



HAL
open science

Etude en imagerie biphotonique in vivo de l'impact de l'hypertension artérielle chronique sur la dynamique des cellules microgliales

Elisa Grimoin

► **To cite this version:**

Elisa Grimoin. Etude en imagerie biphotonique in vivo de l'impact de l'hypertension artérielle chronique sur la dynamique des cellules microgliales. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC418 . tel-01996448

HAL Id: tel-01996448

<https://theses.hal.science/tel-01996448v1>

Submitted on 28 Jan 2019

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

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



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Etude en imagerie biphotonique in vivo de l'impact de l'hypertension artérielle chronique sur la dynamique des cellules microgliales

**Présentée et soutenue par
Elisa GRIMOIN**

**Thèse soutenue publiquement le 17/10/2018
devant le jury composé de**

Mme ISABELLE MARGAILL	Professeur des universités, UNIVERSITE PARIS 5 UNIVERSITE PARIS DESC	Rapporteur du jury
M. EMMANUEL PINTEAUX	Maître de conférences HDR, Université de Manchester - Royaume Uni	Rapporteur du jury
M. VINCENT BEREZOWSKI	Professeur des universités, UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE	Président du jury
M. JULIEN CHUQUET	Maître de conférences, UNIVERSITE ROUEN NORMANDIE	Membre du jury
Mme MARINA RUBIO GOMEZ	Ingénieur HDR, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Membre du jury
M. OMAR TOUZANI	Professeur des universités, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Directeur de thèse

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



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



IMAGERIE & STRATÉGIES
THÉRAPEUTIQUES DES PATHOLOGIES
CÉRÉBRALES & TUMORALES

Remerciements

Mes premiers remerciements vont au Professeur Émérite Eric MacKenzie, pour nous avoir transmis à tous une part de son expertise scientifique. A l'instar d'un héritage familial, je le remercie d'avoir légué de belles valeurs scientifiques que j'ai eu la chance de recevoir de mon directeur de thèse, le Professeur Omar Touzani.

Je te remercie Omar de m'avoir toujours laissé libre de faire mes choix, d'avoir été disponible et bienveillant, surtout dans des moments difficiles. Grâce à toi j'ai pu travailler sur un sujet que j'ai adoré, qui nous a donné pas mal de fil à retordre mais avec le recul, c'est ça aussi qui forge le caractère et l'endurance. J'ai aussi pu donner des cours à l'université et tu le sais c'était un désir très fort que j'avais et que j'ai pu réaliser grâce à toi. Je te remercie également de m'avoir inculqué qu'il faut toujours aller plus loin dans la curiosité (jusqu'à tester les gens qui venaient dans ton bureau avec des pièces de bois et des pièces de monnaies... à leur insu!), de m'avoir permis de murir, j'ai sûrement encore beaucoup de choses à apprendre mais en grande partie grâce à toi, je suis fière de ce que je suis devenue.

Je remercie le Docteur Myriam Bernaudin de m'avoir accueilli dans l'équipe il y a 4 ans pour mon stage de master 2 et de m'avoir permis d'accéder au concours pour l'obtention du financement de thèse à l'origine de tout ça. Je te remercie également de m'avoir permis de participer à de très beaux congrès.

Je tiens à remercier vivement le Professeur Isabelle Margail et le Docteur Emmanuel Pinteaux de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'examiner et de rapporter mon travail de thèse, ainsi que de m'avoir permis, de par leurs commentaires et corrections d'améliorer ce manuscrit.

Mes remerciements vont également au Professeur Vincent Berezowski d'avoir accepté d'examiner mon travail. Je le remercie chaleureusement de ses précieux conseils, de sa bienveillance et de ses encouragements.

Je remercie sincèrement le Docteur Julien Chuquet de m'avoir d'avoir pris le temps d'examiner ma thèse. Je le remercie de m'avoir fait découvrir et adorer la microscopie biphotonique et de m'avoir inculqué la persévérance dans les manip.

Je remercie le Docteur Marina Rubio d'avoir accepté d'apporter son expertise à ce travail. Je la remercie de m'avoir largement aidé à mettre en place la production des souris CX3CR1^{GFP/+} qui ont été l'objet principal de mon travail de thèse.

Je remercie toutes les personnes qui ont directement participé à ce beau projet. Le Docteur Carole Brunaud d'avoir accepté de prendre en charge une partie de l'analyse d'images. Charlotte Marie pour avoir géré à merveille la production des animaux au CURB, Claudine

Pinchon qui surveille et s'occupe de nos animaux en expérimentation et Geoffrey Vingtrois pour n'avoir jamais laissé en suspens un problème informatique.

En particulier je remercie Laurent Chazalviel qui a réalisé l'intégralité des chirurgies rénovasculaires, des ischémies et une partie des IRM. Très cher Laurent je suis très heureuse d'avoir travaillé avec toi, d'avoir eu la chance de profiter de ta bonne humeur, de ta générosité, de ton humour, de tes histoires, sans oublier tes secrets d'expert en chirurgie, malgré tes grandes paluches ! Je te souhaite que de bonnes choses et j'espère sincèrement qu'on se reverra pour aller faire du kite et du tir avec Romaric.

Merci grand gourou biphoton, pour ces heures passées ensemble en tête à tête dans le noir, mes yeux dans ton écran, tes images dans ma tête.

Je remercie également le Docteur Aurélien Corroyer-Dulmont pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de collaborer pour ma première publication !

Je remercie également les membres du conseil de l'EDnBISE avec qui j'ai beaucoup appris et qui m'ont fait une entière confiance dans beaucoup d'occasions : Pierrick Gandolfo, Vincent Richard, Francois Dauphin, Alain Rincé, Frank Le Foll, Emilie Despois, sans oublier Nicolas, Maud et Apolline.

Je remercie Florence et Carole pour leur gentillesse, leur bienveillance, pour leur souci de toujours faire au mieux pour nous, pour leur disponibilité. L'équipe a énormément de chance de vous avoir.

Et toute l'équipe !

Je te remercie Sam pour ta disponibilité et ton aide en stats. Je ne sais pas si c'est une bonne idée de t'encourager dans ce sens, mais je te remercie aussi pour ton humour disons original.. qui n'a pas manqué de me faire rire, mais je suis bon publique. Merci à Jérôme et Didier pour tous leurs bons conseils techniques. Vous avez eu bien du courage (et surtout pas le choix) d'avoir autant supporté/subi certaines facettes de notre bonne humeur débordante avec les filles. Merci Karim pour ton écoute attentive et ta bonne humeur. Par contre tu seras gentil mais ne me pique pas tous les airBnB, après, le chômage arrive et il faut bien que je rembourse mon prêt! Merci Nathalie pour ta bienveillance et ton souci des autres. Je te remercie également Edwige pour m'avoir toujours fait des retours positifs sur mes présentations et pour m'avoir, bon nombre de fois permis de géolocaliser mon chef.

Un petit mots pour les anciens avec qui j'ai partagé aussi de très bons moments, Marine, Marie-Sophie, Clément, Ararat et les futurs docteurs à qui je souhaite du courage et surtout une très belles réussite : Charlie, Gwenn, Kelly, Rhéda, Audrey.

Bon et puis je suis sûre qu'elles attendent leur tour, les futures DocteurEs et déjà thésée qui ont rendues ces trois dernières années plus simples, plus belles, plus drôles et qui m'ont rendu plus forte et plus confiante, mais pas moins sensible.

Gaëlle : ma petite Galinouche, je suis contente qu'on ait partagé toute cette épreuve ensemble, qu'on ait grandi ensemble. Merci pour avoir rigolé, fou-rié avec moi, et d'avoir autant complété mes/tes bouts de chanson. Merci pour tes tweets pourris de chats mourants, c'est toujours un plaisir de partager tes centres d'intérêt. Merci aussi pour m'avoir aidé à poser les lattes et surtout de m'avoir aidé à faire un ~~super~~ coffrage... dans la salle de bain

Rozenn : je ne pourrais jamais suffisamment te remercier pour m'avoir permis de frauder sur ta carte Ganil tous les midis, sans toi je serais probablement morte de faim. Merci pour m'avoir coupé les cheveux, pour tous les massages, pour m'avoir tant fait répéter pour MT180 et pour tes conseils théâtraux, pour être drôle et bienveillante. Je suis contente d'être ton amie, surtout parce que j'ai hâte d'aller faire de la piscine et du bateau !...

et nos deux ingénieures préférées Bertille et Clélia que je remercie pour les soirées salsa endiablées au Che, pour m'avoir accompagné chez Dandan, pour avoir supporté les crises de fou-rire et de larmes.

Merci les filles pour votre écoute, votre épaule, pour votre sourire. J'vous kiff vegra sa mère en short wech !

Monsieur Bibiche, très cher Docteur Khelif (ca en jette !) je n'aurais jamais assez de mot pour te remercier pour ton soutien, pour ta patiente à m'écouter douter sans arrêt de ce que je fais et à toujours me rassurer sans jamais m'envoyer bouler (et sinon toi, tu as écrit combien de pages pour ta page de couverture ?). Je suis heureuse d'avoir partagé autant de choses avec toi : MT180, créer innover, les Doctoriales, biotechno, les soirées, tes bouteilles d'eau, ton pain, ma veste à capuche, MES stylos et puis ton/mon/notre chef. La prochaine étape le voyage ! Signé Ta wingman, Elisouille !

Je remercie mon kyste au cerveau pour ne surement pas me rendre plus intelligente mais surement plus drôle ...

Je remercie tous les copains pour leur soutien. Merci à Nono, Chalie, la Buche, Lyra, Laurent, Loic, Doumi, Nico, Guillaume, La Muts, Mathou, Basco, Audrey pour les soirées brain storming pour MT180, merci à eux et à Mathilde, Jawi, Adri, Popo, Bouvet, Flo, Elsa, Anthony, Laureen, Totof, Sarah pour le sacré chantier de l'appart, sans vous tous on serait surement encore dans la poussière et à dormir sur le balcon. Spéciale dédicace à Mathou pour les journées rédactions !!!

Merci à Laureen et à Caroline pour avoir eu le courage de lire une introduction de thèse et d'avoir empêché la catastrophe orthographique !

Très Cher Ted, je te remercie pour avoir été soutien et moteur à bien des moments depuis ces dernières années, sans toi les choses auraient forcément été bien différentes. Je te remercie d'avoir tant cru en moi, tellement fort que ça m'a permis de prendre confiance en moi. Merci d'avoir partagé ta passion pour la danse, j'ai beaucoup d'admiration pour la personne que tu es et j'espère pouvoir partager encore longtemps des chansons, des photos et des rêves de voyages et pleins d'autres belles choses.

Mes très chers parents, mes p'tit vieux d'amour. C'est sans nul doute vos encouragements, votre soutien, vos « on est fière de toi » pour à peu près tout ce que j'ai pu faire (même laver ma voiture) qui m'ont porté jusqu'ici. C'est un élan permanent que vous m'offrez au quotidien pour aller toujours de l'avant sans avoir trop peur de l'avenir. Vous êtes de beaux exemples et je suis fière de vous. C'est à vous que je dédie ce travail.

A mes grands-parents.

Et pour finir, celui qui a probablement le plus de mérite, merci à toi Manuel pour ton soutien, ta patience, ton écoute, ta positive attitude, ta justesse. Merci de me donner confiance en moi, merci pour toutes ces petites attentions au quotidien : jusqu'à aller faire de la biblio! Je me souviendrai longtemps de la saison Pekin Express 2018 et des nuits sur le balcon. Je n'aurais pas pu rêver meilleur équipier pour franchir toutes ces étapes. RIP Gregory LP. Maintenant l'équipe Cuillère peut partir en Thaïlande !!!!!

Et pour finir la fin, merci à Couscous et Moka, ils n'ont pas fait grand choses mais ils sont mignons ...

Connaissez-vous la différence entre Dupond et Dupont ? ...

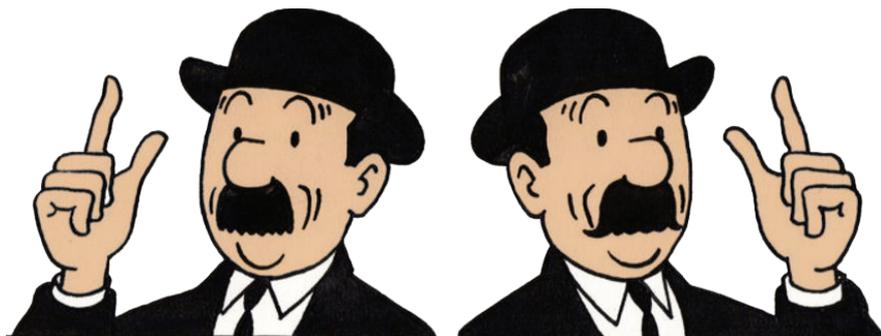


Table des matières

. Table des matières

. TABLE DES MATIERES	1
. LISTE DES ABREVIATIONS	5
. LISTE DES FIGURES	7
. LISTE DES TABLEAUX	11
. AVANT-PROPOS	13
. INTRODUCTION	15
I RÉGULATION PHYSIOLOGIQUE DE LA PRESSION ARTÉRIELLE.....	16
I.1 Les mécanismes immédiats et à court terme de régulation de la pression artérielle.....	17
I.1.1 Mécanismes d'action des barorécepteurs.....	17
I.1.2 Mécanismes d'action des volorécepteurs	19
I.1.3 Mécanismes d'action des chémorécepteurs	20
I.2 Les mécanismes de régulation de la pression artérielle à moyen terme.....	21
I.2.1 Implication de la médullo-surrénale	21
I.2.2 Le facteur natriurétique	21
I.2.3 La vasopressine	21
I.3 Les mécanismes de régulation de la pression artérielle à long terme et implication du système rénine-angiotensine-aldostérone	22
II L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE CHRONIQUE	26
II.1 Définition.....	26
II.2 Epidémiologie	29
II.3 Étiologie.....	31
II.4 Les traitements de l'HTA	32
II.5 Les modèles animaux de l'HTA	36
II.5.1 Les modèles non-génétiques	38
II.5.1.1 Les modèles d'HTA rénovasculaire	38
II.5.1.2 Le modèle par infusion chronique d'angiotensine-II	41
II.5.1.3 Le modèle DOCA-salt	42
II.5.1.4 Le modèle L-NAME	43
II.5.2 Les modèles génétiques	43

II.6 Impact de l'hypertension artérielle chronique sur le cerveau	45
II.6.1 La physiologie cérébrovasculaire	45
II.6.1.1 <i>L'hyperhémie fonctionnelle</i>	46
II.6.1.2 <i>L'autorégulation cérébrale</i>	47
II.6.1.3 <i>La régulation endothéliale</i>	48
II.6.2 L'hypertension artérielle chronique altère la physiologie cérébrovasculaire ...	50
II.6.2.1 <i>Artériosclérose et lipohyalinose</i>	50
II.6.2.2 <i>Le remodelage vasculaire</i>	50
II.6.2.3 <i>La raréfaction vasculaire</i>	55
II.6.2.4 <i>Altérations fonctionnelles : débit sanguin cérébral basal et hyperhémie fonctionnelle</i>	55
II.6.2.5 <i>Le dysfonctionnement endothélial</i>	56
II.6.2.6 <i>La détérioration de l' autorégulation cérébrale</i>	57
II.7 L'hypertension artérielle et l'inflammation.....	59
II.7.1 Hypertension et inflammation rénale.....	60
II.7.2 Hypertension et inflammation vasculaire	61
II.7.3 Hypertension et inflammation cérébrale.....	64
III LE SYSTÈME IMMUNITAIRE CÉRÉBRAL.....	71
III.1 Le système immunitaire, quelques généralités	71
III.2 Impact d'une infection périphérique sur le cerveau	73
III.3 La microglie.....	78
III.3.1 Les origines.....	78
III.3.2 Quels phénotypes pour la microglie ?	85
III.3.3 Récepteurs microgliaux et signalisation <i>On/Off</i>	94
III.3.3.1 <i>Les récepteurs aux neurotransmetteurs</i>	96
III.3.3.1.a <i>Récepteurs purinergiques</i>	96
III.3.3.1.b <i>Récepteurs glutamatergiques</i>	98
III.3.3.1.c <i>Récepteurs GABAergiques</i>	99
III.3.3.2 <i>Les récepteurs aux cytokines et chimiokines</i>	99
III.3.3.3 <i>Les TLR</i>	101
III.3.3.4 <i>Les récepteurs aux immunoglobulines</i>	102
III.3.4 Quels sont les fonctions microgliales dans le SNC adulte en condition physiologique ?	105
III.3.4.1 <i>Modulation de l'activité synaptique</i>	105
III.3.4.2 <i>La microglie et la neurogenèse</i>	106
III.3.4.3 <i>Plasticité synaptique et LTP</i>	107
III.3.5 Méthodes d'étude de la neuroinflammation.....	109
IV L'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE	112
IV.1 Définition, épidémiologie et facteurs de risque.....	112

IV.2 Physiopathologie de l'AVC.....	115
IV.2.1 La pénombre ischémique et la notion de cascade excitotoxique.....	117
IV.2.2 Inflammation et AVC : rôle délétère ou bénéfique de la microglie ?	122
IV.3 Les thérapies pour l'AVC.....	128
. OBJECTIFS	131
. METHODOLOGIE	133
I METHODOLOGIE <i>IN VIVO</i>	133
I.1 La souche de souris transgénique CX3CR1^{GFP/+}	133
I.2 Mesures non-invasives de la pression artérielle chez l'animal vigile	134
I.3 Induction de l'hypertension artérielle chronique	135
I.3.1 Modèle rénovasculaire 2K1C	135
I.3.2 Modèle par infusion chronique d'angiotensine-II	136
I.4 Procédure de mise en place de la fenêtre crânienne	138
II PRINCIPE DE LA MICROSCOPIE BIPHOTONIQUE.....	143
II.1 Imagerie <i>in vivo</i>.....	145
II.1.1 Imagerie biphotonique <i>in vivo</i> de la microglie.....	145
II.1.2 Imagerie <i>in vivo</i> du compartiment vasculaire.....	148
II.1.2.1 Imagerie de la perméabilité de la BHE	148
II.1.2.2 Imagerie de la réponse vasculaire à des stimulations somatosensorielles	149
II.2 Induction de l'ischémie cérébrale	149
II.3 Imagerie par résonance magnétique.....	151
II.4 Préparation des coupes de cerveau	152
III ANALYSE D'IMAGES	153
III.1 Analyse morphologique de la microglie	153
III.2 Analyse de l'activité spontanée et cicatricielle de la microglie.....	154
III.3 Analyse de la perméabilité vasculaire et de la réactivité vasculaire à des stimulations somatosensorielles	158
III.4 Analyse du volume d'infarctus ischémique	159
IV ANALYSE STATISTIQUE.....	160
. RESULTATS	161
I ETUDES PRELIMINAIRES DE MISE AU POINT ET DE PRISE EN MAIN DES MODELES	161

I.1	Introduction.....	161
I.2	Méthodologie et résultats	162
I.3	Conclusion	171
II	ANALYSE <i>IN VIVO</i> DE LA DYNAMIQUE MICROGLIALE EN CONTEXTE D'HYPERTENSION	
	ARTERIELLE CHRONIQUE	173
II.1	Abstract	175
II.2	Introduction.....	176
II.3	Materials and Methods	178
II.3.1	Induction of hypertension.....	178
II.3.2	Arterial pressure measurements	178
II.3.3	Cranial window procedure	179
II.3.4	Two-photon microscopy imaging.....	179
II.3.5	Induction of ischemic stroke	181
II.3.6	Magnetic resonance imaging examinations	181
II.3.7	Brain slices preparation.....	181
II.3.8	Image processing.....	182
II.3.9	Statistical analyses	183
II.4	Results	184
II.4.1	Arterial hypertension induced organs damage.....	184
II.4.2	AngII-induced hypertension altered microglia morphology	184
II.4.3	AngII-induced hypertension modified the spontaneous motility of microglia	185
II.4.4	AngII-Induced hypertension altered microglia reactions to cortical microlesions	186
II.4.5	AngII-induced hypertension altered the BBB permeability and reduced the	187
II.4.6	vascular reactivity to whisker stimulation	188
II.4.6	Ischemic brain lesion is increased in AngII-induced hypertension	188
II.5	Figures	189
II.6	Discussion	201
II.7	Bibliography.....	205
.	DISCUSSION GENERALE	211
.	BIBLIOGRAPHIE	225
.	ANNEXE 1 : Falzone <i>et al.</i>, 2018	251
.	ANNEXE 2 : <i>Curriculum Vitae</i>	265

Liste des abréviations

. Liste des abréviations

1K1C : 1-kidney 1-clip, modèle d'hypertension	BDNF : <i>brain derived neurotrophic factor</i>
2K1C : 2-kidney 1-clip, modèle d'hypertension	BHE : barrière hémato-encéphalique
ACC : artère carotide commune	COX-2 : cyclo-oxygénase 2
ACE : artère carotide externe	CVO : organe circumventriculaire
ACI : artère carotide interne	CX3CR1 : récepteur de la fractalkine/CX3CL1
ACM : artère cérébrale moyenne	DAMP : motif moléculaire associé aux dégâts
ADP : adénosine diphosphate	DOCA-salt : sel d'acétate de désoxycorticostérone, modèle d'hypertension
AMP : adénosine monophosphate	DSC : débit sanguin cérébral
AMPA : acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4- isoxazolepropionique	eGFP : <i>enhanced green fluorescent protein</i>
AngII : modèle d'hypertension par infusion chronique d'angiotensine-II	FITC-dextran : fluorécéine-isotyocyanate dextran
ARA : antagonistes des récepteurs à l'angiotensine	GABA : acide γ -aminobutyrique
AT1/2 : récepteur à l'angiotensine	HNB : hyperoxie normobarique
ATP : adénosine triphosphate	HTA : hypertension artérielle chronique
AVC : accident vasculaire cérébral	IC : inhibiteurs calciques
BB : bêta-bloquants	IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
BDNF : <i>brain derived neurotrophic factor</i>	IFN-γ : interféron- γ
BHE : barrière hémato-encéphalique	IGF-1 : <i>insulin-like growth factor-1</i>
BB : bêta-bloquants	IL : interleukine

Abréviations

iNOS : nitrique oxyde synthétase inductible	PAMP : motif moléculaire associé aux pathogènes
i.p. : intra-péritonéal	PVN : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
IRM : imagerie par résonance magnétique	ROS : espèces réactives de l'oxygène
LCR : liquide céphalo-rachidien	RVLM : médulla rostro-ventrolatérale
L-NAME : N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester, modèle d'hypertension	SFO : organe subfornical
LPS : lipopolysaccharide	SHR : rat spontanément hypertendu
LTD : dépression à long-terme	SNC : système nerveux central
LTP : potentialisation à long-terme	SNS : système nerveux sympathique
MCAo : modèle d'ischémie par occlusion de l'artère cérébrale moyenne	SR101 : sulforhodamine-101
MEC : matrice extracellulaire	SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone
mGluR : récepteurs métabotropiques glutamatergiques	TGF-β : <i>transforming growth factor-β</i>
MMP : métalloprotéinase matricielle	TLR : <i>toll-like-receptor</i>
NF-κB : facteur nucléaire κ B	TNF-α : <i>tumor necrosis factor-α</i>
NMDA : N-méthyl-D-aspartate	tPA : <i>tissue-type plasminogen activator</i>
NO : monoxyde d'azote	TREM : <i>triggering receptor expressed on myeloid cells</i>
OMS : organisation mondiale de la santé	TRITC-dextran : tetraméthyl-isotyocyanate dextran
PA : pression artérielle	
PAD : pression artérielle diastolique	

Liste des figures

. Liste des figures

Figure 1. Arc réflexe de la régulation nerveuse de la pression artérielle.....	19
Figure 2. Le système rénine-angiotensine-aldostérone dans la régulation de la pression artérielle.....	24
Figure 3. Taux de mortalité suite à un accident vasculaire cérébral ischémique par tranche d'âge et en fonction de la pression artérielle systolique.....	28
Figure 4. Principaux modèles d'hypertension artérielle chronique chez la souris.....	38
Figure 5. Schéma représentatif du dispositif chirurgical pour l'induction des modèles d'HTA 1K1C et 2K1C.....	39
Figure 6. Système rénine-angiotensine-aldostérone et modèles 2K1C et 1K1C.....	40
Figure 7. Voies d'induction de l'hypertension artérielle chronique par le modèle AngII.....	42
Figure 8. Implication neuronale et astrocytaire dans la vasoréactivité cérébrale.....	47
Figure 9. Schéma représentatif du mécanisme d'autorégulation cérébrale.....	48
Figure 10. Mécanisme de relaxation vasculaire dépendant de l'endothélium.....	49
Figure 11. Remodelages vasculaires dans l'hypertension artérielle chronique.....	52
Figure 12. Comparaison morphologique de l'artère cérébrale moyenne dans un modèle SHR après différents traitements antihypertenseurs.....	54
Figure 13. Illustration du shift de la courbe d'autorégulation cérébrale par l'hypertension artérielle chronique.....	59
Figure 14. Impact du système immunitaire périphérique sur l'induction de dommages vasculaires et rénaux dans l'hypertension.....	62
Figure 15. Mécanisme spécifique d'exacerbation de la réponse inflammatoire périphérique dans l'hypertension artérielle chronique.....	63

Figure 16. Impacts bénéfiques et délétères de l'action de l'angiotensine-II sur son récepteur AT1.....	67
Figure 17. Élévation de l'excitation sympathique par l'angiotensine-II.....	68
Figure 18. Différence entre l'immunité innée et l'immunité acquise face à l'intrusion d'un agent pathogène dans l'organisme.....	72
Figure 19. Impact de facteurs pro-inflammatoires circulants sur l'inflammation cérébrale.....	77
Figure 20. Del Rio Hortega est reconnu comme le père de la microglie.....	80
Figure 21. Origine embryonnaire des cellules microgliales.....	81
Figure 22. Le <i>turn over</i> microglial finement régulé par la prolifération et l'apoptose.....	83
Figure 23. Aperçu historique de la recherche sur la microglie.....	84
Figure 24. Dynamique de la motilité spontanée de la microglie.....	86
Figure 25. Dynamique de l'activité cicatricielle microgliale.....	88
Figure 26. Interactions physiques entre les cellules microgliales, les neurones, les astrocytes et les vaisseaux sanguins.....	89
Figure 27. Complexité de la modulation du phénotype microglial.....	91
Figure 28. Rôle ambivalent de la microglie en contexte pathologique.....	93
Figure 29. Voies de signalisation microgliales associées aux principaux neurotransmetteurs..	96
Figure 30. Communication neurone-microglie et complexes protéiques associés.....	104
Figure 31. Les cellules microgliales établissent des contacts physiques transitoires au niveau pré- et post-synaptique.....	106
Figure 32. Représentation schématique des différents types d'AVC et leurs principales causes.....	113
Figure 33. Évolution schématique du débit sanguin cérébral, du volume sanguin cérébral, du taux d'extraction d'oxygène et de la consommation d'oxygène en fonction de la pression de perfusion cérébrale.	116

Figure 34. Illustration des caractéristiques tissulaires associées aux variations de débit sanguin cérébral après un AVC.....	118
Figure 35. Cinétique des mécanismes physiopathologiques de l'ischémie cérébrale et principales approches thérapeutiques développées.....	119
Figure 36. Schéma représentatif des voies moléculaires menant à la mort cellulaire lors d'un AVC ischémique.....	121
Figure 37. Implication immunitaire dans la lésion ischémique cérébrale.....	123
Figure 38. Caractéristiques de la microglie M1 et M2 dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale.....	126
Figure 39. Système de mesure non-invasif de la pression artérielle (BP-2000).....	134
Figure 40. Représentation schématique du modèle 2K1C d'hypertension artérielle.....	136
Figure 41. Schéma du dispositif de mini-pompe pour l'induction du modèle AngII d'hypertension artérielle.....	137
Figure 42. Modèle de fenêtre crânienne pour l'imagerie <i>in vivo</i>	141
Figure 43. Points de contrôle pour la validation de l'état de fenêtre crânienne.....	142
Figure 44. Illustration de la capacité de pénétration des rayons rouges (longueurs d'onde élevées) par rapport aux rayons bleus (faibles longueurs d'onde).....	144
Figure 45. Illustration de la différence entre la microscopie à fluorescence monophotonique et biphotonique.....	145
Figure 46. Dérive du plan focal pendant l'imagerie <i>in vivo</i>	146
Figure 47. Lésion tissulaire induite par une puissance laser trop forte pendant l'imagerie <i>in vivo</i>	147
Figure 48. Schéma représentatif du dispositif pour l'induction de l'ischémie cérébrale.....	151
Figure 49. Analyse de la densité microgliale.....	153
Figure 50. Analyse du volume somatique microglial.....	154

Figure 51. Analyse de la vitesse d'extension et de rétractation d'un processus microglial.....	155
Figure 52. Analyse de la capacité de surveillance de l'espace extracellulaire par la microglie.....	156
Figure 53. Induction de la lésion laser et quantification de la taille de la cicatrice microgliale.....	156
Figure 54. Analyse de la réponse microgliale à la lésion laser.....	157
Figure 55. Analyse de la perméabilité vasculaire.....	158
Figure 56. Analyse de la vasoréactivité des artères piémériennes.....	159
Figure 57. Analyse du volume lésionnel ischémique.....	159
Figure 58. Morphologie des astrocytes du cortex cérébral révélée par le marquage au SR101.....	163
Figure 59. Modèle de fenêtre avec accès en silicone mis au point au laboratoire.....	164
Figure 60. Disposition de la fenêtre avec accès en silicone installée au-dessus du cortex cérébral.....	165
Figure 61. Images représentatives du signal cortical obtenu par le SR101 injecté au travers de la fenêtre avec accès en silicone.....	166
Figure 62. Exemple de lésion hémorragique provoquée par la mise en place de la pipette au travers de l'abord en silicone.....	167
Figure 63. Images représentatives du type de signal obtenu par les différents types d'injection du marqueur SR101.....	168
Figure 64. Images représentatives de l'opacification du modèle de fenêtre par affinage de l'os.....	169
Figure 65. Schéma représentatif du système de stabilisation de l'animal.....	170

Liste des tableaux

. Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des niveaux de pression artérielle issue des recommandations de 2013 de la Société Européenne d’Hypertension et e la Société Européenne de Cardiologie....	27
Tableau 2. Prévalence de l’hypertension artérielle en France (Etude Esteban 2015).....	30
Tableau 3. Causes et facteurs de risques de l’hypertension artérielle.....	32
Tableau 4. Tableau bibliographique regroupant les études s’intéressant à l’inflammation cérébrale en contexte d’hypertension artérielle.....	69
Tableau 5. Principaux signaux On/Off régulant l’activité microgliale en condition physiologique et pathologique.....	95

Avant-propos

. Avant-propos

L'hypertension artérielle (HTA) est une maladie insidieuse qui touche près d'1 adulte sur 3 dans le monde. C'est aussi la pathologie chronique la plus fréquemment retrouvée en France, dont la prévalence ne cesse d'augmenter (Campbell *et al.*, 2016; Kearney *et al.*, 2005; Poulter *et al.*, 2015). L'HTA est un problème socioéconomique majeur puisqu'elle est à l'origine de 50 % des accidents vasculaires cérébraux (AVC), elle est également le principal facteur aggravant de l'AVC et est largement impliqué dans la mise en place et l'aggravation des déficiences cognitives vasculaires et de la maladie d'Alzheimer (Faraco et Iadecola, 2013; GBD 2015 Risk Factors Collaborators, 2016; Kennelly et Collins, 2012; Levi *et al.*, 2013; Skoog et Gustafson, 2006). L'une des causes à l'origine de ces différentes pathologies est l'altération du compartiment vasculaire cérébral par l'HTA, qui favorise le remodelage des vaisseaux cérébraux et par conséquent, qui augmente le risque d'occlusion et compromet la perfusion cérébrale (Faraco et Iadecola, 2013; Pires *et al.*, 2013). L'inflammation périphérique est également une caractéristique majeure de l'HTA qui est corrélée à une élévation de différents marqueurs inflammatoires, tels que des cytokines et des cellules immunitaires de type lymphocytaire (Harwani, 2018; Mirhafez *et al.*, 2014). Ces différents éléments participent à la mise en place et à l'évolution de l'HTA, notamment en induisant des dommages aux organes cibles, que sont : les reins, le cœur et le cerveau (Caillon *et al.*, 2018). De plus en plus d'études se sont d'ailleurs intéressées à la relation entre l'HTA et l'inflammation au niveau cérébral et plus particulièrement dans des régions participant à la régulation de la pression artérielle (PA), comme notamment le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN). L'ensemble des résultats semble s'accorder sur le fait que l'HTA est associée à une réactivité microgliale dans cette région (Shen *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2014). La microglie, représentant du système

immunitaire cérébral résident, serait ainsi impliquée dans la mise en place et l'évolution de l'HTA (Winklewski *et al.*, 2016).

Lors d'un AVC, deux régions sont principalement touchées : le cortex cérébral et le striatum. L'existence et l'évolution de l'inflammation dans un contexte d'HTA dans ces deux régions cérébrales, n'est que très peu documentée. Cette problématique est toutefois essentielle puisque ces processus inflammatoires pourraient expliquer, au moins en partie, la sensibilité du cerveau aux dommages ischémiques en condition d'hypertension. Ainsi, l'ensemble du travail présenté ici, a été réalisé dans le but d'analyser l'impact de l'HTA sur l'état inflammatoire du cortex cérébral, avant la survenue d'un AVC. Dans ce contexte, nous nous sommes particulièrement intéressés aux cellules microgliales et au compartiment vasculaire.

Introduction

. Introduction

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'HTA, sur l'état inflammatoire du cerveau. Plus précisément, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'HTA induit ou sensibilise le cortex cérébral à une inflammation qui pourrait expliquer, au moins en partie, la vulnérabilité des sujets hypertendus à des pathologies telles que l'accident vasculaire cérébral. L'HTA est définie par l'organisation mondiale de la santé (OMS), comme une pathologie pour laquelle les valeurs de pression artérielle systolique et diastolique sont respectivement supérieures à 140 mmHg et 90 mmHg et ce, de façon chronique. L'HTA est la principale cause de morbi-mortalité cardiovasculaire et représente donc un problème de santé publique majeur qui touche l'ensemble de la planète.

Avant d'aborder en détail la physiopathologie de l'HTA, il est important de comprendre en amont les processus régulateurs de la PA en contexte physiologique. Ces mécanismes sont abordés dans ce premier chapitre.

I RÉGULATION PHYSIOLOGIQUE DE LA PRESSION ARTÉRIELLE

Les fonctions vitales assurées par le système cardiovasculaire : distribution d'oxygène, des nutriments, des hormones et drainage des déchets de l'organisme, sont permises grâce à la circulation du sang sous pression. Cette pression n'est pas homogène dans l'ensemble du circuit vasculaire, on distinguera ainsi un système à basse pression, comprenant le système veineux et l'ensemble des capillaires, ainsi qu'un système à haute pression correspondant au compartiment artériel. La PA est celle qui règne dans le système artériel et équivaut à la pression exercée par le sang sur la paroi vasculaire. Elle oscille constamment entre deux valeurs au cours du cycle cardiaque : lorsque le cœur se contracte, la pression est maximale, on parle de pression artérielle systolique (PAS) et lorsqu'il se relâche, la pression est la plus basse, c'est la pression artérielle diastolique (PAD). La PA au repos est maintenue à une valeur moyenne stable avoisinant 100 mmHg. Pour simplifier, la PA est dépendante de la résistance artérielle systémique et du débit cardiaque, qui est lui-même dépendant de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection systolique.

$$PA = RAS \times Qc$$

PA : pression artérielle

RAS : résistance artérielle systémique, dépendante du tonus des artères systémiques

Qc : débit cardiaque, quantité de sang pompé par le cœur par minute

Ou encore

$$PA = RAS \times VES \times FC$$

VES : volume d'éjection systolique, volume de sang éjecté pour un ventricule cardiaque.

FC : fréquence cardiaque, nombre de battements cardiaques par minute

La PA est régulée par des mécanismes de types nerveux et humoraux. Ces mécanismes sont complémentaires puisqu'ils ont des dynamiques différentes et vont permettre une régulation dans l'immédiateté, à très court, moyen et à long terme de la PA (Ackermann, 2004).

I.1 Les mécanismes immédiats et à court terme de régulation de la pression artérielle

Les mécanismes d'action immédiats et à court terme sont d'origine nerveuse. Leur mise en place est extrêmement rapide, respectivement de l'ordre de la seconde et de la minute. Ils vont permettre de corriger les fluctuations ponctuelles de la PA en faisant intervenir différentes structures : les barorécepteurs, les volorécepteurs, les chémorécepteurs et le centre cardiovasculaire bulbaire. Ces structures vont agir en modifiant conjointement la résistance périphérique et le débit cardiaque afin de maintenir une PA stable et donc un apport sanguin constant aux différents tissus. Elles sont également impliquées dans la répartition de l'apport sanguin à des organes précis : aux muscles squelettiques lors d'un exercice physique par exemple.

I.1.1 Mécanismes d'action des barorécepteurs

Les barorécepteurs ou baroréflexes sont sensibles à la tension exercée au niveau de la paroi artérielle et donc sensibles à la PA. Lorsque celle-ci évolue, les barorécepteurs vont mettre en place une réponse réflexe très rapide. En effet, ce sont les structures les plus efficaces en terme de dynamique de réponse, au maximum quelques secondes (Di Rienzo *et al.*, 2009). Ils sont principalement retrouvés dans deux zones : (i) la paroi de la crosse aortique, on parle alors de barorécepteurs aortiques ; (ii) à la bifurcation des artères carotides internes et externes, correspondant aux barorécepteurs carotidiens (**Figure 1**). Une augmentation de la PA va provoquer un étirement des barorécepteurs, qui en retour, vont émettre un message nerveux vers les centres cardiovasculaires bulbaires. Les nerfs afférents chargés de transmettre cette

information sont le nerf de Cyon pour les barorécepteurs aortiques et le nerf de Hering pour les barorécepteurs carotidiens. Les nerfs efférents sont, quant à eux, les nerfs parasympathiques (nerf X ou nerf vague) et les nerfs sympathiques. La composante sympathique est prépondérante et contrôle la fréquence et la contractilité cardiaque, ainsi que le tonus artériolaire et veineux par la noradrénaline. Le système parasympathique, quant à lui, agit uniquement sur la fréquence cardiaque par le biais de l'acétylcholine au niveau de récepteurs muscariniques. Au repos, les muscles lisses vasculaires sont continuellement stimulés par les centres vasomoteurs à un rythme régulier. Ainsi, les artérioles sont toujours partiellement contractées. Ce mécanisme donne lieu au tonus vasculaire et celui-ci varie d'un organe à l'autre. Dans un contexte de PA trop élevée, les afférences nerveuses depuis les barorécepteurs auront pour conséquences d'inhiber le centre vasomoteur bulbaire, entraînant un relâchement des muscles lisses et provoquant ainsi une dilatation généralisée. En parallèle, l'activité parasympathique aura pour but d'inhiber l'activité cardio-accélétratrice et ainsi ralentir la fréquence cardiaque. On parle ici d'arc réflexe. Chez les patients souffrant d'HTA, les barorécepteurs s'adaptent aux hautes pressions, afin d'être toujours sensibles aux fluctuations ponctuelles de la PA (Xie *et al.*, 1991).

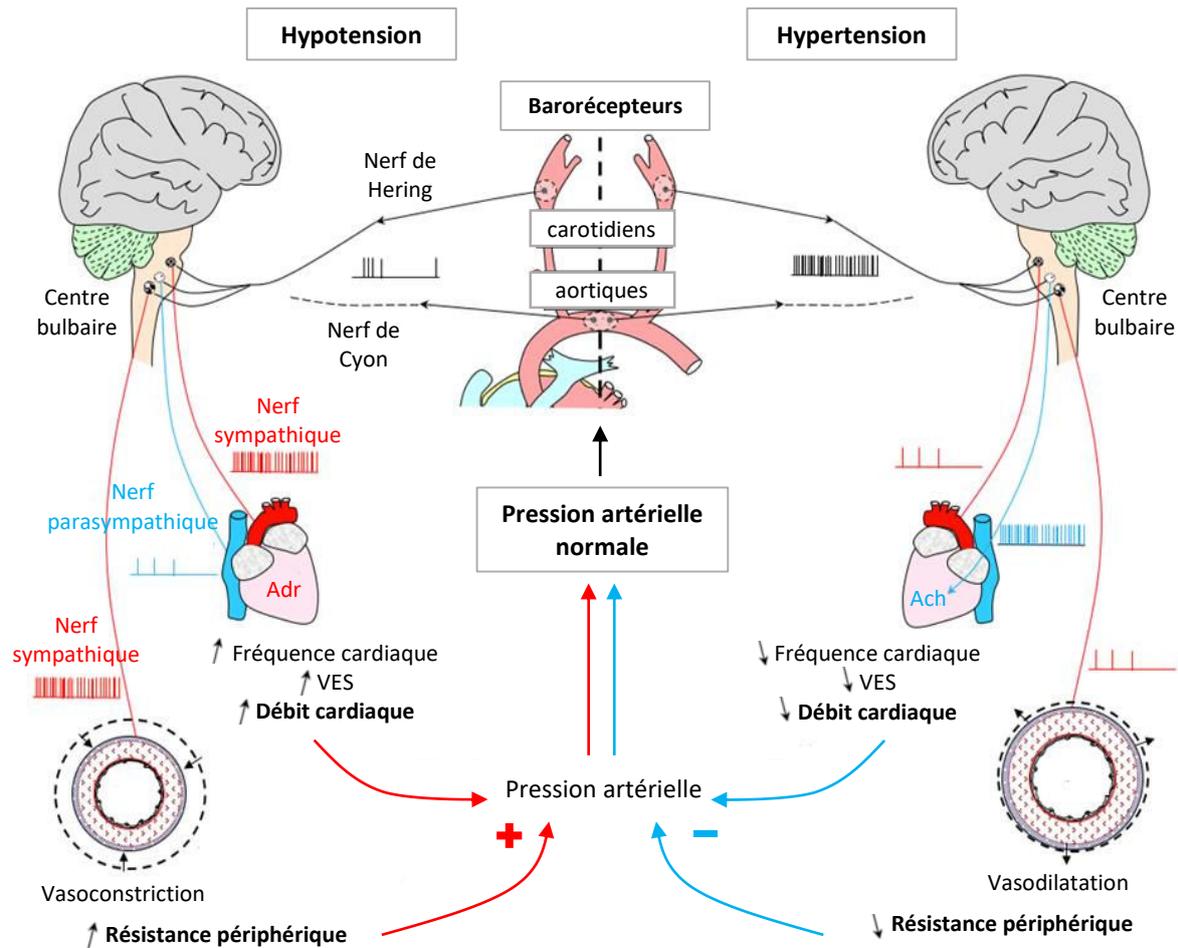


Figure 1. Arc réflexe de la régulation nerveuse de la pression artérielle.

Les barorécepteurs sont centraux dans la régulation rapide de la PA, qui intervient en quelques secondes. Le centre bulbaire permet l'intégration des informations nerveuses et envoie des efférences sympathiques et parasympathiques innervant le compartiment artériel et le cœur. La voie adrénérgique est prépondérante en contexte d'hypotension. La voie cholinérgique est majoritaire lors d'une hypertension. Adr : adrénaline; Ach : acétylcholine ; VES : volume d'éjection systolique. Modifiée d'après <http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt/spip.php?article2503>

I.1.2 Mécanismes d'action des volorécepteurs

Les volorécepteurs sont impliqués dans la régulation de la PA à court terme et déclenchent une réponse réflexe dans les secondes, les minutes suivant un déséquilibre de la PA. Ces senseurs du volume sanguin sont situés dans les parois des systèmes à basse pression : les oreillettes et les artères pulmonaires. Le stimulus initial sera une modification de l'étirement

de ces parois correspondant à une variation du volume sanguin contenu dans les oreillettes et les artères pulmonaires. La réponse initiée est semblable à celle des barorécepteurs : une augmentation du volume sanguin engendrera une diminution de l'activité du centre vasomoteur bulbaire et de l'activité sympathique, résultant en une réduction du débit cardiaque et de la résistance périphérique totale.

I.1.3 Mécanismes d'action des chémorécepteurs

Les chémorécepteurs ou chimiorécepteurs sont situés dans des structures nerveuses appelées corpuscules et sont localisés aux mêmes endroits que les barorécepteurs. Les corpuscules sont traversés par des petites artères, ainsi, les chémorécepteurs, au contact de ces artères vont pouvoir réagir aux variations du pH sanguin et de la concentration du sang en gaz carbonique et en dioxygène. À noter que ces variations peuvent avoir pour conséquence une altération de la PA. L'implication des chémorécepteurs intervient uniquement lorsque les barorécepteurs et les volorécepteurs ne suffisent plus à compenser la chute de pression. Les chémorécepteurs transmettent l'information d'une part, au centre cardioaccélérateur, permettant l'augmentation du débit cardiaque, et d'autre part au centre vasomoteur, de façon à provoquer une vasoconstriction. Cela aura pour conséquence l'amélioration du retour sanguin au cœur et aux poumons.

Nous venons de voir comment fonctionnent les mécanismes immédiats et à court terme de la régulation de la PA. Dans la section suivante nous aborderons la régulation de la PA à moyen terme.

I.2 Les mécanismes de régulation de la pression artérielle à moyen terme

Les mécanismes de régulation à moyen terme de la PA font intervenir des systèmes humoraux qui se mettent en place en plusieurs minutes, voire quelques heures.

I.2.1 Implication de la médullo-surrénale

La partie médullaire des glandes surrénales est responsable de la libération de deux hormones de type catécholamine : l'adrénaline et la noradrénaline. La libération de ces hormones est principalement sous le contrôle des centres bulbaires, qui intègrent notamment des informations en provenance des barorécepteurs. La médullo-surrénale est aussi influencée par le système limbique comme lors d'un stress par exemple. L'adrénaline et la noradrénaline ainsi libérées, exercent sur le cœur et le compartiment vasculaire des effets beaucoup plus durables que ceux de la noradrénaline libérée par les nerfs sympathiques.

I.2.2 Le facteur natriurétique

Le facteur natriurétique auriculaire est produit par les oreillettes sous l'influence de leur distension lors d'une augmentation de la PA. Ce peptide augmente la natriurèse, c'est à dire la concentration de sodium dans les urines en diminuant sa réabsorption rénale. Il va ainsi provoquer une diminution de la rétention d'eau et par conséquent une diminution de la PA.

I.2.3 La vasopressine

La vasopressine, ou encore hormone antidiurétique, est synthétisée par l'hypothalamus et libérée par l'hypophyse. En cas de chute de la PA, les barorécepteurs transmettent l'information à l'hypothalamus qui augmente la production de vasopressine. Cette hormone possède une double action antidiurétique et vasoconstrictrice, permettant de rétablir la PA en jouant sur la volémie et le tonus vasculaire.

Après avoir abordé les mécanismes immédiats, à court et moyen terme de la régulation de la PA, dans la partie suivante nous abordons les mécanismes à long terme, qui font intervenir le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Le SRAA joue un rôle essentiel dans la régulation du volume sanguin et de la résistance vasculaire systémique, lesquels, ensemble, influencent le débit cardiaque et la PA. Nous l'aborderons plus tard, ce système est largement impliqué dans la mise en place de l'HTA.

I.3 Les mécanismes de régulation de la pression artérielle à long terme et implication du système rénine-angiotensine-aldostérone

En faisant varier le volume sanguin, les mécanismes de régulation à long terme corrigent les fluctuations de la PA, indépendamment de la résistance périphérique et de l'activité cardiaque, deux systèmes propres à la régulation à court terme. Comme nous l'avons évoqué précédemment, les barorécepteurs ont la capacité de s'adapter aux basses et hautes pressions prolongées ou chroniques. Ainsi, en régissant le volume sanguin, les reins sont la principale influence régulatrice durable de la PA. De façon purement mécanique, les reins peuvent agir directement sur la volémie. Une hausse de la PA va provoquer une augmentation de la vitesse de passage des liquides de la circulation sanguine vers les tubules rénaux. La capacité de filtration des reins étant limitée, une grande quantité de liquide sera alors éliminée dans les urines, abaissant ainsi la PA. Inversement, une diminution de la PA permet une réabsorption d'eau plus importante, de sorte que la PA augmente. En réponse à une baisse de la PA, le SRAA stimule la production d'un puissant vasoconstricteur, l'angiotensine-II (**Figure 2**). Le réflexe a son origine au niveau du rein et plus précisément au niveau des artérioles glomérulaires. Une baisse de la PA et donc une diminution de la tension exercée sur les cellules musculaires lisses de ces vaisseaux initie la production et la libération dans le sang de rénine. Cette enzyme est

d'abord synthétisée sous forme de prorénine qui est par la suite clivée au niveau de l'appareil juxtaglomérulaire en rénine active. La rénine catalyse la transformation de l'angiotensinogène circulant d'origine hépatique, en un premier peptide inactif, l'angiotensine-I dans le rein. Celui-ci est ensuite libéré dans le sang et clivé en angiotensine-II, l'élément actif du SRAA, par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) principalement présente au niveau des cellules endothéliales.

L'angiotensine-II cible 2 récepteurs spécifiques couplés à des protéines G, les récepteurs AT1 et AT2 (respectivement récepteurs à l'angiotensine de type 1 et de type 2). Toutefois, l'effet de l'angiotensine-II sur la PA passe majoritairement par le récepteur AT1. L'angiotensine-II a une triple action sur la PA. Comme cité précédemment, son action vasoconstrictrice permet une régulation à moyen terme de la PA en augmentant la résistance périphérique et ainsi la PA. Son action à long terme est surtout liée à sa capacité à déclencher la production et la libération d'aldostérone par le cortex surrénalien, favorisant ainsi la réabsorption rénale de sodium. L'angiotensine-II est aussi capable d'intensifier la réabsorption d'eau en provoquant la libération de vasopressine par l'hypophyse (**Figure 2**).

