was obtained on July 27, 2010 and February 2013 (amendment) from the “Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé” (AFSSAPS) entitled since 2012 “Agence Nationale de Sécurité du Médicament” (ANSM) and the “Comité de Protection des Personnes” (CPP) Ile de France which is the French IRB in charge of this trial. The trial is monitored by an Independent Data Monitoring Committee (IDMC).

3. Study procedures

3.1. Recruitment and screening

The investigators of each SCA center participating in the DREPAGREFFE trial screened their patient cohorts for those with the criteria required for participation and sent the abnormal TCDI scan to Suzanne Verlhac, who coordinates the TCDI, MRI/MRA study of this trial for control and validation.

The SCA children detected as eligible for the trial are seen in consultations as part of their pathology, and the investigator provides appropriate oral and written information to parents, patients and siblings, including the objectives, benefits, constraints and risks of participating in this research. A reflection period of at least one week is granted before obtaining participation consent.

After parental consent, familial HLA typing is performed (patients, siblings and parents when necessary).

3.2. Inclusion

The enrollment visit takes place once eligibility is confirmed, consent obtained, and the HLA typing results are available.

Patients with no identical HLA enter the chronic transfusion group. Patients in whom familial HLA typing shows the availability of a genoidentical donor (HLA identity AB, DR, DQ) are included in the transplantation group.

3.3. Treatments

3.3.1. Chronic Transfusion group

Before each transfusion, blood screening, including complete blood counts, hemoglobin electrophoresis, screening tests for RBC antibodies and iron balance, are performed. Crossmatches are systematic. Viral serologies (HBS, CMV, HIV, HTLV) are conducted at baseline and at 1 year post-inclusion.

The aim of the chronic transfusion program is to maintain HbS below 30% and hemoglobin between 9 and 11 g/dL without increasing the hyperviscosity. The choice between simple transfusions, manual exchange or erythrocytapheresis is left to the investigator of the SCA center.

For those performing simple transfusions scheduled every 4 weeks, the following scheme is proposed as follows:

- 15 ml/kg in the case of hemoglobin < 9 g/dL
- 12 ml/kg in the case of hemoglobin between 9 and 9.5 g/dL
- 10 ml/kg in the case of hemoglobin between 9.5 and 10 g/dL
- In the case of hemoglobin > 10 g/dL, an exchange will be performed or the transfusion delayed by one week.

In this group, chronic transfusion is maintained for at least 1 year post-inclusion, after which the choice of treatment, transfusion discontinuation or extension or switch to hydroxyurea, is left to the investigator.

To limit the iron overload, oral chelation with deferasirox is administered when the ferritin level is > 1000 µg/L two times within a 1-month interval.

3.3.2. Transplantation group

Transplantation is recommended in patients with a genoidentical donor. The donor may be AA, AS or A-thal. In accordance with French laws, the minor donor is received individually and their parents by an independent committee of pediatric experts to collect their free consent. The stem cell source is bone marrow or cord blood that may have been cryopreserved. The minimum cellular dose required for a bone marrow transplant has to be $\geq 2 \times 10^8$ CNT/kg and for a placental blood graft $\geq 3 \times 10^7$ CNT/kg of recipient. In the recipient, HbS must be lower than 30% for anesthesia (required for central catheter placement and ovarian or testis fragment cryopreservation) and conditioning.

3.3.2.1. Conditioning (Fig. 1).

- Busulfex (Busilvex® Pierre Fabre Médicaments, Boulogne-Billancourt, France) from day −10 to day −7 at a total dose of 12.8 mg/kg for patient weighing > 34 kg or 15.2 mg/kg for weights from 23 to 34 kg, 17.6 mg/kg for weights from 16 to 23 kg and 19.2 mg/kg for weights from 9 to 16 kg.
- Cyclophosphamide: At a total dose of 200 mg/kg (50 mg/kg/day IV from day −5 to day −2).
- Rabbit anti-thymoglobulin: Thymoglobulin® (Genzyme) at a total dose of 20 mg/kg: 5 mg/kg/day from day −6 to day −3.

3.3.2.2. Prophylaxis of GvHD. Cyclosporin-A (CSA) is introduced intravenously on day −1 at 2 mg/kg and adjusted to achieve a whole blood target (100–200 ng/ml). Following engraftment, CSA is given orally with tapering initiated at 6 months post-transplant and stopping at 9 months in the absence of GvHD. In the case of intolerance such as seizures or posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES), or in the case of GvHD requiring steroid initiation, which is known to increase the risk of seizure on CSA, it is replaced by mycophenolate-mofetil (MMF) (CellCept®, Roche, Boulogne-Billancourt, France).

Methotrexate (MTX) is given at 15 mg/m^2 at day +1 and then 10 mg/m2 at day +4 and +6.

However, MTX is only given for bone marrow transplantation, whereas only CSA is administered for cord blood transplantation.

Prophylaxis of seizures uses clonazepam during conditioning and cyclosporine-A therapy.

3.4. Risks associated with treatments

3.4.1. Chronic transfusion

3.4.1.1. Infections. The residual risk of viral infection of transfusion origin is minimal in the case of known viruses since it is estimated at 1/3150000 for HIV, 1/10000000 for HCV and 1/640000 for HBV [20].

Parvovirus B19, which is not detected in donors, can have consequences for sickle cell anemia. Nearly 50% of donors are immunized against Parvovirus B19, but the prevalence of this infection and its consequences with regard to transfusion is not clear [21]. Thus, the question remains of the need for negative packed red blood cells for Parvovirus B19 in non-immunized sickle-cell anemia.

Transfusion incidents involving bacterial contamination constitute the major infectious risk (1 bacterial infection for 178,000 labile blood products) and can have dramatic consequences in sickle cell patients [22]. They are mainly due to commensal skin bacteria or post-prandial bacteremia of the donor at the time of collection. Finally, the infectious risk also concerns agents that are not known to date, for which it is not possible to take preventive measures. Patients who are transfused in an iterative manner are potentially at risk.

3.4.1.2. Allo-immunization. Immunological risk remains the major risk of transfusion in sickle cell patients. It is mainly the risk of anti-red blood cell (RBC) alloimmunization. Alloimmunization can lead to life threatening hemolytic transfusion reaction. The anti-RBC alloimmunization is relatively frequent in these patients; it can reach 30–50% according to transfusion studies and transfusion practices and results mainly from ethnic polymorphisms in blood group antigens between donors, mainly of Caucasian origin and recipients of African descent [23]. This polymorphism is found at 3 different levels. (i) Common antigens, which are known to be immunogenic: the RH, FY, JK and MNS antigens. (ii) The variation in common antigens that are incomplete, in which the carrier of a partial antigen can be immunized against the missing epitopes when exposed to complete antigen through transfusion or pregnancy. Approximately 7% of patients carry a partial D antigen [24]. These variants can be found only by identifying the associated alleles in molecular biology, a practice that is not routinely implemented [25,26]. Immunohemolytic accidents and a poor transfusion yield have been associated with the corresponding antibodies. (iii) The rare blood groups characterized by the absence of a high frequency antigen. Specific rare blood groups have been demonstrated in individuals of African descent, requiring identical blood for transfusion. Rare blood units are stored and cryopreserved at the National Rare Blood Bank. The management of transfusion, especially in chronically transfused patients, is a real problem for patients with rare blood types. In general, alloimmunization can be prevented in the RH system; however, the resource is insufficient in terms of packed red blood cells from Afro-Caribbean donors and does not prevent alloimmunization against other antigens [24]. When alloimmunization is established, the risk of immuno-hemolytic accidents and a greater frequency of impaired transfusion performance are observed via different mechanisms. The alloantibody may be unknown because it has disappeared from the serum before transfusion or because the history of alloimmunization is not known [25,26]. The antibody that is reactivated by transfusion sensitizes the transfused RBCs and induces their destruction, often causing concomitant destruction of the patient's own RBCs likely via the effect of oxidative stress generated by the dependent antibody hemolysis but also by non-specific binding to sickle cell RBCs of activated complement fractions [27]. A second mechanism is the production of autoantibodies, which can lead to serious arrays of transfusional hemolytic anemia [28]. Finally, apart from any obvious alloimmunization, transfused RBCs can be destroyed rapidly (within 10 to 15 days) without precisely understanding the mechanism [29]. When alloimmunization extends to many common or specific antigens in these populations, irreversible transfusional impasses can occur, with only the possibility of incompatible transfusions associated with a high risk.

The prevention of these accidents lies mainly in knowledge of the extended phenotype of the patient, matching of the transfused RBCs and pre-transfusional crossmatching in the laboratory. In France, matching for RH and KEL, the most immunogenic blood groups, is mandatory. Matching is extended to the other immunogenic blood groups (FY, JK, LNS) only when patients present a first immunization. It is not possible to extend matching beyond the first intention because of

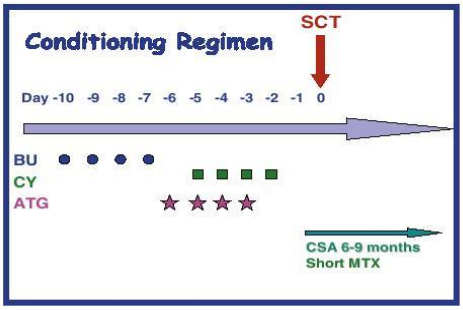


Fig. 1. Conditioning used for the Stem Cell Transplantation.

the supply shortage of units from Afro-Caribbean donors. Finally, crossmatch tests are systematic because they make it possible to overcome some of the deficiencies of the screening test, especially when antibodies against low frequency antigens are produced.

3.4.1.3. Iron overload. Iron overload is unavoidable in long-term transfusion programs. The practice of transfusion exchanges in sickle cell patients makes it possible to limit the potential of iron overload by manual exchanges and even to avoid it with erythrocytapheresis. Iron overload can be responsible for endocrine problems: diabetes, parathyroid hormones, and gonadal and cardiac insufficiencies that only occur after very prolonged transfusion programs over 10 years. To avoid these complications, it is necessary to resort to a chelating treatment, which is, in principle, requested after approximately twenty transfusions. The overload is assessed based on the blood iron balance by the transferrin saturation coefficient and the ferritin level. The reference technique for evaluating iron overload was that obtained by liver biopsy, but liver and cardiac MRI techniques made its assessment easier and less dangerous. Reference chelation involves the use of deferoxamine, the 10-h nocturnal subcutaneous administration of which is extremely restrictive, but the availability of the oral chelator deferasirox improves the compliance of polytransfused patients [30].