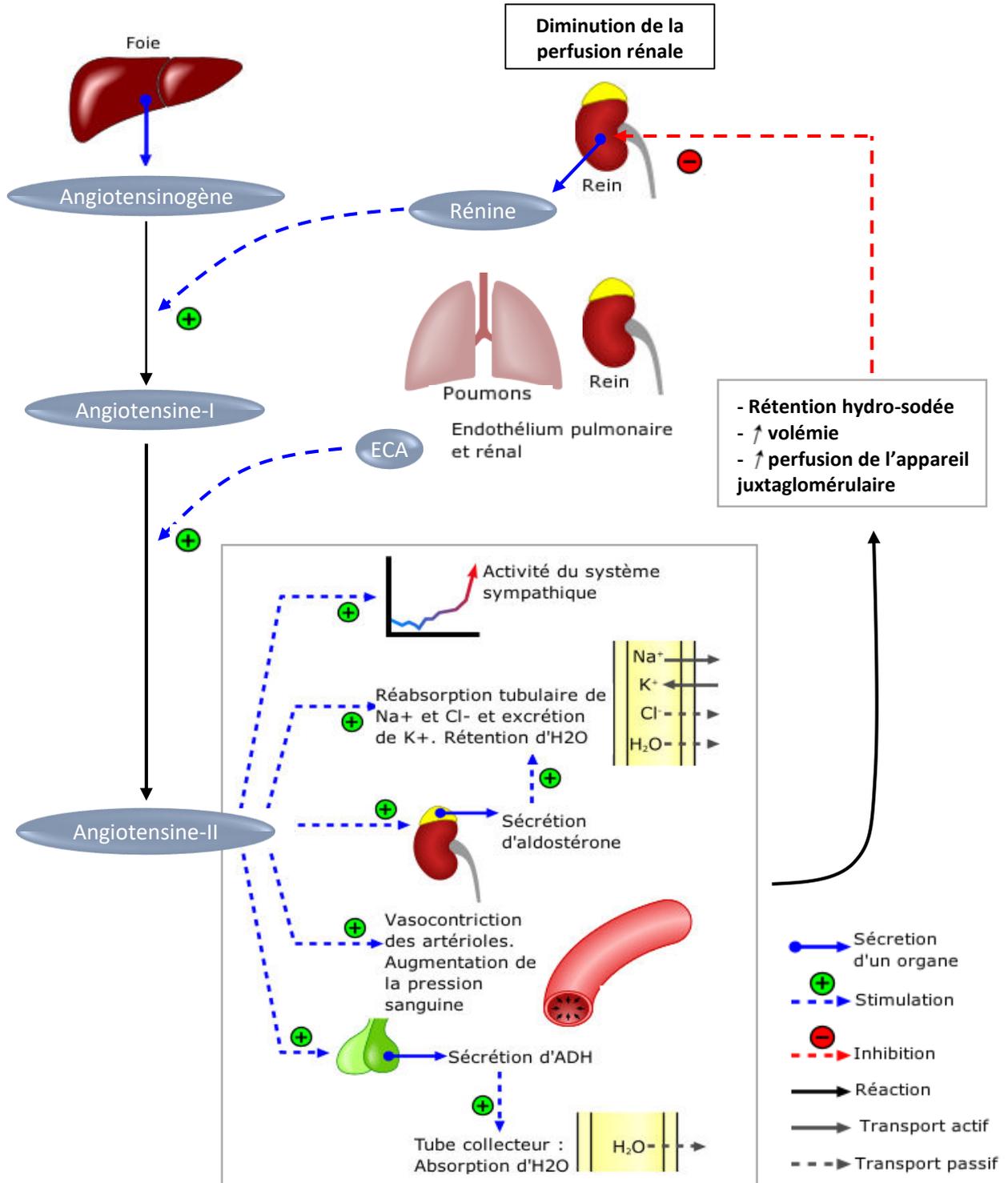


Figure 2. Le système rénine-angiotensine-aldostérone dans la régulation de la pression artérielle. Le SRRA est un système endocrinien et enzymatique dont l'angiotensine-II est le principal médiateur. Il agit sur l'activité sympathique, la rétention d'eau et la résistance périphérique dans le but d'augmenter la pression artérielle. Modifiée d'après https://fr.wikipedia.org/wiki/Syst%C3%A8me_r%C3%A9nine-angiotensine-aldost%C3%A9rone

Nous venons de détailler les différents mécanismes nerveux et humoraux, de type central et périphérique, qui régissent le maintien de la PA en conditions physiologiques. Dans le chapitre suivant, nous verrons que ces mécanismes sont largement impliqués dans la mise en place et l'évolution de l'HTA.

II L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE CHRONIQUE

II.1 Définition

L'HTA est une maladie généralement asymptomatique caractérisée par une PA anormalement élevée, c'est-à-dire supérieure à 140/90 mmHg de PAS/PAD selon l'OMS. L'HTA est une pathologie chronique, ainsi les valeurs de PA doivent être attestées lors de 3 consultations médicales sur une période d'au moins 3 mois, exception faite en cas d'HTA sévère pour laquelle 2 consultations rapprochées sont suffisantes. Physiologiquement, il n'y a pas de seuil franc permettant de distinguer une PA normale d'une hypertension. La définition de l'HTA repose en fait sur l'acceptabilité d'un risque plutôt que sur la normalité d'une valeur. Toutefois, il a été démontré que le risque cardio-vasculaire et les dommages aux organes sont plus importants pour des valeurs de PA supérieures à 140/90 mmHg. A partir de cette valeur, l'intervention thérapeutique par agent antihypertenseur a été démontrée nettement bénéfique (Law *et al.*, 2009). Dans le but d'optimiser et d'harmoniser la prise en charge des patients, 140/90 mmHg a donc été défini comme seuil diagnostique de l'HTA. Par la suite, différents grades ont été établis en fonction de la sévérité de la pathologie (**Tableau 1**).

Catégorie	PAS		PAD
Optimale	<120	Et	<80
Normale	120-129	Et/ou	80-84
Normale haute	130-139	Et/ou	85-89
HTA grade 1	140-159	Et/ou	90-99
HTA grade 2	160-179	Et/ou	100-109
HTA grade 3	≥180	Et/ou	≥110
HTA systolique isolée	≥140	Et	<90

Tableau 1. Définition et classification des niveaux de pression artérielle issue des recommandations de 2013 de la Société Européenne d’Hypertension et de la Société Européenne de Cardiologie. Cette classification fut établie d’après les valeurs de pression artérielle recueillies par des professionnels de santé en cabinets médicaux ou en milieu hospitalier. Une pression artérielle normale haute correspond à ce qui est communément appelé pré-hypertension. L’HTA systolique isolée est caractérisée par des valeurs de PAS élevée et des valeurs de PAD normales menant à une pression artérielle pulsée élevée. PAS : pression artérielle systolique, PAD : pression artérielle diastolique.

L’HTA est l’un des principaux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. En effet, une méta-analyse regroupant 61 études prospectives sur 1 million de patients révèle que le risque de mortalité à la suite d’un accident vasculaire cérébral (AVC) est linéairement et positivement corrélé à l’augmentation des valeurs de PAS et PAD quel que soit l’âge et ce, à partir d’un seuil estimé à 115/75 de PAS/PAD (Lewington *et al.*, 2002) (**Figure 3**). Cette étude met ainsi en avant l’aspect aggravant de l’élévation chronique de la PA vis-à-vis des maladies cérébro-cardiovasculaires.

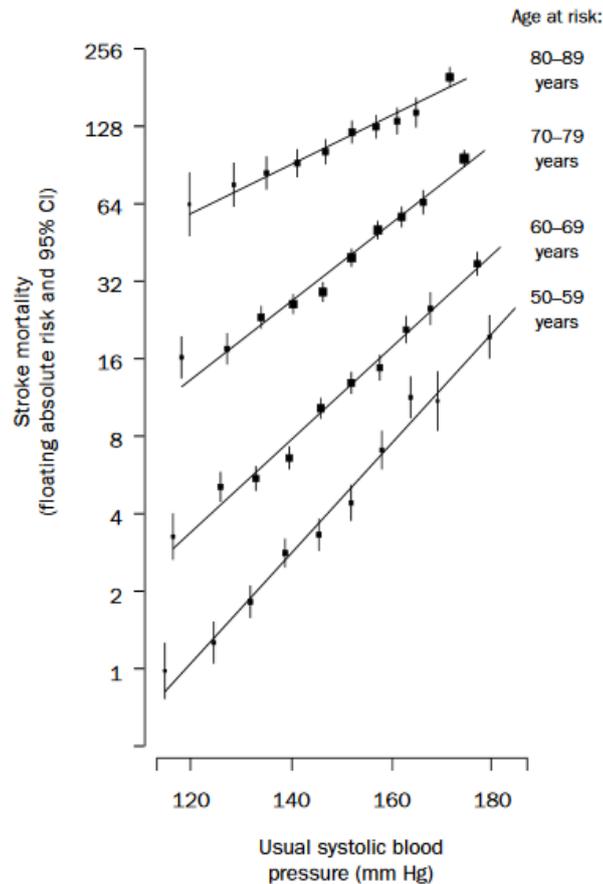


Figure 3. Taux de mortalité suite à un accident vasculaire cérébral ischémique par tranche d'âge et en fonction de la pression artérielle systolique. *Le risque de décès suite à un accident vasculaire cérébral augmente linéairement avec la pression artérielle, quel que soit la tranche d'âge. D'après (Lewington et al., 2002).*

Par ailleurs, l'HTA est l'une des principales causes de déclin cognitif et de démence. En effet, plusieurs études démontrent l'existence d'une corrélation entre le niveau de PA et la survenue de troubles cognitifs, de démences de type vasculaire et de la maladie d'Alzheimer qui interviennent à un âge plus avancé (Gąsecki *et al.*, 2013; Iulita et Girouard, 2017). L'apparition de troubles cognitifs est favorisée par la présence de lésions ischémiques focales et/ou d'ischémie chronique de la substance blanche. L'élévation chronique de la PA endommage largement le compartiment vasculaire cérébral souvent à l'origine de ces mécanismes pathologiques. Il semblerait que la prise d'un traitement antihypertenseur

permettrait de réduire le risque de ces troubles associés. Toutefois, aujourd'hui aucun seuil de PA n'a pu être défini comme assurant un risque minimum.

II.2 Épidémiologie

Alors qu'on attribue aux maladies cardiovasculaires plus de 17.7 millions de décès par an dans le monde, 9.4 millions sont imputables aux complications de l'HTA (Armstrong *et al.*, 2014). L'HTA est aussi la cause de nombreuses autres pathologies handicapantes telles que l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale, l'arythmie et les démences (Forouzanfar *et al.*, 2017). En France, la prévalence de l'HTA est de 30,6 %, elle est plus élevée chez les hommes que chez les femmes (36,5 % contre 25,2 %) et augmente significativement avec l'âge, 6,3 % chez les 18-34 ans contre 67,8 % chez les 65-74 ans (**Tableau 2**). Ces chiffres ont été relevés dans l'étude Esteban (Étude de santé sur l'environnement la biosurveillance, l'activité physique et la nutrition) (Perrine *et al.*, 2018) publiée en 2018, faisant suite à l'étude ENNS (l'Étude nationale nutrition santé) de 2007 (Unité de surveillance et d'épidémiologie nutritionnelle (Usen), 2007). L'étude Esteban a été conduite entre 2014 et 2016 sur 2 169 adultes âgés de 18 à 74 ans et vise à estimer la prévalence, le dépistage, la prise en charge et l'évolution de l'HTA. Les résultats montrent que malgré des campagnes de prévention importantes, la prévalence et la prise en charge de l'HTA ne se sont pas améliorées depuis 10 ans. Bien que la prise en charge soit importante et malgré la disponibilité de nombreux traitements antihypertenseurs, la prévalence de la pathologie est mal contrôlée dans la population. En effet, 45 % des patients hypertendus ne sont pas dépistés et lorsque l'HTA est diagnostiquée, dans la moitié des cas, elle n'est pas traitée ou résiste à un traitement antihypertenseur, c'est-à-dire que la PA reste au-dessus du seuil recommandé de 140/90 mmHg. Le contexte international apporte des chiffres qui ne sont pas plus rassurants. En 2010, on estimait que 40 % de la population âgée de plus de 25 ans présentait une HTA, soit 1 milliard de personnes à travers le monde (OMS, 2013). Les

pays à revenus faibles ou intermédiaires sont les plus touchés et présentent une forte prévalence de personnes hypertendues non-diagnostiquées, notamment due à une faiblesse des dispositifs de santé. Quel que soit le pays, la prévalence de l'HTA est croissante. Ce phénomène est attribuable à une forte croissance démographique et au vieillissement de la population. Les facteurs de risques comportementaux, tels que la consommation de tabac et d'alcool, l'obésité, un mauvais équilibre alimentaire, un manque d'activité physique et l'exposition fréquente à des facteurs de stress sont de plus en plus présents dans la population et participent grandement à l'évolution de la prévalence de l'HTA. L'HTA est donc considérée comme un défi majeur de santé publique dans le monde. La prévention, la détection, le traitement et le contrôle de cette pathologie doivent être pris en considération avec une haute priorité.

	18-34 ans	35-44 ans	45-54 ans	55-64 ans	65-74 ans	18-74 ans	IC95%	p par âge
Hommes								
Prévalence de l'HTA* (%)	11,7	17,0	36,6	58,7	73,1	36,5	32,5-40,4	<0,0001
Femmes								
Prévalence de l'HTA* (%)	1,5	9,1	21,2	48,3	62,1	25,1	21,8-28,4	<0,0001
Total								p H/F
Mesure dans l'année (%)	74,4	77,3	87,6	91,5	94,3	84,1	81,8-86,3	0,11
Prévalence de l'HTA* (%)	6,3	12,9	28,6	53,2	67,8	30,6	28,1-33,2	<0,0001
HTA connue* (%)	21,1	38,6	44,8	63,7	61,9	55,5	50,5-60,5	0,01
HTA connue traitée* (%)	20,2	77,2	59,6	72,9	79,7	72,6	66,5-78,7	NS
HTA traitée* (%)	4,3	36,7	31,5	52,4	60,0	47,3	42,3-52,2	NS
HTA traitée contrôlée* (%)	**	50,3	53,3	55,6	42,0	49,6	42,6-56,7	0,01

Tableau 2. Prévalence de l'hypertension artérielle en France (Etude Esteban 2015). HTA connue : patients hypertendus ayant déclaré avoir connaissance de leur hypertension ; HTA connue traitée : patients hypertendus traités parmi ceux ayant déclaré avoir connaissance de leur pathologie ; HTA traitée : patients hypertendus traités parmi les hypertendus ; HTA traitée contrôlée : patients hypertendus contrôlés parmi les hypertendus traités. Modifiée d'après (Perrine et al., 2018).

Dans les sections précédentes nous avons vu que l'HTA est largement répandue dans la population, quelle est la cause de nombreuses pathologies cardiovasculaires, de déclin cognitif et/ou de démences. Dans la partie suivante, nous abordons les causes de l'HTA.

II.3 Étiologie

Dans 90 % des cas on ne connaît pas la cause sous-jacente à l'apparition de l'HTA, on parle alors d'hypertension essentielle, aussi appelée hypertension primaire ou idiopathique (Messerli *et al.*, 2007). Souvent liée à des risques familiaux, elle est susceptible d'être la conséquence d'une interaction entre des facteurs environnementaux et génétiques (**Tableau 3**). D'autre part, de plus en plus d'études indiquent que le système nerveux sympathique et le système hormonal pourraient agir en synergie pour augmenter de façon chronique la résistance périphérique et de ce fait la PA (Jennings et Zanstra, 2009). La cause de ce dérèglement reste toutefois méconnu, mais il interviendrait au stade très précoce de l'HTA (pré-hypertension) et participerait à son développement. D'autres études se sont intéressées à l'impact génétique sur le développement de cette pathologie et ont travaillé sur l'établissement d'un génotype caractéristique d'une prédisposition à l'HTA. Des polymorphismes associés à certains gènes impliqués dans la régulation de la PA ont été découverts comme étant liés à la survenue de l'HTA. On citera notamment l'angiotensine-II, l'angiotensinogène et le récepteur AT1 (Guo *et al.*, 2005; Mullins *et al.*, 2006).

Les HTA secondaires sont quant à elles relativement rares et ne représentent que 10 % de la population des patients hypertendus. Des déficiences rénales ou endocriniennes sont les causes les plus fréquentes. Toutefois, certains médicaments de type oestroprogestatif ou corticoïdien sont la cause du déclenchement de la pathologie. On parle alors d'HTA iatrogène.

Causes		Facteurs de risque non modifiables	Facteurs de risque modifiables
HTA essentielle (90% des cas)	?	Age Prédisposition génétique Grossesse Sexe	Régime alimentaire sodé Stress Surcharge pondérale Tabagisme Usage de contraceptifs oraux Médication Sédentarité Consommation élevée d'alcool Facteurs socio-économiques
HTA secondaire (10 % des cas)	Maladie des reins Maladie endocrinienne Patrimoine génétique Anomalies congénitales Origine iatrogène Facteurs materno-foetaux		

Tableau 3. Causes et facteurs de risques de l'hypertension artérielle. *Les maladies rénales peuvent correspondre à une néphrite chronique, une maladie polycytique, une sténose de l'artère rénale et les maladies endocriniennes peuvent correspondre à des troubles surrénaliens de type phéochromocytome ou syndrome de Cushing ou de Conn.*

L'HTA est une pathologie complexe qui a sa propre définition en fonction du patient considéré. Le traitement de l'HTA ne peut donc pas être généralisé à l'ensemble des sujets hypertendus. Dans la section suivante nous détaillons les traitements proposés dans le cadre de cette pathologie.

II.4 Les traitements de l'HTA

Alors que la mortalité cardiovasculaire double pour chaque augmentation de 20/10 mmHg (PAS/PAD) (Lewington *et al.*, 2002; Rapsomaniki *et al.*, 2014), il est important de noter qu'une diminution de la PA de quelques mmHg est bénéfique. Des études ont démontré l'efficacité de traitements antihypertenseurs dans plusieurs essais cliniques avec notamment une diminution de 10 % de la morbidité liée aux AVC pour une réduction de 2 mmHg de PA (Palmer *et al.*, 1992). Les traitements antihypertenseurs ont donc deux objectifs : (i) une prévention primaire visant à rétablir une PA à des valeurs normales et optimales ; (ii) une prévention secondaire qui a pour objectif de réduire le risque cérébro-cardiovasculaire. On

notera que toutes les classes d'antihypertenseurs n'ont pas le même impact sur les dommages aux organes induits par l'HTA et on favorisera certaines classes de médicaments pour améliorer la prévention secondaire.

Actuellement on dénombre 8 classes d'antihypertenseurs :

- **les diurétiques** : cette classe d'antihypertenseurs est la première à avoir été utilisée pour lutter contre l'HTA (à partir de 1955). Les diurétiques ont deux actions. La première est transitoire et correspond à l'effet diurétique par excrétion de sodium et donc d'eau dans les urines. La seconde action consiste à diminuer le tonus artériel en provoquant un relâchement vasculaire.

- **les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine-II** ou ARA : c'est la classe d'antihypertenseur la plus récente. Leur effet est directement lié au blocage des récepteurs AT1 à l'angiotensine-II, limitant ainsi la constriction vasculaire. Cette classe a l'avantage de ne pas induire d'effet secondaire spécifique.

- **les bêta-bloquant ou BB** : sont des antagonistes compétitifs des récepteurs β -adrénergiques. Ils sont utilisés depuis 1965 pour le traitement d'angine de poitrine et d'autres pathologies cardiaques. Leur principal mode d'action consiste à diminuer l'activité du système nerveux sympathique se traduisant par un ralentissement de la fréquence cardiaque et une diminution de la force de contraction du cœur. Ils vont également agir sur le SRAA en diminuant la production de rénine par les reins.

- **les inhibiteurs calciques ou IC** : utilisés depuis presque 30 ans, les antagonistes calciques bloquent l'entrée de calcium dans les cellules musculaires lisses. Cela a pour conséquence d'empêcher la contraction de ces cellules et donc la constriction des artères, réduisant ainsi la PA.

- **les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-II ou IEC** : cette classe de médicament bloque l'enzyme de conversion de l'angiotensine responsable de la transformation de l'angiotensine-I en angiotensine-II. Elle limite ainsi l'augmentation du tonus vasculaire et diminue la PA.

- **Les antihypertenseurs centraux** : sont des agonistes α_2 présynaptiques. Ils inhibent la libération de catécholamines des centres bulbaires sympathiques et ainsi diminuent la fréquence et la force de contraction cardiaque.

- **les alpha-bloquants** : cette classe d'antihypertenseurs bloque les récepteurs α_1 adrénergiques des cellules musculaires lisses. Leur effet se traduit par une diminution du tonus sympathique permettant une relaxation des fibres musculaires lisses, entraînant ainsi une réduction de la PA.

- **les inhibiteurs directs de la rénine** : l'aliskiren est le seul médicament de cette classe, il a été commercialisé en 2009 en France. Il agit par inhibition de la rénine et de ce fait, empêche la transformation de l'angiotensinogène en angiotensine-I.

Sur ces 8 classes d'antihypertenseurs, seules les cinq premières sont couramment utilisées et notamment recommandées en première intention dans l'HTA essentielle non-complicquée. En 2002, l'étude LIFE (Losartan Intervention For Endpoint réduction in hypertension), réalisée sur 9 193 patients âgés de 55 à 80 ans souffrant d'HTA essentielle, met en avant que l'utilisation d'un traitement à base de Losartan, le Cozaar, un antihypertenseur de type antagoniste des récepteurs à l'angiotensine-II, est plus efficace pour réduire la morbidité cérébro-cardiovasculaire qu'un bêta-bloquant à base d'Aténolol. Une part importante du bénéfice est observée par réduction significative du nombre d'AVC chez les sujet sous Losartan par rapport au groupe sous Aténolol, respectivement 232 versus 309 (Dahlöf *et al.*, 2002; Lindholm *et al.*, 2002). Le choix du traitement doit donc prendre en compte le risque cérébro-

cardiovasculaire du patient mais pas seulement. Il doit également prendre en compte des situations cliniques particulières ; l'efficacité et la tolérance au médicament ; des comorbidités associées et enfin, le coût du traitement et de sa surveillance. Dans un premier temps la stratégie médicamenteuse consiste à débiter par une monothérapie ou une association fixe d'antihypertenseurs à doses faibles. En cas de réponse insuffisante au traitement initial, lorsque la PA reste au-delà des valeurs seuils, il convient de proposer aux patients une bi, tri voire tétra-thérapie combinée de plusieurs antihypertenseurs.

Les mesures hygiéno-diététiques contribuent à la réduction des chiffres tensionnels et font partie intégrante de la prise en charge de tous les patients souffrant d'HTA. Elles comprennent la pratique d'une activité physique régulière et adaptée aux possibilités du patient. Une normalisation de l'apport sodé, ainsi qu'une alimentation privilégiant la consommation de fruits, de légumes et d'aliments peu riche en graisse. Bien que l'arrêt d'une intoxication tabagique n'entraîne pas directement de réduction de la PA, cette mesure est essentielle à la réduction de la morbi-mortalité liée à l'HTA.

La compréhension de la physiopathologie de la maladie, ainsi que les différents traitements associés n'auraient pas pu être développés sans l'utilisation de modèles expérimentaux. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons choisi d'étudier la physiopathologie de l'HTA chez la souris pour différentes raisons techniques : les modèles associés sont bien détaillés dans la littérature et miment la pathologie humaine, un grand nombre de souches transgéniques existe, sa taille est adaptée à l'utilisation de la microscopie biphotonique *in vivo*. Nous reviendrons sur ces aspects dans la section *Méthodologie*. Ainsi, les modèles animaux d'HTA présentés ci-après sont exclusivement réalisés chez la souris. Toutefois, on notera que d'autres modèles développés chez des espèces différentes existent,

comme par exemple la souche de rat spontanément hypertendu (SHR) très étudiée dans la littérature.

II.5 Les modèles animaux de l'HTA

L'HTA humaine est complexe, elle est multifactorielle et sous contrôle polygénique. Divers modèles expérimentaux mimant la pathologie ont été développés, principalement pour obtenir des informations étiopathogéniques. Ces modèles sont également utilisés dans le criblage pharmacologique d'agents antihypertenseurs potentiels. Au fur et à mesure que de nouvelles molécules sont synthétisées, l'utilisation de modèles animaux augmente pour tester ces molécules. De nouveaux modèles expérimentaux sont également mis au point à mesure que les connaissances sur la pathogenèse de l'HTA évoluent (Ražny *et al.*, 2014). Les modèles animaux partagent de nombreuses caractéristiques qui sont communes à l'HTA humaine. Une grande partie de ces modèles a été développée en utilisant les facteurs étiologiques présumés responsables de la pathologie humaine, tels que l'apport excessif de sel, l'hyperactivité du SRAA et les facteurs génétiques. Il faut d'ailleurs noter que, puisque la régulation de la PA est multifactorielle, l'efficacité d'un agent antihypertenseur dans un modèle donné, ne signifie pas nécessairement que le mécanisme d'action est lié à l'action de cet antihypertenseur sur l'élévation de la PA.

Pour étudier les mécanismes physiopathologiques de l'HTA ou l'impact d'un traitement antihypertenseur, un modèle expérimental idéal se verrait remplir les critères suivants :

- Applicable chez les petits animaux
- Simple dans sa réalisation et uniformément reproductible
- En capacité de prédire les propriétés antihypertenseur potentielles d'un agent donné

- Consommer de faibles quantités de composés
- Comparable à une forme d'HTA humaine

Aucun modèle ne peut satisfaire pleinement à tous ces critères, chaque modèle présente des particularités et doit être choisi en fonction d'applications spécifiques. Alors que dans le passé, la plupart des études sur l'HTA ont été réalisées chez le chien, actuellement le rat présente un grand nombre d'avantages pour l'étude de la pathologie. Le rat SHR, la souche génétique du rat hypertendu est le modèle de choix pour analyser la physiopathologie de l'HTA et tester des antihypertenseurs puisqu'il permet de réaliser le monitoring physiologique complet de l'animal (fréquence cardiaque, PA, paramètres respiratoires). Lapins, singes, cochons et souris sont également utilisés pour produire une hypertension expérimentale. Toutefois, la transgénèse chez la souris a donné l'occasion unique de disséquer les mécanismes de l'HTA et de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Par conséquent, de nombreux modèles classiques ont été transférés à ce petit mammifère. À noter que de plus en plus de modèles de souris transgéniques sont disponibles pour permettre une imagerie intravitale de nombreux types cellulaires dans le cerveau, tels que les neurones, les astrocytes, les cellules microgliales, les cellules endothéliales, intervenant dans la mise en place et le développement de la pathologie.

Les modèles expérimentaux d'HTA peuvent être classés de différentes façons. Ici, nous avons choisi de les présenter selon ce qui a été suggéré par Lerman et collègues en 2005, dans un premier temps présenter les modèles non-génétiques, puis dans un second temps les modèles génétiques de l'HTA (**Figure 4**) (Lerman *et al.*, 2005).

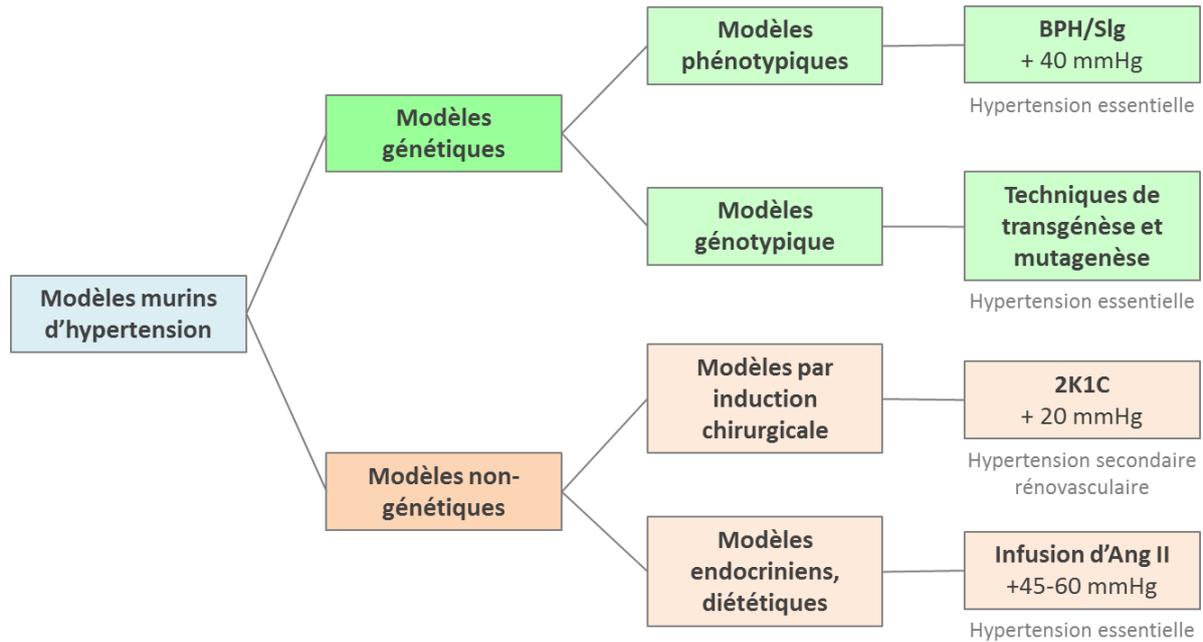


Figure 4. Principaux modèles d'hypertension artérielle chronique chez la souris. Ils peuvent être regroupés en 2 catégories, les modèles génétiques et non-génétiques, mais d'autres types de hiérarchisation existent. On peut par exemple présenter les différents modèles expérimentaux en fonction des 2 grands types d'HTA : l'HTA primaire ou essentielle et l'HTA secondaire. Les modèles présentés ici sont associés à l'élévation de PAS mesurée. BPH : blood pressure high.

II.5.1 Les modèles non-génétiques

II.5.1.1 Les modèles d'HTA rénovasculaire

En 1934, Goldblatt et ses collaborateurs ont introduit le premier modèle animal d'hypertension rénovasculaire réalisé par sténose unilatérale de l'artère rénale par un clip d'argent chez le chien. Ce modèle a été appelé le modèle d'hypertension à haute résistance – 2-kidney 1-clip (2K1C) (Goldblatt *et al.*, 1934) (**Figure 5**). Le modèle a très rapidement été transposé chez le rat (Wilson et Byrom, 1939), le lapin (Goldblatt, 1960), le singe (Panek *et al.*, 1991), la souris (Wiesel *et al.*, 1997) et enfin chez le cochon (Lerman *et al.*, 1999). En parallèle, le modèle 2K1C a évolué sous une autre version, le modèle 1K1C (1-kidney 1-clip), où la

constriction unilatérale de l'artère rénale est associée à une néphrectomie controlatérale. Cette adaptation est appelée modèle d'hypertension dépendant du volume (Thurston et Swales, 1976).

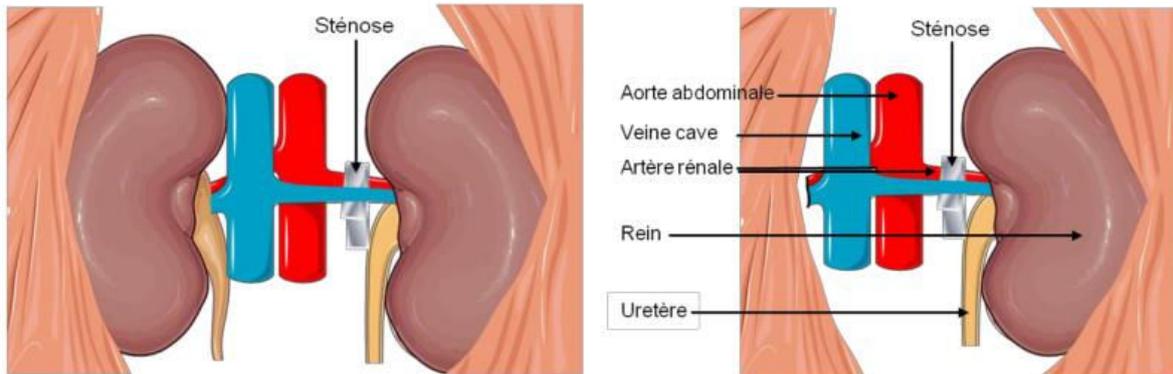


Figure 5. Schéma représentatif du dispositif chirurgical pour l'induction des modèles d'HTA 1K1C et 2K1C. Le modèle Goldblatt initial est celui correspondant au modèle 2K1C présenté à gauche où les deux reins restent en place et l'une des deux artères est sténosée. Le modèle 1K1C, présenté à droite, est plus sévère puisqu'il nécessite une néphrectomie unilatérale.

Ces deux modèles d'HTA rénovasculaire sont différents dans leurs mécanismes physiopathologiques (**Figure 6**). Dans le modèle original 2K1C, une seule des deux artères rénales est sténosée alors que la seconde reste intacte. Cela entraîne une augmentation soutenue de la PA faisant suite à l'augmentation de l'activité rénine plasmatique, qui à son tour augmente l'angiotensine-II circulante, un puissant vasoconstricteur. A ce stade, il n'y a aucune rétention sodée puisque l'autre rein est intact. Ainsi, l'HTA résultante dépend uniquement de la rénine et de l'angiotensine. Après environ 6 semaines, l'augmentation de l'angiotensine-II déclenche la libération d'aldostérone à partir du cortex surrénalien. Celle-ci va conduire à la rétention progressive de sel et d'eau entraînant une diminution de la rénine (Badyal *et al.*, 2003). Dans le modèle 1K1C, l'augmentation de la PA intervient en seulement quelques heures. La sténose d'un rein et l'absence du rein controlatéral limite fortement la diurèse et la natriurèse. Il y a

donc une rétention rapide de sel et d'eau. L'activité rénine plasmatique est habituellement normale. L'HTA devient alors rapidement dépendante de la volémie.

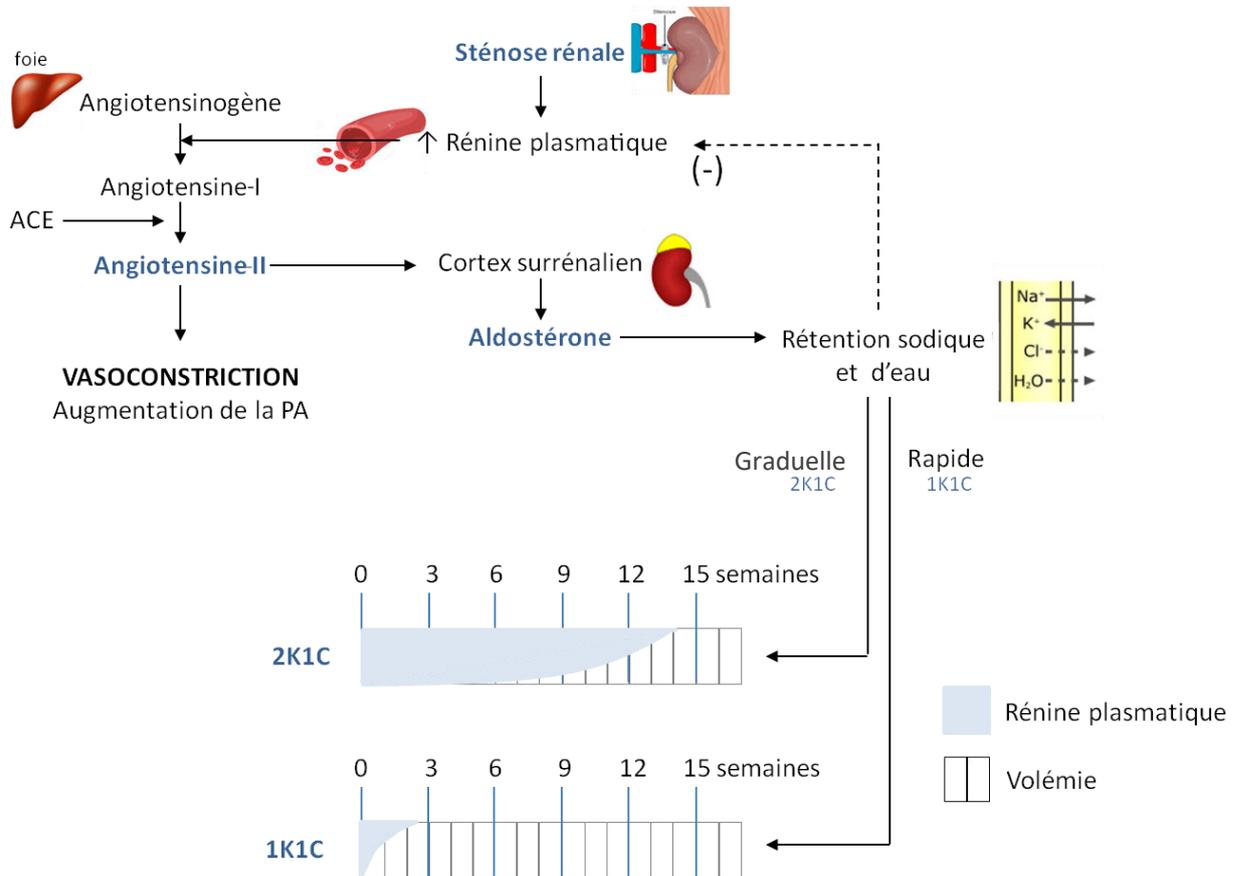


Figure 6. Système rénine-angiotensine-aldostérone et modèles 2K1C et 1K1C. Les modèles d'HTA 2K1C et 1K1C font intervenir le SRAA pour l'augmentation de la PA, toutefois dans des dynamiques différentes. Pour le modèle 2K1C, pendant les 10 premières semaines après induction de l'HTA, l'hypertension est mise en place par augmentation de la résistance périphérique, puis dans un second temps, par augmentation de la volémie. Dans le modèle 1K1C, l'hypertension est dépendant de la rétention hydro-sodique et donc de l'augmentation de la volémie. Modifiée d'après (Badyal et al., 2003).

On notera que les deux modèles, 2K1C et 1K1C ont montré une sensibilité comparable à un régime riche en sodium et développent une hypertrophie cardiaque notamment au niveau du ventricule gauche. Dans le modèle 2K1C, l'HTA est dépendante de la rénine alors que dans

le modèle 1K1C, la hausse de PA est indépendante de la rénine mais dépendante de la réabsorption rénale, c'est-à-dire de la volémie (Tyagi *et al.*, 2005; Wiesel *et al.*, 1997).

Le modèle 2K1C, qui nous intéresse particulièrement dans cette étude, a notamment permis à Shih et collaborateurs en 2016 de montrer chez la souris que l'HTA altère la mémoire à long terme, l'arborisation dendritique et la neurogenèse hippocampique (Shih *et al.*, 2016). Les mécanismes en jeu feraient intervenir une diminution de la libération du BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*).

II.5.1.2 Le modèle par infusion chronique d'angiotensine-II

L'HTA peut également être induite par le modèle AngII, un modèle d'HTA essentielle largement utilisé dans la littérature et facile à mettre en œuvre comparativement au modèle 2K1C précédemment décrit. Il consiste en l'administration continue d'angiotensine-II. Au moyen d'une pompe osmotique placée en sous-cutané, on peut rapidement induire une augmentation de la PA de 40 à 60 mmHg. Différents mécanismes entrent en jeu pour la mise en place de l'HTA et font intervenir le système vasculaire, les glandes surrénales, les reins et le cerveau par action directe ou indirecte de l'angiotensine-II (**Figure 7**). La rétention sodique est un mécanisme clé dans l'induction de l'HTA dans ce modèle (Lohmeier, 2012). Cette HTA induite par l'angiotensine-II est associée à une hypertrophie et une fibrose cardiaque (Byrne *et al.*, 2003). A forte dose, l'angiotensine-II circulante agit sur ses récepteurs AT1 et stimule le stress oxydatif dans plusieurs organes tels que le cœur, au niveau des vaisseaux et du cerveau (Johar *et al.*, 2006; Zimmerman *et al.*, 2004).

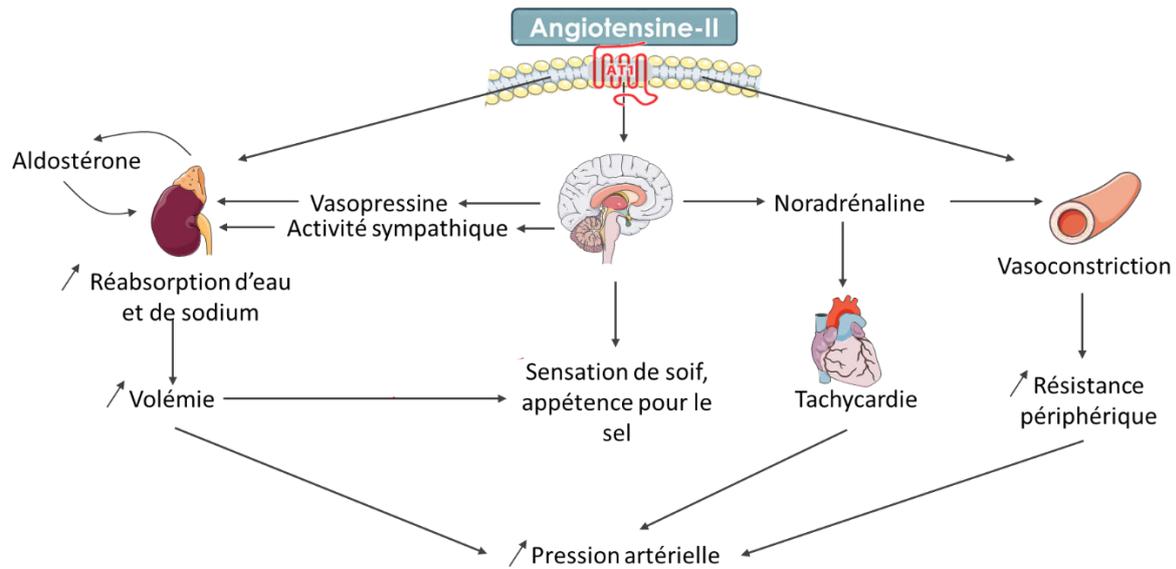


Figure 7. Voies d'induction de l'hypertension artérielle chronique par le modèle AngII
L'infusion d'angiotensine-II a de multiples effets aigus et chroniques à l'origine de l'élévation de PA. Les récepteurs AT1 à l'angiotensine sont présents au niveau rénal, cérébral et vasculaire et sont responsables des effets hypertenseurs et des dommages aux organes associés à l'HTA.

Ce modèle d'HTA que nous avons utilisé dans le cadre de ce travail de thèse, a notamment permis à Shen et collaborateur en 2015 et à Iulita et collaborateurs en 2018 de montrer que cette pathologie induit une inflammation cérébrale régionalisée. Plus précisément, ces deux études ont respectivement démontré l'existence d'une activation gliale localisée au niveau de l'hippocampe et du PVN largement impliqué dans la régulation de la PA (Shen *et al.*, 2015; Iulita et Girouard, 2017).

II.5.1.3 Le modèle DOCA-salt

Le sel d'acétate de désoxycorticostérone (DOCA-salt) est un analogue de synthèse de l'aldostérone. L'aldostérone est une hormone minérocorticoïde entraînant une rétention sodique et hydrique. L'utilisation du DOCA est une méthode endocrinienne permettant

l'induction de l'HTA. Elle est toujours combinée à une néphrectomie unilatérale, ainsi qu'à un régime riche en sel. Ce modèle est associé à une hypertrophie cardiaque et rénale, à un dépôt de collagène dans le ventricule gauche et le rein, à une protéinurie et à un effondrement majeur de la concentration plasmatique de rénine (Ammarguella *et al.*, 2001; Katholi *et al.*, 1980). Le modèle DOCA-salt se rapproche beaucoup de l'hyperaldostéronisme primaire, aussi appelé syndrome de Conn qui est basé sur la présence d'un taux élevé d'aldostérone sanguine, concomitant d'un taux bas de rénine.

II.5.1.4 Le modèle L-NAME

La production de monoxyde d'azote (NO) vasculaire est l'un des mécanismes régulateurs les plus puissants de la PA. L'inhibition chronique de la NO-synthase par le L-NAME (N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester) induit une HTA qui peut être amplifiée lorsqu'elle est associée à un régime riche en sel (Obst *et al.*, 2004). Dans ce modèle, on peut observer la présence d'une hypertrophie et d'une fibrose cardiaque.

II.5.2 Les modèles génétiques

La souche de souris BPH/2S1g a été développée par Gunther Schlager d'une façon similaire à celle employée pour le développement de la souche de rat spontanément hypertendu au Japon, les SHR (Schlager et Sides, 1997). Les BPH/2S1g et leurs équivalents normotendus les BPN/3S1g et hypotendus les BPL/1S1g, dérivent de colonies de 23 générations qui ont été sélectionnées sur la base de PA élevées ou faibles. Chez ces animaux, à l'âge de 15 semaines, la PAS diffère de 50 mmHg entre les BPH/2S1g hypotendus (119 mmHg) et les BPL/1S1g hypertendus (69 mmHg) et de 36 mmHg entre les souris BPH/2S1g hypertendus et les BPN/3S1g normotendus (83 mmHg) (Schlager et Sides, 1997). Une analyse génétique biométrique a été réalisée pour étudier le mode d'hérédité des gènes régulant la PA dans ces souches (Schlager, 1994). L'auteur a découvert que l'augmentation de la PA était due aux effets additifs de trois à

cinq gènes. Plus précisément, l'étude du génome, notamment au niveau des loci impliqués dans la régulation de la PA, a montré un intérêt significatif pour les chromosomes 2, 6, 8, 10, 13 et 18 (Wright *et al.*, 1999). Ces données indiquent également que ces souris sont principalement protégées de l'hypertrophie ventriculaire gauche associée à une hypertension. De plus, les gènes à l'origine de l'hypertrophie cardiaque dans un contexte d'HTA sont différents de ceux qui induisent l'hypertension elle-même. Cette découverte très importante indique que l'analyse de l'hypertrophie cardiaque induite par l'HTA chez la souris nécessite des souches qui présentent une susceptibilité génétique à ce type de dommages.

De nombreux gènes candidats ont été étudiés dans les modèles de souris transgéniques d'HTA. Ce sont notamment les gènes liés à la fonction endothéliale (NO synthétase, voie prostacycline, molécules d'adhésion, adrénomédulline, endothéline ...), au SRAA (rénine, angiotensinogène, enzyme de conversion de l'angiotensinogène, récepteurs à l'angiotensine), au transport d'ions et à l'activité du système nerveux sympathique (dopamine hydroxylase, adrénocéphes) qui ont reçu beaucoup d'intérêt. De manière intéressante, les modèles de souris transgéniques hypertendues sont maintenant utilisés en combinaison avec des modèles non-génétiques pour créer de nouveaux modèles.

Par exemple dans le domaine des AVC et de l'HTA, le L-NAME associé à un régime riche en sel ont été administrés à des souris transgéniques hypertendues exprimant la rénine et l'angiotensinogène humain (Iida *et al.*, 2005). Ces animaux sont morts dans les 10 semaines, avec des AVC hémorragiques.

Dans ce chapitre nous avons abordé les différents modèles d'HTA qui ont été développées chez la souris, avec une attention particulière portée aux modèles 2K1C et AngII utilisés dans ce travail de thèse. Nous le verrons par la suite, l'étude réalisée est basée sur l'analyse de l'impact de ces deux modèles d'HTA sur le cerveau et plus particulièrement, sur

le statut inflammatoire cérébral. Dans le chapitre suivant, nous allons donc développer ce qui est connu de l'impact de cette pathologie sur le cerveau, puis, logiquement sur le système immunitaire cérébral.

II.6 Impact de l'hypertension artérielle chronique sur le cerveau

Nous avons vu précédemment que le maintien de la PA est dépendant de plusieurs organes, notamment le cœur, les reins et le cerveau. On peut donc facilement imaginer que la survenue de l'HTA va être à l'origine de dommages à ces organes, dommages qui sont principalement dus aux effets de l'HTA sur le compartiment vasculaire et notamment aux effets de l'angiotensine-II (Pires *et al.*, 2013). L'angiotensine-II, médiateur clé du SRAA, par ses effets vasoconstricteurs, mitogènes, pro-inflammatoires et pro-fibrotiques, contribue à l'altération du tonus vasculaire, de la fonction endothéliale, au remodelage structurel vasculaire ainsi qu'à l'inflammation vasculaire caractéristiques des dommages retrouvés dans l'HTA (Rhian *et al.*, 2000). Une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent ces dommages aux organes dans l'HTA permettrait de développer des thérapies spécifiques à ces organes. Le cerveau est l'une des cibles préférentielles des effets délétères de l'HTA qui est le premier facteur de risque de l'AVC et l'une des principales causes de déclin cognitif et de démence (Dahlöf, 2007).

Pour bien comprendre l'effet de l'HTA sur le cerveau, nous allons d'abord décrire les mécanismes physiologiques du système cérébrovasculaire, cible principale de l'HTA.

II.6.1 La physiologie cérébrovasculaire

Le cerveau ne possède que très peu de réserves énergétiques. Une diminution, voire l'arrêt de l'apport sanguin et donc de l'oxygène et des substrats énergétiques est dramatique

pour la survie de cet organe. Ainsi, les vaisseaux cérébraux sont dotés de mécanismes adaptatifs qui assurent l'apport sanguin nécessaire et continu, pour la survie et le bon fonctionnement du tissu cérébral.

II.6.1.1 L'hyperhémie fonctionnelle

À un instant donné, l'apport sanguin n'est pas homogène dans le cerveau, mais adapté au besoin énergétique local. Lorsqu'une région cérébrale s'active, la demande énergétique neuronale augmente. En conséquence, les neurones et les astrocytes stimulent l'élargissement vasculaire qui sous-tend l'élévation du débit sanguin cérébral (DSC), c'est le phénomène d'hyperhémie fonctionnelle (Attwell *et al.*, 2010). Ce mécanisme est permis grâce à la communication entre les neurones, les astrocytes et les vaisseaux qu'on appelle couplage neurovasculaire (**Figure 8**). Ces cellules libèrent une multitude d'agents vasoactifs qui agissent de concert pour produire une dilatation des artérioles locales au cours de l'activité neuronale. Ces agents comprennent principalement l'acide arachidonique, l'acide epoxyeicosatrienoïque, des prostaglandines, des ions K^+ et le NO. La dilatation des artérioles locales s'accompagne d'une dilatation des artères piémériennes qui alimentent en amont la zone activée. La vasoréactivité coordonnée des artérioles intraparenchymateuses et des artérioles piémériennes est essentielle pour augmenter efficacement le DSC (Iadecola et Nedergaard, 2007).

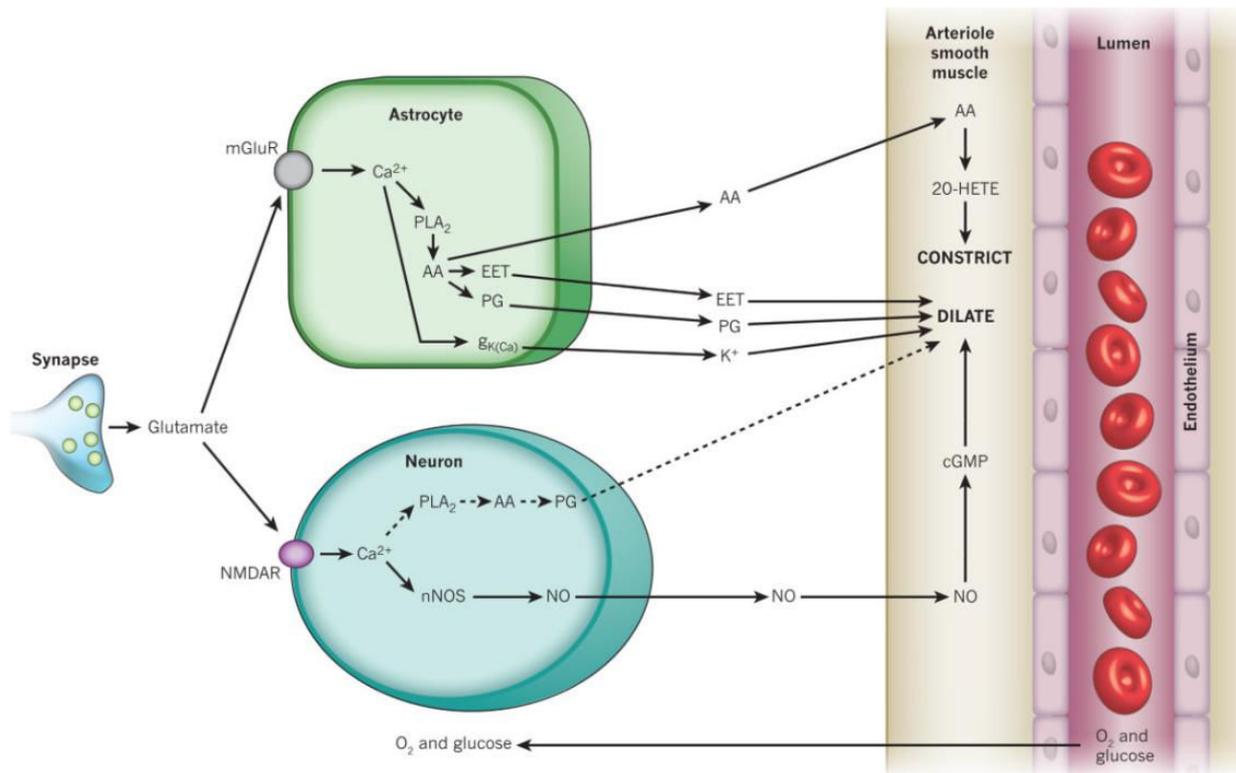


Figure 8. Implication neuronale et astrocytaire dans la vasoréactivité cérébrale. Les neurones et les astrocytes sont positionnés tout au long de la vascularisation cérébrale. Ils régulent le flux sanguin en envoyant des messagers vers les cellules musculaires lisses positionnées au niveau artériolaires, ils régulent leur diamètre et ainsi l'acheminement de l'oxygène et du glucose au parenchyme cérébral. 20-HETE : acide 20-hydroxyeicosatetraenoic, AA : acide arachidonique, cGMP : guanosine monophosphate cyclique, EET : acide epoxyeicosatrienoique, gK(Ca) : canaux K⁺ calcium dépendants, nNOS : nitric oxyde synthétase neuronale, PG : prostaglandines, PLA₂ : phospholipase A₂. D'après (Attwell *et al.*, 2010).

II.6.1.2 L'autorégulation cérébrale

Une caractéristique frappante de la circulation cérébrale est sa capacité à maintenir la perfusion parenchymateuse à des niveaux relativement constants sur une large gamme de pressions artérielles systémiques (**Figure 9**). Au cours d'une journée et en fonction des activités quotidiennes, la PA varie sensiblement, pouvant mener à des hausses ou baisses dangereuses de DSC. Grâce au phénomène d'autorégulation cérébrale, le DSC est indépendant des variations de PA, lorsque celles-ci sont comprises entre environ 50 et 150 mmHg (Paulson *et al.*, 1990).

Les artérioles cérébrales ajustent leur diamètre, elles se contractent lorsque la PA augmente et se dilatent lorsque la PA diminue, de façon à réguler le DSC en parallèle des modifications de pression. La réponse myogénique provient du fait qu'une augmentation de la pression intravasculaire dépolarise les myocytes artériels, conduisant à un influx de Ca^{2+} et à une vasoconstriction (Brayden *et al.*, 2008; Yang et Clark, 2015).

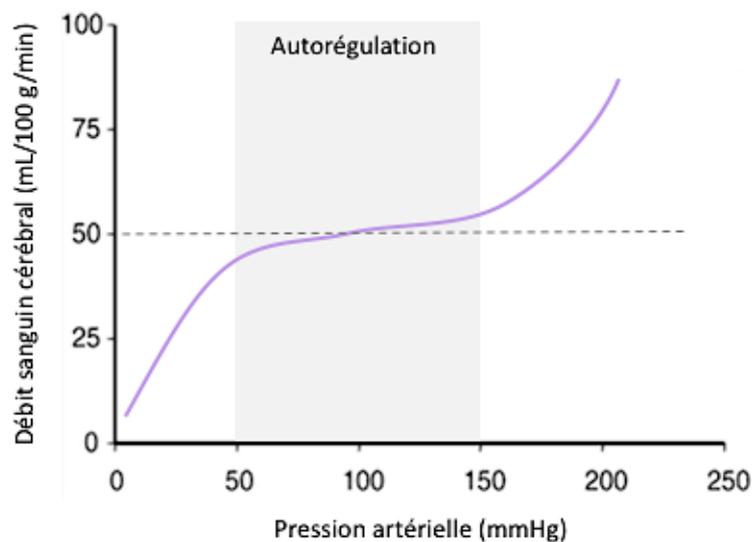


Figure 9. Schéma représentatif du mécanisme d'autorégulation cérébrale. Le débit sanguin cérébral est maintenu relativement constant malgré les variations de pression artérielle dans une certaine gamme de valeurs (50 à 150 mmHg de pression artérielle). Modifiée d'après (Strandgaard et Paulson, 1989).

II.6.1.3 La régulation endothéliale

Les cellules endothéliales contrôlent le tonus vasculaire en libérant divers facteurs relaxants (NO, prostacycline, bradykinine, etc.) et contracteur (endothéline) et en interagissant directement avec les cellules musculaires lisses vasculaires (Sandoo *et al.*, 2010). Les facteurs vasoactifs libérés participent au maintien du tonus vasculaire au repos et à la coordination de la réponse vasculaire des artères intra-parenchymateuses avec les artères piémériennes (**Figure 10**).

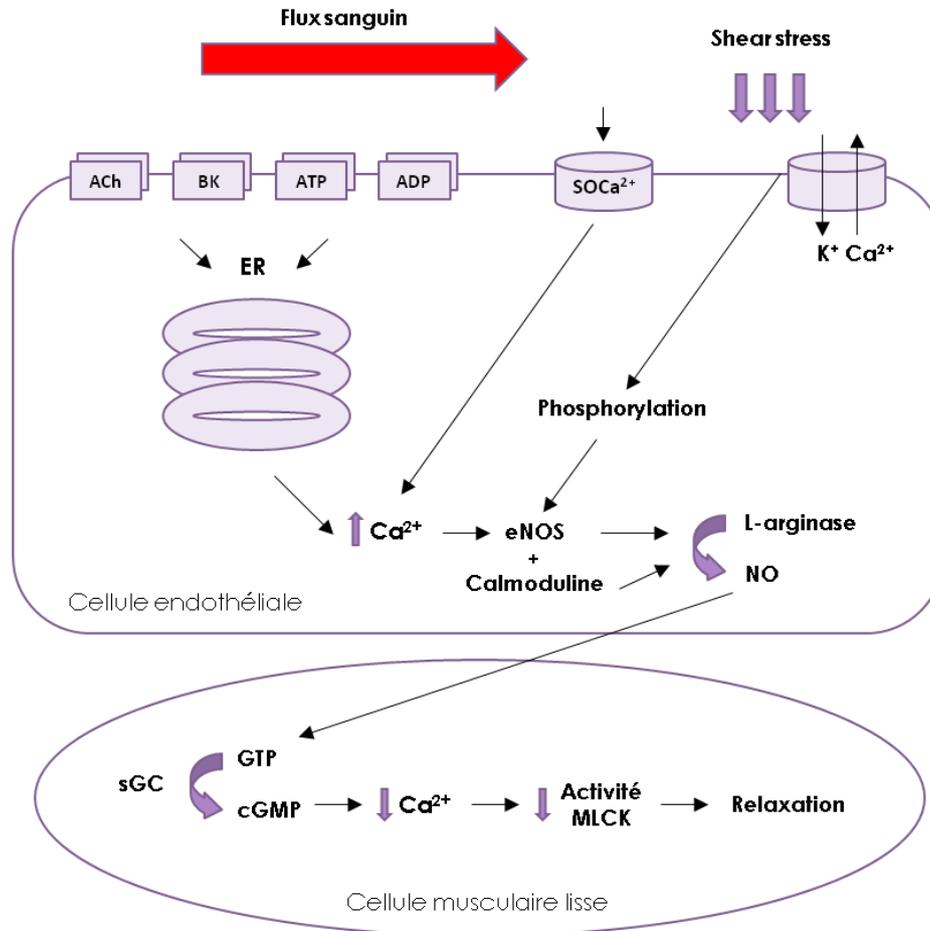


Figure 10. Mécanisme de relaxation vasculaire dépendant de l'endothélium. *Le shear stress correspond aux forces de cisaillement du flux pulsatile sanguin sur la paroi vasculaire. Le shear stress stimule la libération de calcium du réticulum endoplasmique pour la production de NO. Lorsque les réserves de Ca²⁺ du réticulum endoplasmique sont épuisées, un signal est envoyé au canal SOCa²⁺ qui permet de faire entrer le Ca²⁺ extracellulaire dans la cellule endothéliale. Le NO permet d'initier le signal de relaxation des cellules endothéliales vers les cellules musculaires lisses vasculaires. BK : bradykinine, ER : réticulum endoplasmique, MLCK : myosin light chain kinase, sGC : guanylyl cyclase soluble SP : substance P, SOCa²⁺ : canal Ca²⁺ activé pour le stockage. Modifiée d'après (Sandoo et al., 2010).*

Une vaste littérature s'intéresse à l'impact de l'HTA sur le compartiment vasculaire. Chacun des mécanismes cérébrovasculaires que nous venons d'aborder est dérégulé dans l'HTA et dans ce cadre, font l'objet du chapitre suivant.

II.6.2 L'hypertension artérielle chronique altère la physiologie cérébrovasculaire

II.6.2.1 Artériosclérose et lipohyalinose

L'HTA favorise la formation de plaques d'athérosclérose dans les artères cérébrales et les artérioles, ce qui peut entraîner des occlusions artérielles et des lésions ischémiques (Dahlöf, 2007). Elle induit également une nécrose fibrinoïde (lipohyalinose) des artères pénétrantes et des artérioles alimentant la substance blanche, entraînant de petits infarctus de la substance blanche.

II.6.2.2 Le remodelage vasculaire

L'HTA a un impact mécanique direct sur le compartiment vasculaire (Schiffrin, 2004). Chez le modèle de rat SHR, il a été montré que dès le début de la pathologie, à partir de l'âge de 6 semaines, on retrouve une modification structurelle des vaisseaux, avec notamment un rétrécissement du diamètre des artères cérébrales, augmentant significativement la résistance vasculaire (Izzard *et al.*, 2006). Ces altérations vasculaires sont dépendantes de la durée et de la sévérité de l'HTA. Selon la loi de Poiseuille, la résistance à l'écoulement est inversement proportionnelle à la quatrième puissance du rayon du vaisseau. Ce qui signifie qu'une diminution, même mineure, de la lumière des petites artères et des artérioles augmente considérablement la résistance vasculaire. Il faut noter que cette résistance artérielle contribue de façon importante au développement des complications de la pathologie et pourrait être une signification pronostique en ce qui concerne les événements cardiovasculaires chez les sujets hypertendus (Rizzoni *et al.*, 2003). Le remodelage vasculaire que nous venons d'évoquer existe sous deux formes : le remodelage eutrophique et le remodelage hypertrophique. Tous deux ont pour conséquence de diminuer le diamètre interne des vaisseaux (**Figure 11**). Dans le remodelage eutrophique, le diamètre externe est également réduit, de ce fait, la section transversale n'augmente pas, il n'y a pas d'hypertrophie. Pour ce type de remodelage, on observe

uniquement un réarrangement des cellules musculaires lisses autour de la lumière plus petite, il n'y a donc pas de modification de la masse de la portion vasculaire associée. C'est le remodelage hypertrophique qui est le plus souvent retrouvé dans l'HTA. Il correspond à un processus d'hypertrophie et d'hyperplasie des cellules musculaires lisses, augmentant fortement l'épaisseur de la média et donc de la paroi vasculaire (Ando *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2002).

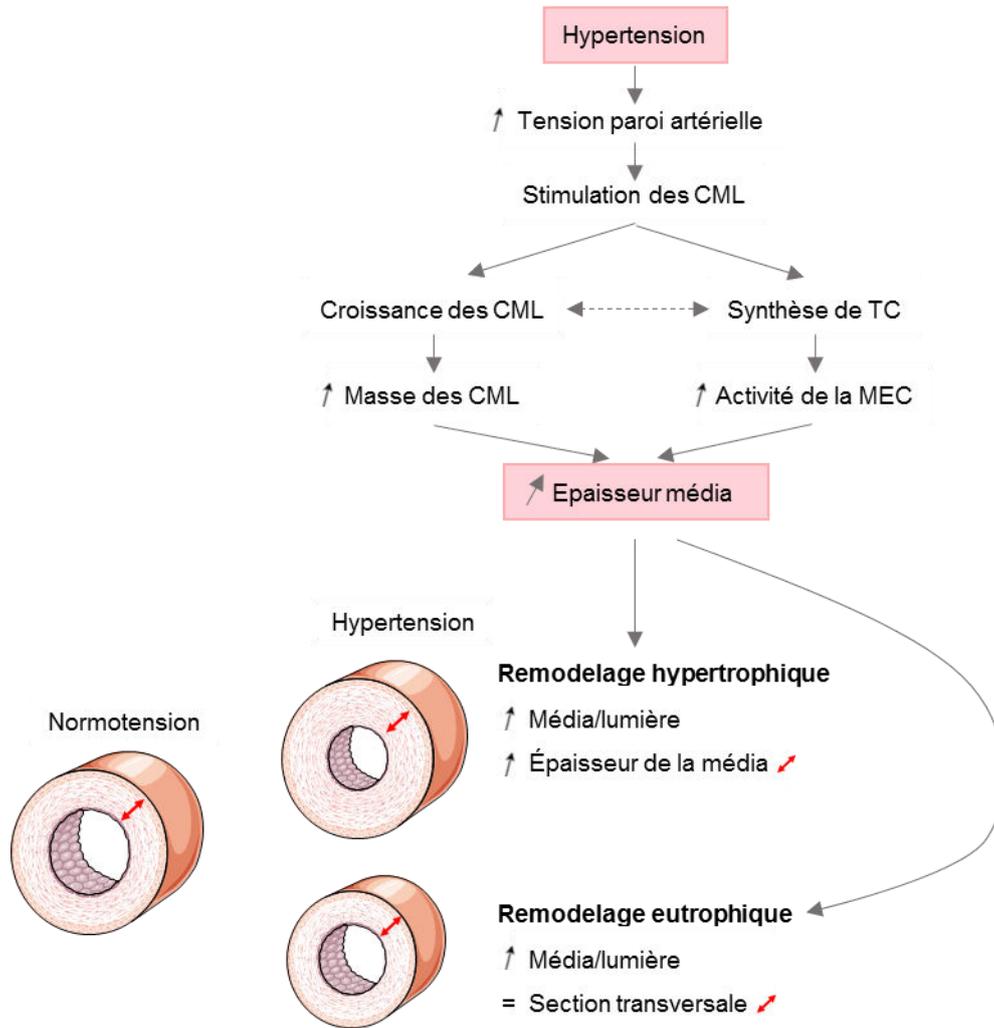


Figure 11. Remodelages vasculaires dans l’hypertension artérielle chronique. *L’HTA provoque un remodelage vasculaire qui peut être de 2 types : hypertrophique ou eutrophique. Ces modifications structurelles sont la conséquence des hautes valeurs de PA qui favorisent une croissance anormale des cellules musculaires lisses et de la production de tissu conjonctif. L’épaisseur de la média, généralement normale dans le remodelage eutrophique, est augmentée dans le remodelage hypertrophique. Le diamètre de la lumière vasculaire est diminué dans les deux types de remodelage, alors que le diamètre extérieur est réduit uniquement dans le remodelage eutrophique. CML : cellules musculaires lisses ; TC : tissu conjonctif. Modifiée d’après (Schiffrin, 2004).*

Selon la loi de Laplace, une lumière plus petite diminue la tension circonférentielle. De plus, en raison de l’épaississement de la média, le *shear stress* est restreint, ce qui protège la paroi du vaisseau contre les effets d’une PA élevée. Si l’HTA est ancienne ou sévère, la

croissance des cellules musculaires lisses (en nombre ou en taille) peut prédominer sur l'apoptose, ainsi le remodelage est hypertrophique. Les remodelages eutrophique et hypertrophique peuvent être présents à divers degrés et dans différents lits vasculaires dans le même modèle animal ou chez un même patient (Intengan et Schiffrin, 2000). L'HTA va également induire un durcissement des vaisseaux en induisant une augmentation du contenu en collagène de leurs parois.

Plusieurs facteurs contribuent au remodelage des artères cérébrales. L'innervation périovasculaire sympathique, qui exerce un effet trophique sur la paroi vasculaire est nécessaire au développement de l'hypertrophie cérébrovasculaire (Baumbach *et al.*, 1989). La production de facteurs de croissance ainsi que l'augmentation du stress oxydatif participent également aux mécanismes de remodelage vasculaire (Harrison *et al.*, 2006). En condition physiologique, le NO possède un effet vasodilatateur et un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules musculaires lisses des vaisseaux (Touyz et Schiffrin, 2004). La diminution de la biodisponibilité du NO participe à l'augmentation du tonus vasculaire et au remodelage vasculaire (Baumbach *et al.*, 2004). L'angiotensine-II circulante contribue également à ces mécanismes indépendamment de l'élévation de la PA. En effet, l'angiotensine-II trouve certains de ses récepteurs AT1 sur les vaisseaux sanguins, via lesquels elle favorise la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Touyz, 2004). Ces ROS vont à leur tour favoriser la prolifération des cellules musculaires lisses et initier un remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) par les métallo-protéinases (MMP), participant ainsi au remodelage hypertrophique (Flamant *et al.*, 2007).

Le remodelage vasculaire induit par l'HTA peut être partiellement, voire complètement rétabli par l'utilisation d'un agent antihypertenseur de type ARA (**Figure 12**). Cela démontre l'implication de l'angiotensine-II dans les mécanismes délétères de l'HTA. Toutefois, il ne faut

pas oublier que l'hypertrophie et le remodelage des artères cérébrales sont des processus adaptatifs qui réduisent l'impact des forces de cisaillement sur la paroi artérielle et protègent les artéριοles, les capillaires et les veinules de l'augmentation de la PA. Dans certains cas, l'incapacité des artères cérébrales à se remodeler en réponse à l'augmentation de la PA a des effets néfastes tels que l'altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et l'apparition d'œdème vasogénique (Iadecola et Davisson, 2008).

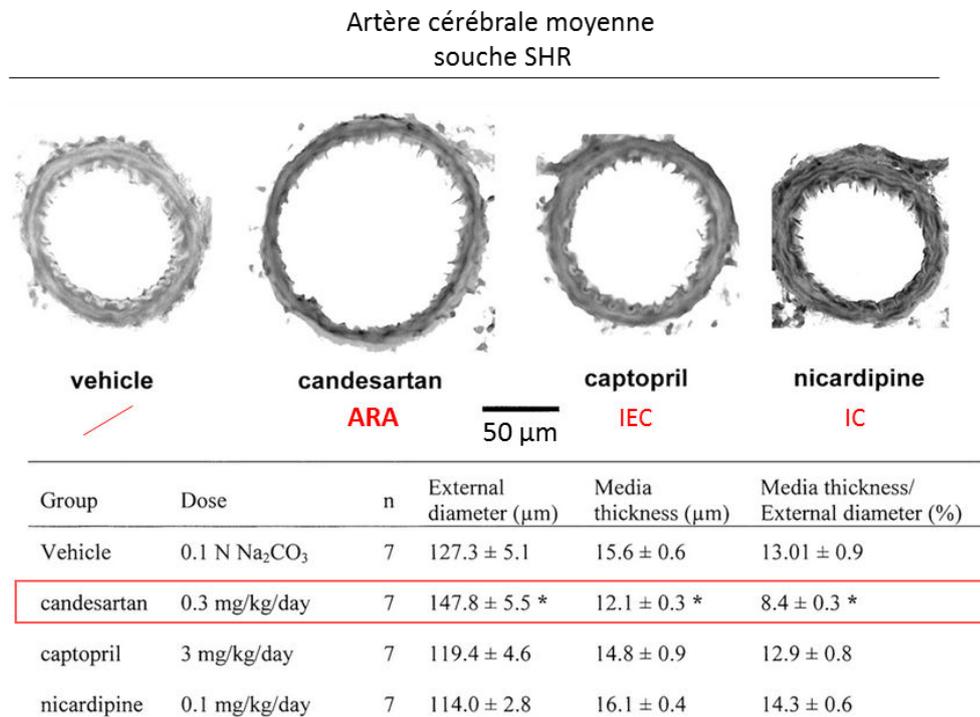


Figure 12. Comparaison morphologique de l'artère cérébrale moyenne dans un modèle SHR après différents traitements antihypertenseurs. Chez les SHR, on observe un remodelage de l'artère cérébrale moyenne associé à une réduction de la lumière vasculaire. Ces altérations structurelles sont améliorées par un traitement candesartan, un antihypertenseur de type ARA (antagonistes des récepteurs à l'angiotensine-II). Le captopril, un IEC (inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène) et le nicardipine est un IC (inhibiteurs calciques, n'améliorent pas la morphologie vasculaire. SHR : souche de rat spontanément hypertendus. Modifiée d'après (Ito et al., 2002).

II.6.2.3 La raréfaction vasculaire

La raréfaction ou la perte d'artérioles et de capillaires a été rapportée dans plusieurs modèles d'HTA, bien que les effets ne soient pas uniformes. L'une des études les plus approfondies menées dans ce domaine a été réalisée par Sokolova et collaborateurs (Sokolova *et al.*, 1985) dans 3 modèles d'HTA, comprenant le modèle rénovasculaire 2K1C, DOCA-salt et le modèle SHR. Chez les animaux rénovasculaires et DOCA-salt, il a été observé une raréfaction des artères piémériennes et des capillaires intracérébraux de 25 à 50 %. Une réduction du nombre de capillaires a également été observée chez les SHR. Dans ce cas, cette raréfaction vasculaire dépendrait vraisemblablement du niveau de PA car elle ne se manifeste pas chez les jeunes SHR, mais uniquement chez les rats âgés de 12 semaines présentant une hypertension marquée (Paiardi *et al.*, 2009). L'appauvrissement du nombre d'artérioles et de capillaires pourrait entraîner une réduction du DSC et à terme, provoquer une hypoperfusion chronique du cerveau. La perte vasculaire pourrait ainsi largement participer au risque accru de déficience cognitive vasculaire ou de démence vasculaire chez les patients hypertendus (de la Torre, 2012).

II.6.2.4 Altérations fonctionnelles : débit sanguin cérébral basal et hyperhémie fonctionnelle

Plusieurs études se sont intéressées à l'impact fonctionnel de l'HTA sur le cerveau. Au repos, des différences significatives en termes de DSC chez des patients hypertendus par rapport au DSC de patients normotendus ont été observées. Ces études ont été réalisées soit par une unique mesure comparative, soit par suivi longitudinal des patients. Ces altérations fonctionnelles du système cérébrovasculaire ont été observées dans des régions cérébrales spécifiques comprenant le cortex occipito-temporal, le cortex préfrontal et l'hippocampe (Beason-Held *et al.*, 2007, Cohen, 2007; Jennings *et al.*, 2005;). L'hypoperfusion retrouvée chez les patients hypertendus pourrait être à l'origine d'une atrophie corticale, augmentant le

risque de démence (Alosco *et al.*, 2014). L'utilisation d'agents antihypertenseurs permettrait de préserver et/ou d'améliorer le CBF chez ces patients et ainsi prévenir le déclin cognitif et les démences retrouvées dans une phase plus tardive de l'HTA (Efimova *et al.*, 2008; Kitagawa, 2010).

Le mécanisme d'hyperhémie fonctionnelle semble lui aussi altéré dans l'HTA. En effet, il a été montré à différentes reprises chez le patient, que l'HTA diminue nettement la réponse vasculaire après une activation neuronale induite (*i.e.* le couplage neuro-vasculaire) (Jennings *et al.*, 2005). Ces résultats ont également été retrouvés dans un modèle de rat spontanément hypertendu (Calcinaghi *et al.*, 2013) et dans un modèle murin (Kazama *et al.*, 2003). Dans cette dernière étude, l'injection répétée d'angiotensine-II provoque une HTA qui est associée à une nette atténuation de la réponse vasculaire à des stimulations somatosensorielles au niveau des vibrisses, révélant une altération du mécanisme d'hyperhémie fonctionnelle. L'affaiblissement de la réponse neurovasculaire semble indépendant de l'élévation de la PA, puisque l'application d'angiotensine-II au niveau du cortex somatosensoriel, à elle seule, suffit à réduire l'hyperémie fonctionnelle sans provoquer d'hypertension (Kazama *et al.*, 2003). L'angiotensine-II serait donc largement impliquée dans l'altération de la fonction cérébrovasculaire.

II.6.2.5 Le dysfonctionnement endothélial

Nous l'avons vu précédemment, les cellules endothéliales communiquent largement avec les cellules musculaires lisses à leur contact et initient des réponses vasomotrices. En effet, l'endothélium libère divers facteurs vasoactifs de type vasodilatateur tels que la prostacycline et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ou de type vasoconstricteurs tels que le thromboxane et l'endothéline-1. Plusieurs études ont rapporté que les modifications fonctionnelles cérébrovasculaires retrouvées dans l'HTA pouvaient être directement dues à des altérations du fonctionnement de l'endothélium (Sandoo *et al.*, 2010 ; Arlier *et al.*, 2015).

L'angiotensine-II circulante, indépendamment de la hausse de PA, serait directement impliquée dans ces mécanismes physiopathologiques. En favorisant la production d'ions superoxydes par la stimulation de la NAPDH oxydase, le principal acteur du SRAA favoriserait le dysfonctionnement des micro-vaisseaux cérébraux (Didion et Faraci, 2003 ; Kazama *et al.*, 2003). D'autres voies dépendantes des cyclo-oxygénases seraient également impliquées dans ces mécanismes délétères dépendants de l'endothélium (Didion *et al.*, 2000). Là encore, le SRAA et particulièrement l'angiotensine-II a été montré comme médiateurs clé des altérations retrouvés dans l'HTA.

II.6.2.6 La détérioration de l'autorégulation cérébrale

La vasoconstriction qui intervient à la suite de l'augmentation de la pression du sang sur la paroi artérielle agit comme un mécanisme homéostatique essentiel. Dans l'HTA, la constriction des artères cérébrales est renforcée et la gamme d'autorégulation est décalée vers de hautes pressions (**Figure 13**). En d'autres termes, chez un patient hypertendu, le mécanisme d'autorégulation est conservé et adapté aux hautes valeurs de PA, dans le but de protéger la microcirculation cérébrale (Paulson *et al.*, 1990). A l'inverse, chez ces sujets, le cerveau est très vulnérable à une baisse de PA ou à une chute de la pression de perfusion cérébrale comme lors d'un AVC par exemple (Traon *et al.*, 2002). Chez les patients hypertendus, la sensibilité des myocytes au calcium intracellulaire et l'activité nerveuse sympathique seraient augmentées favorisant l'augmentation du tonus vasculaire et du décalage de la courbe d'autorégulation vers des hautes valeurs de PA (Chrissobolis et Sobey, 2006). Le remodelage vasculaire participe également à ce mécanisme adaptatif puisqu'il contribue à la réduction du diamètre artériel et augmente ainsi la résistance vasculaire. Lorsqu'on s'intéresse à la limite inférieure de la courbe d'autorégulation, on comprend que les patients hypertendus ont une susceptibilité plus importante à l'ischémie cérébrale. En effet, les vaisseaux cérébraux présentent une moindre capacité dilatatoire et ne peuvent pas compenser la chute de pression de perfusion lors de

l'ischémie (Immink *et al.*, 2004; Jordan et Powers, 2012). La substance blanche périventriculaire est particulièrement sensible aux dommages ischémiques puisqu'elle se situe à la jonction entre deux territoires artériels : les artères cérébrales pénétrantes et les artères lenticulo-striées émergeants depuis la base du cerveau. Enfin, il a été démontré à plusieurs reprises que le volume ischémique, dans des modèles animaux d'HTA, est nettement augmenté comparativement à un groupe d'animaux contrôles normotendus (Letourneur *et al.*, 2011; Jordan et Powers, 2012; Ménard *et al.*, 2017). D'autre part, dans ces études, les auteurs soulignent une difficulté de transposition des traitements neuroprotecteurs pour la récupération fonctionnelle post-AVC de la pré-clinique à la clinique. Cela est notamment dû au manque de prise en compte de l'HTA dans l'étude de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. De plus, certains modèles comme, le modèle SHR, très largement utilisé, présente des prédispositions génétiques à l'ischémie cérébrale indépendamment de l'HTA. Menard et collaborateurs suggèrent par exemple l'utilisation du modèle 2K1C, qui présente un grand nombre d'aspects de la pathologie humaine.

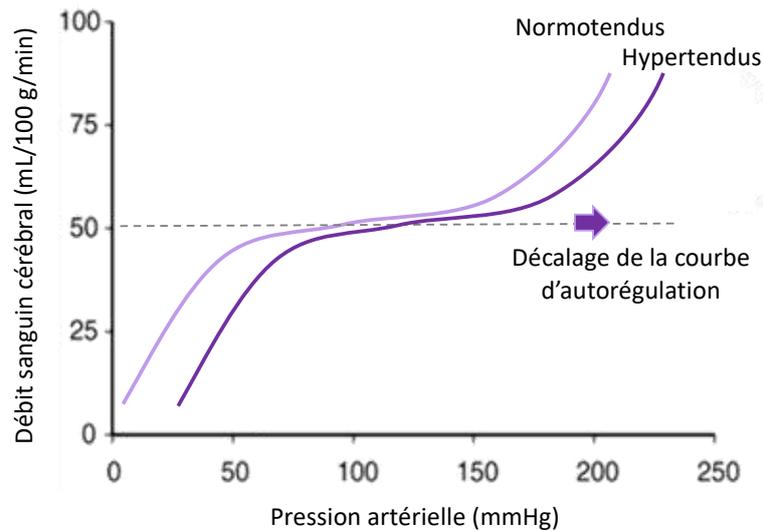


Figure 13. Illustration du shift de la courbe d'autorégulation cérébrale par l'hypertension artérielle chronique. *L'HTA décale la courbe d'autorégulation vers la droite, de sorte que le débit sanguin cérébral reste constant à des valeurs de pression artérielle plus élevées. La limite inférieure de l'autorégulation chez les hypertendus étant là aussi décalée vers la droite, elle rend le cerveau de ces patients plus vulnérable à une chute de la pression artérielle. Modifiée d'après (Strandgaard et Paulson, 1989).*

L'ensemble des résultats abordés suggère qu'en plus d'être un facteur de risque pour l'AVC, l'HTA est également un facteur aggravant de cette pathologie. Les mécanismes responsables de cette aggravation lésionnelle chez les hypertendus impliquent largement le compartiment vasculaire, toutefois, l'intervention d'une composante non-vasculaire n'est pas à exclure et reste à démontrer. Il est d'ailleurs de plus en plus décrit dans la littérature que l'HTA, en plus d'altérer le compartiment vasculaire, pourrait participer à la mise en place d'un statut inflammatoire cérébral. C'est ce que nous décrivons dans la section suivante.

II.7 L'hypertension artérielle et l'inflammation

Bien que le rapprochement entre l'HTA et l'inflammation ne soit pas de prime abord évident, cette relation existe et participe largement à la physiopathologie de l'HTA. En effet, depuis plusieurs décennies, la recherche s'est intéressée aux interactions qui relient étroitement

l'HTA et l'inflammation. L'une des études princeps qui illustre parfaitement cette connexion a été réalisée par Guzik et collaborateurs en 2007. Cette équipe a démontré que dans un modèle de souris transgénique RAG-1, caractérisé par l'absence de lymphocyte B et de lymphocyte T, l'hypertension induite par l'infusion chronique d'angiotensine-II était nettement atténuée (Guzik *et al.*, 2007). En d'autre terme, la présence des lymphocytes, principaux acteurs du système immunitaire adaptatif, est en partie responsable des hautes valeurs de PA caractéristiques de l'HTA.

Bien que le système immunitaire communique avec l'ensemble des organes, les reins, les artères et le SNC sont particulièrement sensibles et sont les principales cibles de l'inflammation dans un contexte d'HTA.

II.7.1 Hypertension et inflammation rénale

L'infiltration des cellules immunitaires au niveau rénal est une caractéristique majeure retrouvée dans plusieurs études expérimentales et cliniques de l'HTA. La présence d'amas de lymphocytes T dans les zones tubulo-interstitielles avaient déjà été constatées il y a plus de 50 ans dans des biopsies rénales prises au cours de sympathectomies faites pour le traitement de l'HTA (Gareau et Cartier, 1955). Une étude publiée en 2013 a également fait état de l'infiltration de lymphocytes CD4 et CD8 dans cette même région, lors de l'analyse de biopsies rénales de 7 patients atteints de néphrosclérose hypertensive (Youn *et al.*, 2013). Dans des modèles précliniques et chez les patients hypertendus, la gravité de l'HTA est corrélée à l'intensité de l'infiltration rénale des cellules immunitaires (Franco *et al.*, 2007; Hughson *et al.*, 2008). Chez le rat, une réduction de l'infiltration de ces cellules par un traitement immunosuppresseur ou par des manipulations génétiques entraîne une amélioration ou une correction de l'HTA (De Miguel *et al.*, 2010; Mervaala *et al.*, 2000). Les cellules immunitaires infiltrantes, les lymphocytes B et T, les macrophages et les cellules NK qui entourent les vaisseaux sanguins et

les tubules, servent de source locale de molécules bioactives qui facilitent la constriction vasculaire, augmentent la réabsorption tubulaire du sodium et de l'eau (Mattson, 2014). Par exemple, les effecteurs cytokiniques tels que l'IFN- γ (interféron- γ), le TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) et l'IL(interleukine)-17 libérés par ces cellules, affectent notamment les échangeurs Na⁺/H⁺ rénaux et ainsi aggravent l'HTA (Small *et al.*, 2018). L'infiltration des lymphocytes T serait en partie due à l'activité du système sympathique rénale qui contribuerait également aux lésions des organes cibles, ainsi qu'au développement de la pathologie (Shen *et al.*, 2015).

II.7.2 Hypertension et inflammation vasculaire

L'inflammation vasculaire est également une caractéristique de l'HTA. Dans différents modèles expérimentaux de la pathologie, on observe une infiltration de cellules CD4 et CD8, de macrophages et de cellules dendritiques dans le tissu périvasculaire et l'adventice des gros vaisseaux (aorte) et des vaisseaux de taille moyenne (artères mésentériques) (Barhoumi *et al.*, 2011; Kasal et Schiffrin, 2012). Les mécanismes par lesquels l'inflammation vasculaire favorise le développement de l'HTA font notamment intervenir le système nerveux sympathique (SNS) et sont liés à l'augmentation du tonus vasculaire et à l'altération de la relaxation artérielle (Haspula et Clark, 2018). Nous l'avons évoqué précédemment, la relaxation artérielle est une réponse physiologique critique régulée par l'activité du NO endothélial qui permet de contrer une augmentation accrue de la vasoconstriction sympathique et qui est altérée dans l'HTA (Sandoo *et al.*, 2010).

Dans cet environnement délétère, depuis les nœuds lymphatiques, les cellules immunitaires deviennent activées et pénètrent au niveau rénal et au sein du système vasculaire (**Figure 14**). Les espèces réactives de l'oxygène, les métalloprotéinases, les cytokines et les anticorps produits par ces cellules, favorisent le dysfonctionnement et les dommages aux organes cibles. Dans les vaisseaux, ces facteurs favorisent la constriction, le remodelage et la

raréfaction vasculaire. Dans les reins, ces médiateurs augmentent l'expression et l'activation des transporteurs au sodium, provoquent une fibrose interstitielle et des lésions glomérulaires.

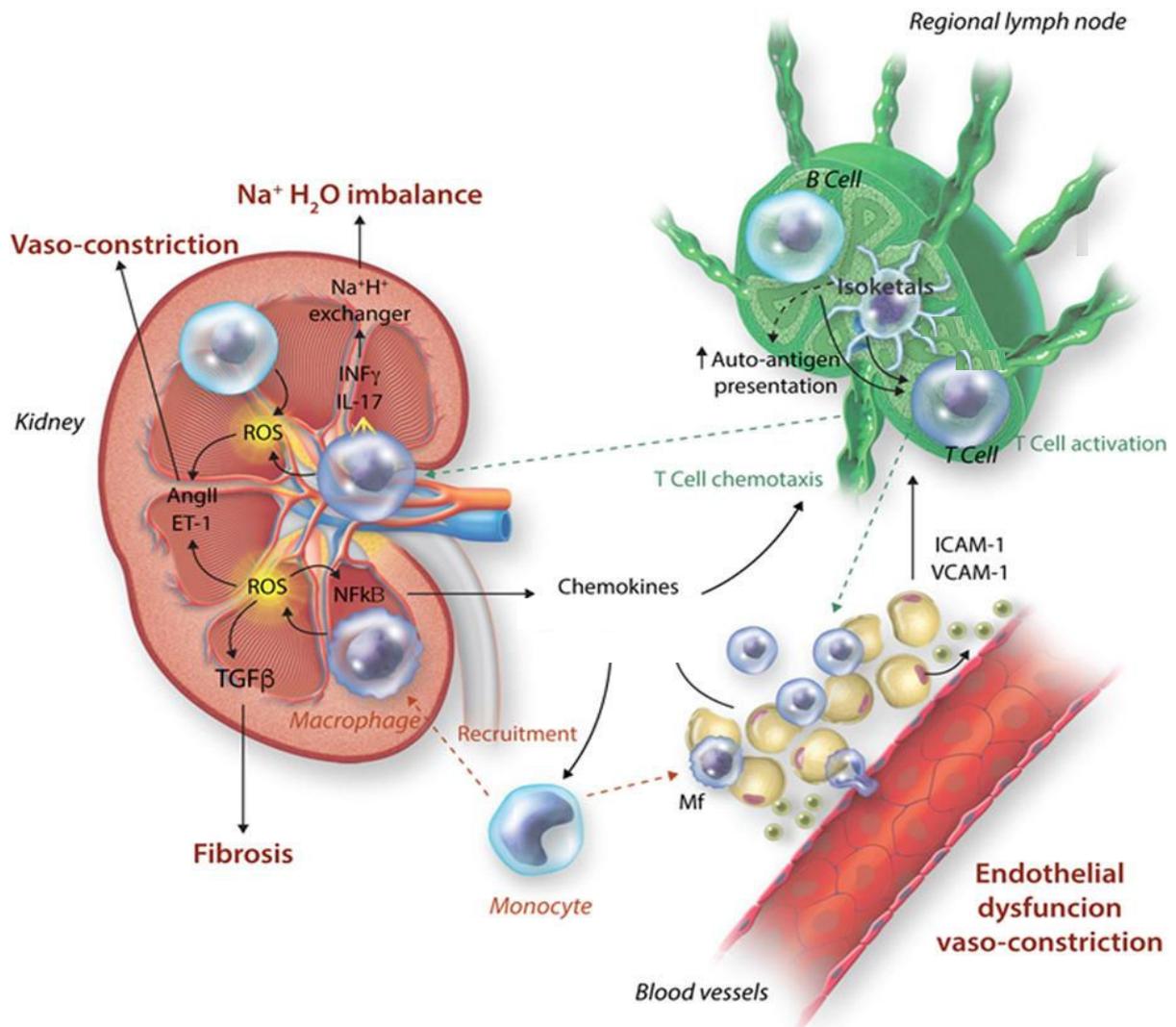


Figure 14. Impact du système immunitaire périphérique sur l'induction de dommages vasculaires et rénaux dans l'hypertension. L'activation des cellules T se produit dans les organes lymphoïdes secondaires et localement dans les organes cibles, en particulier les reins et les vaisseaux sanguins. La présentation de néo-antigènes est renforcée par le stress oxydatif dans les cellules présentatrices d'antigènes grâce à la production isokétal qui intensifie les réponses inflammatoires. Les mécanismes effecteurs évoqués par les cytokines comprennent la fibrose rénale, la vasoconstriction et le déséquilibre Na⁺/H⁺. D'après (Small et al., 2018).

Dans l'HTA, la surproduction de ROS est un mécanisme essentiel à l'évolution de la pathologie. L'un des produits des ROS, l'isokétal, altère la conformation de certaines protéines alors reconnues comme du non-soi (**Figures 14 et 15**). Ces auto-antigènes nouvellement formés participent à la suractivation des lymphocytes T par les cellules dendritiques et à la surproduction cytokinique. (Small *et al.*, 2018). Les thérapies immuno-ciblées classiques axées sur l'immunosuppression et les traitements anti-cytokiniques sont des pistes thérapeutiques largement envisagées pour l'amélioration de l'HTA.

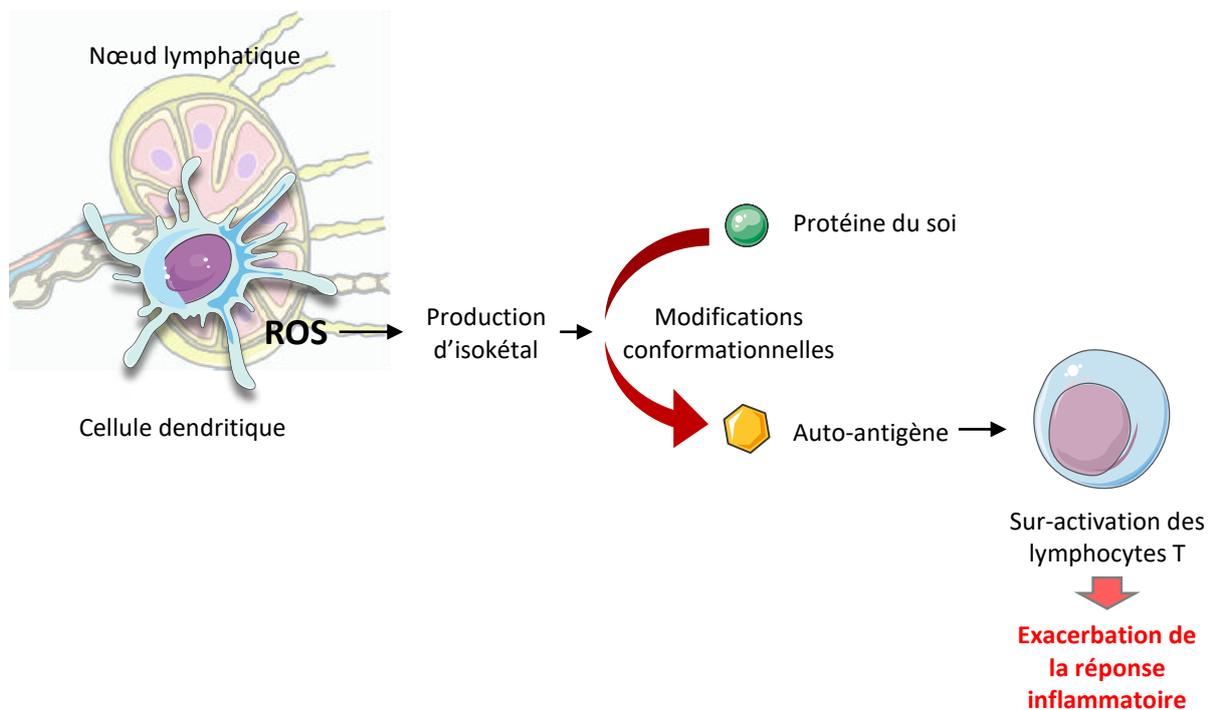


Figure 15. Mécanisme spécifique d'exacerbation de la réponse inflammatoire périphérique dans l'hypertension artérielle chronique. L'augmentation de la concentration d'angiotensine-II circulante et de cytokines pro-inflammatoires favorisent la production de ROS dans les organes lymphoïdes secondaires. L'isokétal (aussi appelé isolevuglandine) produit à partir des ROS modifie la conformation protéique au sein des cellules dendritiques (cellules présentatrices d'antigènes professionnelles). La présentation des auto-antigènes nouvellement formés favorise l'exacerbation de la réponse inflammatoire par l'activation d'un grand nombre de lymphocytes T et la libération d'une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires.

Dans les deux sections précédentes nous avons abordé la relation entre l'HTA et l'inflammation périphérique, notamment au niveau du rein et des vaisseaux sanguins. Dans la prochaine partie, nous abordons là encore la relation entre l'HTA et l'inflammation, mais cette fois-ci, au niveau cérébral.

II.7.3 Hypertension et inflammation cérébrale

Plusieurs études princeps ont fait le lien entre cerveau, système immunitaire et HTA. Le SNS est à la jonction de tous ces éléments. En effet, la sur-stimulation du cœur, du système vasculaire et des reins par le SNS, induit une élévation de la PA en augmentant le débit cardiaque, la résistance vasculaire et la rétention hydrique. D'autre part, le SNS agit également comme une interface intégrative entre le cerveau et le système immunitaire puisque les organes lymphoïdes sont innervés par des nombreuses afférences sympathiques, modulées par la libération de noradrénaline (Harwani *et al.*, 2012; Malpas, 2010).

La transmission efférente du SNS du cerveau aux tissus périphériques est contrôlée par plusieurs régions cérébrales : le PVN, les organes circonventriculaires (CVO), la médulla rostro-ventrolatérale (RVLM), le troisième ventricule antéro-ventral et le noyau du tractus solitaire sont particulièrement importants. Toutes ces structures démontrent une forte expression des récepteurs AT1 (McKinley *et al.*, 2003). Parmi elles, les CVO sont des structures cérébrales démunies de BHE permettant par exemple aux hormones hypothalamiques de quitter le cerveau sans perturbation de la BHE (Kaur et Ling, 2017). La perméabilité de ces structures permet également à certaines substances périphériques qui ne passent pas la BHE de moduler la fonction cérébrale, par exemple l'angiotensine-II ou des cytokines. Chez les mammifères, les CVO comprennent l'éminence médiane, la glande pinéale la neurohypophyse, l'organe vasculaire de la lame terminale, l'organe subfornical (SFO) et l'aire postrema. Puisque ces structures expriment une forte concentration de récepteurs AT1. L'ensemble de ces régions

cérébrales évoquées ici, sont de plus en plus étudiées dans le cadre de la physiopathologie de l'HTA.

Dès lors que le système nerveux intervient dans la mise en place, l'évolution et/ou le maintien de la pathologie, on parle d'hypertension neurogénique. L'hypertension neurogénique est majoritairement associée à une augmentation de l'activité du SNS qui cible le cœur, les vaisseaux et les reins comme nous venons de l'évoquer (Stocker *et al.*, 2017). Cette forme d'HTA peut aussi correspondre à l'élévation de la PA causée par l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire initiant la libération d'hormones vers la périphérie, ou encore, toute autre forme d'HTA qui implique des signaux neuronaux. Il peut alors être la cause sous-jacente à la pathologie, qui est dans ce cas d'origine neurale, ou bien, son origine peut être périphérique, mais fait intervenir le système nerveux pour l'augmentation ou la maintenance des hautes valeurs de PA.

L'activation du système immunitaire périphérique et l'inflammation cérébrale peuvent induire une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique et contribuent ainsi à la mise en place et au maintien de l'HTA. Des études ont montré par exemple, que l'injection intravasculaire de cytokines proinflammatoires, le TNF α ou l'IL-1 β , augmente l'activité sympathique rénale, la fréquence cardiaque et la PA. Une lésion du SFO, atténue cette réponse (Wei *et al.*, 2013). Le SFO fait partie des CVO senseur (à l'inverse des CVO sécréteur), c'est un régulateur clé de la fonction cardiovasculaire. D'autre part, la micro-injection de TNF- α de d'IL-1 β dans cette région cérébrale augmente également l'activité nerveuse sympathique rénale et la PA. Dans cette réponse, l'angiotensine-II joue un rôle majeur, puisque un pré-traitement du SFO par un anti-hypertenseur de type IEC ou ARA atténue ces réponses (Wei *et al.*, 2015). Enfin, d'autres études ont démontré que l'injection de TNF- α ou d'IL-1 β directement dans le SFO stimule certaines voies de signalisation inflammatoires dans le PVN, une autre structure

largement impliquée dans la régulation cardiovasculaire, notamment pas la libération d'ADH. Les voies de signalisation activées dans le PVN provoquent l'augmentation de la PA (Bardgett *et al.*, 2014; Sriramula, Cardinale, et Francis, 2013). Collectivement, ces différentes études suggèrent que l'instauration d'un état inflammatoire dans le SFO par l'angiotensine stimulerait certaines voies de signalisation dans le PVN et augmenterait l'activité nerveuse sympathique et la PA.

En conditions physiologiques, les récepteurs cérébraux AT1 participent au contrôle de l'inflammation cérébrale (Marvar *et al.*, 2011; Saavedra *et al.*, 2006), de la fonction cérébrovasculaire (Paulson et Waldemar, 1991) et du stress oxydatif (Jezova *et al.*, 1998; Saavedra et Benicky, 2007) (**Figure 16**). Toutefois, l'hyperactivité de ces récepteurs est un déterminant important de l'inflammation incontrôlée et excessive, des altérations de la fonction cérébrovasculaire et des réponses pathologiques au stress (Ando *et al.*, 2004; Benicky *et al.*, 2011). Les récepteurs AT1 seraient pleinement impliqués dans les dégâts causés par l'HTA et dans son maintien.

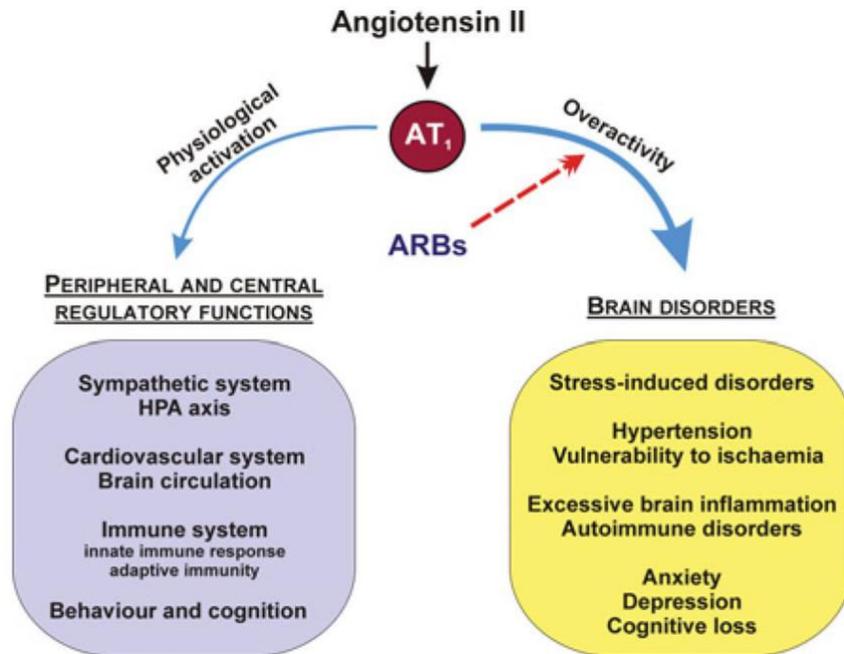


Figure 16. Impacts bénéfiques et délétères de l'action de l'angiotensine-II sur son récepteur AT₁. Le récepteur AT₁ est impliqué, à la fois dans des mécanismes physiologiques, mais aussi dans certains mécanismes pathologiques, en conséquence de sa suractivation par son ligand, l'angiotensine-II. Plusieurs études ont montré que le blocage des récepteurs AT₁ par des bloqueurs (ARBs) améliore l'anxiété, la dépression, le stress, protège le DSC, diminue l'inflammation cérébrale, la neurotoxicité et les lésions cérébrales traumatiques. D'après (Saavedra, 2012).

Plusieurs études récentes se sont intéressées à l'impact de l'HTA sur l'état inflammatoire de certaines régions cérébrales bien spécifiques, telles que le PVN. Cette zone est impliquée dans la régulation de la PA via des efférences nerveuses sympathiques. L'HTA, par l'action de l'angiotensine-II est connue pour altérer le fonctionnement de cette région cérébrale, ainsi impliquée dans l'aggravation de la pathologie (**Figure 17**).