3.4.2. Transplantation (SCT)

3.4.2.1. Aplasia. Aplasia during these myeloablative transplants lasts an average of 20 days for bone marrow transplantations and 28 days for cord blood transplants and has a risk of infectious complications, justifying the use of sterile aseptic measures. Nevertheless, because of these measures and the available antibiotherapies, only one aplastic death occurred among 87 transplants [13].

3.4.2.2. Graft-versus-host disease (GvHD). In these genoidentical transplantations, GvHD is related to minor antigenic differences. It is prevented by cyclosporine A administered from day −1 to 9 months post-transplant. During the first 100 days of the transplant, it is called acute GvHD and results in skin signs such as pruritic erythematous rash, which can lead to Lyell, diarrhea-vomiting-malabsorption and hepatic biological signs. It requires the use of corticosteroids and possibly other immunosuppressive therapies such as mycophenolate mofetil (MMF, Cellcept®). Chronic GvHD manifests itself after day 100 in principle in some patients with acute GvHD: it results in mucocutaneous problems such as irregular pigmentation of the skin, labial and jugal lichen, possible scleroderma and/or digestive problems with malabsorption. The most serious complication is the occurrence of obliterans bronchiolitis.

In the context of genoidentical transplantation for sickle cell anemia [13], acute GvHD grade ≥ II was observed in 20% of patients. Factors that were significantly associated with the risk of GvHD were age > 15 years and the presence of a mismatch. No GvHD ≥ II was observed after cord blood transplantation. Moderate chronic GvHD was observed in 11% and extensive GvHD in 2.4% of patients. GvHD was responsible for 4 deaths among 87 patients.

In the present trial, all transplanted patients were younger than 15 years, and all sibling donors were strictly genoidentical, thus the risk of GvHD will likely be probably lower. Moreover, the results improved with time, and we have reported that disease-free survival among 121 transplants since 2000 (2000 − 2010) was 96.8% (95% CI: 93.2–100%) at 3 years [31].

3.4.2.3. Gonadal risk

3.4.2.3.1. In girls. The myeloablative conditioning proposed herein for transplantation in sickle cell anemia increases the risk of prolonged ovarian failure in post-pubertal girls at the time of transplant and results in a fall in estradiol levels and high levels of FSH and LH, requiring the use of estroprogestative treatment and raising fears of further infertility. At this time, the proportion of females that will have definitive or only transient ovarian failure is unknown: it is estimated to be prolonged for at least 10 to 15 years. Consequently, ovarian cryopreservation has been proposed: the specimen is collected under caelioscopy before conditioning, and the ovary is frozen in small fragments. This technique makes it possible to obtain two pregnancies with two live babies in one transplanted ex-sickle cell female [32,33].

When the transplant is performed in the prepubertal girl, an estroprogestative treatment is often necessary to induce puberty when the

Table 1
Assessments scheduled in the DREPAGREFFE Trial.

Treatment group	Inclusion	Geno-identical transplantation or Chronic Transfusion											
Visits		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
Signed written consent	X												
Familial HLA typing	X												
Cerebral vasculopathy assessment	X												
	X												X
• TCD													X
• MRI/MRA													
Cognitive Testing (SCA-child + sibling)													X
	X												X
• WIPPSI-R	X												
• WISC IV													
Ancillary study (3 ml of blood)	X												X
- Hypoxia factors													
- Phosphatidylserin													
Quality of life (SCD-child and parents)	X			X			X			X			X
Anti-HLA	X												X
Chimerism (transplantation arm)	X	X	X	X			X			X			X
Irregular agglutinins + direct Coombs (chronic transfusion arm)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Irregular agglutinins + direct Coombs (transplantation arm)	X			X			X			X			X
Iron balance: Iron, Transferrin saturation, Ferritin	X			X			X			X			X
Liver and heart MRI	X												X
Hemoglobin electrophoresis (chronic transfusion arm)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Hemoglobin electrophoresis (transplantation arm)	X	X	X	X			X			X			X

Monitoring 100% during one year post-inclusion and then, standard cohort follow-up including TCDI and MRI/MRA at 3 years post-inclusion and cognitive testing.

bone age reaches 13 years, but this is not always necessary, and spontaneous normal puberty with normal rates of estradiol and FSH-LH were observed in several girls who were transplanted before puberty [13,34]. Moreover, puberty has been achieved post-transplantation by reimplantation of ovarian fragments obtained before conditioning for transplantation [35].

3.4.2.3.2. In boys. No gonadal hormone disorders have been observed to date in our French series [13,34] in boys: testosterone and FSH-LH levels were normal in relation to their age and pubertal development, which is always assessed post-transplant. However, no semen analysis has yet been performed to assess future fertility. However, the risk of infertility is probably very high despite the apparent possibility of some (very)-long term recovery. As a precautionary measure, testicular cryopreservation is proposed in young sickle cell boys lacking clinical results to date. However, 3 ex-SCA-transplanted males were fathered spontaneously 11, 12 and 20 years post-transplantation.

3.4.2.4. Other risks

3.4.2.4.1. Carcinogenic risk. Treatments with total body irradiation are known to increase the risk of carcinogenesis, but this seems very unlikely with the conditioning used herein without irradiation. Extensive chronic GvHD can also be a risk factor. Regardless, to date, no secondary cancer has been observed in the wake of sickle cell transplantation [34].

3.4.2.4.2. Psychological aspects and quality of life. The impact of a chronic disease on the emotional development of the child and his/her family is major and must be taken into account. The transplantation also increases the risk of stress for the entire family. A retrospective study, supported by the French Institution of Transplantation, was carried out in France on 28 sickle cell patients treated with SCT. The goal was to assess their psychological state and to identify, through their narratives of illness and healing, the psychic and cultural stakes of the healing processes [36]. Of the 28 patients, nine had psychiatric disorders of moderate intensity, requiring specialized follow-up. Most had a positive view of the transplantation and its effects. Interviews showed the importance of individual and family changes. The main issues of healing were donation, the issue of recognition and debt, the building identity especially in adolescence and infertility and its transgenerational repercussions. In addition to cognitive assessment and quality of life, a prospective and comparative study will be performed to evaluate the psychological state of sick children and their evolution during two different treatments: transplantation or chronic transfusion.

3.4.2.4.3. Costs. Studies have reported the cost of chronic transfusion in SCA in the USA [37] and genoidentical transplantation in France [38]. Our study will make it possible to compare the respective costs of these two techniques in a prospective way. The main endpoint is a biological criterion that does not allow a cost effectiveness study to be performed. We will compare the costs of the transplantation strategy with the objective of providing an additional decision criterion. The costs will be estimated in the two groups of treatment (chronic transfusion or transplantation) from the perspective of the health care system for a period of 3 years (duration of patient follow-up) (Table 1).

4. Study assessments

4.1. Clinical and biological history

The electrophoresis of hemoglobin from the patient and his(her) parents in the absence of transfusion or hydroxyurea treatment is recorded or molecular biology analyses performed to determine the presence of homozygous SS or sickle β0-thalassemia. When possible, baseline biological parameters including hemoglobin, reticulocytes, leukocytes, neutrophils, platelets, mean corpuscular volume (MCV), bilirubin, lactate-dehydrogenase (LDH) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity are recorded in the absence of transfusions or molecular biology. Alpha genes and beta-haplotypes are assessed. An extended erythroid phenotype and history of eventual irregular antibodies are recorded.

The clinical history is recorded, including lateralization of the patient, the date and the type of first manifestation related to sickle cell disease, any history of stroke with the date and localization of the neurological deficit, the date of the first transfusion and the number of transfusions performed before inclusion, any splenic sequestration and splenectomy, gallstones and history of cholecystectomy.

At inclusion and at 1 and 3 years post-inclusion, the physical examination includes weight, height, SpO2, systolic and diastolic blood pressure, assessment of splenomegaly or hepatomegaly, puberty scoring, and neurological exam.

4.2. Transcranial Doppler (TCD)

The first article to report interest in TCD in sickle cell children was published in 1990 [39]. By comparing the velocities of 6 affected children with a history of stroke and intracranial stenosis confirmed by angiography and those of 115 affected children without a neurological history, Adams showed that a TAMV in the proximal middle cerebral artery (MCA) or distal internal carotid artery (ICA) greater than or equal to 190 cm/s strongly evoked a focal stenosis [39]. In a larger study of 34 patients aged 2 to 30 years (mean 12 ± 6 years) with stroke, using TCD and angiography as the gold standard, he noted a sensitivity of 90% and a specificity of 100% with the following criteria: a TAMV higher than or equal to 200 cm/s evokes stenosis, absence of flow in the MCA or slow flow < 70 cm/s in MCA favors thrombosis of the ICA and/or MCA, with the recorded slow flow being related to a type of augmentative circulation Moya Moya [5]. Adams then demonstrated the ability of TCD to predict the occurrence of stroke in asymptomatic sickle cell children [8]. One hundred and ninety children were followed for an average of 29 months. Twenty-three had a T-AMV > 170 cm/s. Seven strokes occurred, including six of 23 patients with an abnormal TCD. This result was confirmed by a subsequent study including 125 additional children, which revealed a risk of stroke of 40% within 3 years in children with a TAMV in the terminal ICA or MCA equal to or higher than 200 cm/s compared with 2% if the TCD was normal [8].

Adams used dedicated Doppler (blind or non-imaging TCD) to identify children for treatment. We used a transcranial color Doppler imaging device, combining B-mode imaging with color coding of the Doppler information. TCD and TCDI are similar, provided that TCDI sonographers focused on Doppler signal optimization, including attention to the audible components of the Doppler signal, meticulous tracking of the arterial segments, and careful documentation of the highest velocities [40].

We first verified that the criteria described by Adams in blind transcranial Doppler could be used in our center in TCDI. While we established a threshold value of 170 cm/s, vasculopathy suspected by TCDI in 9 children in a series of 58 children with sickle cell disease was confirmed by angiography in all but one [6]. All four patients with a velocity > 190 cm/s had stenosis. Two of them had no neurological history. Examination of the TCDI data and conventional angiography or magnetic resonance angiography (MRA) revealed that abnormally high velocities do not always correspond to an anatomical stenosis. TCDI detects focal hemodynamic stenosis that precedes the establishment of an organized stenosis but exposes the downstream tissue area to ischemia. It has been demonstrated that the impact of therapeutic intervention at this stage of circulatory disorders may avoid the evolution towards stenosis [41].