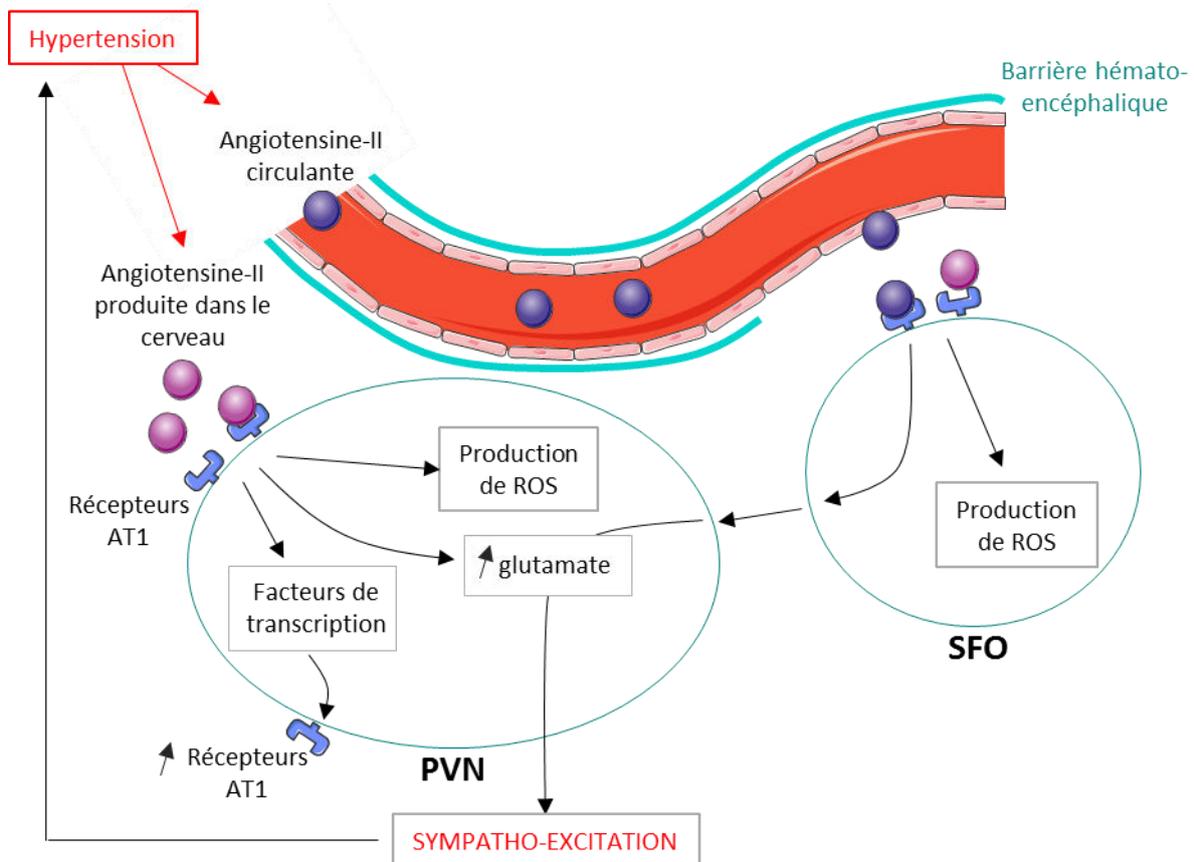


Figure 17. Élévation de l'excitation sympathique par l'angiotensine-II. L'hypertension artérielle chronique favorise la production d'angiotensine-II circulante et intraparenchymateuse. En se fixant sur ses récepteurs AT1 au niveau central, elle agit sur l'organe subfornical (SFO) et le noyau paraventriculaire (PVN) dans l'hypothalamus pour favoriser la production de ROS, la modification de l'expression génique de ses propres récepteurs et l'augmentation de la transmission glutamatergique. Ces différents éléments exacerbent l'élévation de l'activité sympathique participant ainsi à l'entretien et l'aggravation de la pathologie.

Au niveau du PVN, l'inflammation cérébrale serait impliquée dans la physiopathologie de l'HTA, notamment en stimulant le phénotype pro-inflammatoire microglial qui, en retour, accentuerait d'avantage l'élévation de la PA (**Tableau 4**). Dans plusieurs modèles expérimentaux, un *shift* du phénotype de surveillance de la microglie vers un phénotype pro-inflammatoire a été observé dans cette structure cérébrale. Morphologiquement, cet état

correspond à un élargissement du corps cellulaire, une rétractation et un épaississement des processus microgliaux (Shi *et al.*, 2010; Wu, Chan et Chan, 2012; Shi *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2015; Takesue *et al.*, 2017). Très souvent, le changement de morphologie de la microglie est couplé à une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, préférentiellement libérées par les cellules microgliales comme l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6 et à une réduction de l'expression de l'IL-10 anti-inflammatoire. De façon intéressante, l'inhibition microgliale par la minocycline, un agent antibiotique, atténue nettement l'hypertension (Shi *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2015). Cela démontre l'importance de la composante inflammatoire dans la régulation des fonctions cardiovasculaires. D'autres études ne retrouvent pas ce phénotype microglial pro-inflammatoire caractéristique (Korpál *et al.*, 2018). Toutefois, l'HTA pourrait modifier l'activité microgliale spontanée, notamment dans ses interactions physiques avec les neurones, sans pour autant changer sa morphologie (Kapoor *et al.*, 2016).

	Modèle d'HTA	Région étudiée	Réactivité microgliale	Réf.
2010	Infusion d'AngII	PVN	phénotype pro-inflammatoire	(Shi <i>et al.</i> , 2010)
2012	Injection de LPS en IP	RVLM	phénotype pro-inflammatoire	(Wu <i>et al.</i> , 2012)
2014	SHR	PVN	phénotype pro-inflammatoire	(Shi <i>et al.</i> , 2014)
2015	L-NAME, AngII	PVN	phénotype pro-inflammatoire	(Shen <i>et al.</i> , 2015)
2015	SHR	PVN	phénotype pro-inflammatoire	(Santiseban <i>et al.</i> , 2015)
2017	SHR	PVN	phénotype pro-inflammatoire	(Takesue <i>et al.</i> , 2017)

Tableau 4. Tableau bibliographique regroupant les études s'intéressant à l'inflammation cérébrale en contexte d'hypertension artérielle. Par l'imagerie de la microglie et dans différents modèles d'hypertension, l'ensemble de ces études a démontré qu'il existe une activation microgliale en contexte d'hypertension artérielle chronique, révélant la présence d'une inflammation cérébrale. Les régions analysées correspondent à des noyaux hypothalamiques fortement impliqués dans la régulation de la pression artérielle. PVN : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, RVLM : région rostro-ventrale du bulbe rachidien.

La microglie comme médiateur clé de l'inflammation cérébrale serait donc central dans la physiopathologie de l'HTA.

Toutefois, qui de l'œuf ou la poule ... ?

L'inflammation cérébrale et donc l'activation microgliale est-elle la conséquence de l'HTA? Dans ce cas, l'inflammation permettrait de maintenir et de renforcer la pathologie. Est-elle la cause et dans ce cas, l'inflammation interviendrait en premier lieu, induirait l'HTA qui lui permettrait d'être renforcée. Ou est-ce que les deux mécanismes évoluent en parallèle l'un de l'autre et seraient la conséquence d'une troisième composante ?

Dans le but de mieux comprendre les interactions qui lient l'HTA et l'inflammation cérébrale, dans le prochain chapitre nous verrons en détails comment fonctionne le système de protection du cerveau. Nous débuterons ce chapitre par quelques généralités sur le fonctionnement du système immunitaire.

III LE SYSTÈME IMMUNITAIRE CÉRÉBRAL

III.1 Le système immunitaire, quelques généralités

Le système immunitaire est un système biologique complexe, autonome et adaptatif. Son rôle est la défense de l'organisme, le soi, contre des agressions venant de pathogènes et de leurs toxines, définis comme le non-soi. Lors d'une lésion tissulaire, là encore, le système immunitaire permet d'initier une réponse visant à rétablir l'équilibre homéostasique et à éliminer les déchets produits.

Le système immunitaire peut être décliné en 3 grands types : les barrières anatomiques et chimiques, l'immunité innée et l'immunité acquise. Les barrières anatomiques et chimiques correspondent à des structures physiques comme la peau, les muqueuses, elles s'apparentent également à certains systèmes biochimiques, telles que les enzymes, les acides gras, l'acide lactique, mais aussi à des barrières plus spécifiques, telles que la barrière hématoencéphalique. Ces différentes barrières anatomo-chimiques constituent une première ligne de défense pour l'organisme contre des attaques exogènes. À noter qu'elles sont parfois considérées comme faisant partie du système immunitaire inné. En effet, le système immunitaire inné, existe chez tous les organismes vivants et est immédiatement efficace puisqu'il est constitutivement actif. Les médiateurs de ce système sont les cellules de la lignée myéloïde, comprenant des cellules mononucléées comme les cellules dendritiques, les monocytes, les cellules microgliales et les macrophages, ainsi que des cellules polynucléées comme les neutrophiles. Puisque ces agents immunitaires sont répartis dans l'ensemble de l'organisme, l'intrusion d'un agent pathogène sera rapidement détectée. Cela est rendu possible par l'expression de récepteurs spécifiques par les cellules de l'immunité innée. Les récepteurs de type Toll ou TLR (*Toll-like receptor*) (Kawasaki & Kawai, 2014) sont capables de lier plusieurs motifs moléculaires conservés chez de nombreux agents pathogènes, de façon à initier une réponse immunitaire adaptée

(Figure 18). Enfin, l'immunité acquise ou adaptative est très spécifique puisque elle est dirigée contre un unique antigène bien précis. Elle confère également une réponse mémoire à l'organisme, lui permettant de déclencher une réaction efficace et très rapide face à un antigène qui aurait déjà été rencontré par le passé. Les principaux médiateurs de ce système sont les lymphocytes T et les lymphocytes B issus de la lignée lymphoïde.

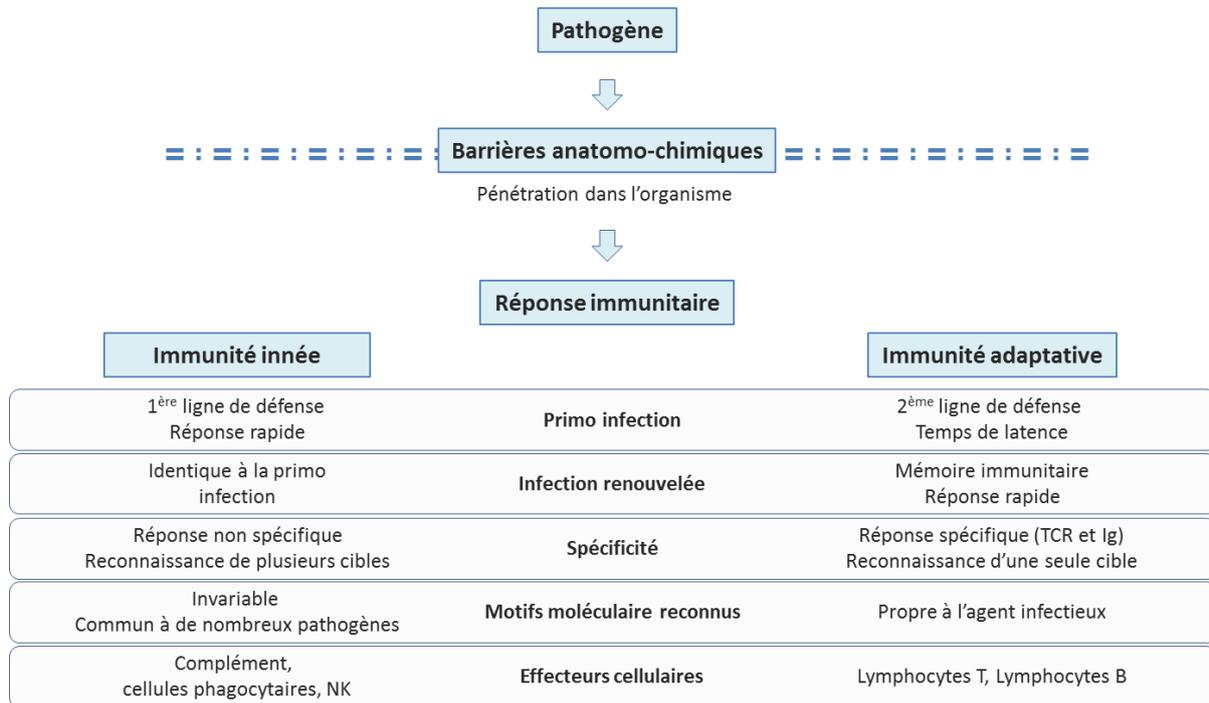


Figure 18. Différence entre l'immunité innée et l'immunité acquise face à l'intrusion d'un agent pathogène dans l'organisme. *Un pathogène sera confronté à plusieurs lignes de défense de l'organisme. La première étant les barrières anatomo-chimiques, avant de faire face à l'immunité innée et adaptative, qui ont des dynamiques d'activation et des rôles différents. Ces deux types d'immunités sont complémentaires et dépendantes l'une de l'autre. NK : cellules "natural killer".*

L'inflammation est un terme général qui désigne les mécanismes de défense de l'hôte contre une agression externe (infection, trauma, brûlure, allergie..) ou interne (cellules tumorales par exemple). La neuroinflammation est une sous-composante de l'inflammation, localisée spécifiquement au niveau du système nerveux central (SNC). Ce processus complexe se

caractérise par l'activation des cellules gliales résidentes, la libération de facteurs modulateurs de l'inflammation mais aussi parfois, il s'accompagne d'une altération de la BHE et d'une infiltration de cellules immunitaires circulantes. L'inflammation cérébrale intervient dans des processus physiopathologiques et dans des pathologies chroniques affectant le SNC.

Nous venons d'aborder quelques grands principes de fonctionnement du système immunitaire. Dans la prochaine section nous verrons que malgré la présence de la BHE, une infection périphérique a un impact direct sur le cerveau.

III.2 Impact d'une infection périphérique sur le cerveau

Le SNC est protégé par la BHE contre l'entrée d'agents pathogènes, de cellules immunitaires circulantes et de facteurs sanguins. La BHE est formée de cellules endothéliales conjointement reliées par des jonctions serrées, d'une épaisse couche protéique appelée "lame basale" et de nombreux processus astrocytaires permettant la formation et la consolidation de cette barrière physiologique.

Au milieu du 20^{ème} siècle, Peter Medawar a donné naissance au concept selon lequel, le cerveau est un site de privilège immun (Medawar, 1948). Cette idée a émergé à la suite de plusieurs études montrant que le cerveau est un organe tolérogène capable de supporter différents types de greffes, associés à un faible taux de rejet (Medawar, 1948; Bechmann et Woodrooffe, 2014). Il en a été conclu que cet organe était incapable d'induire ou de soutenir une réponse immunitaire. Par la suite, d'autres études ont démontré que le SNC avait la capacité de drainer le liquide céphalo-rachidien (LCR), dans lequel il baigne, vers les ganglions lymphatiques cervicaux. Dans certaines conditions pathologiques, cette connexion entre les deux structures peut déclencher une réponse immunitaire périphérique (Cserr *et al.*, 1992; Kida *et al.*, 1993). Le dialogue entre le système immunitaire et le SNC se fait aussi de la périphérie

vers le SNC, puisqu'il a été montré que le système immunitaire était modulateur de l'activité cérébrale et pouvait avoir des effets bénéfiques, mais aussi néfastes sur les fonctions centrales (Schwartz et Raposo, 2014; Steinman, 2004). Enfin, une étude récente a mis en lumière l'existence d'un système lymphatique fonctionnel, localisé au niveau méningé, ayant la capacité de drainer les constituants cellulaires et solubles du LCR dans les ganglions lymphatiques cervicaux (Louveau *et al.*, 2015). À ce jour, le SNC est toujours considéré comme un site de privilège immun, ou du moins un organe immunologiquement unique. À mesure que notre connaissance des interactions physiopathologiques neuro-immunes grandit, les mécanismes associés au privilège immunitaires sont redéfinis (Louveau *et al.*, 2015).

L'un des modèles expérimentaux qui a permis de grandes avancées dans l'étude des effets d'une inflammation périphérique sur le cerveau est l'injection systémique de lipopolysaccharide (LPS). Le LPS est une endotoxine pyrogène présente à la surface membranaire des bactéries Gram négatif. Son administration mime les effets d'une infection bactérienne périphérique et s'accompagne d'une inflammation cérébrale. En effet, le LPS est un exemple classique de PAMPs (motif moléculaire associé aux pathogènes), reconnu par le système immunitaire inné également présent dans le cerveau et représenté par les cellules microgliales. L'intensité de la réponse immunitaire induite est dépendante de la dose de LPS injectée. Comme nous l'avons évoqué précédemment, du fait de la présence de la BHE, le LPS possède une faible capacité de pénétration dans le cerveau (0,025 % de la quantité injectée) (Banks *et al.*, 2010). Il pourra toutefois agir sur celui-ci par le biais de différents processus incluant la circulation de facteurs pro-inflammatoires et de toxines pathogènes dans le sang, l'altération de la BHE et l'infiltration de macrophages au sein du parenchyme cérébral (Pardon, 2015).

Classiquement, le LPS initie une réponse immunitaire en périphérie qui se caractérise par la sécrétion de cytokines circulantes, incluant des interleukines (IL-1 β , IL-6, and l'IL-12), le TNF- α et l'IFN- γ . Dans un second temps, des facteurs anti-inflammatoires, l'IL-4, l'IL10 et l'IL-13, sont libérés en tant que rétrocontrôle négatif, dans le but de normaliser et finaliser la réponse immunitaire. Les cytokines pro-inflammatoires libérées peuvent traverser la BHE pour agir sur le cerveau et activer la microglie, médiateur clé de l'inflammation cérébrale (Banks, 2005; Chen *et al.*, 2012). Bien qu'il ne traverse que très peu cette barrière physique, le LPS peut toutefois stimuler la libération de cytokines, en activant directement la microglie dans les structures cérébrales démunies de BHE, c'est à dire au niveau des CVO (Laflamme et Rivest, 2001). L'un des récepteurs clés de l'activation du système immunitaire inné est le TLR-4 qui lie le LPS. Le TLR-4 est exprimé au niveau des méninges, du canal épendymaire, des CVO, des vaisseaux et du parenchyme cérébral (Chakravarty et Herkenham, 2005). Le LPS peut directement agir sur ces récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales de la BHE, participant ainsi à l'altération de cette barrière et à l'initiation de signaux de transduction intracellulaires pro-inflammatoires bien caractérisés. On pourra notamment observer l'activation de facteurs de transcription tels que NF- κ B (facteur nucléaire κ B) et AP-1 (protéine activatrice-1) (Guha et Mackman, 2001). Ces facteurs sont tous deux impliqués dans la réponse immunitaire, la réponse cellulaire au stress et dans le contrôle de l'apoptose. Au niveau cérébral, ils vont notamment stimuler la surexpression des enzymes iNOS (nitrique oxyde synthétase inductible) et COX-2 (cyclo-oxygénase-2). En conséquence, iNOS induit une production excessive de NO qui perd alors ses effets bénéfiques, il devient pro-inflammatoire et déclenche une vasodilatation excessive, une augmentation de la perméabilité vasculaire et des effets cytotoxiques. COX-2, quant à lui, favorise la production de prostaglandine PGE2 qui possède également des effets pro-inflammatoires similaires à ceux évoqués précédemment. L'activité de

la NADPH oxydase est également augmentée induisant une surproduction de ROS nocives (Saavedra, 2012).

En conséquence, de grandes quantités de facteurs pro-inflammatoires sont libérés dans le parenchyme cérébral et vont pouvoir influencer et altérer l'activité microgliale, astrocytaire et neuronale. Lorsqu'il n'est pas suffisamment régulé, le dialogue perpétuel entre la périphérie et l'inflammation centrale peut mener à une réponse inflammatoire chronique et des dommages cellulaires irréversibles (**Figure 19**).

Nous avons évoqué ici l'impact du LPS sur l'inflammation cérébrale, mais d'autres facteurs peuvent influencer sur le SNC malgré la présence de la BHE. En effet, dans le cas de l'HTA, la présence d'angiotensine-II circulante peut également causer des dommages centraux en empruntant les mêmes cascades de transduction que le LPS.

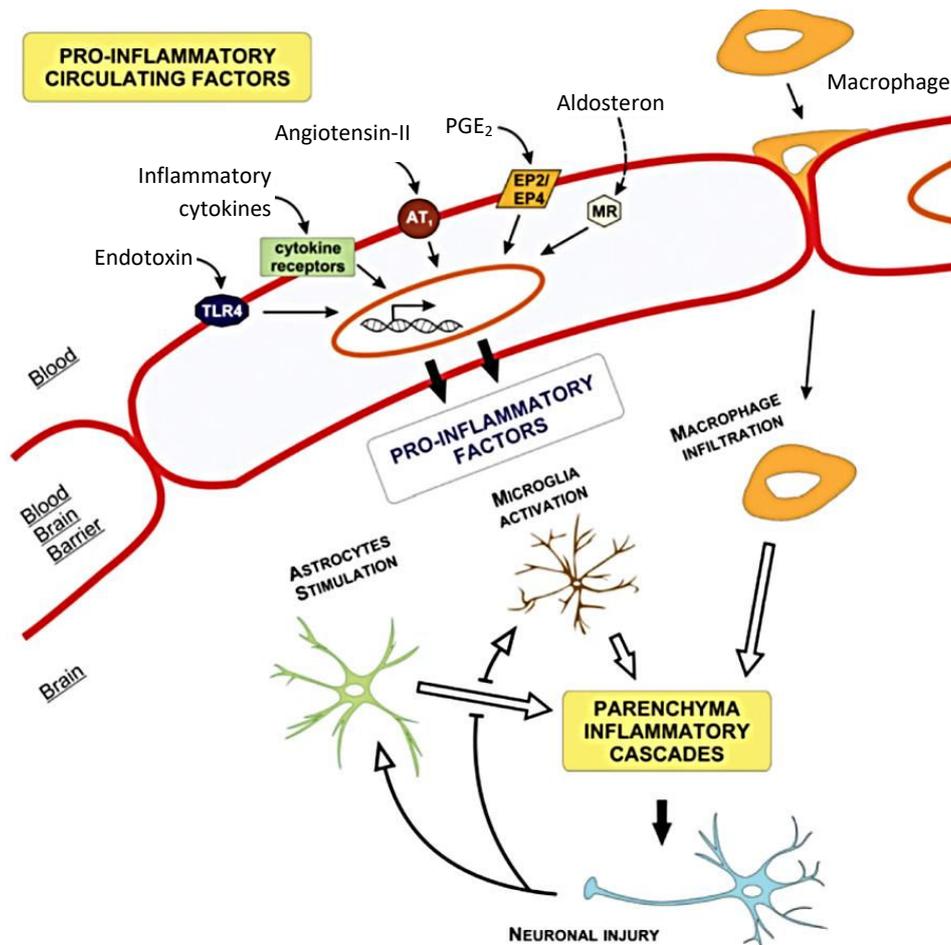


Figure 19. Impact de facteurs pro-inflammatoires circulants sur l'inflammation cérébrale. Différents facteurs circulants peuvent cibler les cellules endothéliales cérébrovasculaires pour initier une cascade de transduction pro-inflammatoire au niveau cérébral. La production excessive de prostaglandine E2 (PGE₂), de monoxyde d'azote (NO), de cytokines pro-inflammatoires, de molécules d'adhésion et d'espèce réactive de l'oxygène (ROS) entraîne l'activation des cellules microgliales et astrocytaires et la rupture de la barrière hémato-encéphalique, permettant l'infiltration de macrophages. La combinaison de l'ensemble de ces facteurs mène à des dommages tissulaires qui peuvent être irréversibles. D'après (Saavedra, 2012).

Les processus inflammatoires initiés dans le cerveau ne sont pas toujours la conséquence d'une stimulation périphérique. Dans le parenchyme cérébral, les TLR neuronaux, microgliaux et astrocytaires peuvent non seulement reconnaître le LPS, comme nous venons de l'évoquer, mais ils peuvent également être activés par les DAMPs (motifs moléculaires associés aux

dégâts), libérés à la suite d'une lésion cellulaire primaire dans le parenchyme cérébral (Hyakkoku *et al.*, 2010; Jayaraman *et al.*, 2008). La reconnaissance des DAMPs par les TLR est à l'origine de l'installation d'un statut pro-inflammatoire cérébral, propice à l'exagération des dommages tissulaires. Ces dommages tissulaires sont associés, là encore, au déclenchement de cascades inflammatoires, à la rupture de la BHE et à l'infiltration de macrophages et de lymphocytes circulants.

Que l'inflammation cérébrale soit générée à la suite d'une stimulation initiale périphérique ou endogène cérébral, la microglie est centrale et représente le médiateur principal des mécanismes inflammatoires. Une altération microgliale déséquilibre la réponse immunitaire et peut avoir de lourdes conséquences sur le devenir fonctionnel du cerveau. Dans la section suivante, nous nous intéresserons à la microglie.

III.3 La microglie

III.3.1 Les origines

L'histoire nous permet d'apprécier et d'acquérir une compréhension plus forte des concepts, des controverses et des percés qui ont façonné la compréhension actuelle de ce que sont les cellules microgliales. En 1846, Rudolf Virchow fut le premier à utiliser le terme glie, désignant alors la substance conjonctive du cerveau et de la moelle épinière, et qu'il révélera 10 ans plus tard au monde comme étant les cellules gliales, que nous connaissons aujourd'hui. Cette découverte fut la porte d'entrée d'une nouvelle aire d'étude du SNC. La première caractérisation des cellules gliales qui comprenaient bien évidemment la microglie, fut possible par l'élaboration d'une technique de marquage en 1880, encore aujourd'hui bien connue : la technique de Nissl. Franz Nissl fit à l'époque le lien entre la microglie et les cellules phagocytiques périphériques. Ses observations fut complétées par Ford Robertson, qui défendit l'origine mésodermale de cette glie phagocytaire et établit le concept de mésoglie. C'est

finalement Pio del Rio Hortega, un disciple de Santiago Ramon y Cajal, qui introduit le concept de microglie en 1932. Il est intéressant de noter que la recherche actuelle est toujours dirigée vers des questions soulevées il y a près d'un siècle et les découvertes récentes ne font que confirmer ces observations pionnières. En effet à cette époque, del Rio Hortega publie le postulat suivant : 1/ la microglie pénètre dans le cerveau à un stade précoce du développement ; 2/ ces cellules envahissantes possèdent une morphologie amiboïde et une origine mésodermale ; 3/ elles utilisent les vaisseaux et le réseau de la substance blanche comme structure de guidage pour la migration et l'accès à toutes les régions cérébrales ; 4/ leur phénotype évolue pour acquérir une morphologie ramifiée à un stade de maturation plus avancé du cerveau ; 5/ dans le cerveau mature, les cellules microgliales sont dispersées d'une façon relativement uniforme et affichent de petites variations ; 6/ chaque cellule semble occuper un territoire défini ; 7/ en contexte pathologique, les cellules subissent une transformation ; 8/ dans ces conditions, les cellules transformées acquièrent une morphologie amiboïde similaire à celle observée à un stade précoce de développement ; 9/ les cellules microgliales ont la capacité à migrer, proliférer et à phagocyter (Kettenmann *et al.*, 2011) (**Figure 20**).

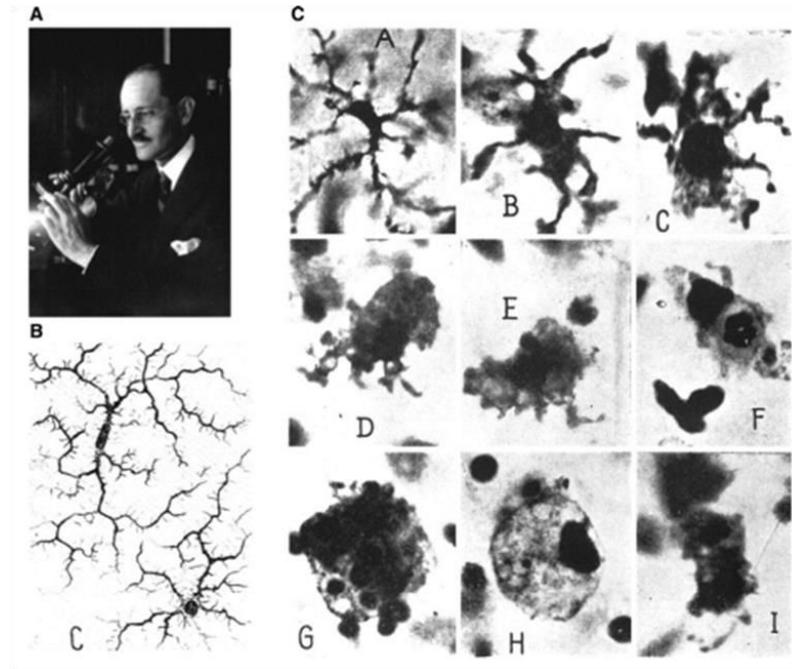


Figure 20. Del Rio Hortega est reconnu comme le père de la microglie. (A) Photographie de Del Rio Hortega (1882-1945). (B) Dessin d'observation réalisé par Del Rio Ortega représentant deux cellules microgliales ramifiées. (C) Microphotographies de l'évolution morphologique d'une microglie ramifiée vers un état amiboïde. D'après (Kettenmann *et al.*, 2011).

La densité microgliale n'est pas équivalente dans toutes les régions cérébrales. En moyenne, elle correspond à 0,5 – 16,6 % des cellules totales du SNC adulte chez l'Homme et à 5-12 % des cellules gliales chez la souris (Lawson *et al.*, 1990; Mittelbronn *et al.*, 2001). Les cellules microgliales sont souvent considérées comme les macrophages du SNC, toutefois, de nombreuses études, réalisées majoritairement chez la souris, ont établi qu'elles constituent une population cellulaire unique, distincte des macrophages périphériques. La microglie adulte dérive de précurseurs qui quittent le sac vitellin à E8.5-9, entrant dans le tube neural via la circulation sanguine primitive (Ginhoux *et al.*, 2010; Greter et Merad, 2013). Des études récentes ont permis de caractériser l'expression de marqueurs spécifiques des précurseurs microgliaux embryonnaires (Kierdorf *et al.*, 2013). Les cellules CD45⁺ c-kit⁺ CSF1R⁺, localisées au niveau du sac vitellin à E8.5 seraient les uniques précurseurs microgliaux et se

distinguent par la suite par l'expression de 3 marqueurs, le CX3CR1 (récepteur de la fractalkine/CX3CL1), le CD45 et le F4/80 (**Figure 21**). Au stade d'intégration du cerveau, les précurseurs microgliaux acquièrent peu à peu un phénotype microglial amiboïde. La BHE n'étant pas encore totalement formée, la microglie amiboïde envahit le cerveau via deux points d'entrée distincts, les méninges et les ventricules cérébraux (Verney *et al.*, 2010). Se produit alors un processus de migration tangentielle, puis radiaire, qui s'appuie sur l'échafaudage élaboré par la glie radiaire, sur la mise en place de la vascularisation cérébrale, associée à la présence de gradient de molécules de guidage (Harry, 2013; Navascués *et al.*, 2000). La microglie amiboïde est hautement proliférative permettant d'augmenter très rapidement le pool de cellules. Cette activité proliférative décroît au fur et à mesure de la différenciation cellulaire et de la répartition des cellules microgliales au sein du SNC.

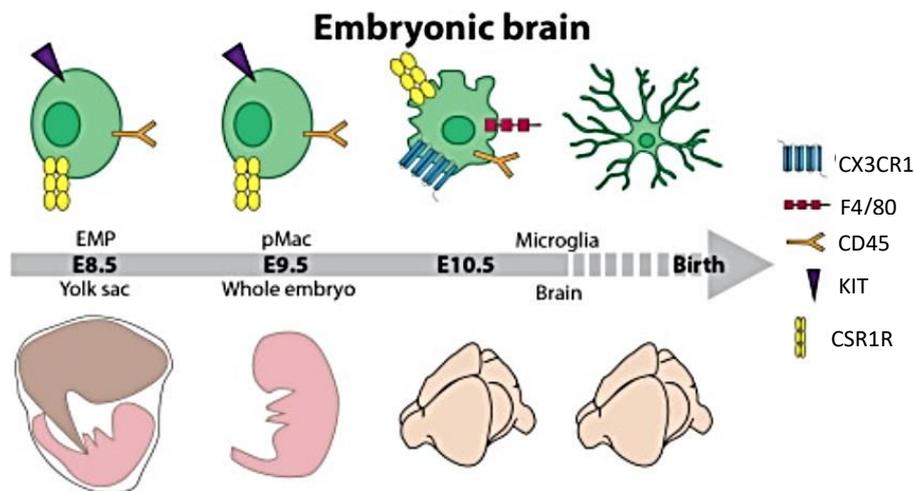


Figure 21. Origine embryonnaire des cellules microgliales. Les cellules microgliales proviennent de cellules progénitrices érythromyéloïdes (EMP) $CSF1R^+$ $c-kit^+$ $CD45^+$ qui émergent du sac vitelin. A partir du jour embryonnaire 9,5, les EMPs deviennent des pré-macrophages (pMac) et colonisent l'embryon selon un mécanisme dépendant du récepteur à la fractalkine, le CX3CR1. Les pMacs s'installent ensuite dans le cerveau en développement et se différencient en microglies amiboïdes, puis en microglies ramifiées matures résidentes du cerveau. D'après (Askew *et al.*, 2018).

Au cours de ces différents processus et notamment au cours de la différenciation, les cellules microgliales acquièrent une expression génétique spécifique à la lignée. En effet, elles passent d'un phénotype amiboïde à un phénotype ramifié différencié et mature. Les mécanismes impliqués dans ce processus de différenciation sont mal connus, mais plusieurs études ont montré une forte implication des astrocytes, qui faciliteraient l'acquisition du phénotype caractéristique de la microglie par la libération de facteurs de type purinergique et cytokinique (le TGF- β (*transforming growth factor- β*), M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) et GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*) dans le milieu extracellulaire (Schilling *et al.*, 2001; Wollmer *et al.*, 2001).

C'est parce que la microglie dérivée du sac vitellin subsiste tout au long de l'existence de l'individu qu'il a longtemps été supposé que la population microgliale possédait une longue durée de vie. À l'échelle d'une cellule unique, cette observation ne s'applique pourtant pas puisque la population microgliale est maintenue par autorenouveau (Ajami *et al.*, 2007). Récemment, il a été montré que le paysage microglial est radicalement modifié en quelques semaines, avec des cellules mourantes, d'autres prenant leur place et leur position absolue changeant (**Figure 22**). La population microgliale cérébrale serait en fait renouvelée totalement en 95 jours chez le rongeur (Askew *et al.*, 2017). Chez l'Homme, la population serait renouvelée une centaine de fois sur une durée de vie de 80 ans (Askew *et al.*, 2017). Cette dynamique d'autorenouveau influence très probablement l'interprétation de certains phénomènes, comme le processus de "sensibilisation microgliale", dans lequel la réponse microgliale est exagérée lors d'une seconde rencontre à un stimulus donné, comparativement à la réponse de la microglie naïve à ce stimulus (Bilbo et Schwarz, 2009; Johnson *et al.*, 2013; Krstic *et al.*, 2012). La sensibilisation microgliale implique le besoin d'une "mémoire microgliale" du premier stimulus, de façon à provoquer une réponse exagérée au second

stimulus. Cette mémoire pourrait être contenue au niveau épigénétique (héréditaire) (Schwarz *et al.*, 2011), ou pourrait être stockée ailleurs dans le réseau neuronal ou glial.

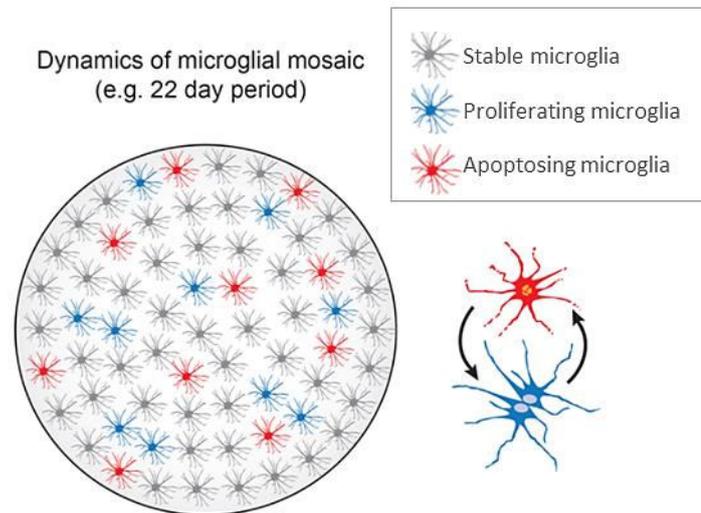


Figure 22. Le *turn over* microglial finement régulé par la prolifération et l'apoptose. *En conditions physiologiques, la population microgliale arbore une organisation en "mosaïque", où les processus de chacune de ces cellules ne se touchent pas et où chaque microglie prend en charge un domaine cérébral bien défini. L'équilibre est rythmé par la balance entre la prolifération et l'apoptose de ces cellules dans le cerveau mature. D'après (Askew et al., 2017).*

Dans le SNC adulte, les cellules microgliales ont une morphologie complexe avec des processus hautement ramifiés qui balayent en continu l'espace extracellulaire. Pourtant, initialement la microglie était considérée comme une cellule dormante qui intervenait uniquement au niveau de processus lésionnels ou infectieux et qui était complètement apparentée aux macrophages périphériques. Aujourd'hui, grâce au développement d'outils d'imagerie non-invasifs permettant l'étude de la dynamique microgliale et d'outils permettant la manipulation génétique, les cellules microgliales sont les actrices de nombreuses publications à fort impact international, démontrant toujours de nouveaux rôles essentiels au sein du SNC (**Figure 23**).

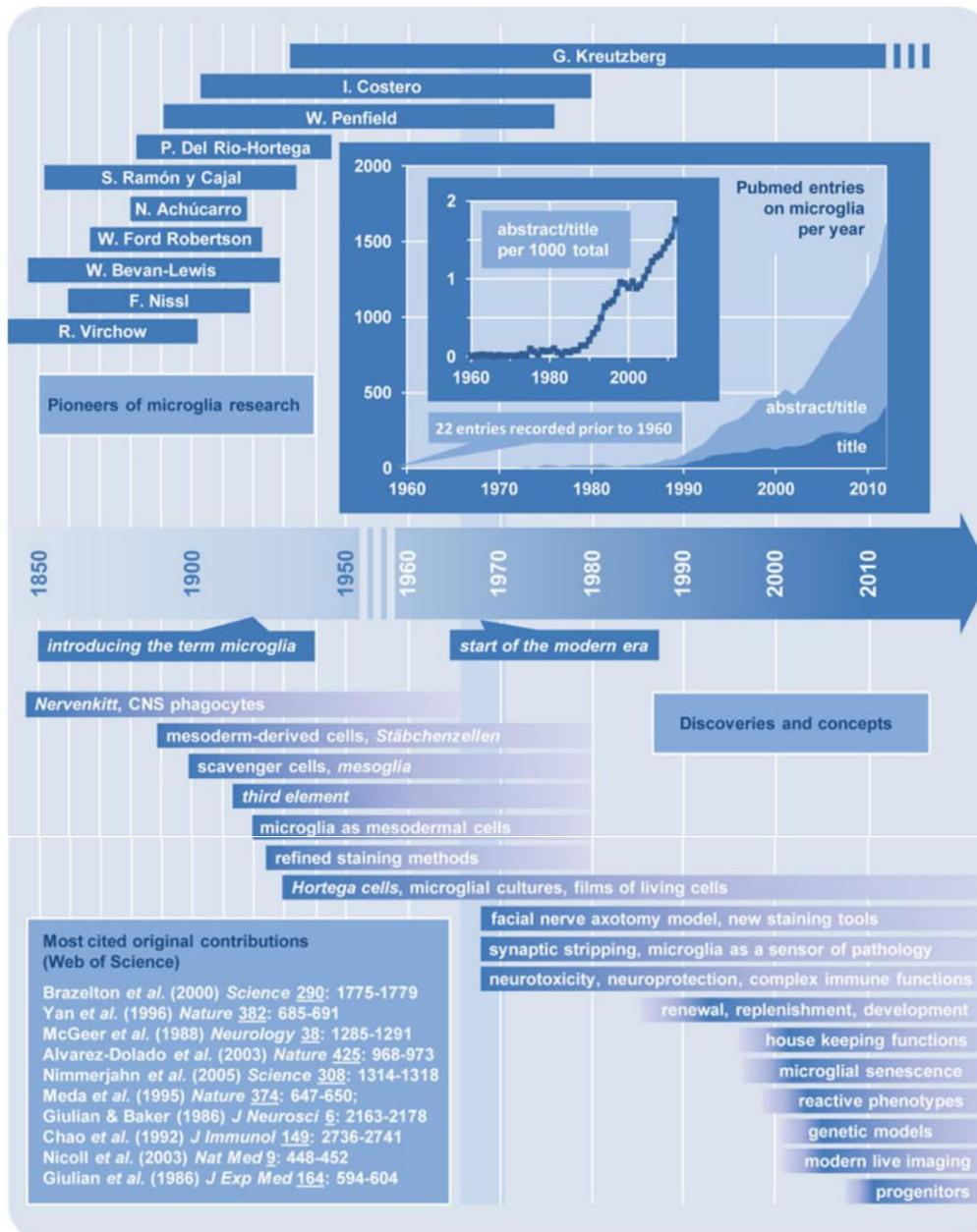


Figure 23. Aperçu historique de la recherche sur la microglie. Les pionniers qui ont contribué aux premières découvertes sont indiqués par leurs dates biographiques. Les découvertes majeures, les développements technologiques et les concepts fondamentaux sont présentés sous la frise chronologique. Le graphique (encart) illustre la croissance de la recherche sur la microglie, selon le nombre de publications par an, portant le terme "microglia" dans l'abstract et / ou le titre (basé sur les entrées PubMed). L'augmentation constante des travaux liés aux cellules microgliales est également reflétée par la normalisation du nombre total de publications (nombre de publications pour 1000 entrées totales). L'encadré en bas, liste les 10 études originales les plus citées (basé sur le site Web of Science). D'après (Resai et al., 2014).

Dans cette section, nous avons vu que la microglie d'origine mésodermique est très vite mise en place dans le cerveau. A un stade mature, elle arbore un phénotype ramifié de surveillance. Toutefois, étant très sensible aux variations de son microenvironnement, ce phénotype peut très vite évoluer. C'est ce que nous détaillons dans la prochaine partie.

III.3.2 Quels phénotypes pour la microglie ?

La microglie mature arbore une morphologie caractéristique et possède un petit soma d'où partent de fins prolongements ramifiés, répartis sur un domaine propre à chaque microglie. Cette morphologie est associée à un phénotype "quiescent". Toutefois, la microglie n'est pas dormante et ce terme ne convient pas à la grande dynamique présentée par ces cellules. Deux études princeps réalisées en microscopie biphotonique *in vivo* chez des souris transgéniques exprimant la protéine eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) sur le locus du CX3CR1 ont démontré que l'ensemble de l'arborisation microgliale est extrêmement motile (Davalos *et al.*, 2005; Nimmerjahn *et al.*, 2005). Les cellules microgliales possèdent un corps cellulaire relativement fixe, alors qu'en effet, l'intégralité des processus microgliaux, de façon spontanée, est continuellement engagée dans des mécanismes de démolition et de reconstruction, avec la formation de processus *de novo* et la rétractation de ces processus (**Figure 24**). La perte et l'addition de nouveaux processus apparaît à chaque niveau de branchement de l'arborisation microgliale et équivaut à une vitesse de l'ordre de la minute par micromètre (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Une étude réalisée par Haynes et ses collaborateurs en 2006, a montré qu'une inhibition de l'expression du purino-récepteur P2Y₁₂ diminue significativement cette dynamique, qui serait donc en grande partie sous le contrôle de la signalisation purinergique (Haynes *et al.*, 2006). L'activation de ces récepteurs par l'ATP (adénosine triphosphate) active une voie de signalisation permettant une délocalisation et une accumulation des intégrines- β 1 vers l'extrémité des prolongements microgliaux. Cette structuration transitoire permet une

adhésion locale à la matrice extracellulaire (Ohsawa *et al.*, 2010). Une autre étude a révélé que la signalisation CX3CR1/CX3CL1 participerait également à la motilité spontanée de la microglie (Liang *et al.*, 2009). Une telle réorganisation structurelle, dynamique et à la fois minutieuse, permet à la microglie de scanner l'entièreté de son environnement en quelques heures, sans perturber le complexe et très fin réseau neuronal. Les cellules microgliales voisines balaient à tour de rôle les régions partagées, garantissant un dépistage exhaustif de l'environnement, tout en évitant les contacts entre elles.

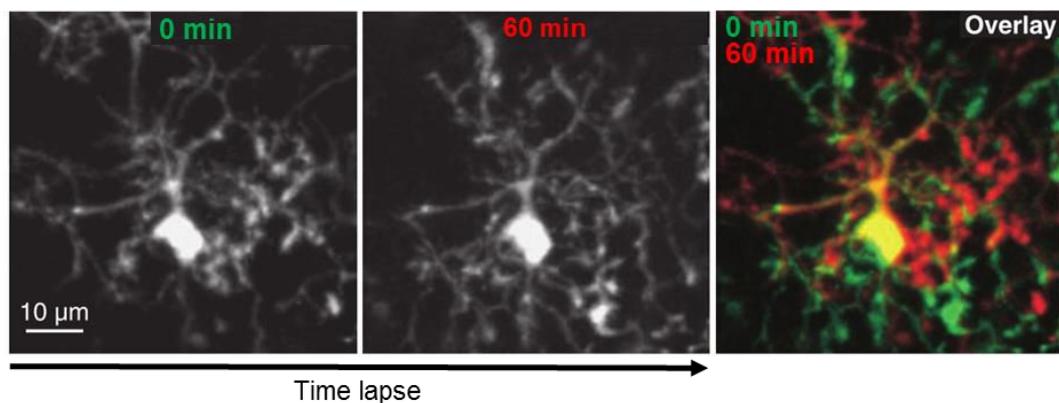


Figure 24. Dynamique de la motilité spontanée de la microglie. *En condition physiologique, les cellules microgliales possèdent une morphologie très dynamique. Time lapse réalisé en microscopie biphotonique in vivo montrant une cellule microgliale au début de l'imagerie (image de gauche) et à 60 min après le début de l'imagerie (image du milieu). L'overlay des deux images précédentes (image de droite) révèle un corps cellulaire fixe (jaune) et des processus spontanément très motiles (rouge et vert). Modifiée d'après (Nimmerjahn *et al.*, 2005).*

Lors de microlésions cérébrales expérimentales induites par un laser focalisé, la réponse microgliale est immédiate. On observe en simultané deux dynamiques différentes des processus microgliaux. Ceux positionnés dans la direction opposée à la lésion se rétractent ; en parallèle, les prolongements dirigés vers la lésion s'étendent de façon coordonnée. Le nombre de microglies impliquées dans ce mouvement ciblé dépend de la sévérité de la lésion. Cette

réponse est probablement conditionnée par un gradient d'ATP créé depuis le site de lésion vers la périphérie. Les cellules microgliales localisées dans la périphérie immédiate de la lésion seront donc les premières et les plus intensément recrutées. L'encerclement de la lésion permet ensuite de restreindre l'extension de la lésion et de protéger l'environnement direct. Cette réponse microgliale est dépendante de l'ATP et fait intervenir les récepteurs P2Y₁₂ microgliaux comme receveurs du signal "*find me*" libéré par les cellules en souffrance (**Figure 25**) (Davalos *et al.*, 2005). De la même façon, les phénotypes associés à la phagocytose microgliale, la réactivité au LPS et la réactivité à une lésion cérébrale ischémique, sont différents et représentent 3 exemples illustrant la gradualité de la réponse microgliale en termes de morphologie et d'expression génique. Cela illustre parfaitement l'adaptabilité de ces cellules à des contextes très différents les uns des autres.

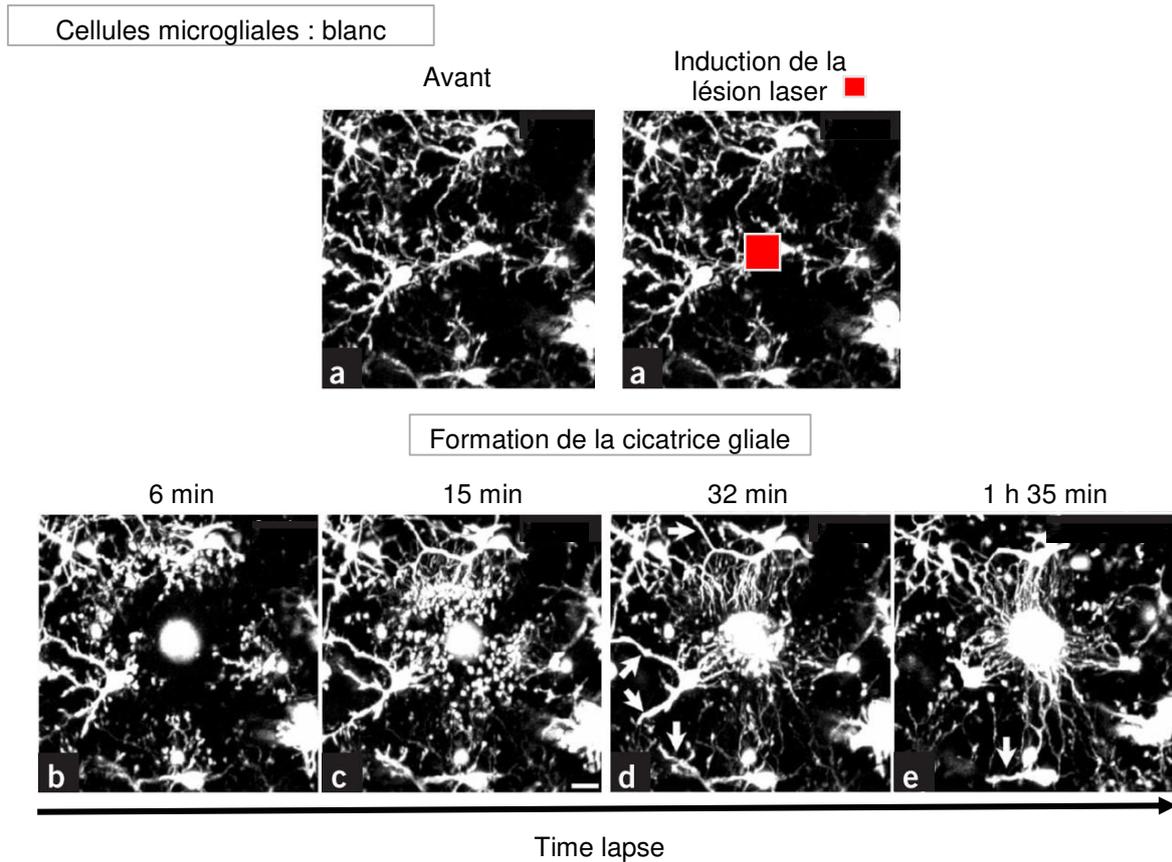


Figure 25. Dynamique de l'activité cicatricielle microgliale. *Après induction d'une microlésion corticale par laser (carré rouge), les cellules microgliales les plus proches répondent immédiatement en envoyant des extensions vers le site lésé en formant peu à peu un confinement sphérique autour de la lésion et formant ainsi une cicatrice. En parallèle, les mêmes cellules, rétractent leurs processus dirigés dans la direction opposée. Time lapse réalisé en microscopie biphotonique in vivo, images obtenues avant et à 6, 15, 32 minutes et 1h35 après induction de la lésion laser. Modifiée d'après (Davalos et al., 2005).*

Il est aujourd'hui largement établi que la microglie n'intervient pas uniquement dans des processus de réponse immune à différentes stimulations de danger, mais possède un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cérébrale et dans la neurotransmission, nous reviendrons plus en détails sur cette notion. Ces fonctions intégrées de la microglie ne se produisent pas de façon isolée mais sont influencées par les cellules avoisinantes que sont les astrocytes, les neurones et le compartiment vasculaire. Cette communication multi-directionnelle est entretenue grâce à la motilité spontanée des processus microgliaux qui

permettent notamment la mise en contact physique de la microglie avec ces différents éléments (Nimmerjahn *et al.*, 2005) (**Figure 26**). La microglie peut ainsi agir de façon très localisée et précise sur ces cellules par des actions mécaniques, pour le remodelage de l'arborisation dendritique par exemple, ou chimique par la libération de médiateurs solubles. En retour, les cellules microgliales possèdent un large panel de récepteurs sensibles à certains neuro- et gliotransmetteurs produits par les neurones, les astrocytes et les cellules endothéliales. L'un des défis actuels consiste à disséquer les signaux qui permettent à un tel réseau orchestré de maintenir une fonction optimale du SNC.

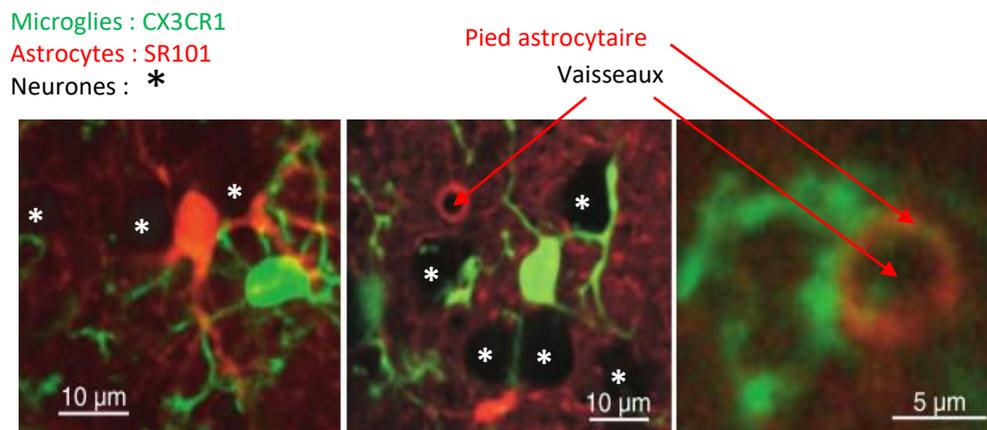


Figure 26. Interactions physiques entre les cellules microgliales, les neurones, les astrocytes et les vaisseaux sanguins. Les processus microgliaux (vert, souris CX3CR1) établissent des contacts physiques avec les astrocytes (gauche, cellule rouge marquée au SR101 (sulforhodamine-101)), les neurones (centre, espaces noirs non marqués, *) et avec le compartiment vasculaire au niveau des pieds astrocytaires de la BHE (droite, flèches rouges). Images réalisées *in vivo* en microscopie biphotonique. Modifiée d'après (Nimmerjahn *et al.*, 2005).

Très souvent on emploie le terme "activation microgliale" compris comme une transformation de la cellule "quiescente", supposée de surveillance, vers un phénotype "activé", amiboïde, lors d'une perturbation de l'homéostasie tissulaire ou lors d'une stimulation expérimentale. Ce mot "activation" implique qu'en amont de l'activation, les cellules

microgliales sont inactives. Cependant, l'imagerie *in vivo* a permis de montrer que cette transition entre l'état "quiescent", de repos, et l'état "activé", devait être considéré comme un changement de phénotype fonctionnel plutôt que comme un éveil. Les cellules quittent un état de surveillance, qui est un état d'activité et adoptent un profil réactif pour faire face au contexte de déséquilibre homéostatique. En l'occurrence, il existe une forme de continuum entre les différents phénotypes microgliaux, qui permet une réponse personnalisée au contexte, mais qui rend aussi la description, la détermination précise du phénotype observé complexe. Ainsi, la microglie aurait à sa disposition tout un panel complet d'outils qu'elle sélectionnerait en fonction du contexte rencontré (**Figure 27**).

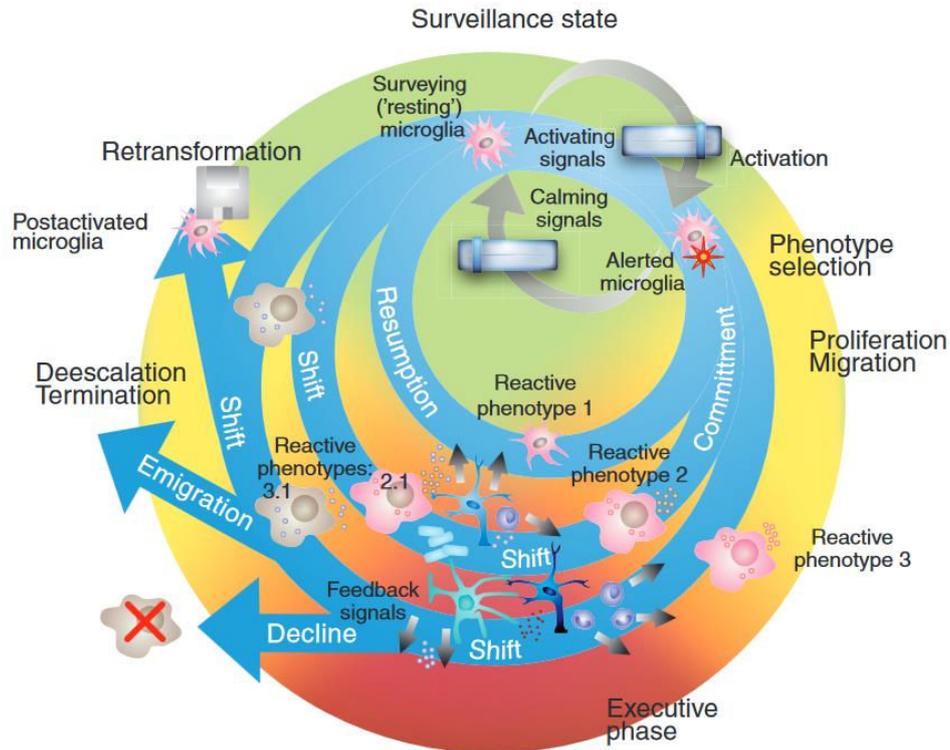


Figure 27. Complexité de la modulation du phénotype microglial.

Les cellules microgliales sont très sensibles à leur environnement, ce qui leur permet d'être très rapidement opérationnelles en cas de menace (infection, traumatisme). Leur phénotype est influencé par des signaux On, stimulant la réactivité microgliale et des signaux Off constitutifs, favorisant un phénotype de surveillance. Il existe une multitude de phénotypes microgliaux, chacun adapté à un contexte donné et associé à des fonctions et à un profil transcriptionnel particulier. Une fois le phénotype réactif sélectionné, les cellules microgliales entrent dans une phase exécutive (libération de cytokines et de chimiokines, prolifération, activité phagocytaire) associée ici pour exemple aux phénotypes réactifs 1, 2 et 3. Un phénotype particulier peut ensuite évoluer en un autre phénotype (illustré ici par 2.1 et 3.1), en parallèle de l'élimination des signaux initiaux (feedback). Les cellules microgliales peuvent faciliter la résolution de l'inflammation et devenir neuroprotectrice, mourir (indiqués par une cellule «X») ou retourner à un état de surveillance. Elles peuvent aussi subir des modifications transcriptionnelles subtiles associées à un phénotype pseudo-activé ou post-activé. La morphologie de ces cellules n'est pas altérée mais leur sensibilité à l'environnement est modifiée et leur capacité de réponse est altérée. C'est une certaine forme d'expérience acquise, on parle alors de mémoire d'activation (icône en forme de disquette). D'après (Hanisch et Kettenmann, 2007).

La microglie est l'un des modulateurs les plus puissants de la réparation et de la régénération du SNC. Toutefois, lorsqu'on l'étudie, elle nous met souvent face à ses contradictions. En effet, dans un contexte pathologique, la microglie favorise la récupération fonctionnelle en éliminant les débris cellulaires, en résolvant l'inflammation locale et en libérant une multitude de facteurs trophiques. Pourtant, elle peut aussi entraver la réparation du SNC et aggraver la lésion tissulaire. Ainsi, la notion de polarisation microgliale M1 et M2 a été introduite pour rendre compte de cette dualité de la microglie. La microglie M1 est caractérisée par l'expression de gènes tels que le TNF- α , l'iNOS et l'IL-6, libère des facteurs pro-inflammatoires et des radicaux libres qui nuisent à la réparation et à la régénération cérébrale (**Figure 28**). En revanche, la microglie M2, caractérisée par l'expression des gènes de signature M2, l'arginase, le CD206 et l'IL-10, améliore la réparation et la régénération en augmentant la phagocytose, en libérant des facteurs trophiques et en résolvant l'inflammation cérébrale. Il faut noter que cette nomenclature M1/M2 a été reprise de celle utilisée pour la caractérisation macrophagique. Elle fut d'abord utilisée pour la caractérisation microgliale *in vitro* et est aujourd'hui utilisée *in vivo* pour faciliter l'interprétation et la communication des résultats, mais son utilisation est débattue dans la littérature pour caractériser le phénotype de la microglie (Ransohoff, 2016). En effet, de récentes études ont montré que la dichotomie M1/M2 est un cadre conceptuel trop simplifié qui ne représente que deux états d'activation extrêmes. Le statut des cellules microgliales *in vivo* est beaucoup plus compliqué qu'*in vitro* et peut inclure un spectre de phénotypes fonctionnels différents mais se chevauchant. Par exemple, certains auteurs ont proposé une classification basée sur des sous-populations phénotypiques M2, tels que M2a, M2b, M2c et Mox, chacun ayant des caractéristiques physiologiques uniques et des fonctions biologiques distinctes. Ransohoff, dans une revue parue dans Nature Neuroscience en 2016 affirme clairement que ce cadre conceptuel est absolument inadapté et n'est basé sur aucun fondement scientifique (Ransohoff, 2016). Alors que des technologies relativement

récentes (microscopie biphotonique, analyse épigénétique) permettent de révéler des fonctions inédites de la microglie, illustrant un type cellulaire toujours plus complexe, l'application d'une classification issue d'observations des cellules macrophagiques isolées *in vitro* semble désuet, La classification M1 et M2 néanmoins persiste, elle peut être perçue comme un concept utile pour faciliter notre compréhension de l'état fonctionnel de la microglie ou au contraire, être vue comme un frein à la compréhension des nombreuses fonctions complexes et de la réalité phénotypique de cette cellule.

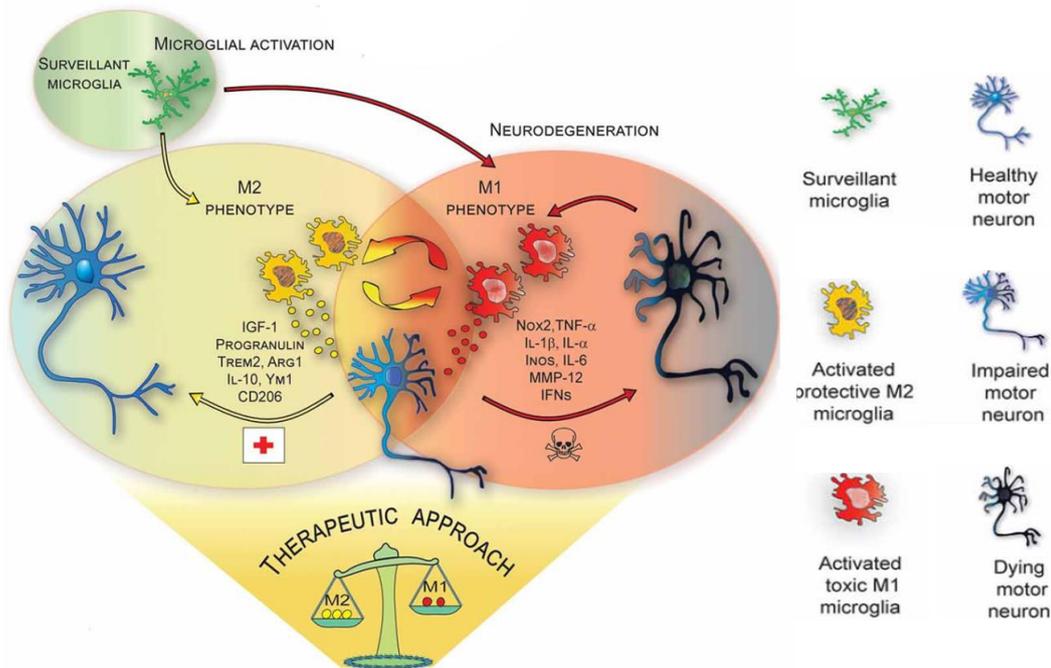


Figure 28. Rôle ambivalent de la microglie en contexte pathologique. Lors d'une lésion cérébrale, un AVC par exemple, l'activation microgliale représente un continuum entre deux phénotypes extrêmes, le phénotype M2 neuroprotecteur qui favorise la survie cellulaire par la libération de facteurs neurotrophiques et le phénotype M1 neurotoxique, qui libère des cytokines pro-inflammatoires. L'une des stratégies thérapeutiques de plus en plus envisagée dans la littérature est de forcer la polarisation microgliale vers un le phénotype M2 protecteur. D'après (Geloso et al., 2017).

Comme nous venons de le voir, la microglie peut évoluer vers des phénotypes très variés en fonction du contexte physiopathologique dans lequel elle se trouve. Ces différents phénotypes sont influencés par des signaux environnementaux de type *On* ou *Off*.

III.3.3 Récepteurs microgliaux et signalisation *On/Off*

Les cellules microgliales ont la capacité de reconnaître un large éventail de signaux, indépendamment de leur nature biochimique (peptides, lipoprotéines, glycolipides, nucléotides), de leur implication physiopathologique ou de leur origine (vasculaire, parenchymateuse, astrocytaire, neuronale...). De nombreuses molécules peuvent amener la microglie à passer de son état de surveillance vers un état réactif, ce sont les signaux *On* (**Tableau 5**). Le point commun entre ces différents signaux est qu'ils indiquent tous la présence d'une menace pour l'intégrité fonctionnelle et structurelle du SNC. A l'inverse, les signaux *Off* sont constitutivement présents dans le parenchyme cérébral. Leur fonction est de maintenir la microglie dans son état de surveillance. C'est l'équilibre des signaux *On* et *Off* qui permet de maintenir l'homéostasie tissulaire et qui influence l'état d'activation microglial selon deux principes (Biber *et al.*, 2007). L'apparition soudaine de facteurs habituellement absents, ou la présence de facteurs à des concentrations inhabituelles et critiques, ou présentant une forme anormale ou un état fonctionnel spécifique, stimule les récepteurs microgliaux associés à ces signaux. Ces différents cas de figure correspondent à des signaux *On* et stimulent des cascades de signalisation dépendantes de ces récepteurs. Autrement, c'est la réduction, voire l'arrêt complet d'une voie de signalisation *Off* qui provoque l'entrée de la microglie dans un stade d'alerte et de réactivité.

Class of compound	Examples
Surface structures and DNA/RNA of viral, bacterial or fungal origin	Agonists of members of the pattern recognition receptor families, notably TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR6/2 and TLR9, such as bacterial LPS or cell wall proteoglycans and lipoteichoic acid (LTA), gp41, gp120 (the TLR4-agonistic LPS serving as a common model agent)
Abnormal endogenous proteins	β -amyloid (aggregates), A β 25–35, A β 40, A β 42, prion protein (PrP)
Complement	Complement factors C1q, C5a
Antibodies	Immunoglobulin of various classes and isotypes (IgA, IgG, IgM), presented in immune complexes
Cytokines	Colony stimulating factors (M-CSF, GM-CSF), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ , TGF- β , TNF- α
Chemokines	Ligands for chemokine receptors: CCR3, CCR5, CXCR2, CXCR, CXCR4, CX3CR1, IL-8R
Neurotrophic factors	Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial-derived neurotrophic factor (GDNF), nerve growth factor (NGF), neurotrophin 3 (NT-3), NT-4
Plasma components	Albumin, fibronectin, fibrinogen, thrombin
Other proteins and peptides	Apolipoprotein E (ApoE), heat shock proteins hsp60 and hsp70, CD40L, melanocyte-stimulating hormone (MSH), endothelin, S100 proteins, vasoactive intestinal peptide (VIP)
Neurotransmission-related compounds	ATP (and related purines), β -adrenergic agonists, glutamate, kainate, NMDA
Ions	K ⁺ , Mn ²⁺
Other compounds	Cannabinoids, ceramide, gangliosides, lysophosphatidic acid (LPA), melatonin, opioids (endomorphines), platelet-activating factor (PAF), prostaglandin E ₂ (PGE ₂), steroid hormones, vitamin D ₃

Tableau 5. Principaux signaux On/Off régulant l'activité microgliale en condition physiologique et pathologique. Les cellules microgliales sont très sensibles à leur environnement puisqu'elles possèdent un grand nombre de récepteurs spécifiques de différentes classes de molécules. *D'après* (Hanisch et Kettenmann, 2007).

Les signaux *Off* sont majoritairement associés à des fonctions bénéfiques de la microglie pour le SNC, comme le contrôle de la phagocytose, la libération de facteurs neurotrophiques ou encore la régulation de la synthèse cytokinique. A l'inverse, les signaux *On* stimulent l'activité microgliale au détriment de la physiologie cérébrale. En effet, ces signaux dérèglent l'activité phagocytaire de la microglie et stimulent la synthèse excessive de cytokines et de monoxyde d'azote (Biber *et al.*, 2007). Voici quelques exemples de signaux *On* et *Off* et de leurs actions sur l'activité microgliale et sur l'environnement cérébral.

III.3.3.1 Les récepteurs aux neurotransmetteurs

La microglie est sensible à différents types de neurotransmetteurs libérés dans son microenvironnement. Pour cela elle exprime à sa membrane des récepteurs aux purines, au glutamate, à l'acide γ -aminobutyrique (GABA), à la noradrénaline et à la dopamine (**Figure 29**). La microglie détecte ainsi l'activité neuronale et peut, en conséquence, initier une réponse adaptée lors d'un déséquilibre observé. Ici, nous avons choisi de ne parler que de certains récepteurs, les plus étudiés et les plus représentatifs pour comprendre les mécanismes physiopathologiques détaillés dans les chapitres suivants.

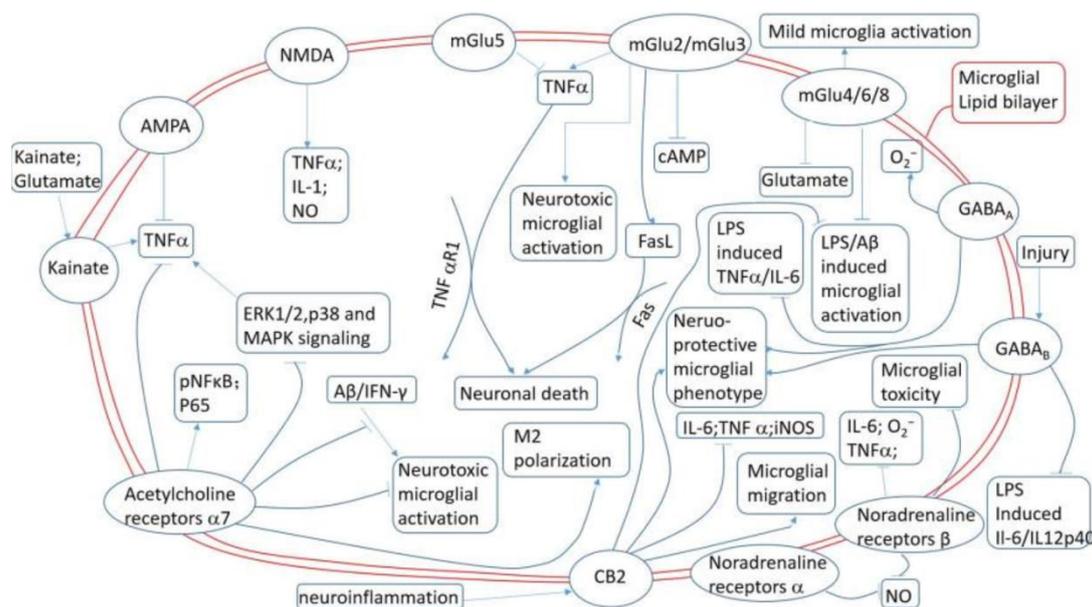


Figure 29. Voies de signalisation microgliales associées aux principaux neurotransmetteurs. Un grand nombre de neurotransmetteurs peut influencer sur l'activité microgliale via des récepteurs spécifiques. AMPA : acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique; AMPc : adénosine monophosphate cyclique; ERK : kinase régulée par le signal extracellulaire; FasL : Fas ligand; MAPK : protéine kinase activée par un mitogène; NMDA : N-méthyl-D-aspartate. D'après (Liu et Chopp, 2016).

III.3.3.1.a Récepteurs purinergiques

L'ATP est un médiateur clé de la réactivité microgliale. Il est largement impliqué dans la signalisation associée à des dommages cellulaires lors d'une lésion cérébrale et peut être

libéré par les neurones et les astrocytes. Celui-ci est rapidement transformé dans l'espace extracellulaire par une enzyme membranaire, l'ectonucléotidase qui se décline en 3 formes : l'ecto-ATPase transforme l'ATP en adénosine diphosphate (ADP), l'ecto-ATP-diphosphohydrolase transforme l'ADP en adénosine monophosphate (AMP) et enfin, l'ecto-5'-nucléotidase transforme l'AMP en adénosine. Ces différents nucléotides vont activer des récepteurs purinergiques que l'on classe en 2 catégories : les récepteurs purinergiques P2 fixent l'ATP, l'ADP et l'AMP et les récepteurs P1 lient l'adénosine. Les récepteurs P2 sont de deux types, les récepteurs P2X ionotropiques (7 isoformes) et les récepteurs P2Y métabotropiques (8 isoformes). L'activation de ces récepteurs module des fonctions majeures de la microglie telles que la phagocytose, la migration, la libération de certains facteurs et la motilité.

De tous les récepteurs métabotropiques, le récepteur P2Y₁₂, couplé à une protéine Gi/o inhibant l'adénylate cyclase et régulant l'activité des canaux ioniques est très étudié *in vivo*, il est en quelque sorte le récepteur signature de la microglie. En effet, le récepteur P2Y₁₂ est constitutivement et exclusivement exprimé par les cellules microgliales dans le cerveau (Hickman *et al.*, 2013). Il est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques et participe notamment à la motilité spontanée des processus microgliaux en condition physiologique (Davalos *et al.*, 2005) et au mécanisme de chimiotaxisme, menant ces processus vers une microrégion lésée (Haynes *et al.*, 2006). En fait, l'ATP libéré dans le milieu extracellulaire à la suite d'une lésion, constitue un signal chimio-attractant ou signal "*find me*" pour les cellules microgliales (Wu *et al.*, 2007). Ce signal peut être direct ou transiter par les astrocytes avant le recrutement des processus microgliaux (Davalos *et al.*, 2005). Les récepteurs P2Y₁₂ sont également impliqués dans la réparation de la BHE par les cellules microgliales (Lou *et al.*, 2016), dans diverses interactions physiques entre les neurones et la microglie (Eyo *et al.*, 2015) et également dans la plasticité synaptique (Sipe *et al.*, 2016). Enfin, une étude récente a montré

que les récepteurs P2Y₁₂ participeraient à la translocation des microglies au sein du parenchyme cérébral indépendamment de leur prolifération (Eyo *et al.*, 2018).

III.3.3.1.b Récepteurs glutamatergiques

Le glutamate est le neurotransmetteur excitation du SNC par excellence. La libération excitotoxique du glutamate au niveau synaptique est l'un des points clés de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. On reconnaît deux types de récepteurs glutamatergiques, les récepteurs ionotropiques NMDA, AMPA et kaïnate, et les récepteurs métabotropiques mGluR, regroupés en classe I, II et III. Certains de ces récepteurs sont exprimés par la microglie et voient leur expression modulée en fonction du contexte physiopathologique

Les récepteurs AMPA favorisent le phénotype pro-inflammatoire microglial par la mobilisation du calcium intracellulaire. Par ce mécanisme, le glutamate participe directement à la libération de facteurs microgliaux délétères dans le parenchyme cérébral, mais posséderait également un rôle chimio-attractant en contexte pathologique (Liu *et al.*, 2009). D'autre part, la présence de du récepteur NMDA au niveau microglial est toujours en débat dans la littérature (Wendt *et al.*, 2016). Une étude a par exemple montré qu'en contexte hypoxique, la microglie amiboïde chez le rat âgé d'1 jour, exprime le récepteur NMDA et que la fixation du glutamate sur ce récepteur stimule la libération de TNF- α , d'IL-1 et de NO (Murugan *et al.*, 2011).

Les cellules microgliales expriment tous les types de récepteurs métabotropiques glutamatergiques, toutefois l'action du glutamate sur les mGluR microgliaux est tantôt neuroprotecteur, tantôt neurotoxique. Par exemple, les récepteurs mGluR5 sont présents à la membrane des cellules microgliales et ont un rôle bénéfique visant à réduire l'inflammation cérébrale en diminuant la production de NO, ROS et de TNF- α (Byrnes *et al.*, 2009). A l'inverse les récepteurs mGluR2 auraient un effet délétère sur le parenchyme cérébral en accentuant les mécanismes de neurotoxicité (Pinteaux-Jones *et al.*, 2008).

III.3.3.1.c Récepteurs GABAergiques

Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur cérébral. Une nouvelle fois, pour ce neurotransmetteur, on peut différencier les récepteurs de type ionotropique perméables au chlore et responsables de l'effet inhibiteur, ce sont les récepteurs GABA_A, et les récepteurs métabotropiques, les récepteurs GABA_B qui sont retrouvés au niveau microglial. Les récepteurs GABA_B sont couplés à une protéine Gi/o. En condition physiologique, un faible nombre de cellules microgliales exprime GABA_B, qui en revanche est exprimé à près de 80 % dans une zone lésée (Kuhn *et al.*, 2004). L'activation de ce récepteur agirait comme agent neuroprotecteur en réduisant l'activité inflammatoire de la microglie et en stimulant la libération d'IL-10 et d'IL-12. Les récepteurs GABA_A sont aussi exprimés dans ces cellules. Leur activation favorise la sécrétion d'ions superoxydes et un phénotype microglial neuroprotecteur (Mead *et al.*, 2012).

III.3.3.2 Les récepteurs aux cytokines et chimiokines

Les cytokines sont des glycoprotéines produites par différents types cellulaires tels que les neurones, les astrocytes, les cellules microgliales et agissent sur un grand nombre de cellules cibles, sur lesquelles elles auront des actions variées. Les cytokines peuvent être ancrées à la membrane ou solubles dans l'espace extracellulaire. Cette ambivalence leur permet d'agir selon un mode autocrine, paracrine ou encore endocrine. Un très grand nombre de cytokines peut agir au niveau de récepteurs microgliaux. Certaines d'entre elles, à l'instar des neurotransmetteurs, auront pour effet de maintenir la microglie dans un état de surveillance, ce sont les signaux *Off*, alors que d'autres sont des signaux *On* et orientent le phénotype microglial vers un état réactif. Toutes les cytokines agissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, dont la grande majorité n'a pas d'action enzymatique propre, mais sont associés à d'autres protéines intracellulaires, menant à l'activation de voies non-transcriptionnelles ou à la modulation de

l'expression génique. Une fois de plus, seules les cytokines les plus évocatrices de l'activité microgliale sont traitées ici.

Classiquement, le TGF- β , l'IL-10, l'IL-4 l'IGF-1 (*insulin-like growth factor*) sont considérés comme des cytokines agissant comme signal *Off* sur la microglie, ce sont des signaux anti-inflammatoires. La fractalkine ou CX3CL1 appartient à la famille des chimiokines qui sont regroupés en 4 sous-familles en fonction de l'emplacement de leurs cystéines : les C, les CC, les CXC et les CX3C dont la fractalkine est l'unique représentante. En condition physiologique, le CX3CL1 est un signal *On* constitutivement exprimé par les neurones et ne présente qu'un unique récepteur, le CX3CR1, présent seulement à la membrane microgliale. La fractalkine peut être clivée par des protéases pour devenir soluble. Dans cette conformation ou lorsqu'elle est membranaire, la fractalkine et son récepteur le CX3CR1 établissent une communication neurone/microglie directe et essentielle au maintien de la physiologie cérébrale. En effet il a été montré qu'un déficit d'expression du CX3CR1 réoriente le phénotype microglial vers un phénotype pro-inflammatoire favorisant la neurotoxicité et la mort neuronale (Cardona *et al.*, 2006). Toutefois, en fonction du contexte pathologique, la fractalkine semblerait tantôt bénéfique tantôt délétère et son rôle reste encore débattu (Lauro *et al.*, 2015; Ransohoff, 2016). En effet, il a été montré dans un modèle souris de la maladie de Parkinson, que la fractalkine possède un rôle neuroprotecteur en réduisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 β (Pabon *et al.*, Bickford, 2011). A l'inverse, un défaut d'expression du récepteur CX3CR1 réduirait les dommages ischémiques liés à la mort neuronale et à l'expression de cytokines pro-inflammatoires chez la souris (Dénes *et al.*, 2008; Fumagalli *et al.*, 2013). Cette ambivalence est toujours débattue et pourrait être liée au contexte physiopathologique, à l'âge des sujets, aux types de modèles étudiés, aux caractéristiques temporelles de la maladie et à d'autres facteurs.

Les cytokines impliquées dans une réorientation de la microglie vers un statut pro-inflammatoire sont nombreuses ; on retrouve notamment l'IL-1 β , l'IL-6, l'IFN- γ et en chef de ligne, le TNF- α (Owens *et al.*, 2005). Le TNF- α est une glycoprotéine fortement impliquée dans l'inflammation cérébrale, dont la source principale est la microglie. Le TNF- α existe sous une forme soluble ou liée à la membrane. Le récepteur membranaire du TNF- α , le TNFR-1 est plus afin pour l'isoforme soluble, alors que le TNF- α membranaire se lie préférentiellement au TNFR-2. La fixation de ce médiateur sur l'un de ses récepteurs favorise la mort cellulaire par apoptose ou nécrose, ou bien, inhibe l'apoptose en stimulant la voie NF- κ B. Cette divergence des résultats observés serait liée à la différence de localisation du récepteur, qui peut être internalisé et dans ce cas la mener à la mort cellulaire, ou localisé à la membrane et favoriser la survie cellulaire. Dans un contexte pathologique, le TNF- α est très souvent surexprimé et favorise un phénotype pro-inflammatoire de la microglie associé à la libération de NO, ROS, IL-1 β et d'IL-6 (Kraft *et al.*, 2009). Dans un modèle murin de la maladie de Parkinson, une étude a mis en lumière la dualité de l'action du TNF qui pourrait également être dépendante de la région étudiée. En effet, le TNF- α possède un effet neuroprotecteur et neurotrophique dans l'hippocampe alors qu'il favorise la mort cellulaire dans le striatum (Sriram *et al.*, 2006).

III.3.3.3 Les TLR

Nous l'avons évoqué précédemment, les TLR sont des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR). Ces récepteurs ont été retrouvés chez les mammifères, de nombreux vertébrés mais aussi chez certains invertébrés et plantes. Ils constituent l'un des plus anciens composants du système immunitaire du vivant. Chez les mammifères, ils sont exprimés par les neurones, les astrocytes et la microglie qui est la seule à exprimer toutes les isoformes. Ils sont capables de reconnaître des motifs moléculaires particuliers associés à une infection pathogène, grâce aux PAMPs ou associés à une lésion tissulaire grâce aux DAMPs. Les TLR coordonnent la réponse immunitaire

dans sa globalité, dès la reconnaissance du danger, l'initiation de la réponse immunitaire, jusqu'au recrutement et l'activation des cellules associées et possèdent ainsi un rôle bénéfique nécessaire, permettant à l'organisme de lutter. Toutefois, ces récepteurs favorisent en parallèle la libération de molécules pro-inflammatoires, la mise en place et la maintenance de l'inflammation, ce qui empêche la résolution de celle-ci. On retrouve les TLR parfois localisés au niveau membranaire pour la reconnaissance des motifs moléculaires particuliers, à ce niveau ils peuvent s'hétérodimériser pour élargir leur spectre de reconnaissance, soit internalisés au niveau des endozomes où ils reconnaissent les acides nucléiques viraux et bactériens. Comme nous l'avons évoqué précédemment, le LPS, ligand du récepteur TLR-4, est très largement utilisé dans la littérature pour étudier la fonction microgliale (Chakravarty et Herkenham, 2005; Qin *et al.*, 2005). La stimulation du récepteur TLR-4 par le LPS initie une puissante réponse immunitaire au sein du parenchyme cérébral qui se caractérise par l'induction de la phagocytose, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, d'iNOS neurotoxique et l'expression de molécules stimulant le stress oxydatif par les cellules microgliales (Lu *et al.*, 2008).

III.3.3.4 Les récepteurs aux immunoglobulines

Lors d'un examen biologique sanguin, la partie sérique peut être séparée par électrophorèse en 2 types de protéines réparties en 5 fractions protéiques. On retrouvera la famille des albumines qui est prédominante et la famille des globulines, qui comprend les α -1-globulines, les protéines α -2-globulines, les β -globulines et les γ -globulines aussi appelées immunoglobulines. Les immunoglobulines sont une famille de glycoprotéines sériques membranaires ou solubles, impliquées dans des mécanismes immunitaires, de reconnaissance, de liaison et d'adhésion cellulaire et possédant une activité anticorps. De façon surprenante, il a été montré que les lymphocytes n'étaient pas les seules cellules capables de synthétiser des immunoglobulines mais que d'autres types cellulaires, comme les neurones en étaient capables

(Huang *et al.*, 2008). Les immunoglobulines sont impliquées dans la modulation du phénotype microglial et possèdent des effets variés. Le complexe formé par la protéine membranaire CD200 exprimée par les neurones et son récepteur microglial, le CD200R, favorise le phénotype de surveillance de la microglie (**Figure 30**). Un déficit d'expression du CD200 initie l'apparition du phénotype pro-inflammatoire microglial (Hoek *et al.*, 2000). Le CD47 est une immunoglobuline transmembranaire exprimée par les neurones, les astrocytes et les cellules endothéliales de façon ubiquitaire dans le cerveau. Le CD47 interagit avec le SIRP- α (*signal regulatory protein- α*) majoritairement exprimé par les cellules myéloïdes, incluant les cellules microgliales. L'interaction entre ces deux protéines génère un signal anti-phagocytaire "*do not eat me*", de la cellule exprimant le CD47 à la microglie (Kierdorf et Prinz, 2013). Enfin, la famille des glycoprotéines TREM (*triggering receptor expressed on myeloid cells*) est également impliquée dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. La fixation de l'immunoglobuline TREM2-L, exprimée par les cellules apoptotiques, à son récepteur microglial TREM2 permet la phagocytose et ainsi l'élimination des cellules en apoptose et des débris cellulaires associés (Hsieh *et al.*, 2009). Dans certaines pathologies, TREM2 est surexprimé et exacerbe la réponse inflammatoire aggravant la pathologie (Piccio *et al.*, 2007).

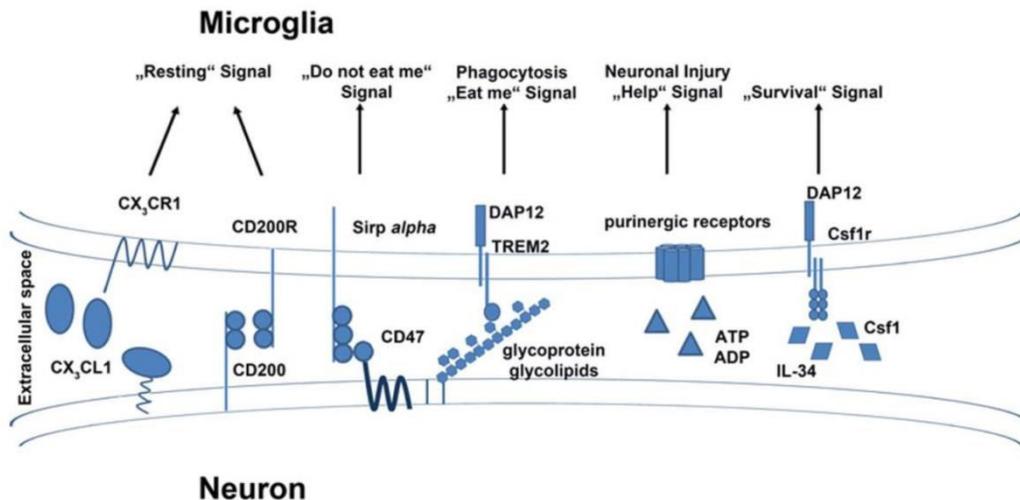


Figure 30. Communication neurone-microglie et complexes protéiques associés. *La communication neurone-microglie est permise par la complémentarité d'une multitude de complexes ligand-récepteur présents à la surface membranaire ou libérés par les neurones. L'activation de ces complexes en condition physiologique ou pathologique déclenche des cascades intracellulaires spécifiques et adaptées à un contexte donné. Le CX₃CL1, le CD200 le CD47 sont constitutivement présents à la surface des neurones sains, ce sont les signaux Off. D'autres signaux, comme ceux reçus par le récepteur TREM2 et les récepteurs purinergiques par exemple, sont essentiels pour alerter la microglie d'une lésion neuronale, ce sont des signaux On. Les neurones libèrent également des facteurs nécessaires à la survie et à la prolifération des cellules microgliales, c'est le cas de l'IL-34 et Csf1 qui se lie à leur récepteur membranaire microglial Csf1r. D'après (Kierdorf et Prinz, 2013).*

Après avoir détaillé les différents signaux qui peuvent influencer le phénotype microglial, nous verrons quelles sont les fonctions associées à la microglie. Nous nous focaliserons sur les fonctions associées à la microglie mature. Toutefois, il faut savoir que de nombreuses autres fonctions sont associées à la microglie tout au long du développement embryonnaire (pour revue voir (Nayak *et al.*, 2014)).

III.3.4 Quels sont les fonctions microgliales dans le SNC adulte en condition physiologique ?

III.3.4.1 Modulation de l'activité synaptique

Nous avons vu dans un précédent chapitre que dans le SNC adulte normal, les cellules microgliales ont une morphologie complexe avec des processus hautement ramifiés, qui s'étendent à partir d'un corps cellulaire de petite taille. Ces prolongements microgliaux balayent en continu l'environnement et ont ainsi une fonction de surveillance du parenchyme cérébral et de vérification du bon fonctionnement cellulaire. Les processus microgliaux créent notamment des contacts physiques transitoires avec les neurones (Tremblay *et al.*, 2010). Au cours d'enregistrements réalisés *in vivo*, Wake et ses collaborateurs ont révélé que les prolongements microgliaux, dans leur rôle de surveillance, contactent des synapses au niveau desquelles, ils effectuent de brèves pauses (environ 5 minutes) à la fréquence d'une connexion par heure. Ces contacts sont dépendants de l'activité neuronale, qui lorsqu'elle est réduite, diminue la fréquence de scanning d'un neurone par une microglie. Cependant, lorsque la connexion est plus longue et s'étend au-delà d'une heure, très souvent l'épine dendritique disparaît (Wake *et al.*, 2009) (**Figure 31**). Cela démontre que la microglie peut prendre une position stratégique pour suivre de près l'activité neuronale et synaptique, pour finalement remodeler l'arbre dendritique et ainsi agir sur la plasticité synaptique. Cette activité est rendue possible notamment parce que les cellules microgliales expriment de nombreux récepteurs aux neurotransmetteurs et médiateurs libérés par les neurones (Liu *et al.*, 2016). La communication neurone-microglie n'est pas unidirectionnelle mais bien à double sens puisque la microglie est capable de répondre activement à ces interactions cellulaires. En effet, chez le poisson-zèbre, il a été montré que les cellules microgliales ont la propriété de diminuer la transmission neuronale. Leurs processus peuvent envelopper le soma des neurones à haute activité et influencer leur dynamique d'une façon d'autant plus forte que la connexion physique intercellulaire est longue

(Li *et al.*, 2012). Ces différentes études illustrent très bien que la microglie n'est pas dormante, que le terme "*resting microglia*", largement employé dans la littérature, n'illustre pas du tout la grande dynamique de ces cellules dans leur phénotype de surveillance. Elles ont en effet la capacité de surveillance et de contrôle de l'activité neuronale, même dans le cerveau sain.

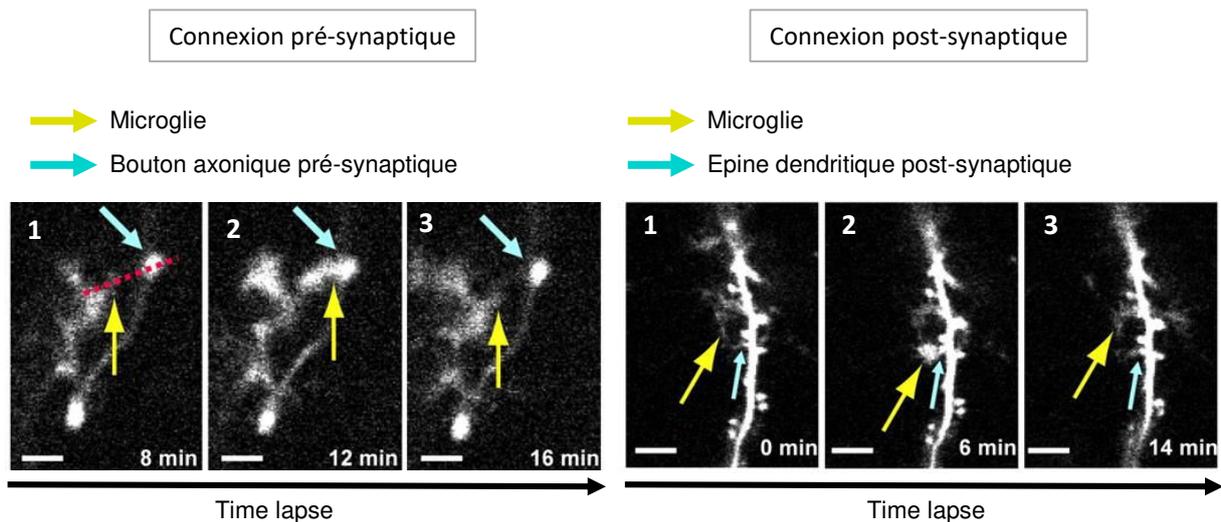


Figure 31. Les cellules microgliales établissent des contacts physiques transitoires au niveau pré- et post-synaptique. *Les processus microgliaux (flèches jaunes) contactent les boutons axoniques pré-synaptiques (panel de gauche, flèches bleues) et les épines dendritiques post-synaptiques (panel de droite, flèches bleues). Les panels 1, 2 et 3 ont été respectivement acquis avant, pendant et après le contact de la microglie avec la structure synaptique. On peut noter que l'extrémité du processus microglial est plus large pendant le contact synaptique. Images acquises en microscopie biphotonique in vivo. Barre d'échelle : -pré 2 μm , -post 4 μm . D'après (Wake *et al.*, 2009).*

III.3.4.2 La microglie et la neurogenèse

Le potentiel neurogénique cérébral est progressivement restreint au courant de la vie d'un individu. De plus en plus d'études mettent en évidence un rôle important de la microglie dans la neurogenèse adulte au niveau de deux zones neurogéniques, la zone sous-granulaire du gyrus denté et la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux (Sato, 2015). Ces niches sont constituées de cellules multipotentes à forte capacité proliférative et pouvant donner des neurones et des astrocytes (Bergmann *et al.*, 2015). Un faible nombre de cellules nouvellement

formées pourra survivre et ensuite intégrer et persister dans un réseau neuronal préexistant. Les cellules microgliales seraient capables de réguler négativement et positivement la neurogenèse adulte en libérant différents types de facteurs solubles. Par exemple, le vieillissement altérerait la formation de nouveaux neurones, notamment via la stimulation d'un phénotype inflammatoire microglial et la libération de cytokines pro-inflammatoires associées, telles que l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6 (Dilger et Johnson, 2008). A l'inverse, l'augmentation de l'expression d'IGF-1 anti-inflammatoire par les cellules microgliales améliore la survie des nouveaux neurones (Kohman *et al.*, 2012). Les neurones qui ne s'intégreraient pas au réseau neuronal meurent par apoptose. Il a également été montré que les cellules microgliales permettent une élimination des cellules apoptotiques par phagocytose (Sierra *et al.*, 2010). Cette élimination des corps apoptotiques est essentielle pour préserver la survie des autres neurones encore immatures. Enfin, d'autres études ont souligné le rôle des cellules microgliales dans la migration et la différenciation des neurones nouvellement produits. Ces fonctions s'appuieraient notamment sur une signalisation par le CX3CR1, le TGF- β et l'IL-4 (Kohman et Rhodes, 2013; Maggi *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2011).

III.3.4.3 Plasticité synaptique et LTP

La plasticité synaptique est définie comme la capacité, au sein d'un réseau neuronal, de modulation et de persistance de l'efficacité d'une synapse. Ce mécanisme est fondamental à l'apprentissage et à la mémorisation, deux processus qui entraînent des modifications durables de l'efficacité de certaines synapses. Il a d'ailleurs été montré que l'inhibition de la plasticité synaptique lors d'un apprentissage, altère la mémoire de cet événement. La plasticité neuronale peut se manifester par une réduction de l'efficacité synaptique, notamment lorsque l'activité électrique entre l'élément pré- et post-synaptique est asynchrone. Dans ce cas on parle de dépression à long-terme ou LTD. A l'inverse, la potentialisation à long-terme ou LTP, correspond au renforcement d'une connexion synaptique dont les éléments pré- et post-

synaptiques sont synchronisés. Plusieurs études suggèrent que l'apprentissage et la mémoire seraient dépendants de la prolifération et du développement de nouveaux neurones et donc de la neurogenèse hippocampique. Nous l'avons évoqué précédemment, de nombreuses études ont mis en lumière la microglie en tant que régulateur critique dans la neurogenèse, mais elle est également impliquée dans la plasticité synaptique (Koeglsperger *et al.*, 2013; Rogers *et al.*, 2011) et dans les processus de mémorisation et d'apprentissage (Parkhurst *et al.*, 2013; Tremblay et Majewska, 2011). Pour comprendre quel est le rôle de la microglie dans la régulation de la plasticité synaptique, plusieurs équipes de recherche se sont basées sur l'utilisation de différents modèles de souris transgéniques. Une étude réalisée par Rogers en 2011, a montré que la perte d'expression du CX3CR1 dans un modèle de souris transgénique altère le processus de LTP. Ces souris ont également des déficits importants d'apprentissage et de mémorisation et présentent également un défaut de la neurogenèse (Rogers *et al.*, 2011). D'autres études montrent que la libération d'IL-1 β pro-inflammatoire par la microglie et la perte d'expression du TGF- β , aurait un impact néfaste sur le processus de LTP (Koeglsperger *et al.*, 2013; Lynch, 2015). Grâce aux outils d'imagerie *in vivo*, de nombreuses études ont pu s'intéresser à la dynamique de formation et de disparition des épines dendritiques de façon extrêmement précise. Dans l'une d'elles, il a été montré chez la souris que la déplétion spécifique des cellules microgliales provoque une réduction du *turn-over* de ces épines normalement stimulées par l'apprentissage moteur. (Butovsky *et al.*, 2014). De façon surprenante, la majorité des effets de la microglie sur l'apprentissage et la plasticité synaptique serait régulée par une unique protéine, le BDNF (Parkhurst *et al.*, 2013). Cette neurotrophine libérée par les cellules microgliales est connue pour moduler la plasticité synaptique. L'inhibition de la production de BDNF spécifiquement par la microglie altère le conditionnement à la peur, l'apprentissage moteur et la formation d'épines dendritiques associée. Dans ce modèle, les auteurs n'ont pas observé de modification morphologique, de

nombre, de distribution microgliale, ni de modification du taux d'association entre les processus microgliaux et les épines dendritiques. De plus, bien que d'autres types cellulaires libèrent également du BDNF en grande quantité, cela ne semble pas compenser la perte venant de la microglie. L'une des hypothèses est que la microglie régulerait la plasticité synaptique par libération très localisée de BDNF au niveau d'une synapse et précisément lorsque c'est nécessaire.

Dans cette partie nous venons de voir quelles sont les fonctions de la microglie en contexte physiologique dans le cerveau mature. Dans le chapitre suivant, nous verrons quelles sont les méthodes d'étude de ces cellules et plus globalement quelles sont les techniques permettant l'analyse de la neuroinflammation *in vivo et ex vivo*.

III.3.5 Méthodes d'étude de la neuroinflammation

La neuroinflammation est le processus complexe chargé de la défense du SNC et de la réparation tissulaire. Elle se caractérise par un enchaînement de réactions cellulaires et vasculaires qui servent à éliminer les lésions et à générer de nouveaux tissus. Pour chaque nouvel épisode neuroinflammatoire ayant une origine différente, la cascade initiée est inédite et adaptée au contexte pathologique, elle peut comprendre une perméabilisation des microvaisseaux, l'adhésion vasculaire de cellules circulantes au voisinage du site de lésion et menant parfois à leur infiltration dans le parenchyme cérébral. Elle se caractérise toujours par une réactivité gliale (microglie et astrocytes) associée à la libération accrue d'un cocktail de facteurs inflammatoires.

Chez le rongeur, de nombreuses techniques permettent l'étude de la neuroinflammation en ciblant les différents événements cités ci-dessus.

La réactivité gliale est un mécanisme majeur de la neuroinflammation qui est souvent analysée en microscopie à fluorescence sur coupe de cerveau. Des modifications morphologiques, de la densité cellulaire et/ou de l'expression de certaines protéines spécifiques du contexte inflammatoire (CD68, CD11b, CMH-II, CD86) (Möller *et al.*, 2014; Toth *et al.*, 2013) peuvent être révélées par immunohistochimie. Les cellules microgliales et astrocytaires peuvent également être visualisées *in vivo* en imagerie biphotonique. Cette technologie, qui sera détaillée dans un chapitre spécifique (*cf.* section Méthodologie), permet l'analyse morphologique et fonctionnelle en 3D, avec une grande résolution spatio-temporelle. Pour ce type d'analyse, la souche transgénique CX3CR1, exprimant la protéine fluorescente eGFP sous le contrôle du promoteur du gène codant le CX3CR1 est très répandue pour visualiser la microglie (Sipe *et al.*, 2016). Les cellules astrocytaires, quant à elles, sont très souvent marquées par l'utilisation du SR101 (sulforhodamine101) appliqué directement à la surface du cortex (Nimmerjahn *et al.*, 2004). Ainsi, une modification de la motilité spontanée de la microglie pourrait être révélatrice d'un contexte inflammatoire. L'un des mécanismes clés de l'établissement de l'inflammation est la libération de facteurs pro-inflammatoires qui peut être analysée par PCR quantitative (réaction en chaîne par polymérase quantitative). L'IL1- β , IL-6, le TNF- α et l'iNOS sont les marqueurs de référence d'un environnement inflammatoire dans le parenchyme cérébral (Shen *et al.*, 2015). Ces marqueurs peuvent également être utilisés pour l'analyse de la population cellulaire cérébrale par cytométrie en flux et par exemple connaître la proportion de microglies M2 par rapport au phénotype M1 (Crain *et al.*, 2013). L'augmentation de la perméabilité vasculaire peut être analysée par l'injection intra-vasculaire d'un traceur suffisamment gros pour ne pas passer la BHE si celle-ci est intacte. Cette technique peut être réalisée par injection de gadolinium ou d'un marqueur fluorescent et l'extravasation du marqueur peut être ensuite visualisée *in vivo*, respectivement en imagerie par résonance magnétique (IRM) (Ding *et al.*, 2014), ou en microscopie biphotonique en temps réel et en

microscopie à fluorescence sur coupe de cerveau (Biancardi *et al.*, 2014). La présence de marquage en dehors du compartiment vasculaire traduit l'altération de la BHE. L'agent de contraste peut être associé à des dextrans de différents poids moléculaires, ce qui permet d'analyser finement la gravité des dommages. Enfin, la présence de molécules d'adhésion au niveau du compartiment vasculaire, telle que p-sélectine, traduit un recrutement de cellules immunitaires périphériques au sein du parenchyme cérébral et donc un état neuro-inflammatoire. Ces protéines peuvent être visualisées en immunohistochimie ou en IRM en utilisant des particules de fer couplées à des anticorps (Fournier *et al.*, 2017).

Dans notre étude, nous avons utilisé l'imagerie biphotonique intravitale très pertinente pour l'analyse de la morphologie et du fonctionnement microglial, en nous intéressant à l'impact de l'HTA sur l'état inflammatoire du cerveau. Nous nous sommes focalisés sur l'analyse de la microglie au niveau du cortex cérébral, souvent affecté lors d'un AVC. L'objectif étant de comprendre comment l'HTA, facteur aggravant de l'AVC, affecte le cerveau avant la survenue de cette pathologie, qui fait d'ailleurs l'objet du prochain chapitre.

IV L'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE

IV.1 Définition, épidémiologie et facteurs de risque

L'AVC ou Accident Vasculaire Cérébral, résulte de l'interruption de tout ou part de l'irrigation sanguine cérébrale. Le terme AVC correspond à différentes pathologies neurovasculaires distinctes.