In France, color Doppler imaging (TCDI) is used with a low-frequency 2-Mhz transducer, which allows a more accurate identification of the arteries and offers a shorter learning curve for the operator. This

equipment is widely available in imaging departments, and training has been largely given by the SV who coordinates the assessment of the trial by TCDI and MRI/MRA. All SCA centers receive the training provided in the US [42], and early TCDI screening is recommended [7,43,44]. Since June 2011, assessment of the extracranial part of the ICA via the submandibular approach, was systematically added to the circle of Willis assessment [45]. The velocity is recorded on both sides of each cerebral artery: MCA, anterior cerebral artery (ACA), posterior cerebral artery (PCA), basilar artery (BA), internal carotid artery (ICA) and extracranial internal carotid artery (eICA). Velocities are calculated without angle correction to avoid the risk of flow velocity overestimation, and the flow velocity of ACA and eICA were considered for treatment, in addition to MCA and distal ICA velocities. This parameter is the time-averaged mean of the maximum flow velocity (TAMV), also called the mean velocity, as in the STOP study. Because of the inverse linear relationship between the hematocrit and velocity, it is necessary to control the hemoglobin level on the same day of the TCDI to ensure that the patient does not experience acute anemia that could lead to a misinterpretation of the TCDI result. TCDI data are classified according to the STOP study as either normal (TAMV in every artery < 170 cm/s), conditional (170–199 cm/s), abnormal (≥ 200 cm/s in at least one artery) or inadequate (unavailable temporal windows).

For this trial, TAMV in all cerebral arteries are recorded, but the values entering in the analysis for the primary endpoint are the TAMV values in the artery with the highest TAMV value. TCD is performed at inclusion and at 1 and 3 years post-inclusion.

4.3. Magnetic resonance imaging (MRI)

MRI is a very sensitive tool for the detection of ischemic lesions depicted as hypersignals on the T2 and Flair sequences. Three types of lesions are described [46]. Most commonly, ACM-territory and ACA-territory infarcts related to severe stenosis or thrombosis of these major arteries are observed. Cortical watershed infarcts of the cortex and adjacent subcortical white matter that occur at the border zones between major cerebral arterial territories as a result of hypoperfusion may also be observed, as well as internal watershed infarcts of the deep white matter of the centrum semiovale and corona radiata at the border zone between the lenticulostriate perforators and the deep penetrating cortical branches of the MCA or at the border zone of the deep white matter branches of the MCA and the ACA.

A silent infarct is defined as an MRI signal abnormality measuring at least 3 mm in one dimension that is visible on 2 views on the T2-FLAIR weighted images and detected in a patient with no history of overt stroke and normal neurological exam.

For this trial, the scoring applied for ischemic lesions on MRI is as follow: 3 = territorial, 2 = cortical watershed infarct, 1 = internal watershed infarct, and for atrophia: 0 = absent, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe.

4.4. Magnetic resonance angiography (MRA)

This noninvasive angiography has improved considerably in recent years and allows the visualization of arterial thromboses as well as even moderate stenoses [47,48]. The time-of-flight sequence in the three-dimensional acquisition (3D TOF) is most commonly used. The injection of contrast medium is not necessary. The very frequent flow artifacts with older equipment in these fast flowing anemic children in the form of a signal vacuum at the two carotid siphons and M1 segments of the MCA have become less troublesome. Console work with careful reconstruction and artery segmentation facilitate the analysis of each arterial segment and minimize false positives. The number and extent of stenoses occurring since inclusion will be compared in both chronic transfusion and transplantation groups. Attention is also paid to the detection of an abnormal basal collateral arterial network resembling “puff of smoke” so-called Moyamoya vessels, especially when the homolateral ICA and/or MCA are not visible.

The MRI/MRA protocol includes FLAIR, T1, T2, diffusion-weighted sequences and 3D time-of-flight angiography of the Circle of Willis. An additional 3D time-of-flight (TOF) multislab MRA (non-contrasted) sequence exploring extracranial ICA and carotid bifurcations are added.

For this trial, the scoring applied for MRA is as follows: 1 = mild stenosis (25–49%), 2 = moderate stenosis (50–74%), 3 = severe stenosis (75–99%), 4 = occlusion for each artery and for Moya: 0 = absent, 1 = mild, 2 = severe.

4.5. Cognitive testing

In a previous national multicenter prospective study, we enrolled 173 sickle cell children aged from 5 to 15 years between January 1996 and July 1997 for assessment with TCDI, MRI/MRA and cognitive tests, which was also performed in non-SCA siblings. The multivariate analysis showed that ischemic lesions on MRI (OR = 2.76, $p = 0.047$), a low hematocrit $< 20\%$ (OR = 5.85, $p = 0.005$) and thrombocytosis $> 500 \times 10^9$/L (OR = 3.99, $p = 0.004$) were significant independent risk factors for cognitive impairment (Full Scale Intelligence Quotient: FSIQ < 75) [49].

In the present study, the Wechsler intelligence scales used in patients and their siblings participating in the study were the “Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence” (WPPSI-3) for children 3–6 years of age or the “Wechsler Intelligence Scale for Children-4th” (WISC-4) for children 7–16 years of age and the “Wechsler Adult Intelligence Scale” (WAIS-3) for siblings older than 16 years.

4.6. Quality of life and psychological conditions

Health-related quality of life (HRQoL) is a patient-reported outcome (PRO) of how his/her well-being and level of functioning are affected by health or the treatment received. Measurement of HRQoL facilitates our understanding of the burden of disease experienced by patients [50].

In this trial, HRQoL is assessed at inclusion and at 3, 6, 9, 12 and 36 months post-inclusion using the French version of the PedsQL 4.0 generic core scales (physical, emotional, social, school items), which are multidimensional child self-report and parent proxy-report scales with proven reliability and validity in children to distinguish between healthy children and pediatric patients with acute or chronic health conditions [51]. Moreover, the PedsQL™ generic core scales have also been shown to be reliable and valid for use in patients with SCD [52]. Several cross-sectional studies have utilized these scales [53–59] and shown that parents and SCA children report worse HRQoL on all scales compared with healthy black norms, and parents report worse HRQoL than child self-reports [57,59]. Factors associated with a worse overall HRQoL are asthma, pain crises, and missed school [56]. Neurological morbidity in children is associated with worse school HRQoL in child reports and worse overall and psychosocial HRQoL in parent proxy reports [54]. Major pain is associated with worse school functioning in the parent report and with poor physical and psychosocial child self-reports [54].

The aim is to evaluate by self-questionnaire the quality of life of SCA children as well as the quality of family life [60–66], as the transplant or non-transplant may have disrupted or improved the family's experience of the disease.

Psychological conditions are evaluated by psychologists in each center but not measured for research. However, it is scheduled to prospectively interview the parents of the 10 children who undergo transplantation in the present trial, a few weeks before the transplant, a second time three months post-transplant and one year later. Each time, a face-to-face, semi-structured interview is conducted, using interview grids that are specifically designed for each stage of the study. Interviews are conducted by one or two researchers in the pediatric ward in which the medical appointments are usually scheduled.

Researchers are either psychiatrists or psychologists, are all aware of the medical aspects of SCT in SCA, and trained to conduct interviews with specific populations.

4.7. Blood screening

The biological parameters assessed in both arms each month during the 1-year follow-up post-inclusion are described in the table.

Iron overload is studied via blood samples (iron, transferrin saturation, ferritin) collected at baseline and at 3, 6 9, 12 and 36 months post-inclusion in both arms.

In the transplantation arm, donor chimerism is assessed at M1, M2, M3, M6, M9 and M12 and 3 years post-transplant.

4.8. Hepatic and heart MRI

Iron overload may be severe in SCA patients who are highly transfused and must be regularly assessed [67]. Liver iron content (LIC) is a reliable reflection of overall iron content in the organism [68], and MRI has become the reference technique for assessing HIC, replacing liver biopsy because it is noninvasive. Two protocols are used in France that have been validated in comparison to the histological results of iron measurements obtained from liver biopsies: the liver/muscle signal intensity ratio (SIR) developed by Gandon [69] and completed by Rose [70], which requires 5 or 6 sequences and T2* relaxometry with a single multiecho gradient-echo T2 sequence [71]; this sequence is also used to evaluate myocardial iron. Verlhac, who also coordinates this assessment for the trial, reported a study comparing these techniques in 92 MRI performed for highly transfused SCA patients and found a good correlation between them with a Pearson coefficient of 0.89 for measuring HIC of < 16 mg/g [72]. Several studies have shown that there is no correlation between iron overload in the liver and heart, which probably results from different iron accumulation and chelation kinetics in the two organs [73]. This justifies the simultaneous assessment of liver and heart, which is easy with T2* relaxometry.

4.9. Costs

Our trial will allow a comparison of the respective costs of these two techniques in a prospective way. The costs of transplantation are compared to those of chronic transfusion. The costs are estimated from the perspective of the health care system over 3 years (duration of patient follow-up). The resources used are documented prospectively in volume for each patient included in the observation book. These resources include hospitalizations, examinations and ambulatory treatments. The valuation is performed based on national costs when they are available (prices of blood products, rate of ambulatory acts). In terms of hospitalizations, administrative data are used and supplemented if necessary by accounting data. The costs associated with HLA typing, sampling, packaging and, in general, all pre-transplant procedures are also included in the calculations. The hospitalizations occurring post-transplant are also taken into account.

4.10. Biological study

4.10.1. Phosphatidylserine

Phosphatidylserine is a membrane phospholipid that is normally present on the inner side of membranes but is abnormally exposed on sickle-cell RBC membranes [74–76]. Externalization of phosphatidylserine (PS) is one of the key signals for RBC removal and may favor their adherence to endothelial cells. In the context of SCA, this could modify the adhesion properties of RBCs and could increase the risk of vasculopathy. It is possible that RBCs that present PS on their surface are capable of altering blood vessel walls, particularly cerebral vessels, and of participating in the formation of cerebral vasculopathy.

4.10.2. Hypoxia and angiogenic factors

Hypoxia-induced angiogenesis may play an important role in the pathophysiology of SCA. It is well recognized that vascular endothelial growth factors (VEGFs) alone do not play a role in the control of angiogenesis. Indeed, VEGF alone initiates but does not complete angiogenesis [77]. Among the molecules that can function in cooperation with VEGF, angiopoietins should be mentioned. Angiopoietins represent a family of cytokines that are known to have two main members, Angiopoietin-1 (Ang-1) and Angiopoietin-2 (Ang-2), which possess a common receptor called Tie-2. During physiological angiogenesis, angiogenic remodeling involves a preliminary Ang-2 action that destabilizes vascular structures to allow VEGF, if present, to stimulate angiogenesis. In the absence of the latter, vascular regression is observed. Ang-1 intervenes in the late phases of angiogenesis to ensure stabilization of the vascular networks in particular by promoting the recruitment of peri-endothelial cells. This discovery of angiopoietins as synergistic agents of VEGF in the angiogenic balance offers new perspectives to the study of angiogenesis in a pathological context, particularly in cerebral ischemia [78]. Similarly, erythropoietin (EPO) can exert distinct effects from its hematopoietic effects on different organs including the brain. For example, EPO is angiogenic, neuroprotective and its receptor has been identified at the cerebral level [79,80].