L'AVC ischémique représente 80 % des cas d'AVC et correspond à l'arrêt de la perfusion cérébrale artérielle. Il peut être global, lors d'un arrêt cardiaque, ou focal. L'AVC ischémique focal peut correspondre à l'occlusion ou à la sténose d'une ou de plusieurs artères cérébrales ou artères à destination du cerveau (carotides ou artères vertébrales). Ce type d'AVC, fera l'objet des travaux présentés dans cette thèse. Une ischémie focale peut être provoquée par l'occlusion d'une artère par un thrombus formé en périphérie au niveau d'une plaque d'athérome. Ce thrombus, alors qu'il occlue le vaisseau dans lequel il s'est formé, va pouvoir se détacher de la plaque d'athérome et migrer vers le cerveau où il pourra boucher une artère de diamètre inférieur. L'occlusion peut également venir d'un caillot sanguin formé en périphérie. Dans ces deux derniers cas, on parlera d'occlusion embolique. Les AVC ischémiques de type embolique sont très fréquents. Le tissu cérébral, alors privé d'apport en substrats énergétique et en oxygène, évolue vers la mort de façon dépendante de la durée et de la sévérité de l'occlusion. En ce sens, on distinguera les AVC ischémiques transitoires, des AVC ischémiques constitutifs (ou infarctus cérébraux), pour lesquels les lésions cérébrales sont plus importantes (**Figure 32**).

L'AVC hémorragique, quant à lui, représente environ 20 % des cas, il est consécutif à la rupture d'un vaisseau cérébral. On distingue deux types d'AVC hémorragiques, les hémorragies sous-arachnoïdiennes, aussi appelées hémorragies méningées, principalement

causées par une rupture d'anévrisme et les hémorragies intra-parenchymateuses, souvent retrouvées dans l'HTA et majoritairement localisées dans les noyaux gris centraux. Ces deux types d'AVC vont rapidement mener à la formation d'un œdème et à l'augmentation de la pression intracrânienne, souvent responsable de la mort des patients.

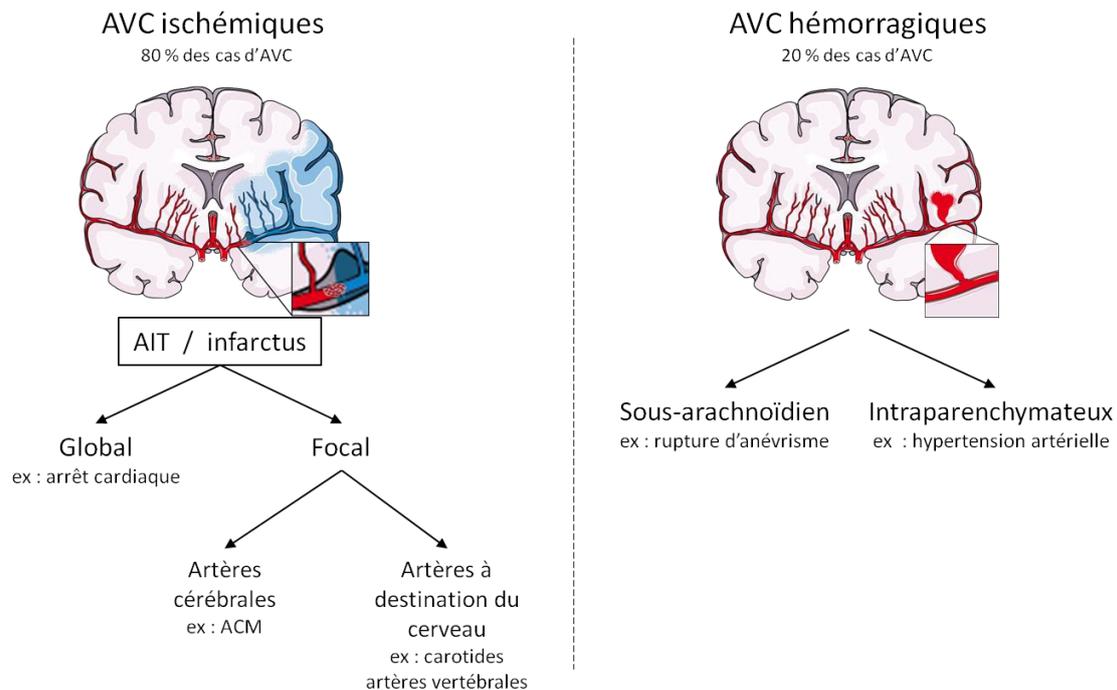


Figure 32. Représentation schématique des différents types d'AVC et leurs principales causes. Un AVC peut être de 2 types : ischémique, le plus commun, ou hémorragique. L'AVC ischémique correspond à l'arrêt de la perfusion de tout ou part du cerveau (zone bleu). L'AVC hémorragique correspond à la rupture d'un vaisseau cérébral, menant à une hémorragie. ACM : artère cérébrale moyenne, AIT : AVC ischémique transitoire.

Très souvent, un AVC se manifeste soudainement par des déficits neurologiques centraux moteurs et/ou sensoriels. Les plus couramment observés sont : (i) la paralysie d'une moitié latérale du corps, elle peut être partielle, on parle alors d'hémiplésie, ou totale, c'est l'hémiplégie ; (ii) une hémiparésie, caractérisée par un déficit de perception unilatéral ; (iii) une aphasia sensitivo-motrice ; (iv) un trouble de l'équilibre ; (v) un trouble visuel ; (vi) des maux de têtes. Suite à un AVC, 1 personne sur 5 décède dans le mois suivant, parmi les survivants, 3 personnes sur 4 garderont des séquelles définitives, 1/3 deviendra dépendant, 1/4

ne reprendra jamais d'activité professionnelle et 1 patient sur 4 présentera des troubles dépressifs. Ainsi, l'AVC est un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés. Dans le monde, il représente la deuxième cause de mortalité, avec 16 millions de nouveaux cas par an responsables de plus de 6 millions de décès. En France, ça n'est pas moins de 150 000 nouveaux cas chaque année, soit un AVC toutes les 4 minutes.

De nombreux facteurs de risques interviennent dans la survenue de l'AVC. Certains d'entre eux sont non-modifiables et intrinsèques à l'individu, tandis que d'autres sont modifiables et liés au comportement de l'individu. L'AVC touche majoritairement les personnes âgées. L'âge est en effet un facteur critique puisque le risque d'AVC double pour chaque décennie passé 55 ans. Toutefois, 25 % des patients atteints ont moins de 65 ans et sont donc en âge de travailler. Bien que le nombre de cas soit supérieur chez la femme, due à une espérance de vie plus importante, les hommes sont les plus à risque de développer un AVC. Le facteur génétique, et donc les antécédents familiaux sont à prendre en compte dans la prédiction du risque de survenue d'un AVC (Hassan et Markus, 2000). D'autre part, les populations africaines et hispaniques sont plus à risque que la population caucasienne, les différences hygiéno-socio-économiques sont à prendre en considération pour expliquer ces observations.

Nous l'avons évoqué précédemment, le premier facteur de risque de la survenue d'un AVC est la présence d'une HTA. En effet, plus la PA est élevée, plus le risque d'AVC est important, et ce, quelle que soit la tranche d'âge étudiée (voir Figure 3 précédemment présentée) (Lewington *et al.*, 2002). Le diabète et les cardiopathies constituent également des facteurs de risque non négligeables. Enfin, la consommation tabagique, la consommation d'alcool, la sédentarité, la prise de contraception orale et une surcharge pondérale sont autant de facteurs augmentant la prévalence de l'AVC que de facteurs de risques modifiables.

Dans cette partie, nous avons vu qu'il existe différents types d'AVC et que l'AVC de type ischémique est majoritaire par rapport à l'AVC hémorragique. Pour aller plus loin, dans la section suivante nous abordons brièvement quels sont les mécanismes principaux de la physiopathologie de l'AVC ischémique auquel nous nous sommes intéressés dans ce travail de thèse.

IV.2 Physiopathologie de l'AVC

Précédemment, nous avons vu que le processus d'autorégulation cérébral permet de maintenir constant le DSC pour des valeurs de PA qui oscillent entre 50 et 150 mmHg en condition physiologique (Paulson *et al.*, 1990). Ces deux valeurs d'encadrement peuvent varier sous différentes conditions, comme lors d'une HTA où la courbe d'autorégulation est décalée vers la droite (Traon *et al.*, 2002). En conditions ischémiques, la pression de perfusion cérébrale passe au-dessous du seuil d'autorégulation et le DSC chute. Il existe un second mécanisme permettant de palier à une éventuelle chute de pression de perfusion. L'anatomie vasculaire cérébrale est composée de trois anastomoses qui servent de suppléance pour la circulation en aval d'un vaisseau bouché ou rompu. On distinguera les anastomoses extra-intracrâniennes, le polygone de Willis et les anastomoses terminales, localisées au niveau cortical (Winship, 2015). Lorsque les mécanismes d'autorégulation et le réseau anastomotique ne permettent pas de compenser la chute de débit, le tissu est en souffrance. Dans cette région, la chute de DSC va déterminer un gradient selon lequel on pourra définir 3 régions : le corps ischémique (où la chute de débit est la plus importante), la pénombre ischémique et la zone d'oligémie. Dans le foyer ischémique, le DSC, le volume sanguin, le taux d'extraction de l'O₂ et la consommation d'O₂ s'effondrent. La chute de débit est telle qu'on considère que 3 minutes après le début de l'ischémie, la mort cellulaire est importante et les dégâts sont irréversibles. Dans la zone de pénombre, le DSC chute en dessous du seuil électrique, ce qui signifie que l'activité électrique

neuronal cesse. Dans cette zone hypoxique, les cellules maintiennent toutefois un gradient ionique membranaire leur permettant de survivre pendant un certain temps. Dans la zone d'oligémie, des mécanismes adaptatifs permettent d'augmenter la fraction d'extraction de l'oxygène lorsque l'apport d'oxygène est réduit, permettant ainsi de maintenir le métabolisme cérébral de l'oxygène. Cette région n'est donc pas en danger (Marchal *et al.*, 1993) (**Figure 33**). Puisque le corps ischémique est de toute façon condamné et que la zone d'oligémie n'est pas en danger, c'est la zone de pénombre qui est majoritairement étudiée pour la mise au point d'une stratégie thérapeutique.

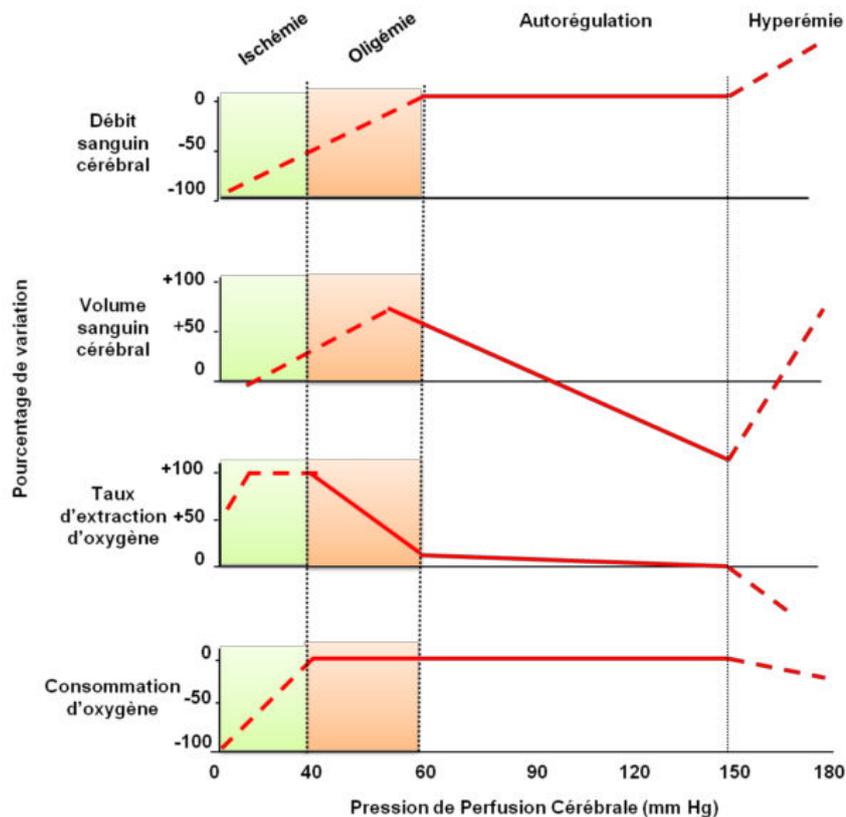


Figure 33. Évolution schématique du débit sanguin cérébral, du volume sanguin cérébral, du taux d'extraction d'oxygène et de la consommation d'oxygène en fonction de la pression de perfusion cérébrale. *En dessous du seuil d'autorégulation, la vasoconstriction ne permet plus de compenser la chute de pression. Vont se dessiner deux zones imaginaires correspondant à l'oligémie pour laquelle la forte extraction d'oxygène permet de maintenir une consommation d'oxygène nécessaire à la survie neuronale à l'inverse de la zone d'ischémie. D'après (Powers, 1991).*

Nous venons de voir que la chute de débit sanguin cérébrale définit trois régions distinctes. Dans le prochain chapitre nous aborderons brièvement quels sont les mécanismes de mort neuronale associés, en nous focalisant sur la zone de pénombre ischémique.

IV.2.1 La pénombre ischémique et la notion de cascade excitotoxique

La pénombre ischémique n'est pas irréversiblement atteinte. Alors que le foyer ischémique se définit par un DSC inférieur à 10 ml/100g/min contre 50 ml/100g/min dans une zone saine, le DSC de la pénombre ischémique est compris entre 12 et 22 ml/100g/min (Moustafa et Baron, 2008). À ces valeurs, le DSC est suffisamment bas pour provoquer une hypoxie locale, ainsi qu'une extinction de la transmission synaptique provoquant un arrêt de l'activité électrique (Astrup *et al.*, 1977) (**Figure 34**). Il faut garder en tête que le niveau de DSC associé à chaque zone conditionne les mécanismes qui rentrent en jeu dans ces différentes zones, mais que de façon interdépendante, la zone ischémique, la pénombre, la zone d'oligémie et le tissu sain vont ensuite s'influencer mutuellement.

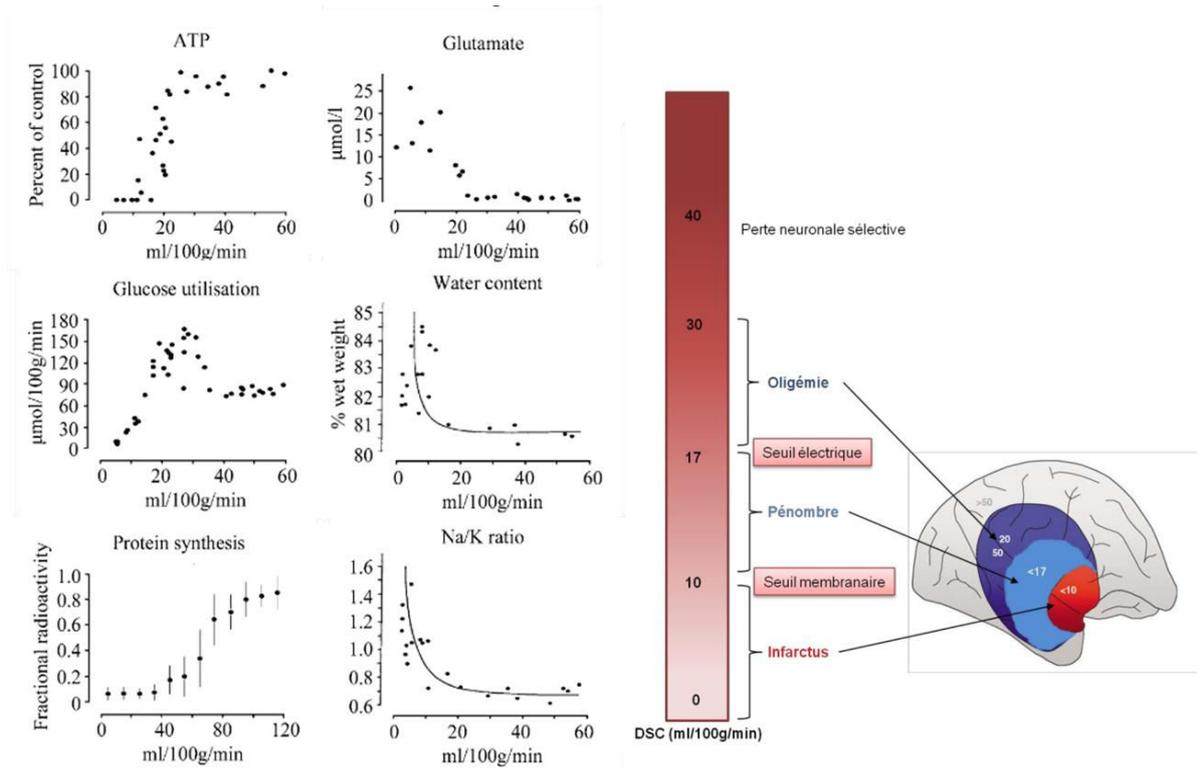


Figure 34. Illustration des caractéristiques tissulaires associées aux variations de débit sanguin cérébral après un AVC. Après un AVC, on distingue le tissu sain, le tissu oligémique, la pénombre ischémique et le foyer ischémique. L'état de ces tissus est directement dépendant du débit sanguin cérébral. La pénombre entoure le tissu nécrosé ; elle souffre de dérèglements importants et n'est pas encore infarctée mais peut le devenir. La zone d'oligémie est peu atteinte et ne progressera pas vers l'infarctus. Modifiée d'après (Hossmann, 2006; Moustafa et Baron, 2008; Murphy *et al.*, 2006).

Les mécanismes cellulaires initiés par l'arrêt de l'apport sanguin sont nombreux et très dynamiques, on parle de cascade ischémique. Dans un premier temps, dans les quelques minutes qui suivent l'ischémie, des vagues de dépolarisations envahissantes vont provoquer un phénomène d'excitotoxicité ainsi que du stress oxydatif. Les réponses inflammatoires et vasculaires vont ensuite se mettre en place. Des phénomènes œdémateux de type cytotoxique puis vasogénique vont précéder l'apoptose dans les jours suivants l'AVC. Enfin, dans les

semaines et mois après la survenue de l'événement ischémique, la plasticité cérébrale permet une récupération fonctionnelle partielle du tissu lésé (**Figure 35**).

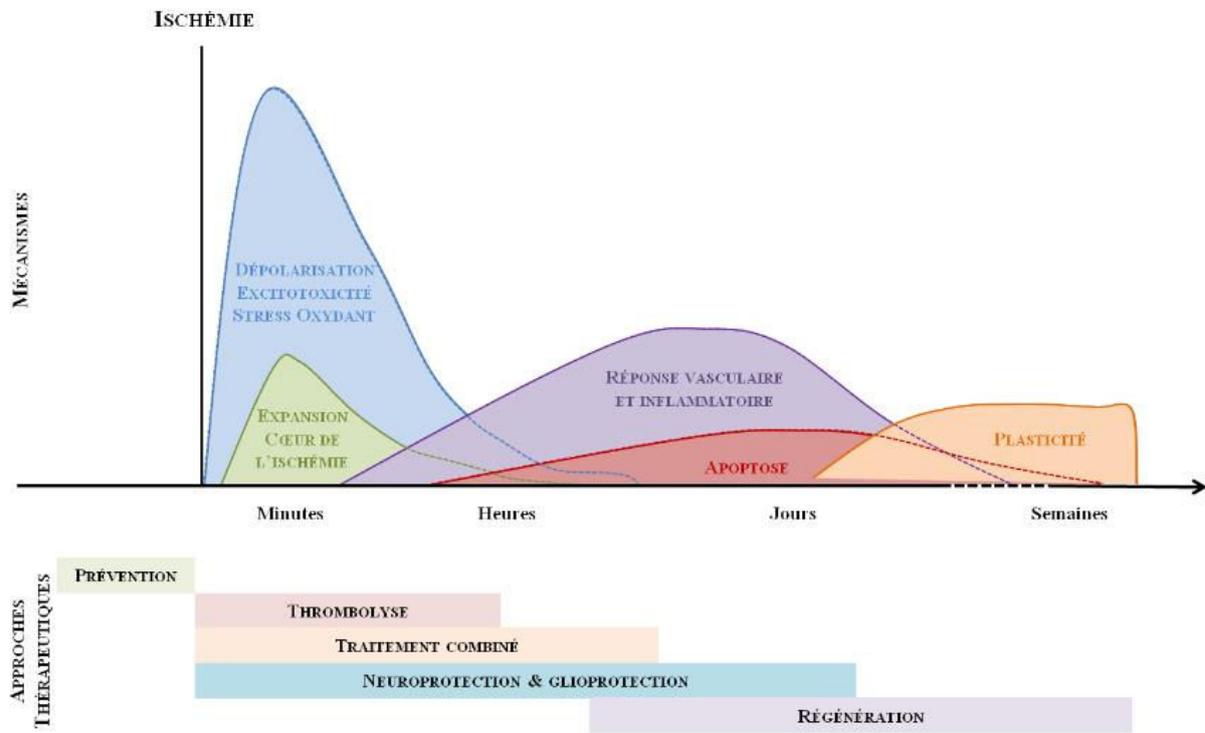


Figure 35. Cinétique des mécanismes physiopathologiques de l'ischémie cérébrale et principales approches thérapeutiques développées. Dans une phase aiguë de l'ischémie, la première stratégie envisagée est la reperfusion tissulaire par l'utilisation d'un traitement thrombolytique, permettant de limiter l'expansion du core ischémique et les dommages excitotoxiques et oxydatifs. Ce traitement, est le seul qui soit présent et qui ai fait ses preuves en clinique. Les stratégies thérapeutiques envisagées sont ensuite des traitements combinés, de neuroprotection et de glioprotection visant à réduire la mort neuronale, l'inflammation et empêchant le vasospasme post-ischémique dans les heures et jours qui suivent l'AVC. Dans une phase plus tardive (semaines, mois), la régénération tissulaire tend à être améliorée par des stratégies de stimulation de la neurogenèse, de l'angiogenèse, par l'utilisation de facteurs de croissance et par l'inhibition de la cicatrice gliale. Modifiée d'après (Zaleska et al., 2009).

Bien que le cerveau représente ~2 % de la masse corporelle chez l'Homme, sa dépense énergétique avoisine les 20 % de la consommation totale du corps. Le maintien du potentiel

membranaire neuronal à l'état de repos par l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase représente plus de 50 % de la consommation cérébrale d'ATP (Attwell et Laughlin, 2001). Étonnamment les réserves énergétiques du cerveau sont quasiment inexistantes et l'activité électrique neuronale est complètement dépendante de l'apport sanguin systémique, rendant l'encéphale vulnérable en cas d'ischémie. En effet, au stade aigu de l'ischémie, la réduction drastique de l'apport en oxygène et en glucose limite la production d'ATP, empêchant le fonctionnement de la pompe Na^+/K^+ . S'en suit un déséquilibre ionique cellulaire, qui se traduit par une accumulation de K^+ dans le compartiment extracellulaire et de Na^+ et de Ca^{2+} dans l'espace intracellulaire (Lai *et al.*, 2014) (**Figure 36**). La voie anaérobie est alors favorisée pour la production énergétique d'urgence, conduisant alors à la production de lactate et à une acidose. L'accumulation de charges positives à l'extérieur de la cellule dépolarise le neurone et conduit à la libération massive de glutamate, principal neurotransmetteur excitateur. La recapture du glutamate est effectuée par des pompes spécifiques dont le fonctionnement est dépendant du gradient ionique. En condition d'ischémie, ce gradient étant déséquilibré, les pompes permettant la recapture du glutamate peuvent s'inverser et ainsi provoquer une accumulation de glutamate au niveau synaptique. S'en suit une activation des récepteurs glutamatergiques ionotropiques ; AMPA et NMDA et métabotropiques, mGlu. L'activation des récepteurs AMPA, perméables aux ions potassiques et sodiques, provoque l'ouverture des canaux ioniques et ainsi l'entrée de sodium et d'eau dans le neurone. Le gonflement des cellules provoqué par l'influx d'eau est appelé œdème cytotoxique et peut mener à l'éclatement du neurone (Rosand et Schwamm, 2001; Rosenberg, 1999). Les récepteurs NMDA vont laisser entrer une quantité massive d'ions calciques. En parallèle, l'activation des récepteurs métabotropique catalyse la formation de diacylglycérol et d'inositol triphosphate. La liaison de l' IP_3 à son récepteur présent au niveau du réticulum endoplasmique provoque une dérégulation de l'expression génique, ainsi qu'une importante libération de calcium du réticulum vers le cytoplasme. L'accumulation

du calcium intracellulaire provoquée par la stimulation des récepteurs NMDA et mGluR aboutit à des dysfonctionnements mitochondriaux (Siesjö *et al.*, 1999), la synthèse de radicaux libres menant à l'induction de dommages à l'ADN et de mécanismes inflammatoires, à l'activation d'enzymes de dégradation cellulaire calcium-dépendantes de type lipase, protéase, endonucléase, fragilisant peu à peu la structure et la fonction cellulaire et conduisant à la mort de la cellule (Eliasson *et al.*, 1999; Green et Kroemer, 2004; Paschen, 2003).

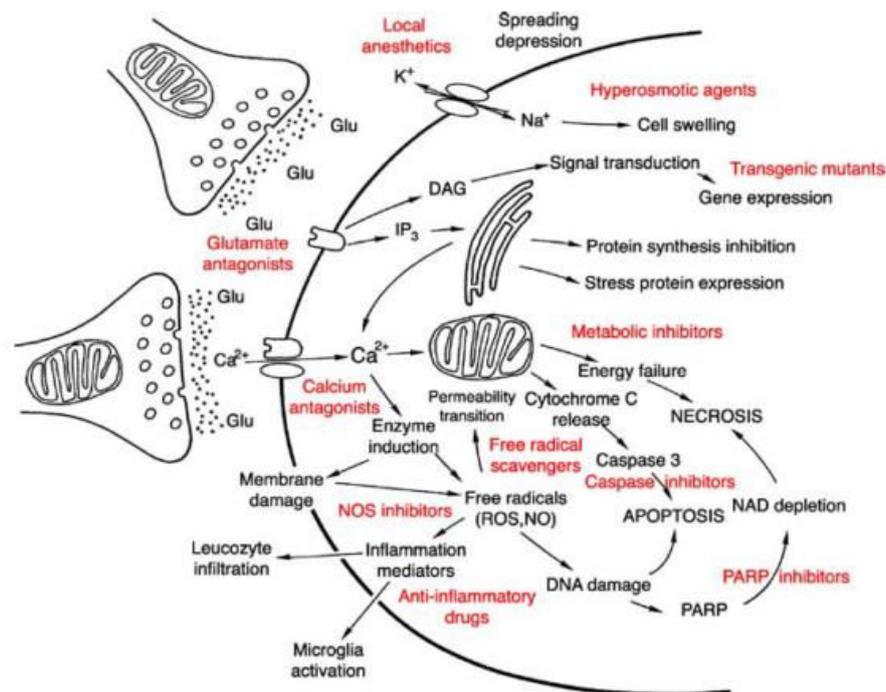


Figure 36. Schéma représentatif des voies moléculaires menant à la mort cellulaire lors d'un AVC ischémique. Certaines voies de signalisation peuvent être bloquées à différents niveaux fournissant de multiples approches pour l'amélioration des lésions tissulaires nécrotiques et apoptotiques (rouge). DAG : diacylglycérol, IP₃ : inositol triphosphate. D'après (Hossmann, 2006).

Nous venons de voir qu'un grand nombre de mécanismes participe au processus de mort neuronale lors d'un AVC ischémique. L'un de ces éléments qui nous intéresse particulièrement et qui intervient dès les premières minutes de l'ischémie est l'inflammation cérébrale. La microglie est bien évidemment centrale dans cette réponse et possède un rôle ambivalent.

IV.2.2 Inflammation et AVC : rôle délétère ou bénéfique de la microglie ?

L'inflammation est un mécanisme essentiel de la physiopathologie de l'AVC, qu'il y ait ou non reperfusion. La restauration du DSC est un objectif évident, toutefois, la reperfusion tardive peut déclencher de nombreuses cascades délétères, telles que la production de radicaux libres, l'altération de la BHE ou encore stimuler la mort neuronale par apoptose, nécrose ou autophagie (Burrows *et al.*, 2015). En parallèle de ces différents mécanismes cellulaires centraux, en périphérie, on observe l'activation de la réponse immunitaire qui se traduit par un afflux de cellules inflammatoires vers et dans le cerveau (**Figure 37**). Il a été montré que l'inhibition de certaines voies inflammatoires empêche l'accumulation cérébrale de neutrophiles, de lymphocytes et de macrophages et permet une meilleure récupération fonctionnelle post-ischémique (Lee *et al.*, 2014; Macrez *et al.*, 2011).

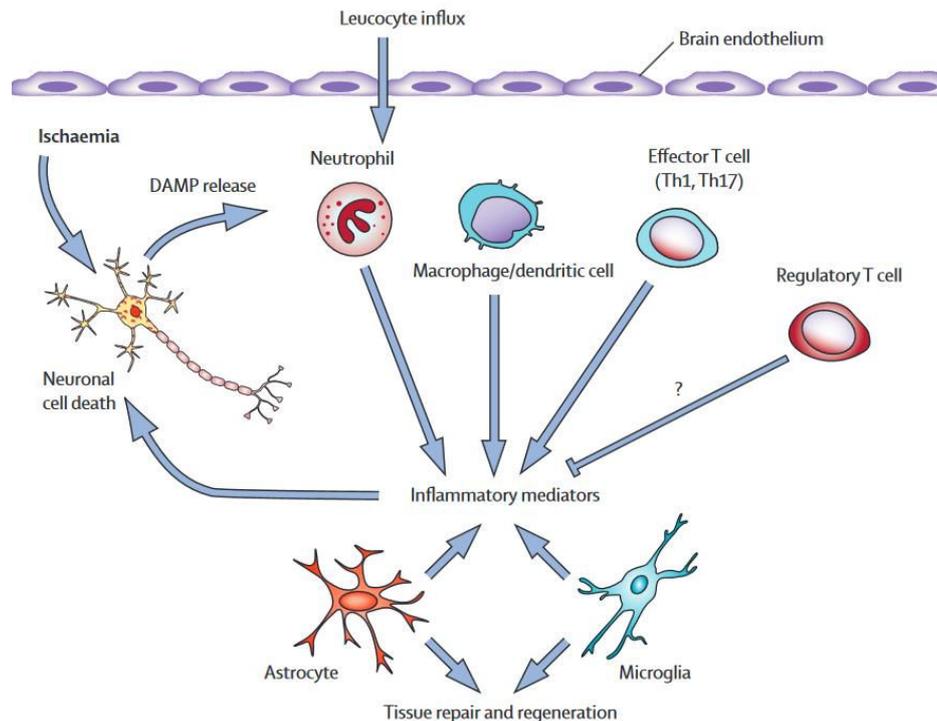


Figure 37. Implication immunitaire dans la lésion ischémique cérébrale. *Lors de la phase aigüe, l'AVC ischémique stimule l'inflammation cérébrale qui participe à la mort neuronale. La libération de DAMPs (motifs moléculaires associés aux dégâts) par les cellules en souffrance active des cascades inflammatoires qui contribuent à la stimulation de la microglie, des astrocytes et des cellules immunitaires périphériques infiltrées. Ces différents acteurs cellulaires produisent à leur tour des médiateurs qui exacerbent les dommages neuronaux. Les cellules résidentes peuvent aussi participer à la neuroprotection et à la réparation tissulaire post-ischémique. D'après (Macrez et al., 2011).*

Après une lésion ischémique, les cellules microgliales sont les premières à être sollicitées, elles réagissent aux modifications de l'environnement dans les minutes suivant l'apparition de la lésion et s'accumulent au niveau du corps ischémique et dans la pénombre (Ma et al., 2017; Morrison et Filosa, 2013). Dans un modèle d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (MCAo) réalisé chez la souris, il a été observé que le pic de prolifération microglial est atteint dans les 48-72 heures après ischémie et que le surnombre de microglies peut perdurer plusieurs semaines/mois après l'induction de la lésion (Denes et al., 2007; Thiel et Heiss, 2011). Dans ces conditions, la microglie passe rapidement d'un phénotype de

surveillance à un phénotype amiboïde. Au niveau du cœur ischémiq, l'activation microgliale est principalement déclenchée par les signaux excitotoxiques (Murugan *et al.*, 2013), alors que dans la région péri-lésionnelle, elle est déclenchée par les DAMPs, provoquant une forte réponse inflammatoire (Neher *et al.*, 2013). De plus, la microglie peut être activée via ses récepteurs purinergiques qui reconnaissent et fixent l'ATP et l'ADP extracellulaires libérés par les neurones en souffrance dans le tissu lésé (Haynes *et al.*, 2006). Les cellules microgliales deviennent alors rondes, leurs prolongements se rétractent dans le même temps qu'ils s'épaississent, elles commencent à produire et à libérer des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance, génèrent des ROS, augmentent l'expression de molécules immunomodulatrices de surface et développent la capacité de présentation antigénique.

Traditionnellement, on considère que la microglie a un impact délétère sur le tissu cérébral après une lésion ischémiq. En effet, ce contexte lésionnel a été montré comme favorisant l'apparition du phénotype pro-inflammatoire microglial, qui est associé à une action neurotoxique par la libération de ROS et de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 β . Ces facteurs exacerbent la réponse inflammatoire et provoquent du stress oxydatif en stimulant la libération de ROS et la production excessive de NO (Lambertsen *et al.*, 2005; Rothwell *et al.*, 1997). Il a d'ailleurs été montré que l'inhibition de ces cellules favorise la récupération fonctionnelle et diminue la taille de l'infarctus cérébral (Fumagalli *et al.*, 2013; Jolivel *et al.*, 2015). Le phénotype microglial évoqué ici, correspond à une "réactivité classique" de la microglie, alors dite M1. Ces résultats sont toutefois de plus en plus discutés, puisque différentes études ont démontré un rôle bénéfique des cellules microgliales en condition ischémiq. Nous l'avons évoqué dans un précédent chapitre, la réactivité microgliale ne se définit pas comme un mécanisme binaire activée/désactivée, ou même encore, microglie réactive/microglie de surveillance. En effet, la microglie peut arborer tout un panel de phénotypes, qui peuvent, dans certaines conditions être anti-inflammatoires et

neuroprotecteurs. Cet état de la microglie est appelé "alternatif" ou microglie alternativement activée" ou encore microglie M2. Les cellules microgliales dites M2 sont caractérisées par une production réduite de NO et une libération accrue de cytokines anti-inflammatoires et de facteurs neurotrophiques comme le GDNF, le BDNF, l'IGF-1, TGF- β et VEGF (Orihuela *et al.*, 2016; Tang et Le, 2016). De plus, le phénotype M2 est caractérisé par une plus grande capacité phagocytaire, permettant une élimination plus efficace des débris cellulaires et une meilleure reconstruction matricielle post-lésionnelle comparativement au phénotype M1 (Tang et Le, 2016) (**Figure 38**).

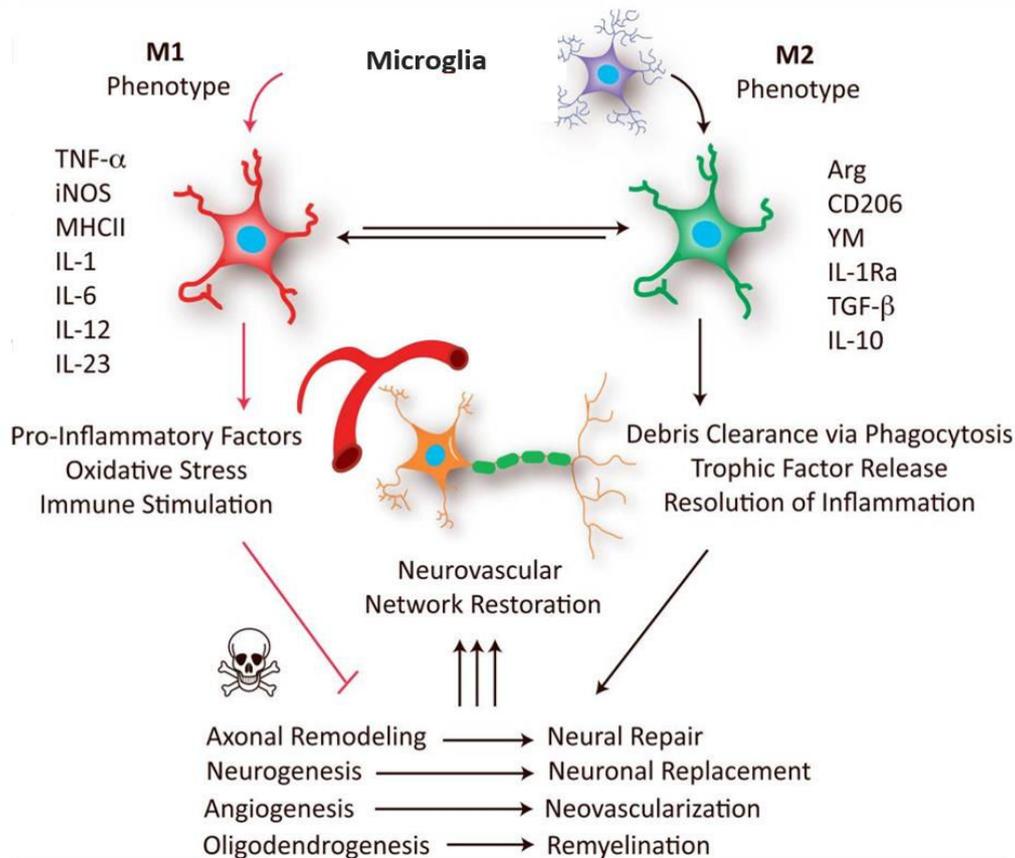


Figure 38. Caractéristiques de la microglie M1 et M2 dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. Les cellules microgliales se polarisent vers un phénotype M1 ou M2 à divers stades de l'AVC et dépendamment de nombreux facteurs. La microglie M1 libère des facteurs pro-inflammatoires et des radicaux libres qui nuisent à la réparation et à la régénération du tissu cérébral. En revanche, la microglie M2 favorise la résolution de l'inflammation pour la réparation et la régénération du cerveau en augmentant la phagocytose et en libérant des facteurs trophiques. Arg : arginase ; IL-1Ra : antagoniste des récepteurs de l'interleukine-1 ; MHCII : complexe majeur d'histocompatibilité II. D'après (Hu et al., 2015).

L'élimination des débris cellulaires par phagocytose et la libération de cytokines anti-inflammatoires par les cellules microgliales traduit la capacité de restauration de l'homéostasie tissulaire endommagée, en atténuant les effets néfastes de l'inflammation, afin de favoriser la régénération et la réparation tissulaire. Plusieurs études ont démontré une évolution du phénotype microglial au cours du processus lésionnel lors d'un AVC ischémique. Dans la phase aiguë de l'ischémique, l'environnement tissulaire favorise le phénotype M2 réparateur de la

microglie, alors que dans les phases subaiguë et chronique, la polarisation de la microglie intervient dans le sens du phénotype délétère et destructeur, le phénotype M1. Ce changement phénotypique de la microglie crée un microenvironnement défavorable pour la résolution des dommages tissulaires. Les mécanismes qui favorisent le phénotype M1 par rapport au phénotype M2 dans une phase lésionnelle plus tardive sont encore mal compris. La présence de la BHE et de la cicatrice gliale limite sûrement le recrutement de nouvelles microglies M2. D'autre part, la polarisation microgliale en contexte ischémique est probablement affectée par de nombreux facteurs. La localisation de la lésion, qu'elle soit dans la substance blanche ou la substance grise (Wang *et al.*, 2013) ou encore l'envergure de la lésion conditionne la taille des différentes régions ischémiques : core, pénombre et zone d'oligémie, dans lesquelles, les cellules microgliales n'ont pas les mêmes phénotypes (Hu *et al.*, 2012; Perego *et al.*, 2011). Les éléments cellulaires et matriciels du microenvironnement peuvent aussi influencer la réactivité microgliale. Par exemple des études *in vitro* ont démontré que les neurones ischémiés favorisent le phénotype M1 (Hu *et al.*, 2012) et que les protéoglycanes chondroïtine sulfate, composants de la MEC, favorisent le phénotype M2 (Hu *et al.*, 2015). Enfin, le modèle d'étude, l'âge, le sexe participent également à l'orientation de la polarisation de la microglie (Norden et Godbout, 2013).

Le rôle et l'impact de ces cellules lors d'une lésion ischémique est également débattu dans la littérature. En 2007 par l'inhibition de l'expression du TLR-4 dans des modèles d'ischémie chez la souris, Caso et Hua ont conclu à un rôle préjudiciable de la microglie dans l'évolution de l'AVC ischémique (Caso *et al.*, 2007; Hua *et al.*, 2007). Toutefois, puisque l'expression du TLR-4 n'est pas spécifique aux cellules microgliales, sur la base de ces deux études, il serait inexact de conclure que les effets bénéfiques observés sont exclusivement associés à l'activité des cellules microgliales. La même année, Kriz et collaborateurs utilisent un modèle particulier de souris transgénique, pour lequel la microglie proliférative et

uniquement celle qui prolifère est supprimée (Lalancette-Hébert *et al.*, 2007). Dans un modèle d'AVC par occlusion de l'ACM, ils montrent que la microglie résidente proliférative permet de moduler la réponse inflammatoire et de limiter la neurotoxicité. Cette neuroprotection passerait par la libération de facteurs trophiques tels que l'IGF-1 (Lalancette-Hébert *et al.*, 2007). Une autre étude a montré que l'injection intracérébroventriculaire de cellules microgliales exogènes chez la souris ischémisées réduit les dommages ischémiques et améliore la récupération fonctionnelle (Kitamura *et al.*, 2004). D'autres résultats suggèrent que les cellules microgliales ne sont pas seulement impliquées dans la limitation de l'expansion lésionnelle, mais aussi dans la réparation tissulaire et la régénération après un AVC ischémique, notamment en libérant des facteurs neurotrophiques tels que l'IGF-1 dans la zone sous-ventriculaire (Thored *et al.*, 2009). Enfin, une étude récente basée sur l'utilisation de la microscopie biphotonique *in vivo* a montré que l'élimination sélective de la microglie conduit à l'augmentation significative de la taille d'une lésion ischémique, qui est rétablie après repopulation microgliale. L'absence de cellule microgliale aggrave le processus de vagues de dépolarisations envahissantes et perturbe la signalisation calcique des neurones, aboutissant à leur mort (Szalay *et al.*, 2016). Ces résultats fournissent de nouvelles informations fonctionnelles sur le rôle de la microglie dans la modulation des changements dans l'activité du réseau neuronal après un AVC ischémique.

IV.3 Les thérapies pour l'AVC

La prise en charge de l'AVC ischémique est centrée sur quatre objectifs thérapeutiques. Tout d'abord, elle a pour but de limiter le déficit neurologique, elle doit également prévenir la récurrence des AVC chez le patient, protéger contre d'éventuelles complications et enfin, faire de la prévention secondaire vis-à-vis de pathologies sous-jacentes. Aujourd'hui, une seule thérapie a démontré une réelle amélioration de la récupération fonctionnelle. La thrombolyse intraveineuse par injection de tPA (*tissue-type plasminogen activator*) est le gold-standard du

traitement pour l'AVC. L'un des points faibles de cette thérapie est la faible fenêtre thérapeutique qu'elle permet, avant de devenir inefficace, puisqu'en effet le tPA doit être administré dans les 4,5 heures suivant l'apparition de l'AVC ischémique (Re-examining Acute Eligibility for Thrombolysis (TREAT) Task Force, 2013). De plus, ce traitement ne peut être prescrit qu'à 10 % des patients à cause des risques de complication hémorragique liés à la thrombolyse.

La recanalisation mécanique intra-artérielle est une technique de plus en plus utilisée en clinique, qui a montré ses preuves indépendamment de l'âge des patients et de la sévérité de l'AVC (Cheang *et al.*, 2014; Ferrante *et al.*, 2016; Nogueira *et al.*, 2018). Son efficacité se base sur l'introduction d'un cathéter assorti d'un *stent* rétractable, introduit en intra-artériel et remonté jusqu'à l'artère occlue. Cette technique peut être utilisée seule ou en complément du traitement thrombolytique, jusqu'à 6 heures après le début des symptômes.

L'administration immédiate d'antiagrégants plaquettaires tels que l'acide acétylsalicylique est efficace pour prévenir les récurrences d'AVC, alors que les anticoagulants doivent être évités à ce stade en raison d'un risque accru d'hémorragie cérébrale (Chýlová *et al.*, 2015). L'injection sous-cutanée d'héparine, la mobilisation (sortie du lit du patient précoce), la craniotomie dé-compressive peuvent protéger des complications liées aux AVC telles que la thromboembolie veineuse et l'œdème cérébral malin. Enfin, bien que prometteuses dans les études précliniques, les stratégies neuroprotectrices peinent à démontrer une réelle efficacité jusqu'à présent (Stocchetti *et al.*, 2015).

Enfin, l'hyperoxie normobarique (HNB) qui consiste à améliorer l'apport en oxygène dans le tissu hypoxique est de plus en plus étudiée pour l'amélioration des dommages suite à un AVC de type ischémique. L'HNB permettrait de normaliser le métabolisme tissulaire en réduisant l'acidose et la déplétion en ATP dans la zone péri-infarctée (Sun *et al.*, 2011), elle

permettrait aussi d'améliorer le DSC et réduit le volume lésionnel (Shin *et al.*, 2007). D'ailleurs, une méta-analyse regroupant 6366 patients montre un bénéfice prometteur de l'HNB pour les patients atteints d'AVC (Ding *et al.*, 2018).

Dans les études précliniques s'intéressant à de nouveaux traitements thérapeutiques pour l'AVC ischémique, bien qu'étant un facteur aggravant, l'HTA est couramment ignorée. Depuis plusieurs années, des comités d'experts ont appelé à la prise en compte de cette pathologie pour l'amélioration de la transposition des études précliniques vers la clinique.

Objectifs

. Objectifs

L'HTA constitue un problème de santé publique majeur, tant d'un point de vue médical que socio-économique. Elle touche un adulte sur trois dans le monde et sa prévalence ne cesse d'augmenter. Cette pathologie est à l'origine de 50 % des AVC, elle est également le principal facteur aggravant de l'AVC et représente le facteur de risque majeur des déficiences cognitives vasculaires et de la maladie d'Alzheimer.

L'HTA est définie comme une élévation chronique de la PA, au-dessus de valeurs seuils de 140 mmHg de PAS et de 90 mmHg de PAD. Malgré une grande disponibilité des différents traitements antihypertenseurs, cette pathologie est peu maîtrisée dans la population. Certains de ces traitements, en plus d'avoir une action de régulation de la PA pourraient s'avérer protecteurs, notamment dans le cadre de pathologies cardiovasculaires, telles que l'AVC.

L'objectif de ce travail de thèse est de comprendre les mécanismes cellulaires qui sous-tendent l'aggravation des lésions de type ischémique retrouvées chez les patients hypertendus, et en conséquence, plaider en faveur d'un traitement antihypertenseur qui pourrait améliorer la protection du cerveau contre les pathologies cérébrovasculaires.

Le système immunitaire est largement impliqué dans les mécanismes physiopathologiques de l'HTA. Au niveau périphérique, il participe notamment à l'induction de dommages aux organes cibles que sont : le cœur, les vaisseaux sanguins et les reins. Le système immunitaire semblerait également pouvoir agir au niveau cérébral et ainsi participer à la mise en place et au maintien de la pathologie. En effet, dans des modèles précliniques d'HTA, plusieurs études ont démontré une modification phénotypique des cellules microgliales dans certaines régions hypothalamiques impliquées dans la régulation de la PA. Cette réactivité

microgliale est associée à un état pro-inflammatoire, favorisant l'entretien des hautes valeurs de PA.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'HTA sur l'état inflammatoire du cerveau au niveau du cortex cérébral, région où se développent majoritairement les lésions ischémiques chez le patient.

Nous avons tiré parti de deux modèles d'HTA bien décrits dans la littérature, l'un mimant une hypertension rénovasculaire secondaire : le modèle 2-kidney, one-clip (le modèle 2K1C) et l'autre mimant l'hypertension essentielle également retrouvée chez le patient : le modèle par infusion chronique d'angiotensine-II (le modèle AngII). L'état inflammatoire du cortex cérébral a été analysé grâce à l'imagerie *in vivo* de la microglie, principale acteur de l'immunité cérébrale résident. L'imagerie biphotonique de la morphologie et de l'activité de ces cellules a été réalisée à un temps où l'HTA est déjà consolidée et pour lequel l'inflammation hypothalamique est déjà présente.

Méthodologie

. Méthodologie

I Méthodologie *in vivo*

I.1 La souche de souris transgénique CX3CR1^{GFP/+}

Des souris transgéniques CX3CR1^{GFP/+} mâles d'environ 20 semaines ont été utilisées pour cette étude. Comme nous l'avons décrit plus tôt dans l'introduction, la souche transgénique CX3CR1^{GFP/+} a la particularité d'exprimer la protéine fluorescente GFP sous le contrôle du promoteur du gène codant le CX3CR1 (Jung *et al.*, 2000). Ainsi, les cellules microgliales possèdent un signal de fluorescence intrinsèque qui permet de les distinguer facilement des autres types cellulaires et de les analyser en imagerie *in vivo*.

Le nombre d'animaux défini pour chaque groupe est basé sur des études similaires disponibles de la littérature, utilisant la microscopie biphotonique *in vivo*, le modèle d'hypertension artérielle par sténose de l'artère rénale et le modèle par infusion chronique d'angiotensine-II. Ce nombre est également défini à l'aide d'un test de puissance statistique. Au cours des différentes procédures expérimentales, certains animaux ont dû être exclus du protocole pour les raisons suivantes :

- Les animaux issus de la production CX3CR1 n'exprimant pas la fluorescence.
- Les animaux ayant subi une chirurgie pour l'induction de l'hypertension mais n'ayant pas développé d'hypertension.
- Les animaux pour lesquels la fenêtre crânienne n'était de suffisamment bonne qualité pour l'imagerie.
- Les animaux pour lesquels l'imagerie n'était pas de suffisamment bonne qualité pour l'analyse.

I.2 Mesures non-invasives de la pression artérielle chez l'animal vigile

Les mesures de la PA sont réalisées sur l'ensemble des animaux, 2 fois par semaine pendant 3 semaines, en amont et jusqu'à 8 semaines après induction de l'HTA. La mesure de la PA peut être influencée par de nombreux éléments comme le cycle circadien des animaux, leur état de stress et leurs mouvements dans le système de mesure. Ainsi, chaque session de mesures est réalisée au même moment de la journée, dans une pièce calme dédiée à un unique expérimentateur. Plusieurs sessions d'habituation sont réalisées avant de débiter le protocole.

Le système de mesure (BP-2000, Visitech) (**Figure 39**) fonctionne de la même façon qu'un tensiomètre utilisé chez l'Homme, aussi appelé sphygmomanomètre. Brièvement, un manchon occlusif gonflable est positionné à la base de la queue des animaux, un capteur en aval de celui-ci permet de mesurer la fréquence cardiaque et la PA. Le manchon gonfle progressivement jusqu'à atteindre une pression interne suffisante, équivalente à la PA détectée par le capteur. Passée cette valeur, le manchon occlue la circulation sanguine de la queue.



Figure 39. Système de mesure non-invasif de la pression artérielle (BP-2000). *Le module électronique, à gauche, permet la réception et l'analyse du signal. Les animaux sont placés et contentionnés au niveau de la plateforme de mesure représentée à droite de l'image. D'après Bioseb.com.*

Les animaux sont placés dans des box de contention individuels 5 minutes avant le début des mesures. Ces box sont directement en contact avec une plateforme chauffante réglée à 38 °C, qui permet une augmentation légère et temporaire de la température corporelle afin d'obtenir une dilatation des vaisseaux de la queue et ainsi d'optimiser la réception du signal de PA. L'appareil utilisé permet de mesurer les valeurs de PAS et PAD, ainsi que la fréquence cardiaque.

I.3 Induction de l'hypertension artérielle chronique

L'HTA a été étudiée chez des souris CX3CR1^{GFP/+}, dans deux modèles différents : le modèle rénovasculaire (2 reins, 1 clip : 2K1C ; (Goldblatt *et al.*, 1934)) et le modèle par infusion continue d'angiotensine-II, le modèle AngII.