Numerous factors lie at the root of angiogenesis, among which tissue hypoxia is known to play a major role in increasing the synthesis of angiogenic factors, in particular via the transcription factor HIF-1 (hypoxia inducible factor-1). Among the angiogenic factors induced by HIF-1 are VEGF, Ang-2 and EPO [81–83]. VEGF, angiopoietins, EPO and the placental growth factor (PlGF) seem particularly interesting in the context of sickle cell anemia. Indeed, the serum level of these molecules, and in particular that of Ang-2, revealed a pro-angiogenic state in adult sickle cells [84]. Moreover, recent data demonstrated that hydroxyurea therapy in SCA was associated with a reduction of the raised levels of Ang1, bFGF and VEGF [81].

It should be noted that in sickle-cell anemia, organic damage is related to vaso-occlusion accidents associated with ischemia-reperfusion. These molecules are known to be involved in post-ischemia and in particular angiogenic processes [82,83,85]. Thus, all these studies highlight the relevance of studying the expression of these hypoxic/angiogenic factors at the serum level in sickle cell children with abnormal Doppler velocities and of comparing their expression during chronic transfusion or after transplantation.

4.10.3. Brain injury-related factor expression

SCA is a chronic illness that causes an increased risk of stroke and progressive brain and cognitive dysfunction. Several studies have highlighted the expression of brain injury-related factors such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and S100B protein as potential peripheral biomarkers of brain damage [86–88]. Therefore, the serum levels of these potential brain-related injury factors will be evaluated at baseline and 12 months post-inclusion in both arms. Moreover, stroke incidence and high TCD velocity have been associated with elevated BDNF in SCA [89]. Plasma BDNF and PDGF-AA levels are associated with high TCD velocity and stroke in children with sickle cell anemia.

Therefore, it will be very interesting to compare the serum level of all these hypoxic/angiogenic and potential brain-related injury factors at baseline and 12 months post-inclusion in both arms.

4.11. Safety assessments

For the patients included in the chronic transfusion program, direct Coombs, irregular agglutinins and iron balance (iron, transferrin saturation, ferritin) will be checked before each transfusion.

For the transplanted patients, the direct Coombs, irregular agglutinins and iron balance (iron, transferrin saturation, ferritin) are performed at 3, 6, 9 and 12 months after inclusion. Anti-HLA testing is

performed at inclusion and 1 year post-inclusion.

An amendment approved by ANSM and CPP in February 2013 allowed extension of the follow-up of patients to 3 years post-inclusion. Thus, blood screening will be assessed again at 3 years as part of the regular follow-up.

4.12. Adverse events

All adverse events (AEs) during the study will be recorded in the case report form, with information about the date of onset and end date (if applicable), severity and seriousness of the AE, investigator's opinion of the relationship to the protocol treatment, treatment for the AE, cause of the event (if known), and information regarding the resolution or outcome. Adverse events classified as serious will be recorded using a serious adverse event reporting tool and reported to the sponsor.

The intensity of an AE is graded according to the National Cancer Institute's Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI CTCAE) version 4.03.

5. Outcome measures

5.1. Efficacy evaluation

The primary outcome of the Drepagreffe trial was the average at 1 year of the velocities (TAMV) of the right and left middle cerebral arteries. This was then modified after the amendment by using the following:

- TAMV recorded in the artery with the highest TAMV value at 12 months after inclusion

The secondary outcomes include the following:

- Incidence of stroke
- Survival without stroke
- TCD velocities in all arteries at 1 and 3 years post-inclusion
- Proportion of patients with normalized velocities at 1 and 3 years (TAMV < 170 cm/s in all arteries).
- Incidence of ischemic lesions on MRI.
  - The number of patients with ischemic lesions that appeared since inclusion is compared in both arms
  - The difference in MRI scoring between inclusion and at 1 and 3 years post-inclusion is compared in both arms
- Incidence of stenosis on MRA
  - The number and extent of stenosis occurring since inclusion
  - The difference in MRA scoring between inclusion and 1 and 3 years post-inclusion
  - MRI/MRA performed at inclusion and at 1 and 3 years post-inclusion will be read again in a blinded manner by 2 experts with no knowledge of the patient's history or treatment
- Cognitive performance in patients and siblings
  - Performance at inclusion and at 1 and 3 years post-inclusion
- Quality of life in patients and parents
- Costs in each arm of treatment
- Expression of membrane phosphatidyl, hypoxia, angiogenic and brain injury-derived factors at 12 months in both arms and comparison with values at inclusion

An amendment approved by ANSM and CPP in February 2013 allowed extension of the follow-up of patients to 3 years post-inclusion. Thus, TCDI, MRI/MRA, quality of life scales, and blood screening, will be assessed again at 3 years as part of the regular follow-up. Only cognitive testing is not included in the regular follow-up and has been financed by another grant.

5.2. Safety evaluation

Alloimmunizations that have appeared since inclusion are compared in both groups. In the transfusion group, the program will be terminated if any iron overload is assessed at inclusion and at 12 and 36 months post-inclusion.

5.3. Sample size consideration

For a type I error rate of 5% risk and 80% statistical power, 21 children should be included in the transplantation group and 42 children in the chronic transfusion group to demonstrate a difference from 140 cm/s to 100 cm/s on the TAMV at 12 months assuming a standard deviation of 40 cm/s, as suggested by our previous data [13], and a prevalence of 1/3 donor availability.

The protocol was amended in February 2013 due to a different prevalence of treatment groups. Therefore, the sample size computation was revised accordingly, as follows. For a type I error rate of 5% risk and a 90% statistical power, and assuming a prevalence of 1/2 donor availability, 63 children should be included to demonstrate a difference from 140 cm/s to 100 cm/s on the TAMV at 12 months assuming a standard deviation of 40 cm/s, as suggested by our previous data [13].

5.4. Duration of the research

The inclusion period was scheduled at 24 months and the follow-up for each patient at 12 months. An amendment was approved by ANSM and CPP in February 2013, which allowed extension of the inclusion period by 6 months and of the follow-up by 24 months. Thus, for the patients, the length of the follow-up is 36 months.

5.5. Statistical analysis

The intention-to-treat (ITT) population will be considered for the analysis. Two primary analyses of the main endpoint will be performed based namely on genetic randomization and using propensity score matching.

Genetic randomization considers the availability of the donor as a result of a random experiment; hence, a rough comparison of the main endpoint across treatment groups will be performed for the whole sample.

At the time of protocol amendment, a propensity score matching analysis was also scheduled for the ITT population as a type of sensitivity analysis.

5.6. Description of the stopping rules

The sponsor and/or regulatory bodies may decide at any time to discontinue the trial prematurely for medical and/or administrative reasons. In all cases, the decision shall be determined after mutual consultation and appropriate documentation of the reasons. The investigator will then return the observation books and all documentation related to the study to the proponent.

Rules for discontinuing the study on an individual scale:

- Patients and parents refusing transfusion protocol will not be included.
- Patients with an identical HLA donor who refuse an allograft will be analyzed for the intention-to-treat population.
- Major alloimmunization prohibiting continuation of the transfusion program.

5.7. Trial status

The French DREPAGREFFE Study is a large prospective multicenter interventional study comparing the outcome of cerebral vasculopathy

in SCA children with a history of an abnormal TCDI. The initial protocol, which was approved by "Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé" (AFSSAPS) and the "Comité de Protection des Personnes" (CPP) on July 27, 2010, scheduled the enrollment of 63 participants and 1-year follow-up.

An amendment, which was approved by "Agence Nationale de Sécurité du Médicament" (ANSM), the new name of AFSSAPS since 2012, and CPP in February 2013, allowed extension of the inclusion period by 6 months and of the follow-up period by 2 years. Thus, the follow-up for each patient is 3 years post-inclusion or transplantation.

Enrollment began on December 31, 2010 and stopped on June 30, 2013. The last transplantation was performed on January 13, 2014 and the clinical follow-up ends on January 2017. The trial is supervised by the Clinical Research Unit in the Paris area.

6. Discussion

This is the first prospective trial to compare transplantation to chronic transfusion in SCA children with cerebral vasculopathy. This multicenter trial enrolled SCA children in long-term chronic transfusion treatment due to a history of abnormal cerebral velocities on TCDI regardless of a history of stroke. The hypothesis is that genoidentical transplantation will facilitate improvement or stabilization of cerebral vasculopathy than chronic transfusion with a favorable balance benefit/risk. The measures of efficacy are velocities on TCDI, silent infarcts and stenoses on MRI/MRA, quality of life and psychological status, iron overload, PS exposure on RBCs, angiogenic factors and costs.

A disadvantage of using observational data for assessing clinical benefit is that treatment groups may differ such that confounding bias can be suspected. Nevertheless, to minimize comparison biases, the availability or not of an HLA-identical sibling donor was considered to be the equivalent of genetic randomization to the allograft or transfusion arm, respectively. Indeed, selection criteria included only patients with at least one non-SCA sibling from the same parental couple who agreed to HLA typing and transplantation when available genoidentical donor. Moreover, we also considered propensity-score matching as a sensitivity analysis to control for potential residual confounding.

The chronic transfusion program applied in patients detected at risk due to abnormal TCD has proven its efficiency for decreasing the risk of stroke by 91% [9], but even after at least 30 months of transfusion in patients with normalized velocities, its discontinuation is not safe and leads to a high risk of stroke or reversion to abnormal TCD [12]. In the Créteil SCA newborn cohort that was screened at an early time point with TCDI, there was a high 29.6% cumulative incidence by age 9 of abnormal TCDI, raising concerns about the number of patients to indefinitely transfuse [11]. To limit these indications of long-term transfusions, a switch to hydroxyurea has been proposed in monocenter [41] and randomized multicenter studies [90]. Hydroxyurea via an increasing hemoglobin level, decreased velocities [91] and inferiority TWITCH trial has shown that hydroxyurea was not inferior to chronic transfusion in SCA children with a history of abnormal TCD who had been previously transfused for at least 1 year [90]. However, as the mean age at enrollment was 9.7 years old and the duration of past transfusions was 4.5 years, we suspect that most of the patients were probably beyond the risk period [92]. Moreover, the short-term follow-up in the TWITCH trial requires caution in determining the safety of this switch [92]. In contrast, in the Créteil SCA cohort, we have extensive experience with the follow-up of 92 patients with a history of abnormal TCDI. A switch to hydroxyurea was prescribed since 1998 to 45 SCA children with normalized velocities and no stenosis. A reversion to abnormal TCDI was observed in 13/45 (28.9%) patients before age 9.5 years, and transfusions were immediately reinitiated to avoid stroke occurrence [93]. Thus, in our opinion, it is cautious to regularly check TCDI after the switch to hydroxyurea [92]. By contrast, in the same cohort, 24 among the 92 patients with a history of abnormal TCDI, were transplanted with a genoidentical sibling, no reversion to abnormal TCD occurred and velocities were normalized in 4 patients who still had abnormal TCDI despite a long-term transfusion program [93]. This monocenter experience encouraged us to propose the prospective multicenter DREPAGREFFE trial.