I.3.1 Modèle rénovasculaire 2K1C

Ce modèle d'HTA, aussi appelé modèle Goldblatt (Goldblatt *et al.*, 1934), repose sur la sur-activation du SRAA qui permet l'élévation chronique de la PA. Comme nous l'avons décrit précédemment, l'une des deux artères rénales est sténosée afin de réduire la perfusion sanguine du rein clippé, alors que la seconde artère rénale est laissée intacte.

Dix minutes avant le début de la chirurgie, les souris reçoivent de la Tolfédine (0,1 ml/kg ; 4 %), un analgésique anti-inflammatoire non-stéroïdien injecté en intra-péritonéal (i.p.). L'induction de l'anesthésie est réalisée par inhalation d'isoflurane à 5 % dans un mélange gazeux constitué de 30 % d'oxygène et de 70 % de protoxyde d'azote pendant 2 minutes. Après avoir réduit la quantité d'isoflurane à 2 %, une pommade à base de vitamine A est appliquée sur les yeux des animaux afin d'éviter un dessèchement ou une irritation. La température corporelle est maintenue à 37 °C grâce à une sonde rectale couplée à un tapis chauffant. Les animaux sont ensuite positionnés en décubitus ventral et la peau du dos est soigneusement

nettoyée et désinfectée à l'aide d'un mélange d'alcool 70 % et de Bétadine. Une incision de 2 cm de la peau et des muscles est ensuite réalisée au niveau du flanc droit, parallèlement à la ligne médiane. Après avoir été isolée de la veine, l'artère rénale droite est exposée. Un clip en argent, formant une ouverture de 20 μm et permettant d'induire la sténose de l'artère est ensuite positionné (**Figure 40**). La paroi musculaire dorsale est désinfectée et recousue à l'aide d'un fil de suture 3.0 résorbable. La peau du dos est également recousue avec du fil 3.0 non-résorbable et est recouverte de Xylocaïne 5 %. Pendant une semaine, les animaux sont attentivement surveillés de façon à vérifier leur bonne récupération postopératoire.

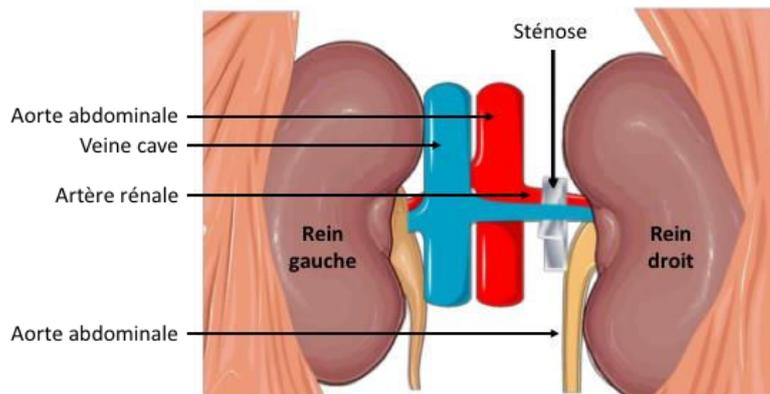


Figure 40. Représentation schématique du modèle 2K1C d'hypertension artérielle. Dispositif de sténose de l'artère rénale par un clip en argent pour l'induction de l'hypertension rénovasculaire selon le modèle 2K1C (2 reins, 1 clip) développé par Godblatt 1934.

I.3.2 Modèle par infusion chronique d'angiotensine-II

Ce modèle AngII d'HTA repose sur l'implantation sous-cutanée d'une mini-pompe permettant la délivrance chronique d'angiotensine-II par osmose. L'angiotensine-II induit l'élévation de la PA principalement en favorisant la rétention sodique et la constriction vasculaire.

En préparation de la chirurgie, les mini-pompes (Alzet, #2006, Charles Rivers) (**Figure 41**) sont remplies par une solution d'angiotensine-II préalablement préparée. Le modèle de

pompe utilisé permet une délivrance du produit pendant 6 semaines (quantité administrée 1000 ng/kg.min).

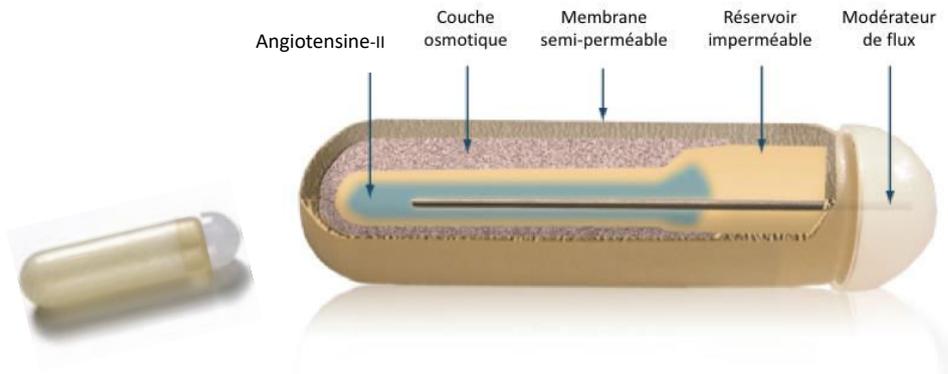


Figure 41. Schéma du dispositif de mini-pompe pour l'induction du modèle AngII d'hypertension artérielle. La mini-pompe Alzet est implantée en sous-cutanée (Modèle 2006). Ce système permet une délivrance du produit en continue par osmose. L'image de gauche est à l'échelle (longueur de la pompe : 3 cm). D'après Alzet.com.

Comme décrit précédemment pour le modèle rénovasculaire, la Tolfédine est utilisée comme couverture analgésique (0,1 ml/kg, 4 %). L'induction de l'anesthésie est effectuée pendant 2 minutes sous isoflurane 5 % (ajoutée à un mélange d'oxygène/protoxyde d'azote : 30/70 %). Les animaux sont positionnés en décubitus ventral, l'isoflurane est alors réduit et maintenu à 2 % tout au long de la chirurgie. De la vitamine A est appliquée sur les yeux des animaux, dont la température est maintenue à 37 °C. La peau du dos est soigneusement nettoyée et désinfectée (alcool 70 % et Bétadine). Une incision médiane de 1,5 cm de la peau est réalisée verticalement au milieu du dos. A cet endroit, la peau est soigneusement décollée de la paroi musculaire et la cavité formée est humidifiée à l'eau physiologique. La pompe est insérée dans la cavité qui est ensuite refermée à l'aide d'un fil de suture 3.0 non-résorbable. De la Xylocaïne 5 % est pulvérisée sur la zone suturée. Les animaux sont remis dans leur cage pendant une semaine pour leur permettre de récupérer de la chirurgie.

I.4 Procédure de mise en place de la fenêtre crânienne

Une fenêtre crânienne est un outil d'accès optique au cortex cérébral par le crane pour l'imagerie *in vivo*.

Le choix du modèle de fenêtre crânienne retenu a été un point important dans la mise en place de cette étude, puisqu'en effet, il existe différents types de fenêtres crâniennes (Drew *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2007) :

- Le modèle de fenêtre ouverte : l'os du crâne ainsi que la dure-mère sont retirés sur une petite portion d'environ 2 mm² (Sadakane *et al.*, 2015).
- Le modèle de fenêtre ouverte avec maintien de la dure-mère : là encore, l'os est retiré sur une petite portion de crâne 2 mm², mais la dure-mère est laissée en place (Stetter *et al.*, 2013).
- Le modèle de fenêtre par affinage du crâne : sur une portion de crâne similaire en termes de taille, l'os est affiné jusqu'à obtenir une fine membrane transparente d'environ 15-25 µm d'épaisseur (Yang *et al.*, 2010).
- Le modèle de fenêtre par affinage du crâne renforcé : le principe est le même que le modèle décrit précédemment, à la différence qu'une lamelle de verre est collée à la surface de l'os affiné, de façon à le renforcer (Drew *et al.*, 2010).

Dans notre étude, nous avons choisi de travailler chez la souris notamment vis-à-vis du type de fenêtre crânienne associé.

En effet, le premier modèle de fenêtre que nous venons d'évoquer est adapté à des animaux dont la dure-mère est trop épaisse pour réaliser une imagerie intravitale au travers de celle-ci, comme par exemple pour le rat et le marmouset (petit primate non-humain). L'os et la dure-mère étant retirés, la pression intracrânienne et donc l'homéostasie cérébrale est perturbée, c'est

en effet le gros point faible de ce modèle. D'autre part, la suppression du crâne et de la dure-mère laisse une partie du cerveau vulnérable durant la mise en place de la lamelle de verre.

Le second modèle est adapté à la souris, dont la dure-mère est suffisamment fine pour ne pas trop altérer l'imagerie *in vivo*. L'intérêt de ce modèle est de pouvoir utiliser certains marqueurs nécessitant une application corticale, comme pour le SR101 un marqueur astrocytaire, ou encore le Fluo4-AM (Fluo4-acetoxyméthyl) qui marque le calcium astrocytaire. Dans ce modèle, la dure-mère est laissée intacte et permet donc de limiter l'altération de la pression intracrânienne, elle ne l'empêche toutefois pas complètement puisque l'os est retiré.

Le troisième modèle est également utilisable chez la souris dès l'instant que l'os est suffisamment affiné pour limiter la dispersion du signal de fluorescence et ainsi permettre une imagerie en profondeur. Toutefois, le crâne étant très aminci, il devient aussi très fragile et est susceptible d'être rapidement lésé, mettant alors en danger l'intégrité du cortex cérébral.

Dans notre étude, nous avons tiré parti de l'existence de la souche de souris transgénique CX3CR1 pour laquelle les cellules microgliales possèdent un signal de fluorescence intrinsèque. N'ayant donc pas la nécessité d'ajouter des marqueurs diffusibles directement à la surface du cortex, nous nous sommes dirigés vers un modèle de fenêtre fermée par affinage du crâne. L'os et la dure-mère étant laissés en place, le milieu très peu perturbé est propice à l'analyse du système immunitaire très sensible à toute variation et stimulation non-physiologique. Après avoir tenté la mise en place de la fenêtre sans la protection d'une lame en verre, nous nous sommes finalement orientés vers le dernier modèle cité, qui nous permet de garantir l'intégrité cérébrale une fois la fenêtre réalisée.

La fenêtre crânienne est mise en place sur les animaux contrôles et les animaux hypertendus 2K1C et AngII (**Figure 42**). Dix minutes avant le début de la chirurgie, les souris reçoivent de la Tolfédine (0,1 ml/kg) injectée en i.p. L'induction de l'anesthésie est réalisée par inhalation

d'isoflurane à 5 % (ajouté à 30 % d'oxygène et de 70 % de protoxyde d'azote) pendant 2 minutes. La quantité d'isoflurane est ensuite diminuée à 2 %. La vitamine A est appliquée sur les yeux des animaux et la sonde rectale couplée au tapis chauffant est mise en place. Les animaux sont positionnés dans un cadre orientable qui permet de stabiliser parfaitement leur tête. La peau de la tête est nettoyée et désinfectée à l'alcool et à la Bétadine. Une petite portion du scalp de 6 mm² est retirée et étirée, de façon à exposer le crâne au-dessus du cortex somatosensoriel. A ce niveau, l'os est minutieusement fraisé pendant environ 30 minutes sur une zone de 4 mm². Toutes les 30 secondes, un coton-tige imbibé d'eau physiologique est passé délicatement sur cette région, afin de limiter l'échauffement du tissu cérébral causé par le fraisage. Ainsi, le crâne est aminci jusqu'à devenir complètement transparent (épaisseur mesurée d'environ 50 µm). Le fraisage doit être délicat, sans à-coup et homogène, de façon à produire une surface plane, sans aspérité qui pourrait altérer l'imagerie. Une lamelle de verre de 2 mm² est découpée à l'aide d'une pointe diamant. Elle est ensuite fixée au niveau de la région amincie par de la glue cyanoacrylate (Loctite #414, SEFI, Caen). Cette étape doit être réalisée avec beaucoup de minutie pour éviter l'apparition d'une bulle sous la fenêtre qui empêcherait l'imagerie. Puis, le scalp est collé au niveau des bords de la fenêtre et une piscine est réalisée par du ciment dentaire. Les bords de la piscine doivent être réguliers et suffisamment hauts pour empêcher la fuite de l'eau pendant l'imagerie, mais suffisamment bas pour permettre la descente de l'objectif à immersion utilisé. Enfin, la zone est recouverte de Xylocaïne 5 % avant de remettre l'animal dans sa cage. L'imagerie n'est faite qu'à partir du lendemain de la pose de la fenêtre, afin de laisser les animaux récupérer de la chirurgie.

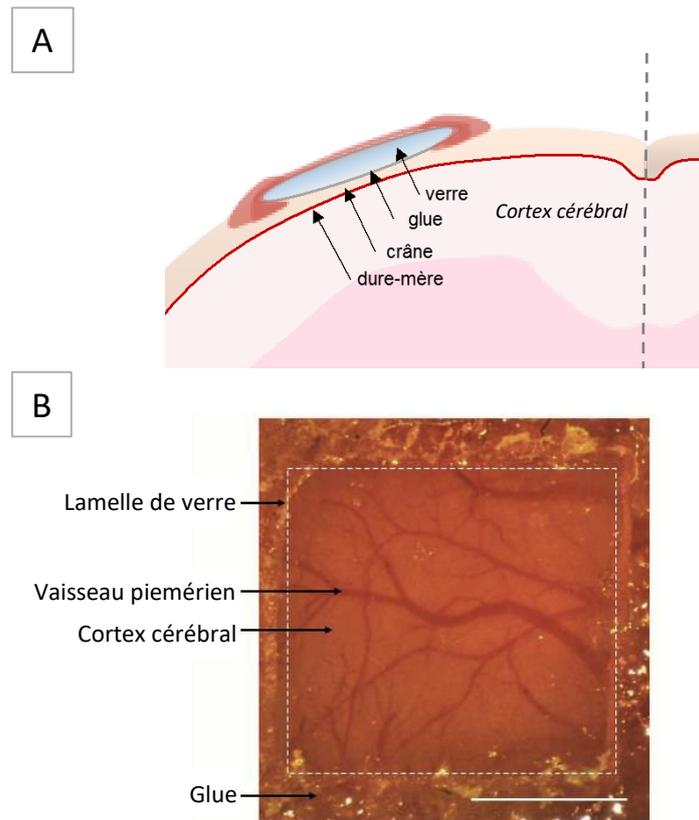


Figure 42. Modèle de fenêtre crânienne pour l'imagerie *in vivo*. *A. Schéma représentatif du modèle de fenêtre crânienne utilisé dans cette étude : le modèle d'os affiné renforcé, initialement décrit par Drew en 2010 (Drew et al., 2010) B. Vue prise du dessus de la fenêtre une fois la lamelle collée. L'absence de saignement et l'aspect des vaisseaux sont contrôlés pour valider la qualité de la fenêtre. Barre d'échelle : 1 mm.*

Il faut savoir que la mise au point d'un tel modèle est très complexe et demande de très nombreuses heures d'apprentissage pour pouvoir garantir les conditions physiologiques du tissu cérébral. Une fenêtre crânienne qui n'est pas parfaitement réalisée génère automatiquement des données erronées, d'autant plus que dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'inflammation cérébrale. En conséquence, une fenêtre présentant au moins l'une des caractéristiques suivantes était exclue du protocole (**Figure 43**).

- Des micro-saignements corticaux ou de la dure-mère
- Des altérations morphologiques des vaisseaux

- Des zones de réactivité microgliale (hypersignal GFP)
- Des microfissures du crâne
- La présence de bulles d'air sous la fenêtre empêchant l'imagerie
- Une épaisseur d'os trop importante, limitant le signal de fluorescence et donc l'imagerie en profondeur

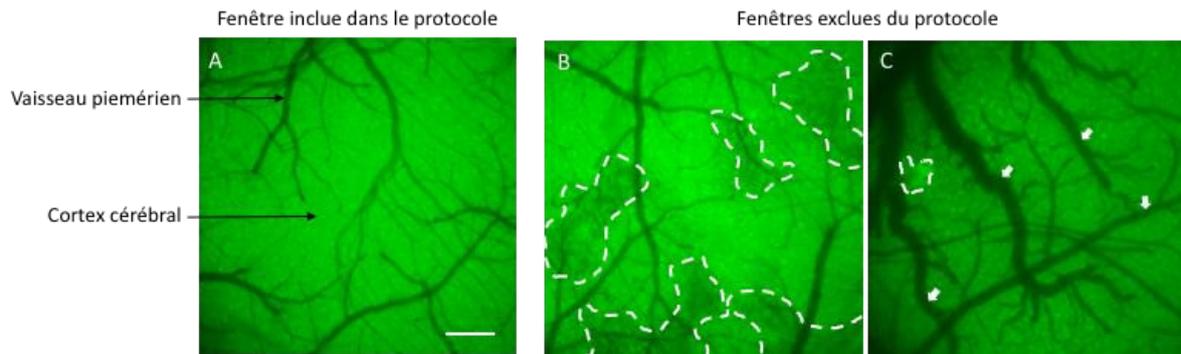


Figure 43. Points de contrôle pour la validation de l'état de fenêtre crânienne. Images prises 1 jour après l'installation de la fenêtre chez des souris transgéniques $CX3CR1^{GFP/+}$. L'autofluorescence du tissu cérébral permet d'observer les vaisseaux par contraste. Les micro-points lumineux verts correspondent aux cellules microgliales. **A.** Cortex intact. **B.** Cette fenêtre présente des saignements à la surface du cortex (zones entourées en pointillés blancs). **C.** Les vaisseaux sont dilatés et sinueux (flèches blanches). Le marquage microglial intense (pointillés blancs) témoigne d'une inflammation localisée. Barre d'échelle : 200 μm .

Un gros travail a également été réalisé pour optimiser le système de fixation de l'animal. La parfaite stabilisation de la tête de l'animal est un aspect essentiel pour l'imagerie à l'échelle cellulaire. En effet le moindre mouvement micrométrique rend l'imagerie impossible. Le modèle initial développé au laboratoire chez le rat, nécessitait la mise en place de plusieurs boulons à la surface du crâne. Ce système relativement encombrant pour l'animal a été amélioré. Ici, seule la portion de scalp au niveau de la fenêtre est retirée et le système est limité à la fenêtre en elle-même. D'autre part, l'expertise acquise pour la réalisation de la fenêtre crânienne, ainsi que pour l'imagerie biphotonique *in vivo* nous a permis de collaborer pour la publication d'une étude parue en 2018 dans *Theranostics* (Falzone *et al.*, 2018)(voir Annexe 2).

II Principe de la microscopie biphotonique.

La microscopie biphotonique se base sur le principe de fluorescence classique. La fluorescence classique correspond à l'absorption d'énergie par un corps excité à une longueur d'onde donnée et qui en retour, produira immédiatement l'émission de lumière à une autre longueur d'onde. La microscopie à fluorescence repose sur la formation d'une image à partir de la détection de cette lumière émise.

L'énergie transportée par un photon est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde. Ainsi la microscopie à fluorescence classique et la microscopie confocale utilisent de faibles longueurs d'onde (ultra-violet) de haut niveau énergétique, permettant la stimulation des fluorochromes du tissu visualisé. Ce type de fluorescence ne permet pas une imagerie en profondeur puisqu'elle utilise des longueurs d'onde peu pénétrantes et que le tissu biologique est un milieu très dispersif. Pour ce type de microscopie l'intensité lumineuse doit être augmentée pour atteindre des profondeurs plus importantes mais toutefois limitées, ce qui endommage l'échantillon.

La solution à ce problème fut basée sur l'utilisation de photons de longueurs d'onde plus élevées (infra-rouge) et donc plus pénétrants et transportant moins d'énergie (**Figure 44**). Un seul photon ne suffisant pas pour l'excitation d'un fluorochrome, il fallait pouvoir provoquer l'absorption simultanée de deux photons. Cette théorie fut étayée en 1931 par Maria Göppert Mayer et devait toutefois être associée à une technologie puissante permettant d'augmenter fortement la densité photonique et de façon à provoquer une absorption biphotonique à un endroit donné, à un instant donné. Cela n'a été permis que 60 ans plus tard, grâce à l'invention du laser pulsé.

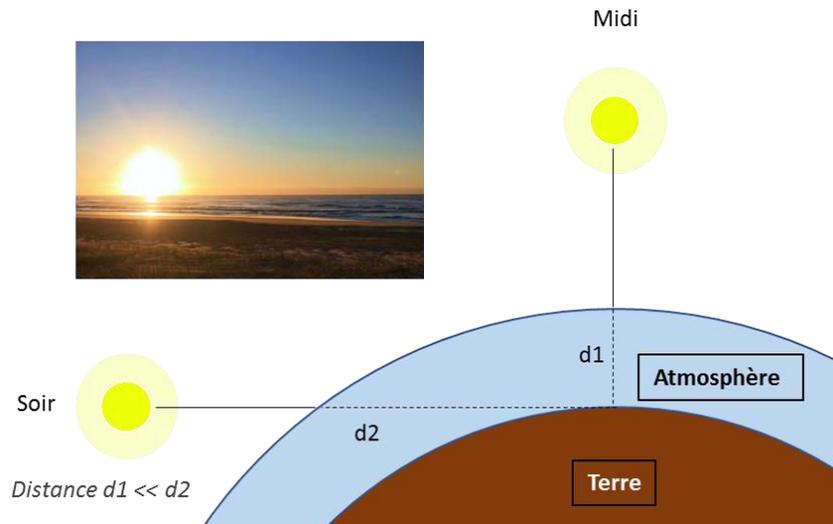


Figure 44. Illustration de la capacité de pénétration des rayons rouges (longueurs d'onde élevées) par rapport aux rayons bleus (faibles longueurs d'onde). La capacité de pénétration des rayons rouges s'illustre très bien au moment du coucher de soleil. Les rayons lumineux doivent traverser une distance importante au travers de l'atmosphère jusqu'à l'observateur. Les rayons bleus, peu pénétrants sont déviés.

Basé sur les principes que nous venons d'évoquer, la microscopie biphotonique possède plusieurs avantages comparativement à la microscopie de fluorescence mono-photonique, notamment dans le cadre de l'imagerie d'un tissu biologique.

- L'imagerie biphotonique utilise des longueurs d'ondes situées dans l'infra-rouge qui sont moins dispersées par la matière biologique et donc plus pénétrantes. Elles permettent ainsi de réaliser une imagerie plus en profondeur.
- L'excitation biphotonique est restreinte à la zone de collision des deux photons. Ainsi la fluorescence émise provient uniquement du volume focal excité, améliorant ainsi le rapport signal/bruit (**Figure 45**).
- La zone d'excitation étant limitée spatialement et temporellement, la microscopie biphotonique n'endommage quasiment pas le tissu et diminue énormément le photoblanchiment (**Figure 45**).

- La microscopie biphotonique permet de réaliser une imagerie avec une grande résolution spatio-temporelle.

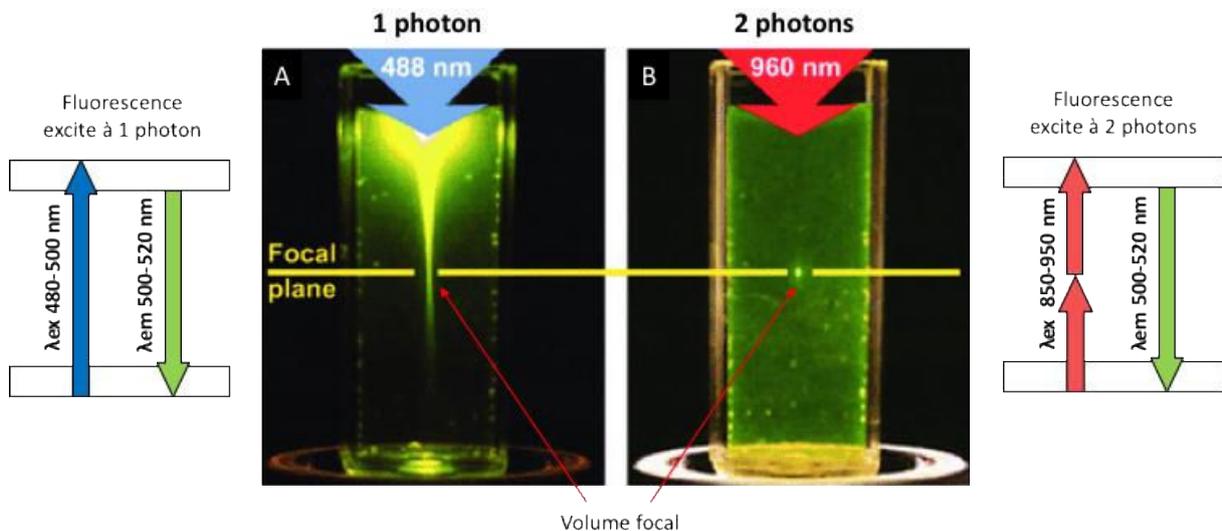


Figure 45. Illustration de la différence entre la microscopie à fluorescence monophotonique et biphotonique. **A.** En microscopie de fluorescence à 1 photon, la zone d'excitation est beaucoup plus importante qu'en biphoton. **B.** Pour cette technologie, la zone d'excitation se limite au volume focal. λ_{em} : longueur d'onde d'émission, λ_{ex} : longueur d'onde d'excitation. Modifiée d'après (Zipfel et al., 2003).

II.1 Imagerie *in vivo*

II.1.1 Imagerie biphotonique *in vivo* de la microglie.

Le lendemain de la mise en place de la fenêtre crânienne, soit 6-8 semaines après induction de l'HTA, les animaux sont initialement anesthésiés à l'isoflurane 5 % (dans un mélange 30/70 %, O₂/N₂O) pendant 2 minutes et l'anesthésie est poursuivie par l'injection i.p. d'un mélange de kétamine/xylazine (50 mg/kg/ 5 mg/kg), qui sont respectivement un inhibiteur des récepteurs NMDA et un agoniste α_2 adrénergique. Ce protocole d'anesthésie a été choisi car il est reconnu pour préserver la réactivité vasculaire, comparativement à l'isoflurane (Shim et al., 2018). La sonde rectale et le tapis chauffant sont ensuite installés pour le maintien de la température corporelle durant l'imagerie. Les animaux sont ensuite placés dans un cadre

orientable, leur tête est fixée au niveau de barres d'oreilles et d'une barre de dent. Cette étape est primordiale, si le positionnement n'est pas parfaitement réalisé, les mouvements de l'animal, même minimes se répercuteront sur la qualité des images qui seront inanalysable. On peut noter que même avec l'expérience, la dérive du plan focal est parfois incontrôlable et pour cette étude, un certain nombre d'acquisitions a dû être exclu des analyses (**Figure 46**).

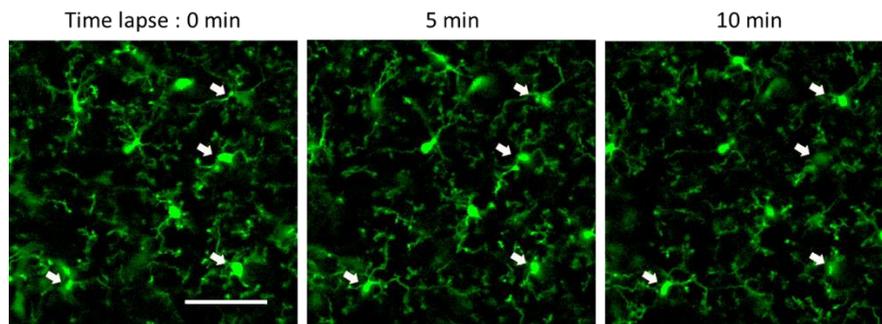


Figure 46. Dérive du plan focal pendant l'imagerie in vivo. *La dérive lente du plan focal n'est pas facilement observable et ne permet donc pas d'être rectifiée au cours de l'imagerie. Ce type de mouvement empêche une analyse fiable de la motilité microgliale. Barre d'échelle : 20 μm .*

Afin de marquer le compartiment vasculaire, 100 μl de TRITC-dextran (tetraméthylrhodamine isothiocyanate-dextran, 70 kDa) (Sigma-Aldrich) est injecté en rétro-orbitaire. L'injection rétro-orbitaire est utilisée car elle est très peu invasive, rapide et facilement réalisable sous le microscope. Les animaux dans le cadre de fixation sont ensuite positionnés sous le microscope biphotonique (Leica DM6000, plateforme Cyceron, Caen, France), sous un objectif 25x/0.95 Water HCX IRAPO. La longueur d'onde d'excitation est réglée sur 900 nm, permettant de récupérer à la fois le signal de fluorescence intrinsèque de la microglie et le signal de fluorescence de la rhodamine issu du compartiment vasculaire. Les images acquises ont une taille de 196 x 196 μm^2 .

Dans un premier temps nous avons réalisé une imagerie morphologique de la microglie. Pour cela, une pile d'images anatomique est réalisée sur 50 μm de profondeur à partir du zéro,

défini pour toutes les images comme étant la profondeur à partir de laquelle les vaisseaux piémériens commencent à plonger dans le cortex. Le pas d'acquisition en z et la fréquence de scanning sont respectivement réglés à $0,99\ \mu\text{m}$ et 200 Hz (200 lignes scannées par secondes).

L'imagerie de la motilité spontanée de la microglie est ensuite réalisée pendant 30 minutes de time lapse au niveau d'une zone comprise dans la pile d'images anatomique (fréquence d'acquisition : 0,2 Hz, fréquence de scanning : 200 Hz). Lors de la mise au point de ces séquences d'imagerie, nous avons pu observer qu'une puissance de laser trop importante était associée à une altération très rapide de la morphologie de la microglie, avec une augmentation rapide du nombre de processus microgliaux et des ramifications en forme de "grappe de raisins" (**Figure 47**). Ces observations nous ont permis d'avoir un bon contrôle qualité sur les séquences réalisées par la suite.

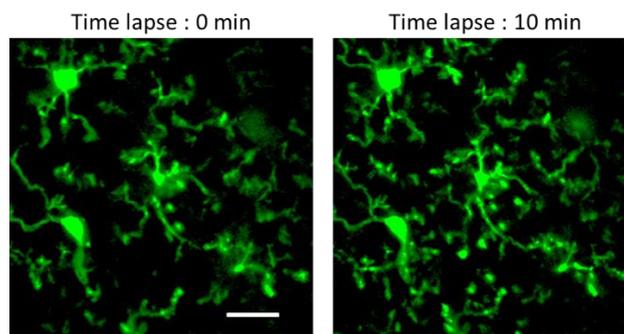


Figure 47. Lésion tissulaire induite par une puissance laser trop forte pendant l'imagerie *in vivo*. Une augmentation du nombre de processus avec des extrémités en "grappe de raisins" au cours d'un time lapse sur une même région témoigne d'une altération du tissu cérébral imagé. Barre d'échelle : $50\ \mu\text{m}$.

Nous avons ensuite analysé la réponse microgliale à la suite d'une microlésion induite par le laser. Avant de lancer l'acquisition, la microlésion est réalisée en focalisant le faisceau laser sur une zone de $4\ \mu\text{m}^2$, à la puissance de 50 mW pendant 20 secondes. Cette région sélectionnée est caractérisée par l'absence de signal GFP microglial et l'absence de signal

TRITC vasculaire. Le time laps de 30 minutes est commencé directement après les 20 secondes d'induction de la microlésion.

L'ensemble de ce protocole est reproduit 24 heures plus tard, dans le but de déterminer si la réponse microgliale après injection de LPS est modifiée par l'HTA (2K1C et/ou AngII). Le LPS de sérotype 0127: B8 (Sigma; 100 µg / kg dans une solution saline stérile) est administré en i.p. 3 heures avant le début de l'imagerie biphotonique.

II.1.2 Imagerie *in vivo* du compartiment vasculaire

Dans un deuxième groupe d'animaux, nous avons étudié l'impact de l'HTA artérielle sur différents aspects du compartiment vasculaire. Nous avons utilisé le même protocole d'anesthésie et de fixation des animaux que ce qui est décrit dans la section précédente. La fluorescence monophotonique du microscope DM 6000 est utilisée pour les séquences de cette partie.

La région visualisée doit comporter au moins une artère avec au moins une ramification. Chez le rat la distinction entre les artères et les veines est relativement facile, pour cette espèce on peut se baser sur la forme du vaisseau (rectiligne pour les artères, sinueux pour les veines), sur la vitesse du flux dans le vaisseau (rapide pour les artères, plus lent et permettant d'observer les hématies pour les veines). Chez la souris, la distinction est plus délicate à faire. Nous nous sommes basés sur l'observation d'une pulsativité vasculaire pour identifier les artères piémériennes.

II.1.2.1 Imagerie de la perméabilité de la BHE

Dans un premier temps, nous avons analysé le degré de perméabilité à la BHE après injection rétro-orbitaire de 150 µl d'un mélange de deux marqueurs fluorescents, un de faible poids moléculaire (FITC-dextran (fluorescéine isothiocyanate-dextran), 40 kDa) (Sigma-

Aldrich) et l'autre de plus haut poids moléculaire (TRITC-dextran, 70 kDa) (Sigma-Aldrich). L'utilisation de deux marqueurs excitables à deux longueurs d'onde différentes et de deux poids moléculaires différents permet d'analyser et de potentiellement distinguer deux niveaux de perméabilité de la BHE. Les filtres fluorescents GFP (480-green) et N21 (555-red) ont été utilisés pour visualiser les deux marqueurs, à partir desquels une image est prise à t0 et à t20 minutes après injection des traceurs.

II.1.2.2 Imagerie de la réponse vasculaire à des stimulations somatosensorielles

Nous avons ensuite analysé la réponse vasculaire à des stimulations somatosensorielles réalisées au niveau des vibrisses. A côté de la platine du microscope est installé un système que nous avons développé pour cette étude, permettant de générer un flux d'air pulsé focalisé et contrôlable à distance. Le système est dirigé vers les vibrisses des souris, du côté opposé à la fenêtre crânienne. L'imagerie consiste à analyser la réactivité vasculaire pendant les stimulations somatosensorielles qui sont réalisées à la fréquence de 5 Hz pendant 5 blocs de stimulation (20 secondes de stimulations espacées de 40 secondes d'intervalle). Une image par seconde est générée sous un filtre fluorescent N21 (555-rouge) permettant de visualiser le compartiment vasculaire marqué par le TRITC-dextran préalablement injecté.

II.2 Induction de l'ischémie cérébrale

Le modèle d'ischémie est celui développé par Longa et collaborateurs en 1989 et consiste en une occlusion de l'ACM de façon proximale selon une approche intraluminale (Longa *et al.*, 1989).

Comme pour les procédures chirurgicales précédentes, une injection i.p. de Tolfédine (0.1 ml/kg, 4%) est réalisée 10 minutes avant le début de la chirurgie. L'induction de l'anesthésie est initiée par inhalation d'isoflurane à 5 % dans un mélange gazeux constitué de

30 % d'oxygène et de 70 % de protoxyde d'azote pendant 2 minutes. Après avoir réduit la quantité d'isoflurane à 2 %, les animaux sont positionnés en décubitus dorsal. La vitamine A est appliquée sur les yeux et la température corporelle est maintenue à 37 °C.

Une incision longitudinale de 2 cm est réalisée au niveau du cou de l'animal où les muscles sont écartés autour de la trachée (**Figure 48**). L'artère carotide commune (ACC) droite est exposée jusqu'à la bifurcation qui sépare l'artère carotide interne (ACI) de l'artère carotide externe (ACE). Des ligatures temporaires sont positionnées sur les ACC et ACI et l'ACE est électrocoagulée le plus loin possible de la bifurcation. Au niveau de cette branche, une micro incision est réalisée avant d'y insérer un filament occlusif (filament 6-0, longueur 20 mm, diamètre de l'extrémité occlusive : $0,23 \pm 0,02$ mm, longueur de l'extrémité occlusive : 2-3 mm) (#602323PK10, Docol Corporation), qui est ensuite remonté jusqu'à l'ACI. Le filament est ligaturé au niveau de l'ACI avant de pouvoir sectionner l'ACE et l'amener dans l'axe de l'ACI. L'embolie est ensuite délicatement remonté jusqu'à l'origine de l'ACM. La ligature de l'ACI est resserrée et celle de l'ACC est retirée. L'embolie est laissé en place pendant 45 minutes, puis retirée précautionneusement. L'animal est maintenu sous anesthésie pendant toute la durée de ce protocole. La zone est ensuite suturée et recouverte de Xylocaïne 5 % puis les animaux sont replacés dans leur cage et surveillés jusqu'à leur réveil.

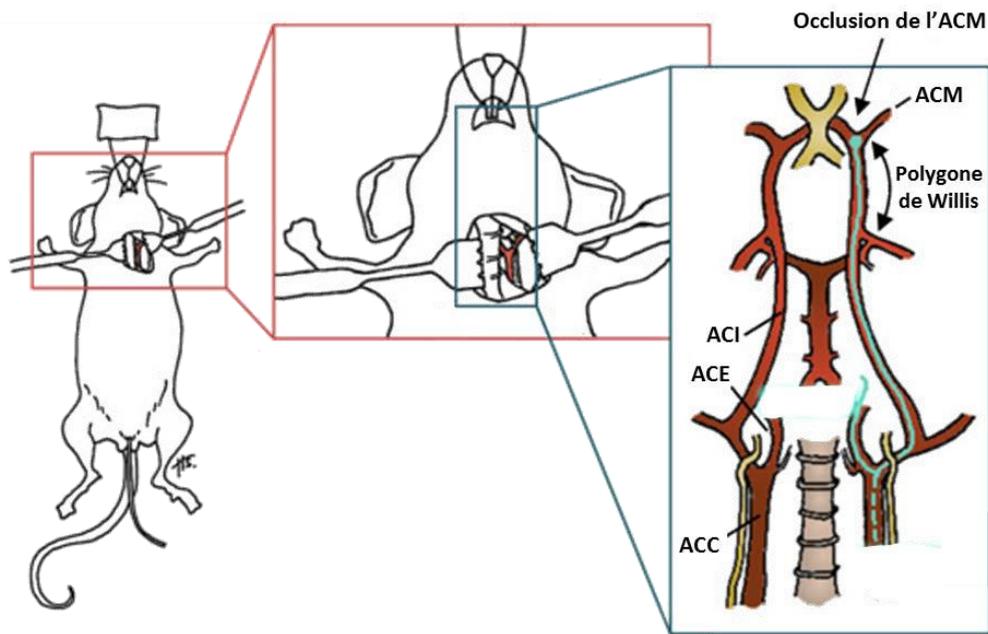


Figure 48. Schéma représentatif du dispositif pour l'induction de l'ischémie cérébrale. *L'induction de l'ischémie cérébrale est réalisée selon un modèle intraluminal d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM). Ce modèle consiste à l'insertion d'un filament depuis l'artère carotide jusqu'à l'origine de l'ACM, au niveau du polygone de Willis. ACI : artère carotide interne, ACE : artère carotide externe, ACC : artère carotide commune. Modifié d'après (Smith et al., 2015).*

II.3 Imagerie par résonance magnétique

L'imagerie IRM est réalisée 24 heures après induction de l'ischémie par un imageur Bruker Pharmascan 7-Tesla (7T, PharmaScan®, Bruker BioSpin, Ettlingen, Allemagne). Après induction de l'anesthésie, les animaux sont installés dans l'IRM sous isoflurane 1,5 % (dans un mélange 30/70 % O₂/N₂O). Leur température est maintenue à 37 °C par un système de chauffage localisé au niveau du berceau de l'IRM. La fréquence respiratoire est suivie grâce à un ballonnet à pression, scotché sous l'abdomen de l'animal et relié à un système récepteur. Ce dispositif nous permet d'adapter l'anesthésie pendant la séquence d'imagerie si besoin.

Avant de lancer la séquence d'imagerie anatomique, une séquence FLASH (Fast Slow Angle Shot) donne lieu à 3 images correspondant à un plan axial, coronal et sagittal (TR/TE = 100/4 msec ; résolution = $0,39 \times 0,39 \times 3 \text{ mm}^3$; temps d'acquisition 12 secondes). Cette séquence permet de vérifier le positionnement de l'animal suivant les 3 directions. Si besoin, le positionnement peut être ajusté avant l'imagerie anatomique.

L'imagerie anatomique est une imagerie pondérée en T2 avec une acquisition rapide en séquence d'échos recentrés (facteur RARE de 8; TR / TE = 5000 / 16,25 millisecondes; nombre d'expériences (NEX) = 2; 20 coupes contiguës; temps d'acquisition = 4 minutes; résolution nominale = $0.15 \times 0.15 \times 0.75 \text{ mm}^3$). Ce type d'imagerie permet d'observer une quantité d'eau par voxel. En hypersignal, on distingue les zones comportant de grandes quantités d'eau, comme dans les ventricules cérébraux par exemple. A 24 heures post-ischémie, un hypersignal striatal et cortical est associé à un œdème vasogénique. C'est-à-dire à un surplus d'eau présent dans le parenchyme provenant du compartiment vasculaire après rupture de la BHE.

II.4 Préparation des coupes de cerveau

A la fin du protocole, les animaux sont profondément anesthésiés à l'isoflurane à 5 % dans un mélange $\text{O}_2/\text{N}_2\text{O}$ (30/70 %). Une perfusion transcardiaque est réalisée à l'eau physiologique héparinée puis au paraformaldéhyde (PFA, 4 %) permettant de fixer les tissus. Les cerveaux sont prélevés et laissés dans le PFA pendant 24 heures, puis laissés dans du PBS sucrose (30 %) pendant 48 heures. Des coupes de $30 \mu\text{m}$ d'épaisseur sont réalisées au microtome puis montées sur lame. L'imagerie de fluorescente est réalisée sur la base de l'expression intrinsèque de la GFP chez les souris $\text{CX3CR1}^{\text{GFP/+}}$.

III Analyse d'images

L'intégralité du traitement et de l'analyse des images a été effectuée en aveugle, à l'aide du logiciel ImageJ avec autant que possible des techniques semi-automatiques. Tous les paramètres liés à la microglie ont été analysés à partir du signal intrinsèque de la GFP.

III.1 Analyse morphologique de la microglie

L'analyse de la densité et du volume somatique microglial a été réalisée à partir de la pile d'images anatomique. Avant l'analyse de la séquence d'imagerie, les contrastes sur la totalité de la pile d'images sont homogénéisés par le plugin *Enhance Contrast*.

Pour quantifier la densité microgliale, l'ensemble des 50 μm de la pile d'images est projeté sur une seule image (**Figure 49**). A partir de la projection obtenue, le nombre de cellules microgliales est manuellement compté à l'aide du plugin Cell Counter et rapporté au volume analysé qui est toujours de 196 x 196 x 50 μm , permettant d'obtenir une valeur de densité.

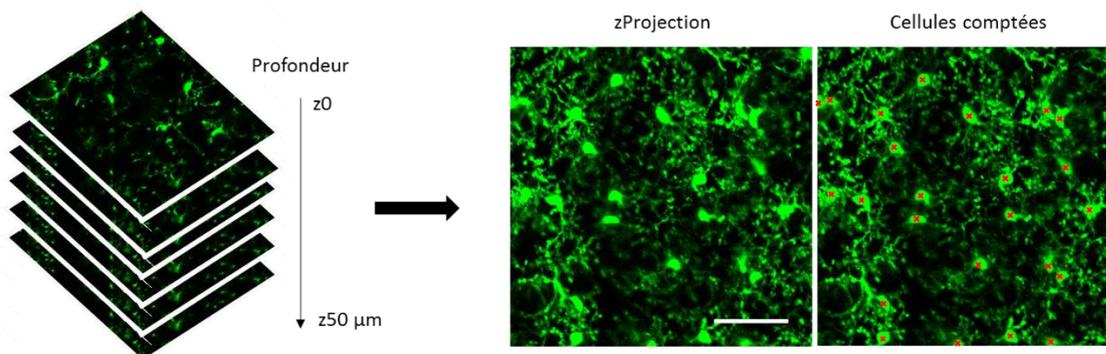


Figure 49. Analyse de la densité microgliale. A partir de la pile d'images anatomique, une image projetée est générée à partir de laquelle les cellules sont comptées. Barre d'échelle : 50 μm .

Le volume somatique de la microglie est mesuré en circonscrivant la surface de chaque corps cellulaire présent sur chaque image de la pile à l'aide d'un outil de seuillage d'intensité :

Threshold. Les cellules prises en compte pour cette analyse sont uniquement celles dont le corps cellulaire est entièrement présent au sein de la pile d'images (**Figure 50**). Chaque corps cellulaire sélectionné est isolé sur la pile binaire par le plugin *Crop*. Une analyse de particules est ensuite utilisée pour obtenir l'aire de chaque section du soma.

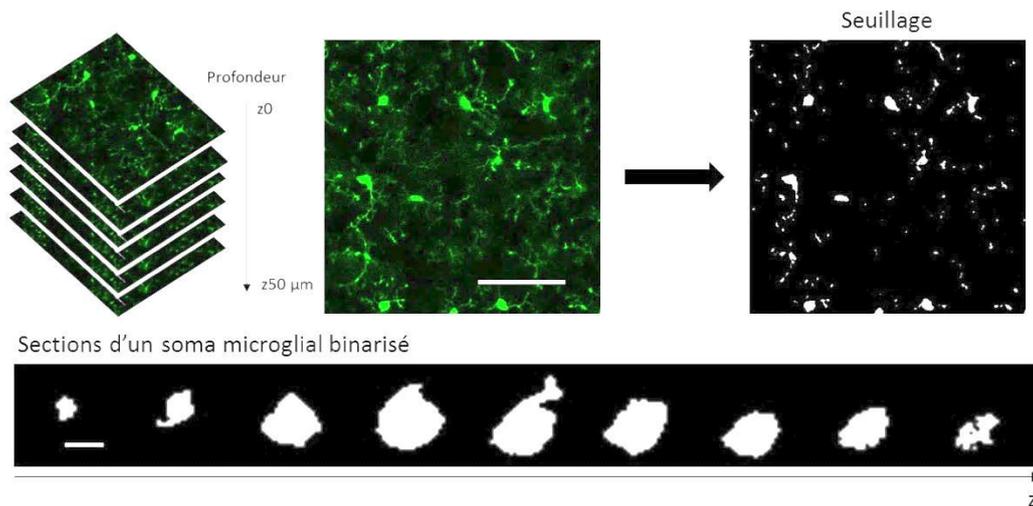


Figure 50. Analyse du volume somatique microglial. L'analyse des volumes somatiques se base sur le seuillage de chaque image de la pile anatomique et de la récupération de chaque soma sélectionné individuellement dans une autre pile d'images analysée. Barres d'échelles : 50 µm et 5 µm.

III.2 Analyse de l'activité spontanée et cicatricielle de la microglie

Les times lapse réalisés pour cette analyse sont tous recalés grâce au plugin *Recalage*, et homogénéisés en termes d'intensité par le plugin *Enhance Contrast*.

La motilité microgliale spontanée est mesurée uniquement sur les processus que l'on peut clairement observer en train de se rétracter ou de s'étendre durant l'acquisition. Chaque processus sélectionné est suivi individuellement. La formule suivante est utilisée pour calculer la motilité à l'échelle d'un unique processus : (longueur du processus au temps 2 - longueur du

processus au temps 1 $) / (\text{temps 2} - \text{temps 1})$). Les temps 1 et 2 correspondent aux deux temps limites pour lesquels un processus a sa taille minimale et maximale avant d'évoluer (**Figure 51**). La longueur du processus (t_2-t_1) est mesurée en plaçant manuellement une ligne sur la partie qui s'est étendue ou rétractée pendant l'imagerie.

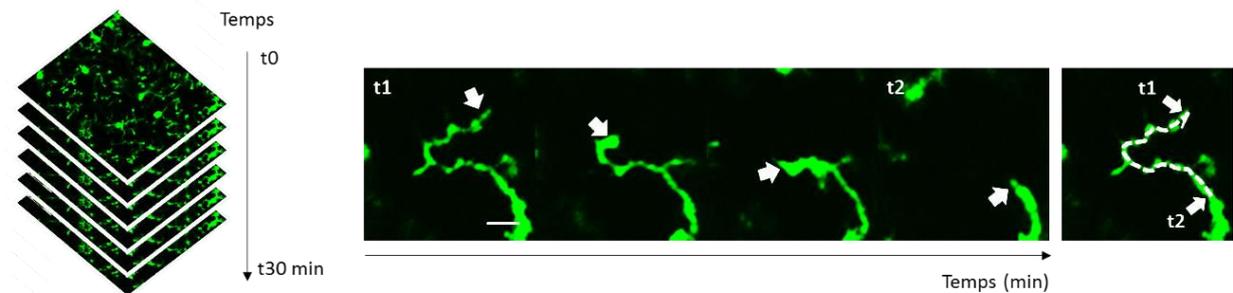


Figure 51. Analyse de la vitesse d'extension et de rétractation d'un processus microglial. L'analyse de la motilité se fait manuellement à l'échelle d'un unique processus à partir d'une imagerie time lapse. La longueur (t_2-t_1) correspond à la portion du processus qui a évolué entre les temps t_1 et t_2 . Barre d'échelle : $5 \mu\text{m}$.

L'activité de surveillance des cellules microgliales est quantifiée après seuillage de la première image du time-lapse et de la projection de l'ensemble des images prises pendant 30 minutes (**Figure 52**). Une aire est ensuite récupérée pour chacune des deux images seuillées permettant d'obtenir un coefficient directeur représentatif de la droite reliant l'aire recouverte à t_0 et l'aire recouverte par la microglie pendant 30 minutes. Ce coefficient directeur est représentatif de l'activité de scanning de la microglie (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Le coefficient directeur s'obtient à partir de l'aire du signal des processus microgliaux sur les images t_0 et $t_0 \rightarrow t_{30}$ minutes seuillées.

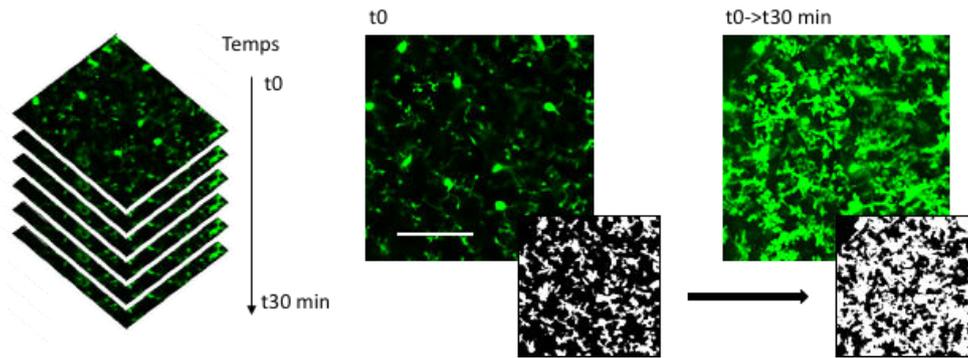


Figure 52. Analyse de la capacité de surveillance de l'espace extracellulaire par la microglie. L'analyse de la capacité de scanning de la microglie se fait à partir du time lapse de 30 minutes et se base sur la valeur d'un coefficient directeur calculé. Barre d'échelle : 50 μm .

L'activité de la microglie après microlésion induite par un laser focalisé a été mesurée selon deux paramètres différents : la taille de la cicatrice gliale formée au terme des 30 minutes de time-lapse et la réponse microgliale globale. La cicatrice microgliale est définie comme le site entourant la lésion induite par le laser et où les processus microgliaux s'accumulent. La taille de la cicatrice est quantifiée à la fin du time-lapse de 30 minutes par seuillage (**Figure 53**).