Silent cerebral infarcts (SCI) are the most common form of neurologic disease in SCA patients [94], and the cumulative risk does not reach a plateau [11] with a cumulative risk of 19.2% by age 8 years, 32.4% by age 14 years, 39.1% by age 18 [95] and 53.3% by age 30 years [96]. In the Créteil cohort [95], the cumulative incidence of SCI in patients with a history of abnormal TCDI was 20/38 (52.6%) vs 44/151 (29.1%) in those with no such history ($p = 0.006$) (personal data). They are associated with the presence of stenosis but also occur in absence of macrovasculopathy [11,95,97]. The risk factors for SCI reported in the literature are baseline [11,95,97,98] and acute [93] severe anemia, stenosis [93,97], a high leukocyte count [99], male sex [98], Senegal β haplotype [99], and relatively high systolic blood pressure [98]. In the STOP-2 study, SCA children with a history of abnormal TCD but normalized velocities and no severe stenosis, 21/79 (27%) had SCI at study entry, and 3/37 (8.1%) developed new MRI lesions in the transfusion-continued group compared with 11/40 (27.5%) in the transfusion-halted group ($p = 0.03$) [100]. The total number of lesions remained essentially unchanged, decreasing from 25 to 24 while increasing from 27 to 45 in transfusion-halted patients [100]. In the SIT trial examining patients with SCI in the absence of abnormal TCD, 6/99 (6%) had a new or enlarged infarct in the 3-year transfusion group compared with 14/97 (14%) in the observation group, corresponding to a significant reduction in incidence: 2.0 vs 4.8 events, $p = 0.04$ [101]. The outcome of stenosis on MRA was evaluated in a subset of patients in the STOP-2 trial. Indeed, MRA studies, were not initially included but were added after initiating the trial. Twenty-six patients had MRA at enrollment and during follow-up. Among the 19 patients with an initial normal MRA, no appearance of stenosis was observed among 10 patients who were randomized to the transfusion-continued arm, whereas one appeared among the 9 patients in the transfusion-halted group [100].

Cognitive performances have been shown to be significantly lower in SCA patients than in non-SCA siblings [49]. SCA patients with a history of stroke exhibit lower performance than those with SCI who themselves have lower performances than those without SCI [49,102–105]. Moreover, we have shown in a previous prospective multicenter study that low performances were associated with the presence of ischemic lesions on MRI, severe anemia and thrombocytosis [49]. To date, no prospective study has evaluated the outcome of cognitive function after SCT compared with chronic transfusion. Only the SIT trial compared chronic transfusion to simple observation in SCA patients with silent infarcts and found no significant difference in cognitive performance at 3 years [101]; however, but only abbreviated scales of intelligence (WASI) were used.

The risk of transplantation is not negligible, including treatment-related mortality, post-transplant neurological worsening, graft-versus-host disease (GvHD) and gonadal dysfunction, although they are quite reduced when transplantation is performed before the age of 15 [13–19]. Important progress have been achieved in the management and results of genoidentical transplantation for SCA patients. In 2007 in France, disease-free survival among 44 SCA patients transplanted since 2000 was 95.3% at 5 years [34]. In 2010, we confirmed that the chances of cure were at least 95% because among 121 patients transplanted since 2000, DFS was 96.8% (95% CI: 93.2–100%) [106]. Moreover, in 2013, we showed that the high ATG dose (20 mg/kg) significantly reduced the incidence of chronic GvHD [107]. The risk of early neurotoxicity (seizures, posterior reversible encephalopathy syndrome) was also reduced by switching CSA to MMF when steroid initiation was required [106]. To preserve the chances of fertility, testis or ovarian fragments were cryopreserved before transplantation.

Health-related quality of life (HRQoL) is a patient-reported outcome (PRO) of how his/her well-being and level functioning are affected by

health or the treatment received. In this trial, HRQoL was assessed with the French version of the PedsQL 4.0 generic core scales because the new PedsQLTM SCD module [108] was not available when this trial was initiated. Measurement of HRQoL facilitates our understanding of the burden of disease experienced by patients [50]. HRQoL has been assessed in the SIT trial comparing chronic transfusions with observation in SCA children with SCI in the absence of abnormal TCD. The investigators used other HRQoL scales, CHQ PF 50, and discovered significantly better scores in the transfused group in terms of physical function, bodily pain and change in health compared with the observational group [109]. This was the first evidence that children with SCA who received regular blood transfusion therapy felt better and had a better overall HRQoL than those who did not receive transfusion therapy. However, a recent study reported very low HRQoL in SCA patients chelated with deferasirox, although the neurological status of SCA patients was not described [110]. Hydroxyurea treatment has been shown to be associated with better overall HRQoL per child report and better parent and child-reported physical HRQoL [58]. A significant improvement in HRQoL was recently reported at 1 year after HSCT for SCA patients [111–113] but there is no trial comparing HRQoL between transfused and transplanted SCA patients.

Thus, DREPAGREFFE trial is the first prospective study to compare the outcome of cerebral vasculopathy in two arms, transfusion vs transplantation, defined by the random availability of having a genoidentical donor. Our hypothesis is that velocities will be significantly more reduced after transplantation and cerebral vasculopathy better stabilized or improved at 1 year, but that it will also be very important to evaluate whether the difference in cognitive performance observed between SCA patients and non-SCA siblings may be reduced after SCT. The other major point of this study will be the evaluation of the benefit/risk balance in terms of safety, quality of life, and cost with the objective of providing an additional decision criterion.

7. Competing risks

We declare that we have no conflict of interests.

Acknowledgments

We thank the many families for their participation and loyalty.

Funding

This work is supported by the French Ministry of Health [grant numbers AOM08215]; and from “Cordons de Vie”

Appendix A. Appendix

Title	National multicenter prospective study comparing the results of geno-identical allograft to the transfusion program in
Code	sickle cell children with cerebral vasculopathy detected by transcranial Doppler. DREPAGREFFE
	P: 071247
Investigator coordinator	Françoise BERNAUDIN, MD
Objectives	Principal:
	Show that the allograft significantly more decreases the velocities on TCDI than the extended chronic transfusion
	Secondary:
	Compare in the 2 groups (transfusion vs transplantation):
	- Outcome of cerebral vasculopathy
	* Percentage of patients with normalized TCDI (TAMV < 170 cm/s)
	* Ischemic lesions on MRI
	* Possible stenosis on MRA
	* Serum expression of “angiogenic” molecules
	* Comparative cognitive performance patient and sibling
	- Evaluation of transfusion performance, anti-erythroid alloimmunization, and post-transfusion incidents and accidents
	- Iron overload
	- Psychological condition and quality of life
	- Costs
Eligibility criteria	Inclusion criteria
	- Sickle cell anemia (SCA) patients (SS/Sb0),
	- Aged < 15 years,
	- With a history of abnormal TCDI (≥ 200 cm/s)
	- with or not a stroke history
	- Having at least one non-SCA sibling of the same parental couple
	- Of which parents accept HLA typing and transplantation project in the event of available HLA geno-identical donor among siblings or the extended chronic transfusion
	Non-Inclusion Criteria
	- non SCA patients (not SS/Sb0)
	- aged > 15 years
	- No history of abnormal TCDI (≥ 200 cm/s)
	- no non-SCA sibling of the same parental couple
	- Of which parents refuse HLA typing and transplantation project in the event of the existence of an available HLA geno-identical donor among siblings or the extended chronic transfusion
Sample size	63 patients
Duration of	Inclusions over 2 years and 6 months and follow-up over 3 years, i.e., a study duration of 5 years and 6 months

research	
Methodology	National multicenter non-randomized prospective cohort study but defined by the random availability of having geno-identical donor transplanted (exposed) versus transfused (unexposed). Study of cell therapy.
Exams required	1. The TCDI 2. The MRI/MRA 3. Cognitive tests (WIPPSI-R or WISC-4 or WAIS-3) 4. Quality of Life Scales 5. Alloimmunization 6. Externalization of phosphatidylserine 7. Expression of angiogenic molecules.
End points	1. Main endpoint Improvement of the cerebral vasculopathy assessed on the measurement of velocities (TAMV) at one year 2. Secondary endpoints 2.1 Evolution of cerebral vasculopathy - Incidence of stroke - Survival without stroke - TCD Velocities in all arteries - Percentage of patients with normalized velocities - Expression of membrane phosphatidyl and angiogenic molecules - Incidence of ischemic lesions in MRI - Incidence of stenoses on MRA - Cognitive performance (patient and sibling) 2.2 Anti-erythrocytic alloimmunization 2.3 Hemolysis and iron overload 2.4 Assessment of Psychological Status and Quality of Life 2.5 Costing

References

[1] K. Ohene-Frempong, S.J. Weiner, L.A. Sleeper, et al., Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors, Blood 91 (1) (1998) 288–294.
[2] C.T. Quinn, Z.R. Rogers, G.R. Buchanan, Survival of children with sickle cell disease, Blood 103 (Jun 2004) 4023–4027.
[3] R.J. Adams, T. Nichols, K. McKie, P. Milner, T.E. Gammal, Cerebral infarction in sickle cell anemia mechanism based on CT and MRI, Neurology 38 (1988) 1012–1017.
[4] R.J. Adams, V. McKie, F. Nichols, et al., The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease, N. Engl. J. Med. 326 (9) (1992) 605–610.
[5] R.J. Adams, T. Nichols, F. Ramon, et al., Transcranial Doppler correlation with cerebral angiograhy in sickle cell disease, Stroke 23 (1992) 1073–1077.
[6] S. Verlhac, F. Bernaudin, D. Tortrat, et al., Detection of cerebrovascular disease in sickle cell disease children by transcranial Doppler sonography. Correlation with MRI and MRA and conventionnal angiography, Pediatr. Radiol. 25 (1995) S14–S19.
[7] S. Verlhac, F. Bernaudin, P. Brugieres, Doppler transcrânien couleur chez les enfants drépanocytaires, J. Radiol. 84 (2 Pt 1) (2003) 131–138.
[8] R.J. Adams, V.C. McKie, E.M. Carl, et al., Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial Doppler, Ann. Neurol. 42 (1997) 699–704.
[9] R.J. Adams, V.C. McKie, L. Hsu, et al., Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography, N. Engl. J. Med. 339 (1998) 5–11.
[10] H.J. Fullerton, R.J. Adams, S. Zhao, S.C. Johnston, Declining stroke rates in Californian children with sickle cell disease, Blood 104 (2) (2004) 336–339.
[11] F. Bernaudin, S. Verlhac, C. Arnaud, et al., Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort, Blood 117 (4) (2011) 1130–1140 (quiz 1436).
[12] R.J. Adams, D. Brambilla, Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease, N. Engl. J. Med. 353 (2005) 2769–2778.
[13] F. Bernaudin, G. Socié, M. Kuentz, et al., Long-term follow-up of a multicenter collaborative study of genoidentical myeloablative stem cell transplantation for sickle cell disease, Blood 110 (2007) 2749–2756.
[14] C. Vermylen, E. Fernadez Robles, J. Ninana, G. Cornu, Bone marrow transplantation in five children with sickle cell anaemia, Lancet 1 (1988) 1427–1428.
[15] F. Bernaudin, G. Souillet, J.P. Vannier, et al., for the SFGM, Bone marrow transplantation in 14 children with severe Sickle cell disease: the french experience, Bone Marrow Transplant. 12 (S 1) (1993) 118–121.
[16] M.C. Walters, M. Patience, W. Leisering, et al., Bone marrow transplantation for sickle cell disease, N. Engl. J. Med. 335 (6) (1996) 369–376.
[17] C. Vermylen, G. Cornu, A. Ferster, et al., Haematopoietic stem cell transplantation for sickle cell anaemia: the first 50 patients transplanted in Belgium, Bone Marrow Transplant. 22 (1) (1998) 1–6.
[18] M.C. Walters, R. Storb, M. Patience, et al., Impact of bone marrow transplantation for symptomatic sickle cell disease: an interim report. Multicenter investigation of bone marrow transplantation for sickle cell disease, Blood 95 (6) (2000) 1918–1924.
[19] F. Locatelli, V. Rocha, W. Reed, F. Bernaudin, E. Gluckman, Eurocord Transplant Group, et al., Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease, Blood 101 (6) (2003 Mar 15) 2137–2143.
[20] J. Pillonel, S. Laperche, Etablissement Français du sang, Trends in risk of transfusion-transmitted viral infections (HIV, HCV, HBV) in France between 1992 and 2003 and impact of nucleic acid testing (NAT), Euro. Surveill. 10 (2) (2005 Feb) 5–8 (PubMed PMID: 15735313).
[21] K. Smith-Whitley, H. Zhao, R.L. Hodinka, J. Kwiatkowski, R. Cecil, T. Cecil, et al., Epidemiology of human parvovirus B19 in children with sickle cell disease, Blood 103 (2) (2004 Jan 15) 422–427.
[22] P.L. Rao, L.J. Strausbaugh, L.A. Liedtke, A. Srinivasan, M.J. Kuehnert, Bacterial infections associated with blood transfusion: experience and perspective of infectious diseases consultants, Transfusion 47 (7) (2007 Jul) 1206–1211.
[23] F. Noizat-Pirenne, Immunohematologic characteristics in the Afro-caribbean population. Consequences for transfusion safety, Transfus. Clin. Biol. 10 (3) (2003 Jun) 185–191.
[24] M. Silvy, C. Tournamille, J. Babinet, S. Pakdaman, S. Cohen, J. Chiaroni, F. Galactéros, P. Bierling, P. Bailly, F. Noizat-Pirenne, Red blood cell immunization in sickle cell disease: evidence of a large responder group and a low rate of anti-Rh linked to partial Rh phenotype, Haematologica 99 (7) (2014 Jul) e115–7, http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2014.104703 (PubMed PMID: 24727821 ; PubMed Central PMCID: PMC4077098).
[25] F. Noizat-Pirenne, K. Lee, P.Y. Pennec, P. Simon, P. Kazup, D. Bachir, et al., Rare RHCE phenotypes in black individuals of Afro-Caribbean origin: identification and transfusion safety, Blood 100 (12) (2002 Dec 1) 4223–4231.
[26] E.P. Vichinsky, Current issues with blood transfusions in sickle cell disease, Semin. Hematol. 38 (1 Suppl 1) (2001 Jan) 14–22.
[27] C. Liu, P. Marshall, I. Schreibman, A. Vu, W. Gai, M. Whitlow, Interaction between terminal complement proteins C5b-7 and anionic phospholipids, Blood 93 (7) (1999 Apr 1) 2297–2301.
[28] B. Aygun, S. Padmanabhan, C. Paley, V. Chandrasekaran, Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions, Transfusion 42 (1) (2002 Jan) 37–43.
[29] L.D. Petz, Bystander immune cytolysis, Transfus. Med. Rev. 20 (2) (2006 Apr) 110–140.
[30] E. Vichinsky, F. Bernaudin, G.L. Forni, et al., Long-term safety and efficacy of deferasirox (Exjade) for up to 5 years in transfusional iron-overloaded patients with sickle cell disease, Br. J. Haematol. 154 (3) (2011 Aug) 387–397.

[31] F. Bernaudin, M. Robin, C. Ferry, K. Yacouben, J.H. Dalle, R. Peffault de Latour, Y. Bertrand, C. Pondarre, M. Kuentz, J.P. Vannier, A. Fischer, I. Thuret, P. Lutz, P. Bordigoni, P. Rohrlich, J.L. Stephan, N. Dhedin, J.P. Vernant, J.Y. Cahn, F. Demeocq, B. Rio, D. Bories, E. Gluckman, G. Socié, Related myeloablative stem cell transplantation (SCT) to cure sickle cell anemia (SCA): update of french results, Blood 116 (2010) 3518.

[32] J. Donnez, M.M. Dolmans, D. Demylle, et al., Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anaemia: case report, Hum. Reprod. 21 (1) (2006) 183–188.

[33] J. Donnez, M.M. Dolmans, D. Demylle, P. Jadoul, C. Pirard, J. Squifflet, B. Martinez-Madrid, A. Van Langendonckt, Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue, Lancet 364 (2004) 1405–1410.

[34] F. Bernaudin, M. Kuentz, G. Socié, Response: Late effects of myeloablative stem cell transplantation or late effects of sickle cell disease itself ? Blood 111 (3) (2008) 1744.

[35] C. Poirot, F. Abirached, M. Prades, C. Coussieu, F. Bernaudin, P. Piver, Induction of puberty by autograft of cryopreserved ovarian tissue, Lancet 379 (9815) (2012 Feb 11) 588.

[36] J. Pradère, E. Drain, O. Taïeb, et al., Psychological outcome after hematopietic cell transplantation for sickle cell disease, Blood 106 (11) (2005) 2021 (572a).

[37] A.S. Wayne, S.E. Schoenike, C.H. Pegelow, Financial analysis of chronic transfusion for stroke prevention in sickle cell disease, Blood 96 (2000) 2369–2372.

[38] H. Esperou, A. Brunot, F. Roudot-Thoraval, et al., Predicting the costs of allogeneic siblin stem cell transplantation at base-line. Results from a prospective, multicenter, French study, Transplantation 77 (12) (2004) 1854–1858.

[39] R.J. Adams, F.T. Nichols, Aaslid, et al., Cerebral vessel stenosis in sickle cell disease: criteria for detection by transcranial Doppler, Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 12 (3) (1990) 277–282.

[40] A.M. Jones, J.J. Seibert, F.T. Nichols, et al., Comparison of transcranial color Doppler imaging (TCDI) and transcranial Doppler (TCD) in children with sickle cell anemia, Pediatr. Radiol. 31 (2001) 461–469.

[41] F. Bernaudin, S. Verlhac, L. Coic, et al., Long term follow-up of pediatric sickle cell disease patients with abnormal high velocities on transcranial Doppler, Pediatr. Radiol. 35 (3) (2005) 242–248.

[42] US Health maintenance for people with SCD, Evidence-based management of SCD, https://www.guidelines.gov/summaries/summary/48524/health-maintenance-for-people-with-sickle-cell-disease-in-evidencebased-management-of-sickle-cell-disease?q=TCD+recommendations+in+sickle+cell+disease.

[43] HAS Syndromes drépanocytaires majeurs de l'enfant et l'adolescent. Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare, Available at: http://www.has-sante.fr.

[44] S. Verlhac, Transcranial Doppler in children, Pediatr. Radiol. 41 (Suppl. 1) (2011 May) S153–65, http://dx.doi.org/10.1007/s00247-011-2038-y (Review).

[45] S. Verlhac, S. Balandra, I. Cussenot, et al., Extracranial carotid arteriopathy in stroke-free children with sickle cell anemia: detection by submandibular Doppler sonography, Pediatr. Radiol. 44 (5) (2014 May) 587–596, http://dx.doi.org/10.1007/s00247-014-2880-9.

[46] F.G. Moser, S.T. Miller, J.A. Bello, et al., The spectrum of brain MR abnormalities in sickle cell disease: a report from the cooperative study of sickle cell disease, Am. J. Neuroradiol. 17 (5) (1996 May) 965–972.

[47] R.A. Zimmerman, MRI/MRA evaluation of sickle cell disease of the brain, Pediatr. Radiol. 35 (2005) 249–257.

[48] A. Kandeel, R. Zimmerman, K. Ohene-Frempong, et al., Comparison of magnetic resonance angiography and conventional angiography in sickle cell disease: Clinical significance and reliability, Neuroradiology 38 (1996) 409–416.

[49] F. Bernaudin, S. Verlhac, F. Fréard, et al., Multicenter prospective study of children with sickle cell disease: radiopsychometric correlation, J. Child Neurol. 15 (5) (2000 May) 333–343.

[50] J.A. Panepinto, M. Bonner, Health-related quality of life in sickle cell disease: past, present, and future, Pediatr. Blood Cancer 59 (2) (2012 Aug) 377–385, http://dx.doi.org/10.1002/pbc.24176.

[51] J.W. Varni, M. Seid, P.S. Kurtin, PedsQL 4.0: reliability and validity of the pediatric quality of life inventory version 4.0 generic core scales in healthy and patient populations, Med. Care 39 (8) (2001 Aug) 800–812.

[52] J.A. Panepinto, N.M. Pajewski, L.M. Foerster, R.G. Hoffmann, The performance of the PedsQL generic core scales in children with sickle cell disease, J. Pediatr. Hematol. Oncol. 30 (9) (2008 Sep) 666–673, http://dx.doi.org/10.1097/MPH.0b013e31817e4a44.

[53] J. Hankins, P. Hinds, S. Day, et al., Therapy preference and decision-making among patients with severe sickle cell anemia and their families, Pediatr. Blood Cancer 48 (7) (2007 Jun 15) 705–710.

[54] C.B. McClellan, J. Schatz, C. Sanchez, C.W. Roberts, Validity of the Pediatric Quality Of Life Inventory for youth with sickle cell disease, J. Pediatr. Psychol. 33 (10) (2008 Nov-Dec) 1153–1162, http://dx.doi.org/10.1093/jpepsy/jsn036 (PubMed PMID: 18400838).

[55] J.A. Panepinto, N.M. Pajewski, L.M. Foerster, S. Sabnis, R.G. Hoffmann, Impact of family income and sickle cell disease on the health-related quality of life of children, Qual. Life Res. 18 (1) (2009 Feb) 5–13, http://dx.doi.org/10.1007/s11136-008-9412-8.

[56] C. Dampier, S. Lieff, P. LeBeau, et al., Comprehensive Sickle Cell Centers (CSCC) Clinical Trial Consortium (CTC). Health-related quality of life in children with sickle cell disease: a report from the Comprehensive Sickle Cell Centers Clinical Trial Consortium, Pediatr. Blood Cancer 55 (3) (2010 Sep) 485–494, http://dx.doi.org/10.1002/pbc.22497.

[57] J.A. Panepinto, R.G. Hoffmann, N.M. Pajewski, The effect of parental mental health on proxy reports of health-related quality of life in children with sickle cell disease, Pediatr. Blood Cancer 55 (4) (2010 Oct) 714–721, http://dx.doi.org/10.1002/pbc.22651 (PubMed PMID: 20589646; PubMed Central PMCID: PMC3835190).

[58] C.D. Thornburg, A. Calatroni, J.A. Panepinto, Differences in health-related quality of life in children with sickle cell disease receiving hydroxyurea, J. Pediatr. Hematol. Oncol. 33 (4) (2011 May) 251–254, http://dx.doi.org/10.1097/MPH.0b013e3182114c54 (PubMed PMID: 21516020; PubMed Central PMCID: PMC3729442).

[59] J.C. Dale, C.J. Cochran, L. Roy, E. Jernigan, G.R. Buchanan, Health-related quality of life in children and adolescents with sickle cell disease, J. Pediatr. Health Care 25 (4) (2011 Jul-Aug) 208–215, http://dx.doi.org/10.1016/j.pedhc.2009.12.006.

[60] S. Manificat, A. Dazord, P. Cochat, J. Nicolas, Evaluation de la qualité de vie en pédiatrie: comment recueillir le point de vue de l'enfant, Arch Pédiatr 4 (1997) 1238–1246.

[61] G.J. Thöni, M. Lalande, G. Bachelard, P. Vidal, S. Manificat, C. Fédou, M. Rodière, J. Nicolas, Evolution de la qualité de vie des enfants et adolescents infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) sous multithérapie antirétrovirale: effet de l'âge et du contexte familial, Arch Pédiatr (2006) 130–139.

[62] J.W. Varni, M. Seid, P.S. Kurtin, PedsQL 4.0: reliability and validity of the pediatric quality of life inventory version 4.0 generic core scales in healthy and patient populations, Med. Care 39 (8) (2001) 800–812.

[63] J.W. Varni, C.A. Limbers, T.M. Burwinkle, How young can children reliably and validly self-report their health-related quality of life?: an analysis of 8591 children across age subgroups with the PedsQL 4.0 generic core scales, Health Qual. Life Outcomes 5 (1) (2007) 1.

[64] M. Wang, J.A. Summers, T. Little, A. Turnbull, D. Poston, H. Mannan, Perspctives of fathers and mothers in early intervention programmes in assessing family quality of life, J. Intellect. Disabil. Res. 50 (2006) 977–988.

[65] J.A. Panepinto, K.M. O'Mahar, M.R. DeBaun, K.M. Rennie, J.P. Scott, Validity of the child health questionnaire for use in children with sickle cell disease, J. Pediatr. Hematol. Oncol. (2004) 574–578.

[66] J.A. Summers, D.J. Poston, A.P. Turnbull, J. Marquis, L. Hoffman, H. Mannan, M. Wang, Conceptualizing and measuring family quality of life, J. Intellect. Disabil. Res. 49 (2005) 777–783.

[67] P. Harmatz, E. Butensky, K. Quirolo, et al., Severity of iron overload in patients with sickle cell disease receiving chronic red blood cell transfusion therapy, Blood 96 (1) (2000 Jul 1) 76–79.

[68] E. Angelucci, G.M. Brittenham, C.E. McLaren, et al., Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major, N. Engl. J. Med. 343 (5) (2000 Aug 3) 327–331 (Erratum in: N Engl J Med 2000 Dec 7; 343(23):1740).

[69] Y. Gandon, D. Olivié, D. Guyader, et al., Non-invasive assessment of hepatic iron stores by MRI, Lancet 363 (9406) (2004 Jan 31) 357–362.

[70] C. Rose, P. Vandevenne, E. Bourgeois, N. Cambier, O. Ernst, Liver iron content assessment by routine and simple magnetic resonance imaging procedure in highly transfused patients, Eur. J. Haematol. 77 (2) (2006 Aug) 145–149.

[71] J.L. Fernandes, E.F. Sampaio, M. Verissimo, et al., Heart and liver T2 assessment for iron overload using different software programs, Eur. Radiol. 21 (12) (2011 Dec) 2503–2510, http://dx.doi.org/10.1007/s00330-011-2208-1.

[72] S. Verlhac, M. Morel, F. Bernaudin, S. Béchet, C. Jung, M. Vasile, Liver iron overload assessment by MRI R2* relaxometry in highly transfused pediatric patients: an agreement and reproducibility study, Diagn. Interv. Imaging 96 (3) (2015 Mar) 259–264, http://dx.doi.org/10.1016/j.diii.2014.11.021.

[73] L.J. Noetzli, S.M. Carson, A.S. Nord, T.D. Coates, J.C. Wood, Longitudinal analysis of heart and liver iron in thalassemia major, Blood 112 (7) (2008 Oct 1) 2973–2978, http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-04-148767.

[74] F. Lang, K.S. Lang, P.A. Lang, S.M. Huber, T. Wieder, Mechanisms and significance of eryptosis, Antioxid. Redox Signal. 7-8 (2006) 1183–1192.

[75] J. Haynes Jr., B. Obiako, J.A. King, R.B. Hester, S. Ofori-Acquah, Activated neutrophil-mediated sickle red blood cell adhesion to lung vascular endothelium: role of phosphatidylserine-exposed sickle red blood cells, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 291 (4) (2006) 1679–1685.

[76] Z. Yasin, S. Witting, M.B. Palascak, C.H. Joiner, D.L. Rucknagel, R.S. Franco, Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: associations with cell age, density, and hemoglobin, Blood 102 (1) (2003) 365–370.

[77] W. Risau, Mechanisms of angiogenesis, Nature 386 (6626) (1997 Apr 17) 671–674 (Review).

[78] S. Valable, J. Montaner, A. Bellail, V. Berezowski, J. Brillault, R. Cecchelli, D. Divoux, E.T. Mackenzie, M. Bernaudin, S. Roussel, E. Petit, VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1, J. Cereb. Blood Flow Metab. 25 (11) (2005 Nov) 1491–1504.

[79] E. Pacary, E. Petit, M. Bernaudin, Erythropoietin, a cytoprotective and regenerative cytokine, and the hypoxic brain, Neurodegener. Dis. 3 (1–2) (2006) 87–93 (Review).

[80] M. Bernaudin, H.H. Marti, S. Roussel, D. Divoux, A. Nouvelot, E.T. MacKenzie, E. Petit, A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice, J. Cereb. Blood Flow Metab. 19 (6) (1999 Jun) 643–651.

[81] F.C. Lopes, F. Traina, C.B. Almeida, F.C. Leonardo, C.F. Franco-Penteado, V.T. Garrido, M.P. Colella, R. Soares, S.T. Olalla-Saad, F.F. Costa, N. Conran, Key endothelial cell angiogenic mechanisms are stimulated by the circulating milieu in sickle cell disease and attenuated by hydroxyurea, Haematologica 100 (6) (2015 Jun) 730–739, http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2014.119727 (PubMed PMID: 25769545; PubMed Central PMCID:PMC4450618).

[82] F.R. Sharp, M. Bernaudin, HIF1 and oxygen sensing in the brain, Nat. Rev. Neurosci. 5 (6) (2004 Jun) 437–448 (Review).

[83] M. Bernaudin, Y. Tang, M. Reilly, E. Petit, F.R. Sharp, Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance, J. Biol. Chem. 277 (42) (2002 Oct 18) 39728–39738.

[84] A.J. Duits, T. Rodriguez, Schnog JJB, CURAMA Study Group, Serum levels of angiogenic factors indicate a pro-angiogenic state in adults with sickle cell disease, Br. J. Haematol. 134 (2006) 116–119.

[85] M.M. Hickey, M.C. Simon, Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors, Curr. Top. Dev. Biol. 76 (2006) 217–257.

[86] H. Ye, L. Wang, X.K. Yang, L.P. Fan, Y.G. Wang, L. Guo, Serum S100B levels may be associated with cerebral infarction: a meta-analysis, J. Neurol. Sci. 348 (1–2) (2015 Jan 15) 81–88, http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2014.11.010 (PubMed PMID: 25434713).

[87] H. Ehrenreich, A. Kästner, K. Weissenborn, J. Streeter, S. Sperling, K.K. Wang, H. Worthmann, R.L. Hayes, N. von Ahsen, A. Kastrup, A. Jeromin, M. Herrmann, Circulating damage marker profiles support a neuroprotective effect of erythropoietin in ischemic stroke patients, Mol. Med. 17 (11 – 12) (2011) 1306–1310, http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2011.00259 (PubMed PMID: 21912808 ; PubMed Central PMCID: PMC3321813).

[88] T.M. Stanne, N.D. Åberg, S. Nilsson, K. Jood, C. Blomstrand, U. Andreasson, K. Blennow, H. Zetterberg, J. Isgaard, J. Svensson, C. Jern, Low circulating acute brain-derived neurotrophic factor levels are associated with poor long-term functional outcome after ischemic stroke, Stroke 47 (7) (2016 Jul) 1943–1945, http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.012383 (PubMed PMID: 27301948).

[89] H.I. Hyacinth, B.E. Gee, T.V. Adamkiewicz, R.J. Adams, A. Kutlar, J.K. Stiles, J.M. Hibbert, Plasma BDNF and PDGF-AA levels are associated with high TCD velocity and stroke in children with sickle cell anemia, Cytokine 60 (1) (2012 Oct) 302–308, http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.05.017 (Erratum in: Cytokine. 2013 Apr; 62(1):174. PubMed. PMID: 22704695; PubMed Central PMCID: PMC3429653).

[90] R.E. Ware, B.R. Davis, W.H. Schultz, et al., Hydroxycarbamide versus chronic transfusion for maintenance of transcranial doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia-TCD With Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWiTCH): a multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority trial, Lancet 387 (10019) (2016 Feb 13) 661–670, http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01041-7.

[91] S.A. Zimmerman, W.H. Schultz, S. Burgett, N.A. Mortier, R.E. Ware, Hydroxyurea therapy lowers transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anemia, Blood 110 (3) (2007) 1043–1047.

[92] F. Bernaudin, S. Verlhac, S. Chevret, Treating sickle cell anaemia: the TWiTCH trial, Lancet 388 (10048) (2016 Sep 3) 960, http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31492-1.

[93] F. Bernaudin, S. Verlhac, C. Arnaud, et al., Long-term treatment follow-up of children with sickle cell disease monitored with abnormal transcranial Doppler velocities, Blood 127 (14) (2016 Apr 7) 1814–1822, http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-10-675231.

[94] M.R. Debaun, F.D. Armstrong, R.C. McKinstry, R.E. Ware, E. Vichinsky, F.J. Kirkham, Silent cerebral infarcts: a review on a prevalent and progressive cause of neurologic injury in sickle cell anemia, Blood 119 (20) (2012 May 17) 4587–9621.

[95] F. Bernaudin, S. Verlhac, C. Arnaud, et al., Chronic and acute anemia and extracranial internal carotid stenosis are risk factors for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia, Blood 125 (10) (2015 Mar 5) 1653–1661, http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-09-599852.

[96] A.A. Kassim, S. Pruthi, M. Day, et al., Silent cerebral infarcts and cerebral aneurysms are prevalent in adults with sickle cell anemia, Blood 127 (16) (2016 Apr 21) 2038–2040, http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-01-694562.

[97] J.L. Kwiatkowski, R.A. Zimmerman, A.N. Pollock, et al., Silent infarcts in young children with sickle cell disease, Br. J. Haematol. 146 (3) (2009 Aug) 300–305.

[98] M.R. Debaun, S.A. Sarnaik, M.J. Rodeghier, et al., Associated risk factors for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: low baseline hemoglobin, gender and relative high systolic blood pressure, Blood 119 (16) (2012) 3684–3690.

[99] T.R. Kinney, L.A. Sleeper, W.C. Wang, et al., Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: a risk factor analysis. The cooperative study of sickle cell disease, Pediatrics 103 (3) (1999) 640–645.

[100] M.R. Abboud, E. Yim, K.M. Musallam, R.J. Adams, STOP II Study Investigators. Discontinuing prophylactic transfusions increases the risk of silent brain infarction in children with sickle cell disease: data from STOP II, Blood 118 (4) (2011 Jul 28) 894–898, http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-12-326298.

[101] M.R. DeBaun, M. Gordon, R.C. McKinstry, et al., Controlled trial of transfusions for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia, N. Engl. J. Med. 371 (8) (2014 Aug 21) 699–710, http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1401731.

[102] F.D. Armstrong, R.J. Thompson Jr., W. Wang, et al., Cognitive functioning and brain magnetic resonance imaging in children with sickle cell disease. Neuropsychology Committee of the Cooperative Study of sickle cell disease, Pediatrics 97 (6 Pt 1) (1996 Jun) 864–870.

[103] M.R. DeBaun, J. Schatz, M.J. Siegel, M. Koby, S. Craft, L. Resar, J.Y. Chu, G. Launius, M. Dadash-Zadeh, R.B. Lee, M. Noetzel, Cognitive screening examinations for silent cerebral infarcts in sickle cell disease, Neurology 50 (6) (1998 Jun) 1678–1682.

[104] J. Schatz, R.L. Finke, J.M. Kellett, J.H. Kramer, Cognitive functioning in children with sickle cell disease: a meta-analysis, J. Pediatr. Psychol. 27 (8) (2002 Dec) 739–748 (Review).

[105] J.M. Kawadler, J.D. Clayden, C.A. Clark, F.J. Kirkham, Intelligence quotient in paediatric sickle cell disease: a systematic review and meta-analysis, Dev. Med. Child Neurol. 58 (7) (2016 Jul) 672–679, http://dx.doi.org/10.1111/dmcn.13113.

[106] F. Bernaudin, M. Robin, C. Ferry, K. Yacouben, J.H. Dalle, R. Peffault de Latour, Y. Bertrand, C. Pondarre, M. Kuentz, J.P. Vannier, A. Fischer, I. Thuret, P. Lutz, P. Bordigoni, P. Rohrlich, J.L. Stephan, N. Dhedin, J.P. Vernant, J.Y. Cahn, F. Demeocq, B. Rio, D. Bories, E. Gluckman, G. Socié, Related Myeloablative Stem Cell Transplantation (SCT) to Cure Sickle Cell Anemia (SCA): Update of French Results, Blood (2010) 116–3518.

[107] F. Bernaudin, D. Bories, J.H. Dalle, M. Robin, R. Peffault de Latour, B. Neven, Y. Bertrand, C. Pondarre, J.P. Vannier, K. Yakouben, M. Kuentz, C. Cordonnier, N. Dhedin, I. Thuret, P. Lutz, E. Gluckman, G. Socié, Sickle cell anemia and HSCT: Relation between ATG, chimerism, GvHD and outcome in Myeloablative Genoidentical transplants for the SFGM-TC, Blood 122 (2013) 971.

[108] J.A. Panepinto, S. Torres, C.B. Bendo, et al., PedsQL™ sickle cell disease module: feasibility, reliability, and validity, Pediatr. Blood Cancer 60 (8) (2013 Aug) 1338–1344, http://dx.doi.org/10.1002/pbc. 24491.

[109] L.M. Beverung, J.J. Strouse, M.L. Hulbert, et al., SIT trial investigators. Health-related quality of life in children with sickle cell anemia: impact of blood transfusion therapy, Am. J. Hematol. 90 (2) (2015 Feb) 139–143, http://dx.doi.org/10.1002/ajh.23877.

[110] S.P. Senol, E.N. Tiftik, S. Unal, A. Akdeniz, B. Tasdelen, B. Tunctan, Quality of life, clinical effectiveness, and satisfaction in patients with beta thalassemia major and sickle cell anemia receiving deferasirox chelation therapy, J. Basic Clin. Pharm. 7 (2) (2016 Mar) 49–59, http://dx.doi.org/10.4103/0976–0105.177706.

[111] M. Bhatia, E. Kolva, L. Cimini, et al., Health-related quality of life after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease, Biol. Blood Marrow Transplant. 21 (4) (2015 Apr) 666–672, http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.12.007.

[112] S.L. Saraf, A.L. Oh, P.R. Patel, et al., Nonmyeloablative stem cell transplantation with alemtuzumab/low-dose irradiation to cure and improve the quality of life of adults with sickle cell disease, Biol. Blood Marrow Transplant. 22 (3) (2016 Mar) 441–448, http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.08.036.

[113] S. Shenoy, M. Eapen, J.A. Panepinto, et al., A trial of unrelated donor marrow transplantation for children with severe sickle cell disease, Blood 128 (21) (2016 Nov 24) 2561–2567.

Développement d'une thérapie de neuroprotection et de régénération cérébrale à base d'un agent de la matrice extracellulaire combiné à une thérapie cellulaire pour le traitement de l'accident vasculaire cérébral ischémique

L'AVC représente la première cause d'handicap acquis chez l'adulte. L'AVC ischémique, représentant 87% des AVCs, est une pathologie complexe dont le premier facteur de risque aggravant est l'hypertension artérielle. À l'heure actuelle les seuls traitements disponibles sont la thrombolyse et la thrombectomie. Cependant, ces traitements présentent de nombreuses contre-indications et effets secondaires limitant leurs applications chez les patients.

L'objectif des travaux menés dans cette thèse est l'évaluation d'un traitement pharmacologique, le RGTA (ReGeneraTing Agent), combiné ou non à un traitement cellulaire utilisant les cellules souches mésenchymateuses (CSMs), chez des rats normo- et hyper-tendus.

Les résultats obtenus dans cette thèse montrent qu'à la suite d'une ischémie cérébrale, les traitements évalués offrent une neuroprotection et une récupération fonctionnelle persistantes, chez les animaux noromo- et hyper-tendus. Cette récupération est expliquée par la réduction du volume lésionnel, par une meilleure plasticité cérébrale (angiogenèse, neurogenèse), ainsi par la potentialisation de l'effet des CSMs par le RGTA.

En conclusion, nos études démontrent l'efficacité d'une thérapie robuste de neurorprotection chez le rongeur à la suite d'une ischémie cérébrale

Development of a matrix-based therapy combined to a cellular therapy for the brain neuroprotection and regeneration following ischemic stroke

Stroke is the leading cause worldwide of adult severe disability. The limited available treatments for ischemic stroke, which accounts for 87% of strokes, makes it necessary to develop new therapeutical approaches. Stroke is a complex pathology and chronic hypertension (CAH) represents the first aggravating risk factor for ischemic stroke. At the present time, the only two available treatments for ischemic stroke, thrombolysis and thrombectomy, present several side effects limiting their clinical use.

Here we evaluate the effect of a molecular RGTA (ReGeneraTing Agent) based therapy combined or not to a cellular therapy based on the use of mesenchymal stem cells (MSCs) for the treatment of ischemic stroke in normo- and hyper-tensive rats.

The results demonstrate that the evaluated therapies confer a long lasting neuroprotection accompanied by animals' functional recovery. Further analysis suggest that RGTA enhances brain plasticity (angiogenesis, and neurogenesis), protects the extracellular matrix structure, and potentiates MSCs' beneficial effects.

In conclusion, our studies demonstrate the efficacy of a molecular and cellular combined therapy conferring a persistent neuroprotection and functional recovery for the treatment of ischemic stroke.

Mots clefs: Ischémie cérébrale, RGTA, Cellules souches mésenchymateuses, neuroprotection, régénération tissulaire, matrice extracellualire, heparan sulfate, biomatériaux.

Adresse du laboratoire : ISTCT FRE 2001, équipe CERVOxy, GIP cyceron
Boulevard Henri Becquerel, BP 5229, 14074 Caen cedex