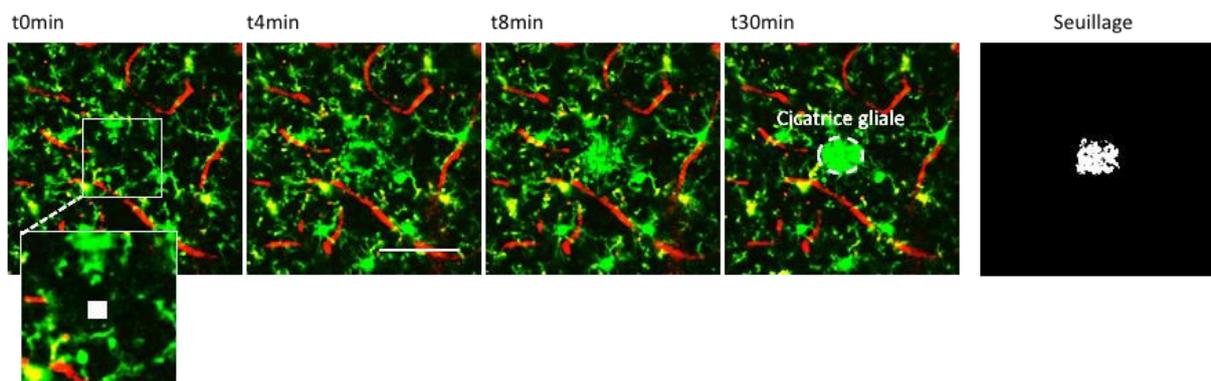


Figure 53. Induction de la lésion laser et quantification de la taille de la cicatrice microgliale. A t_0 , la microlésion est induite par focalisation du laser sur une zone de $4 \mu\text{m}^2$ (carré blanc) dépourvu de marquage microglial et de marquage vasculaire. L'image obtenue à 30 minutes est seuillée et nettoyée pour quantifier l'aire cicatricielle. Barre d'échelle : 50 μm .

Pour l'analyse de la réponse globale de la microglie, nous avons défini deux zones différentes appliquées à l'ensemble de la pile d'images : la zone interne X (rayon de 30 μm) et la zone externe Y (rayon de 70 μm) entourant le site lésé (**Figure 54**). La réponse globale de la microglie est définie comme la quantité de processus microgliaux entrant depuis la zone externe Y dans la zone interne X, en fonction du temps. Chaque image est seuillée pour tenir compte des différences d'intensité du signal entre les expériences. Ainsi, le signal GFP après seuillage correspond à une intensité de signal de 255 alors que l'espace extracellulaire correspond à une valeur d'intensité égale à 0. La réponse microgliale à un instant t est donnée par la formule suivante $R(t) = (R_x(t) - R_x(0)) / R_y(0)$ où $R_x(t)$ est l'aire couverte par la microglie dans la zone X au fil du temps et a été soustrait à $R_x(0)$ qui est l'aire du signal GFP mesurée dans la zone X de la première image prise immédiatement après la lésion. $R_y(0)$ correspond à la zone recouverte par la microglie dans la zone externe Y, immédiatement après la lésion. Ce dernier paramètre permet de prendre en compte la variabilité du nombre de cellules microgliales présentes au début de l'acquisition dans chaque expérience (Davalos *et al.*, 2005).

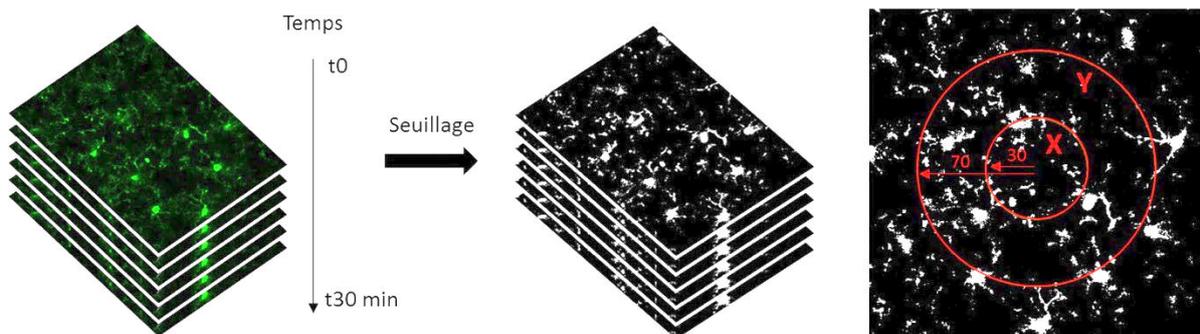


Figure 54. Analyse de la réponse microgliale à la lésion laser. *Après seuillage et binarisation du time lapse, les zones X et Y sont appliquées à l'ensemble de la pile d'images pour l'analyse de l'activité globale cicatricielle de la microglie.*

III.3 Analyse de la perméabilité vasculaire et de la réactivité vasculaire à des stimulations somatosensorielles

Le degré de perméabilité de la BHE est évalué par quantification du signal des marqueurs TRITC (70 kDa) et FITC (40 kDa) retrouvé dans l'espace extra-vasculaire. Ce signal est mesuré en calculant la valeur moyenne de niveau de gris sur l'ensemble de l'image obtenue après soustraction des images t20min et t0 (**Figure 55**). Ces images correspondent respectivement à l'image prise à 20 minutes et immédiatement après injection des marqueurs fluorescents.

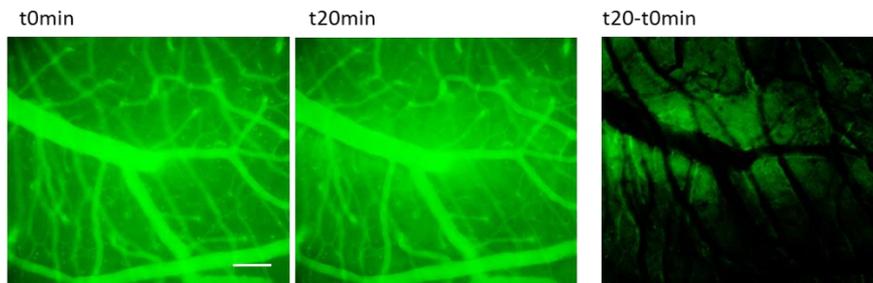


Figure 55. Analyse de la perméabilité vasculaire. *Pour quantifier la perméabilité vasculaire, l'intensité moyenne du niveau de gris est calculé sur l'ensemble de l'image t20min-t0. Barre d'échelle 100 μ m.*

Les analyses de réponse vasculaire aux stimulations somatosensorielles sont réalisées de la façon suivante : à partir de l'imagerie time lapse en 2D et à l'aide d'une macro développée sur ImageJ au laboratoire, 3 line scan de 3 sections artérielles éloignées sont extraits (**Figure 56**). Ces line scan sont seuillés de façon à distinguer les pixels correspondants au vaisseau (intensité = 255) de ceux qui correspondent à l'espace extravasculaire (intensité = 0). Une seconde macro développée au laboratoire est ensuite utilisée pour mesurer l'évolution du diamètre vasculaire au fil du temps.

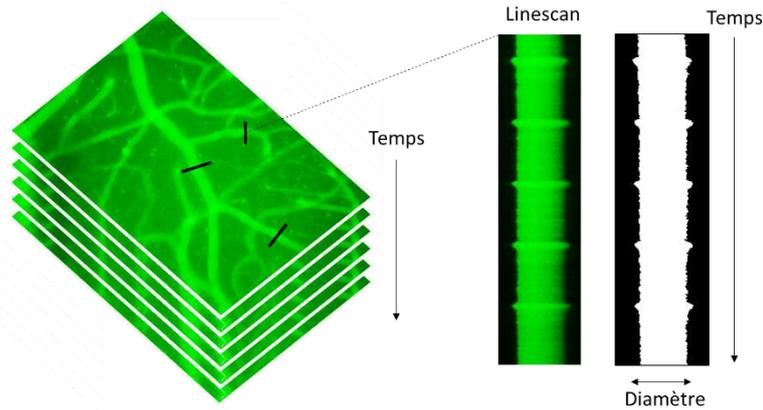


Figure 56. Analyse de la vasoréactivité des artères piemériennes. *Les line scan sont obtenus à partir de 3 sections artérielles de l'imagerie time-lapse 2D. Ces portions vasculaires sont choisies au hasard sur des branches artérielles si possible différentes.*

III.4 Analyse du volume d'infarctus ischémique

Le volume de l'infarctus corrigé de l'œdème est quantifié grâce à la formule décrite par Gerriets en 2004 (Gerriets et al., 2004) : $\% \text{HLV} = ((\text{HVC} - \text{HVi} + \text{LV}) / (\text{HVC})) \times 100$, où HLV est le volume de lésion ischémique corrigé de l'œdème, HVC est le volume hémisphérique controlatéral à la lésion ischémique, HVi le volume hémisphérique ipsilatéral et LV le volume brute de la lésion (**Figure 57**). L'ensemble de ces différents éléments sont manuellement délimités sur les imageries IRM pour chaque coupe de la pile.

IRM T2 – 24 heure post ischémie

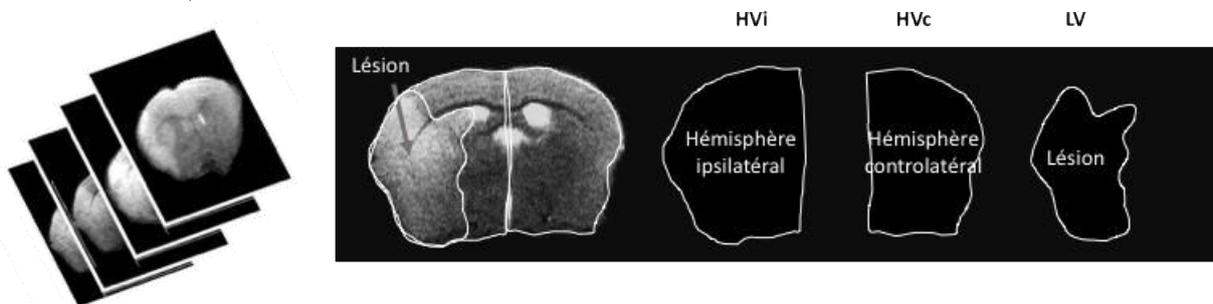


Figure 57. Analyse du volume lésionnel ischémique. *L'analyse du volume lésionnel corrigé de l'œdème se fait par circonscription manuelle de l'hémisphère ipsilatéral, de l'hémisphère controlatéral et du volume lésionnel sur chaque image de la pile obtenue en IRM.*

IV Analyse statistique

Toutes les expériences et les analyses de données ont été randomisées et effectuées à l'aveugle. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel JMP. Les analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées et suivi si nécessaire d'un test post-hoc HSD de Tukey ou du test t de Dunnett lorsque cela était approprié. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Résultats

. Résultats

I Etudes préliminaires de mise au point et de prise en main des modèles

I.1 Introduction

Initialement, le projet qui devait être développé dans ce travail de thèse devait consister en l'étude de l'impact de l'hypertension artérielle chronique sur l'unité neuro-gliovasculaire en microscopie biphotonique chez le primate non humaine

A causes de nombreux freins techniques le projet de thèse a été réorienté. La mise au point et le développement du projet initial est présenté dans ce premier chapitre de résultats.

Des études précliniques ont montré que l'HTA pouvait être à l'origine d'altérations structurelles et fonctionnelles des vaisseaux, favorisant l'apparition et l'aggravation de la lésion ischémique et de démences de type Alzheimer. Il a également été montré une altération de l'hyperhémie fonctionnelle chez les patients hypertendus. L'hyperhémie fonctionnelle est supportée par un mécanisme de couplage neurovasculaire qui permet la régulation quasi instantanée du diamètre vasculaire à la suite d'une stimulation neuronale pour adapter le DSC local. Au niveau de l'unité neurovasculaire, les astrocytes possèdent une position stratégique puisqu'ils connectent à la fois les neurones et le compartiment vasculaire. C'est en se basant sur ces observations que plusieurs études ont démontré que les astrocytes sont impliqués dans ces mécanismes de couplage. L'information transite depuis les neurones vers les vaisseaux en passant d'abord par les astrocytes comme composantes d'intégration du signal. Pour initier la réponse vasculaire, les astrocytes s'activent par un mécanisme calcium-dépendant, analysable en microscopie biphotonique *in vivo*.

I.2 Méthodologie et résultats

A l'origine, l'objectif de ces travaux de thèse était de mettre au point un protocole d'imagerie séquentielle chez un même animal permettant de suivre la cinétique d'évolution de l'HTA et de son impact sur le couplage neurovasculaire et notamment sur l'activité calcique astrocytaire.

Dans un premier temps, la mise au point d'un protocole pour l'analyse *in vivo* des astrocyte devait être réalisée chez le rongeur pour ensuite être adapté chez le marmouset, un petit primate non-humain. Ce protocole devait permettre une analyse longitudinale des astrocytes sur plusieurs mois chez un même animal.

Classiquement, le marquage astrocytaire pour l'imagerie *in vivo* est effectué selon le protocole initialement décrit par Nimmerjahn et collaborateurs 2004. Brièvement, après réalisation d'un volet crânien, le marqueur SR101 est déposé à la surface du cortex, laissé en place pendant 30 minutes, puis rincé. La fenêtre est ensuite refermée par une lamelle de verre et celée (**Figure 58**). Ce protocole est celui qui est le plus largement retrouvé dans la littérature pour l'étude du compartiment astrocytaire *in vivo*.

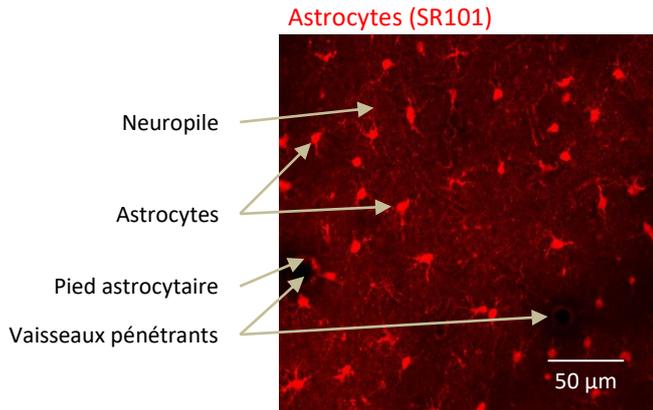


Figure 58. Morphologie des astrocytes du cortex cérébral révélée par le marquage au SR101. Image représentative réalisée en microscopie biphotonique *in vivo* révélant la disposition et la morphologie astrocytaire après un marquage spécifique au SR101 réalisé selon le protocole initialement décrit par Nimmerjhan. Ici, le SR101 est appliqué directement à la surface du cortex cérébral et rincé.

L'application du marqueur directement sur le cortex nécessite donc la réalisation d'une fenêtre ouverte (suppression d'une partie du crâne). La fenêtre est ensuite refermée par une lamelle de verre qui est ensuite celée par du ciment dentaire. Le marquage astrocytaire n'étant efficace que quelques heures, ce protocole ne permet de réaliser qu'une unique imagerie pour un animal donné.

Notre protocole nécessitait pourtant de réaliser une imagerie longitudinale sur le même animal sur plusieurs. Ainsi, nous avons dû mettre au point un système nous permettant de garder un accès permanent au cortex pour pouvoir appliquer à nouveau le marqueur astrocytaire avant chaque session d'imagerie. Pour cela, un modèle de fenêtre avec un accès en silicone par lequel injecter le marqueur (initialement décrit par Droome 2000) a été mise en place. Là encore, un volet crânien est réalisé et la fenêtre est refermée et celer par une lamelle en verre percée d'un petit trou rempli de silicone. Le silicone permet de garder la fenêtre étanche tout au long du protocole, tout en permettant, à cet endroit, de réaliser des injection du SR101 pour l'imagerie *in vivo*.

La fabrication de ce type de fenêtre est très délicate et a demandé plusieurs semaines de mis au point. Elle consiste à découper un premier disque de 3 mm de diamètre dans une lamelle en verre dans laquelle est réalisée un trou d'un demi millimètre sans casser ni fissurer la lamelle (**Figure 59**). Ce trou est ensuite comblé par du silicone. Un protocole détaillé pour la réalisation de ce modèle de fenêtre a été rédigé pour le laboratoire.

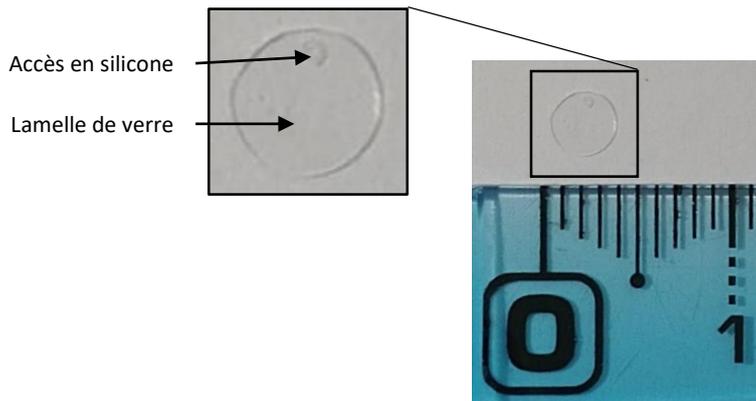


Figure 59. Modèle de fenêtre avec accès en silicone mis au point au laboratoire. *Dans une lamelle de verre, un premier disque d'environ 3 mm est découpé. Dans ce disque, un petit trou de 0.5 mm est délicatement réalisé à l'aide d'une fraise en faisant attention de ne pas fissurer la lamelle. Du silicone est ensuite déposé dans le trou, le silicone ne doit pas déborder sur la fenêtre en verre. L'injection se fait par l'accès en silicone.*

L'application du SR101 au travers du port en silicone a également demandé une mise au point importante. Avant l'imagerie, l'animal doit être positionné en cadre et une micropipette en verre étirée est utilisée à l'aide d'un cadre stéréotaxique pour l'injection du marqueur au travers du port en silicone. La difficulté technique réside dans la mise en place de la pipette qui doit être descendue exactement entre le silicone et le cortex, un espace très restreint (**Figure 60**).

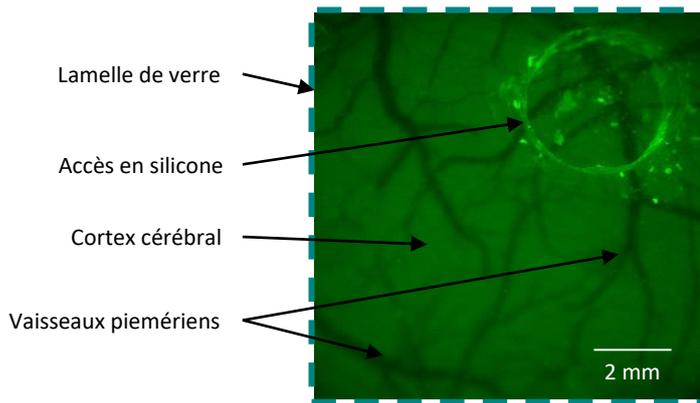


Figure 60. Disposition de la fenêtre avec accès en silicone installée au-dessus du cortex cérébral. Image réalisée en microscopie à fluorescence du cortex cérébral au niveau de la fenêtre. Le cortex apparaît en vert (autofluorescence). L'injection du marqueur doit se faire par l'accès en silicone sous lequel on observe des vaisseaux du cortex qui ne doivent absolument pas être lésés. Pour cela le marqueur doit être injecté précisément dans l'espace de quelques micromètres entre la fenêtre et le cortex.

Pour les quelques essais qui ont fonctionné, nous avons d'abord réalisé une imagerie à 30 minutes après injection du marqueur, qui est le délai normal d'incubation du marqueur (**Figure 61**). Toutefois, pour ce protocole le rapport signal/bruit obtenu ne permettait pas une bonne observation des astrocytes à cause d'un fort signal extracellulaire. Ce signal est la cause d'une impossibilité de rincer le marqueur avec ce dispositif. Ces résultats nous ont amené à réaliser des imageries plus tardives à 1h30 après injection du SR101. Ce délai nous a permis d'obtenir un signal satisfaisant pour l'analyse astrocytaire.

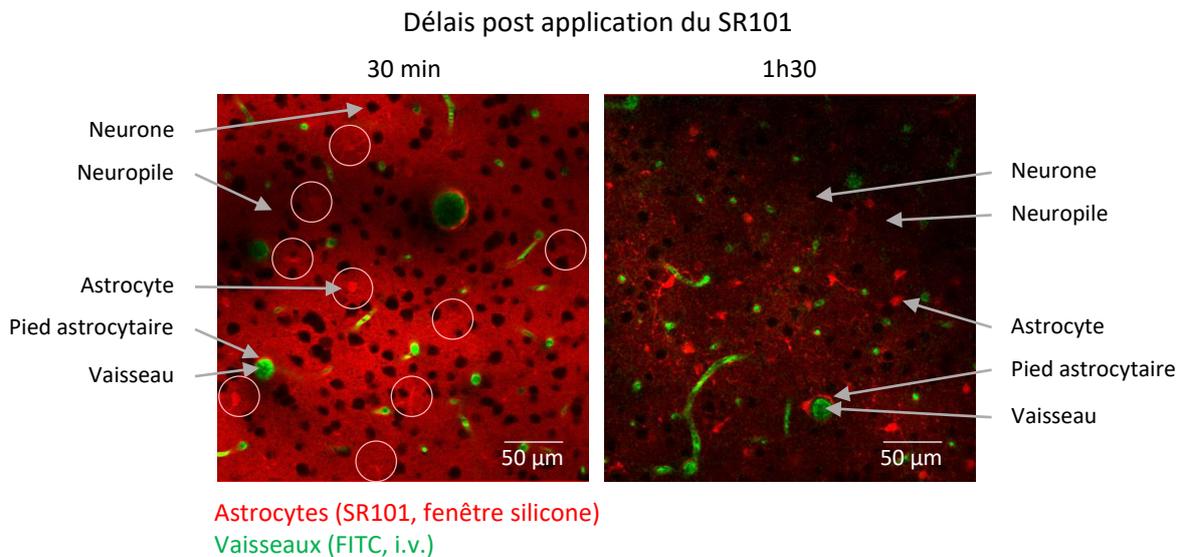


Figure 61. Images représentatives du signal cortical obtenu par le SR101 injecté au travers de la fenêtre avec accès en silicone. A 30 minutes post injection du marqueur spécifique des astrocytes, le rapport signal/bruit trop faible et ne permet pas d'observer correctement les cellules. A 1h30, le SR101 révèle différents types de structures cellulaires. Les astrocytes, ainsi que leurs prolongements apparaissent distinctement, le SR101 rentrent spécifiquement dans ces cellules dans lesquelles il s'accumule. Les neurones apparaissent par contraste. Les vaisseaux apparaissent en vert (injection rétro-orbitaire de FITC) et sont délimités par un signal rouge intense qui correspond aux pieds astrocytaires. Le neuropile est défini comme une région de la substance grise qui est occupée par plusieurs types de prolongements cellulaires (dendrites, axones, processus astrocytaires et microgliaux).

Malgré une extrême précaution prise pendant l'étape de mise en place de la pipette au travers de l'accès en silicone et au moment de l'injection du marqueur, la grande majorité des essais a mené à des dommages au cortex et/ou à la rupture de vaisseaux piémériens, ne garantissant plus la physiologie corticale et allant même parfois à rendre impossible l'imagerie (**Figure 62**).

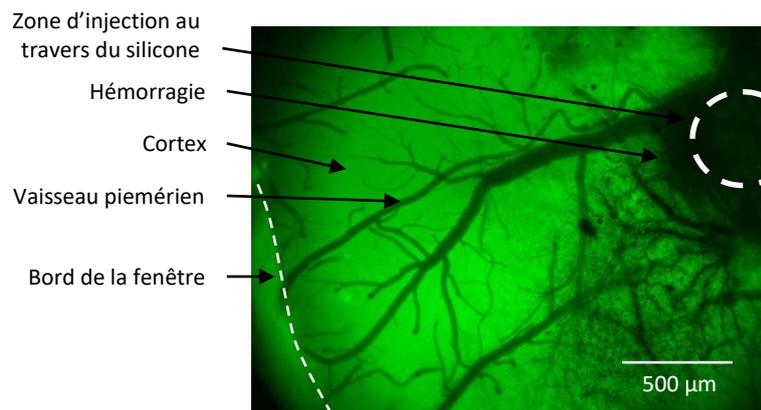


Figure 62. Exemple de lésion hémorragique provoquée par la mise en place de la pipette au travers de l'abord en silicone. Image du cortex cérébral réalisée en microscopie à fluorescence. Lors de la mise en place de la pipette, un vaisseau superficiel du cortex a été rompu ce qui a créé une hémorragie. Pour ce type d'acquisition, le cortex apparaît en vert (autofluorescence) et les érythrocytes présents dans les vaisseaux apparaissent en noir, ce qui permet de parfaitement voir la lésion hémorragique. Bien que certaines zones du cortex ne semblent pas affectées, une telle hémorragie menace l'intégrité d'une large zone corticale, l'animal correspondant ne peut pas être inclus dans un protocole.

Au vu d'un trop grand nombre d'échecs dans la réalisation de l'injection du marqueur après la pose de la fenêtre, nous avons conclu que ce modèle de fenêtre pour l'application tropicale d'un marqueur n'est pas optimal.

Par la suite, 3 autres types d'approches de marquage astrocytaire cortical pour l'imagerie biphotonique *in vivo* ont été essayés (**Figure 63**).

Nous avons tenté l'administration du marqueur par :

- voie intracisternale
- voie intra-cérébroventriculaire
- voie intra-veineuse, ce protocole avait été décrit dans la littérature (Appaix *et al.*, 2012)

- voie intra-veineuse co-injecté avec du mannitol, permettant la perméabilisation transitoire de la BHE

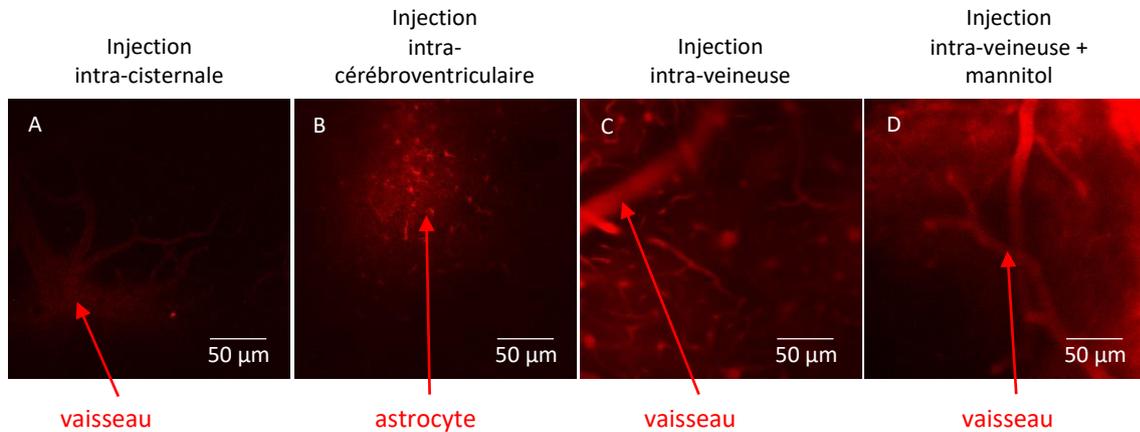


Figure 63. Images représentatives du type de signal obtenu par les différents types d'injection du marqueur SR101. **A.** L'injection intracisternale permet d'observer très légèrement les gros vaisseaux corticaux de surface. **B.** L'injection intracérébroventriculaire marque un certain nombre d'astrocytes de façon hétérogène et non reproductible entre les expériences. **C.** L'injection intraveineuse ne permet pas de marquer les astrocytes, le marqueur reste dans le compartiment vasculaire. **D.** L'injection de mannitol en intraveineux ouvre transitoirement la BHE. Le SR101 est ensuite injecté de la même façon. Ce protocole permet de faire sortir une partie du marqueur du compartiment vasculaire vers le parenchyme de façon hétérogène et ne permet pas d'observer les cellules astrocytaires malgré un délai d'une heure après injection du marqueur.

Aucune de ces voies d'administration n'a permis un marquage reproductible, homogène et analysable du compartiment astrocytaire. Nous en avons donc conclu que dans nos conditions, la meilleure façon de marquer le compartiment astrocytaire était le protocole initialement décrit par la réalisation d'un volet crânien permettant une application et une incubation tropicale du marquage suivi d'un rinçage avant l'imagerie.

Nous avons ainsi choisi de réorienter notre étude et d'analyser la cinétique de mise en place de l'HTA et de son impact sur la physiologie cérébrale en se rapportant à un marqueur de l'état inflammatoire du cerveau : la microglie. Nous avons tiré parti de la souche transgénique

CX3CR1^{+/GFP} pour réaliser l'imagerie des cellules microgliales intrinsèquement marquées par l'expression spécifique de la GFP (Hierro-Bujalance *et al.*, 2018). Ainsi, ce protocole ne nécessite pas l'application corticale de marqueur. Pour cette étude nous avons pu mettre au point un modèle de fenêtre crânienne fermée par affinage de l'os, permettant de laisser en place la dure-mère et le crâne (Drew *et al.*, 2010; Shih *et al.*, 2012). Il a en effet été montré que ce modèle, s'il est parfaitement réalisé, permet de garantir la physiologie corticale, à l'inverse du modèle de fenêtre ouverte, qui stimule la réactivité gliale et modifie la dynamique de renouvellement des épines dendritiques localement au niveau du cortex, pendant plus de 4 semaines après la mise en place du dispositif (Xu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010).

Nous avons de nouveau été confrontés à une limite méthodologique, puisque passée une semaine après installation de la fenêtre crânienne par affinage de l'os, l'imagerie corticale de la microglie n'était plus possible à cause de l'opacification du dispositif (**Figure 64**). Ce phénomène est décrit dans la littérature et serait dû à différents facteurs : la repousse du crâne, l'épaississement de la dure-mère et très probablement une opacification de la colle utilisée. Il semblerait que dans notre modèle, ce phénomène apparait très précocement comparativement à ce qui avait été décrit (Drew *et al.*, 2010; Shih *et al.*, 2012).

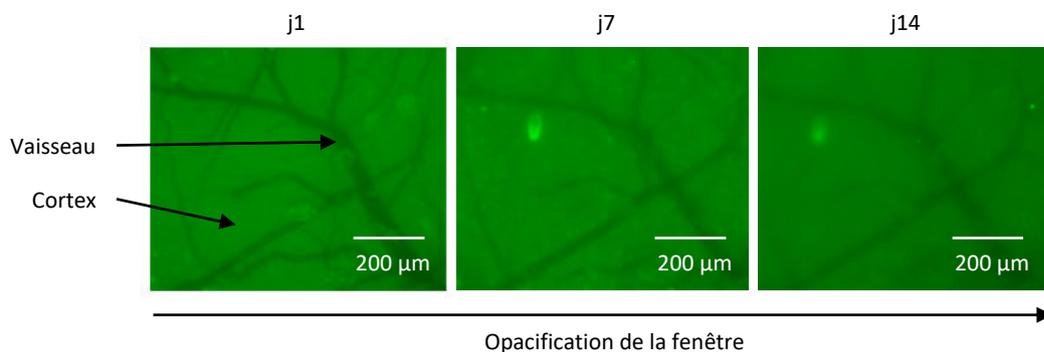


Figure 64. Images représentatives de l'opacification du modèle de fenêtre par affinage de l'os. Les images sont acquises en microscopie à fluorescence à j1, j7 et j14 après mise en place de la fenêtre. L'opacification empêche de réaliser une imagerie de bonne qualité passée 1 semaine.

En conséquence, nous avons essayé différents types de colles pour fixer la lamelle de verre, différentes épaisseurs de crâne fraisé, différentes techniques de fraisage et nous avons également tenté de polir le crâne (avec de la poudre d'oxyde de fer) avant la pose de la fenêtre. Ces différents essais n'ont pas été concluants et nous avons donc dû renoncer à réaliser une imagerie séquentielle sur plusieurs semaines pour le suivi de l'évolution de l'HTA.

En parallèle, nous avons amélioré le système de fixation de l'animal pour l'imagerie biphotonique *in vivo* (**Figure 65**). La stabilisation de la tête de l'animal doit être parfaite pour réaliser une imagerie analysable à l'échelle d'un punique processus microglial. A l'origine, lors de la mise en place de la fenêtre, deux écrous étaient collés au crâne. Ces écrous, étaient eux même fixés à des vis d'un système de cadre pour stabiliser et orienter la tête de l'animal en dessous de l'objectif du microscope. Pour raffiner ce dispositif relativement encombrant, nous avons mis au point un système de stabilisation basé sur des barres d'oreille et des barres de dent beaucoup moins invasif pour l'animal.

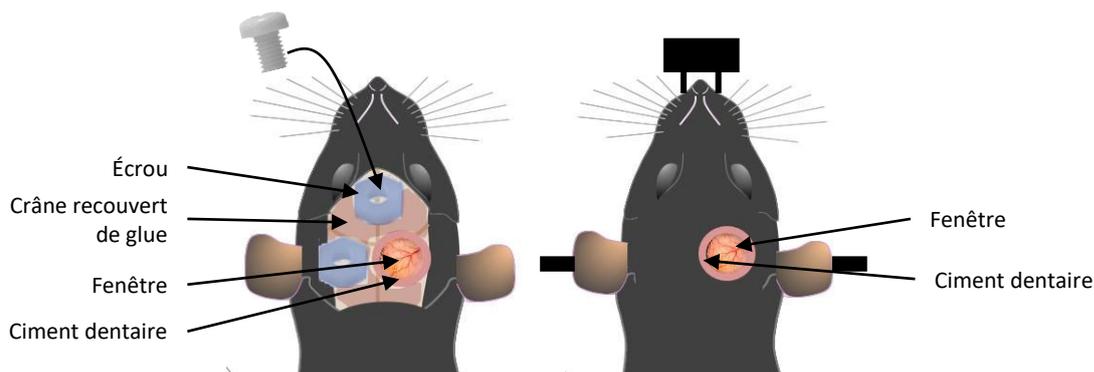


Figure 65. Schéma représentatif du système de stabilisation de l'animal. *A gauche est représenté le système de fixation initial. Les 2 écrous sont fixés au crâne par de la glue. Ce dispositif nécessite de retirer le scalp sur une grande partie du crâne. Le système que nous avons mis en place permet de stabiliser suffisamment la tête de l'animal pour réaliser une imagerie intravitale à l'échelle cellulaire et est très peu invasif.*

I.3 Conclusion

L'objectif initial de ces travaux était d'analyser la cinétique de mise en place de l'HTA et de son impact sur le mécanisme de couplage neurovasculaire. Le protocole devait consister à réaliser une imagerie biphotonique séquentielle *in vivo* des astrocytes sur un même animal pendant plusieurs mois.

Ainsi, nous avons d'abord mis un point un modèle de fenêtre avec un accès au cortex. Ce modèle devait nous permettre de réaliser des applications répétées du marqueur astrocytaire le SR101.

Dans la majorité des cas, la procédure de mise en place d'une pipette pour l'injection du marqueur entraînait des lésions corticales et vasculaires rendant l'imagerie impossible. Nous avons donc tenté d'autres approches pour marquer les astrocytes, des procédures d'injection intracisternal, intracérébroventriculaire, intraveineuse et intraveineuse associée à une pré-injection de mannitol pour l'ouverture de la BHE. Aucune de ces voies d'accès n'a permis d'obtenir un marquage satisfaisant des astrocytes. Nous en avons conclu que le meilleur protocole pour l'analyse des astrocytes était celui décrit dans la publication originale par application du marqueur directement à la surface du cortex.

Nous avons finalement réorienté le projet scientifique pour nous intéresser à l'analyse du compartiment microglial et à l'impact de l'hypertension artérielle chronique sur l'état inflammatoire du cortex cérébral. Pour cette étude, des souris transgéniques pour lesquelles l'observation *in vivo* des cellules microgliales est permise par un marquage intrinsèque des cellules ont été utilisées.

Les modèles de fenêtres ouvertes classiquement utilisés dans la littérature et qui consistent en la suppression d'une partie du crâne, ont été montrés comme délétères pour la

physiologie corticale et stimulant l'inflammation. Nous avons donc mis au point un modèle de fenêtre crânienne par affinage de l'os du crâne qui est renforcé par de la glue et une lamelle de verre. L'objectif initial était de réaliser une imagerie longitudinale sur le même animal et ainsi étudier la cinétique de mise en place de l'HTA et de son impact sur le cortex cérébrale. L'opacification très précoce de la fenêtre a empêché de réaliser l'imagerie longitudinale.

Enfin, le travail de mise au point du protocole *in vivo* nous a amené à raffiner le dispositif initial de stabilisation de la tête de l'animal. Ce dispositif est un point essentiel du protocole puisque l'imagerie *in vivo* à l'échelle d'une cellule nécessite une stabilisation parfaite de la tête de l'animal.

L'ensemble de ces travaux préliminaire a donné lieu à l'étude qui est présentée dans le chapitre suivant et qui a fait l'objet d'un papier soumis dans le journal JCBFM.

II Analyse *in vivo* de la dynamique microgliale en contexte d'hypertension artérielle chronique

L'HTA est le principal facteur aggravant des lésions ischémiques cérébrales. De précédentes études ont montré l'existence d'une inflammation cérébrale dans des modèles précliniques d'HTA. Cette inflammation a notamment été caractérisée par une réactivité microgliale accrue associée à un phénotype pro-inflammatoire dans ces régions. L'existence d'une telle inflammation dans le cortex, zone cérébrale particulièrement touchée lors d'un AVC n'a encore jamais été étudiée, avant le déclenchement de dommages ischémiques. Toutefois, cette question est d'intérêt majeur dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'HTA et dans la compréhension de l'aggravation des lésions ischémiques chez les patients hypertendus. En effet, bien qu'ayant un rôle de protection du système nerveux central, la microglie est connue pour être impliquée dans l'aggravation de lésions cérébrales en contexte ischémique.

Sur la base de l'utilisation de deux modèles d'HTA bien décrits dans la littérature, à savoir l'hypertension rénovasculaire (induite par la sténose d'une l'artère rénale, 2K1C) et l'hypertension essentielle (induite par infusion chronique d'angiotensine-II, AngII), nous avons analysé pour la première fois l'activité des cellules microgliales dans le cortex intact *in vivo* en utilisant la microscopie biphotonique en contexte d'HTA.

To be submitted to Journal of Cereb Blood Flow Metab

Angiotensin-II causes dramatic alteration on microglia functions under arterial hypertension

Author(s): Elisa Grimoin^a, Laurent Chazalviel^a, Carole Brunaud^a, Myriam Bernaudin^a, Omar Touzani^{a,*}.

^aNormandie Univ, UNICAEN, CNRS, CEA, ISTCT/CERVOxy group, GIP Cyceron, 14000 Caen, France

***Author for correspondence:**

Prof. Omar TOUZANI

CERVOxy group, ISTCT unit, GIP CYCERON, Bd Henri Becquerel, BP5229, 14074 CAEN Cedex, FRANCE.

Phone : 33 (0) 2 31 47 02 73

E-mail: touzani@cyceron.fr

Running headline:

Hypertension and microglia dynamics

II.1 Abstract

Chronic arterial hypertension (HTN) is highly prevalent and is well known to be the most aggravating factor for stroke. Nonetheless, the definitive mechanisms responsible for HTN-induced effects on the brain are not completely resolved. It has been reported that HTN is associated with a systemic inflammation. However, whether HTN can promote brain inflammation that may sensitize brain tissue to a vascular insult, has not been definitively established. This issue is of importance since the understanding of how HTN affects the brain before the onset of permanent damage may open new avenues to prevent exacerbated brain damage after stroke in hypertensive subjects. Here, based on the use of two different well described models of HTN, namely renovascular hypertension (induced by renal artery stenosis, 2K1C) and essential hypertension (induced by infusion of angiotensin-II, AngII), we analysed the impact of HTN on the dynamics of microglia in the intact cortex *in vivo* using two-photon microscopy. We found that HTN, induced by AngII but not by 2K1C, dramatically modified the morphology of microglia and reduced its motility in the resting state, as well as following an induced inflammation by lipopolysaccharide (LPS) administration. Furthermore, the ability of microglia to react to a cortical microlesion was significantly impaired in AngII-induced HTN. Those changes in microglia were associated with alterations in blood brain barrier (BBB) permeability and functional hyperemia, as well as to increased stroke-induced brain damage. These findings demonstrate that before stroke onset, AngII-induced HTN provokes alterations in cortical microglia functions which may underlie the susceptibility of hypertensive subjects to exaggerated ischemic damage.

Key words: hypertension, microglia, angiotensin-II, stroke, renovascular hypertension, essential hypertension, two photon microscopy

II.2 Introduction

HTN is an insidious disease which affects more than a quarter of the adult worldwide population. Its incidence, still increasing, is expected to reach 29 % in 2025¹⁻³. Although great efforts in prevention and treatment, HTN remains a dramatic socioeconomic burden worldwide. HTN is a major risk factor for several diseases¹. The brain is one of the principal target organs for which HTN is recognized as the major risk factor for stroke, vascular cognitive impairment and Alzheimer's disease⁴⁻⁷. The effects of HTN on stroke and vascular cognitive impairment are often attributed to its impact on the cerebral circulation⁷. Indeed, it is well known that HTN induces structural alterations of the brain vasculature (i.e. hypertrophic and/or eutrophic remodelling of vessels), which facilitate vascular occlusions and compromise cerebral perfusion (for review, see Pires *et al.*, 2013⁸). Also, HTN impairs the function of cerebral blood vessels such as endothelium-dependent relaxation and cerebrovascular autoregulation⁷.

Alike several other pathologies, HTN has been linked to vascular inflammation⁹⁻¹¹. Several investigations have correlated the presence of HTN with elevated levels of circulating inflammatory markers, cytokines, and antibodies¹²⁻¹⁴. This inflammation is believed to cause and/or sustain blood pressure elevation and promote end-organ damage⁹. In the brain, the great majority of the available studies have focused on the link between HTN and inflammation in the brain stem and the circumventricular organs, where are located structures involved in the regulation of blood pressure¹⁵. Those studies demonstrated that the circulating angiotensin-II and the resident microglial cells are critical actors which contribute to the installation and the development of cerebral inflammation under HTN.

Nonetheless, the evolution of inflammation in regions that are primarily affected by stroke, such as the cortex has been less analysed. This issue is crucial as it remains important to understand how HTN affects the brain before the onset of permanent damage. Therefore, we

have focused, in the present paper, on the impact of HTN on inflammation in the cerebral cortex and examined HTN-induced changes in microglia, a surrogate marker of inflammation.

Microglia is the resident immune cells of the brain. Each microglial cell is responsible for its own non-overlapping domain and is very sensitive to local variations in its environment¹⁶. It displays a large variety of shapes and functions to adapt to these environmental changes. The quiescent or ramified microglia is not dormant and uses its highly motile processes to guarantee an exhaustive continuous screening of the entire extracellular space^{17,18}. Microglia is known to participate to the maintenance of the brain tissue homeostasis¹⁹ but is also able to exacerbate brain damage and functional impairment²⁰. As an example, during the first hours after ischemic stroke onset, microglia assumes an amoeboid reactive phenotype and has the potential to produce pro-inflammatory cytokines and neurotoxins, which promote neuronal death, blood brain barrier (BBB) permeability and macrophage infiltration^{21,22}.

To address our hypothesis in that HTN drives cortical inflammation and induces a “primed” inflammatory state prior to a cerebrovascular event, we took advantage of transgenic CX3CR1^{GFP/+} mice, which selectively express green fluorescent protein (GFP) in microglial cells, and therefore, can be imaged *in vivo* by two-photon microscopy²³. In these mice, HTN was induced according to two models namely renovascular hypertension (2K1C) and chronic infusion of angiotensin-II (AngII)^{24,25}. The former mimics renovascular hypertension and the latter mimics essential hypertension²⁶. Although these two models display an overstimulation of the renin-angiotensin-aldosterone system, the kinetics of development of HTN as well as the levels of circulating angiotensin-II are increased in the AngII model of hypertension^{27,28}.

II.3 Materials and Methods

Twenty weeks CX3CR1^{GFP/+} male mice were used for this study. They were purchased from Charles River Laboratories (L'arbresle, France) and were reproduced at Centre Universitaire de Ressources Biologiques (Caen, France). All experiments were performed at Cyceron platform (Caen, France, agreement: FA-118-001). The procedures were approved by the Ethic Committee for Animal Research (CENOMEXA, #10579) and data are reported according to ARRIVE guidelines.

II.3.1 Induction of hypertension

Animals were anesthetized with 5 % isoflurane (in an O₂/N₂O mixture) for induction and 2 % during the surgical procedure. The body temperature was maintained around 37 °C using a heating pad. Chronic renovascular hypertension was induced by the two-kidney one-clip method (2K1C) as previously described²⁹. Briefly, 10 minutes before surgery, mice received an analgesic (Tolfedine 4 %, 0.1 ml/kg, intraperitoneally) and the right renal artery was isolated through a 1 cm flank incision. An U-shaped silver clip with a 0.2 mm wide opening was placed around the artery to induce vascular stenosis. Then, muscles and skin layers were sutured and xylocaine (5 %) was applied locally. Sham mice underwent the same surgical procedure without clip placement.

In the angiotensin-II chronic infusion model (AngII) and as described previously³⁰, HTN was induced by subcutaneous implantation of an osmotic minipump (Alzet 2006, Charles Rivers) to deliver angiotensin-II (1000 ng/kg.min) for 6 weeks.

II.3.2 Arterial pressure measurements

Systolic blood pressure (SBP) measurements were performed in awake mice with the tail cuff method (BP-2000, Visitech). SBP was measured before and every week after the

induction of HTN. In each session, mice were subjected to 15 consecutive measurements in a black warm restraint chamber. During each session, the five first measures were discarded.

II.3.3 Cranial window procedure

The cranial window was performed 6 to 8 weeks after HTN induction, according to the approach described by Shih and colleagues³¹. Briefly, under 2 % isoflurane (in an O₂/N₂O mixture), Sham and hypertensive mice (2K1C and AngII) were placed in a stereotaxic frame and a small region (2 x 2 mm) of the cranial bone over the somatosensory cortex was meticulously thinned to ~50 μm with a high-speed drill. A drop of cyanoacrylate glue (Loctite-414, SEFI, Caen) was placed on the thinned region and a cover glass was used to cap the glue in order to reinforce the thinned skull window. This cranial window model was chosen because it does not alter the intracranial pressure and does not induce inflammation³².

II.3.4 Two-photon microscopy imaging

After 6 to 8 weeks of HTN, animals were separated in two different groups according to the following protocol (**Fig. 1**). In both, Group 1 and Group 2, *in vivo* two-photon microscopy imaging was performed 24 hours after the cranial window implantation. Animals were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (50 mg/kg body weight) and xylazine (5 mg/kg body weight), this regimen of anesthesia is known to preserve vascular reactivity compared to isoflurane³³. Animals were fastened in a homemade apparatus under Leica DM6000 two-photon microscope (Cyceron platform, Caen, France).

In Group 1, *in vivo* imaging was performed after 100 μl retro-orbital injection of TRITC-dextran fluorescent dye (70 kDa, 10 mg/ml) (Sigma-Aldrich) to visualize the cortical vascularization. A 25x/0.95 Water HCX IRAPO objective was used at a zoom of 3.0 and laser excitation wavelength was centered to 900 nm for GFP-labeled microglia and TRITC

simultaneously. Images were acquired using low laser power (< 30 mW at the sample). All images were 196 x 196 μm . As no difference in microglia morphology was observed throughout the cerebral cortex, we restrict the depth of imaging to the first 50 μm under the pial surface. Following a cortical 3D microglial cells morphology imaging at a z-spacing of 0.99 μm , a time-lapse imaging session was performed (during 30 minutes with 5.16 seconds image spacing) to analyze spontaneous microglia motility. Subsequently and in order to examine the reaction of microglia to a microlesion, a focused laser beam (as a spot of 4 μm^2 , with a laser power of 50 mW) was applied during 20 seconds in an area devoid of GFP-labelled microglia nor TRITC-labelled vessels. Immediately after the induction of the microlesion, a 30 minutes time-lapse imaging was performed (5.16 seconds image spacing). This imaging protocol was reproduced 24 hours later, to examine whether HTN alters the microglia reactivity to lipopolysaccharide-induced brain inflammation. LPS serotype 0127:B8 (Sigma; 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in sterile saline) was intraperitoneally administrated 3 hours before the onset of two-photon imaging.

In Group 2, fluorescent microscopy was used to analyse the degree of BBB permeability after a retro-orbital injection of a small-size (FITC, 40 kDa, 150 μl) and large-size (TRITC, 70 kDa, 150 μl) fluorescent-dye mixture. GFP (480-green) and N21 (555-red) fluorescent filters were used to visualize both dyes. Images were taken at t0 and at t20 minutes after injection of dyes. Afterwards, the vascular reactivity to somatosensory stimulations was imaged. Under the microscope, whiskers were deflected (5 Hz) using an air-puff stimulator during 5 stimulation blocks (20 seconds on, interspaced by 40 seconds off). Time-lapse session (1 Hz) was performed under N21 (555-red) fluorescent filter to visualize the vascular compartment labeled with previously injected TRITC-dextran.

II.3.5 Induction of ischemic stroke

Ischemic stroke was induced by transient intraluminal middle cerebral artery occlusion as previously described³⁴. Briefly, 10 minutes before surgery, mice received an analgesic (Tolfedine 4 %, 0.1 ml/kg, intraperitoneally). Then, under 2 % isoflurane (in an O₂/N₂O: 30/70 mixture), a 1 cm midline neck skin incision was made and the carotid arteries were exposed. A 6-0 monofilament suture (length: 20 mm, final tip diameter: 0.23 ± 0.02 mm, coating length: 2-3 mm) (#602323PK10, Doccol Corporation) was introduced into the internal carotid, via the external carotid, to occlude the stem of the right middle cerebral artery (MCA). The filament was removed 45 minutes later for reperfusion, skin was sutured and xylocaine (5 %) was applied locally. Animals were then allowed to recover from anesthesia.

II.3.6 Magnetic resonance imaging examinations

Magnetic resonance imaging (MRI) examinations (7T, PharmaScan®, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) were performed 24 hours following stroke induction. Each animal was anaesthetized with isoflurane (2 % in O₂/N₂O: 30/70) and underwent a T2-weighted imaging with a rapid acquisition with refocused echoes (RARE) sequence (RARE factor of 8; TR/TE = 5000/16.25 milliseconds; number of experiments (NEX) = 2; 20 contiguous slices; acquisition time = 4 minutes; nominal resolution = 0.15 x 0.15 x 0.75 mm³). The volume of infarction was manually delineated and was corrected for edema as previously described by Gerriets and colleagues³⁵: % HLV_c = ((HV_c - HV_i + LV)/(HV_c)) x 100, where HLV_c is the hemispheric lesion volume, HV_c the contralateral hemispheric volume, HV_i the ipsilateral hemispheric volume and LV the volume lesion.

II.3.7 Brain slices preparation

At the end of the protocol, after being deeply anaesthetized with isoflurane 5 % in O₂/N₂O: 30/70 mixture, mice were transcardially perfused with heparinized saline followed by

paraformaldehyde (PFA, 4 %). Brains were removed and left in the PFA during 24 hours and then left in the sucrose (30 %) for 48 hours. Slices (30 μ m) were obtained with a freezing microtome. Fluorescent imaging was performed based on the intrinsic GFP expression in CX3CR1^{GFP/+} mice.

II.3.8 Image processing

Image processing was performed using ImageJ software. All the parameters related to microglia were analyzed based on the intrinsic GFP signal in a blind manner. To quantify the microglia density from two-photon images, maximum intensity projections of z-series were created. The number of microglial cells was manually counted using ImageJ Cell Counter plugin. The microglia soma volume was measured by circumscribing the cell body area using an intensity threshold tool. On brain slices, microglia density, cell body size, process area was also analyzed using the same plugins and the number and the length of microglia branches were manually assessed. *In vivo* microglia motility was measured only on extended or retracted processes which were individually traced according to Nimmerjahn *et al.*, 2005¹⁸. The following formula was used: $(\text{length of process at time2} - \text{length of process at time1}) / (\text{time2} - \text{time1})$. Time1 and time2 respectively correspond to the last times at which a process has its minimal and maximal size before it evolves. Microglia sampling activity was quantified by the use of a threshold plugin on the first image of the time-lapse series and on the cumulative projection of all images taken during 30 minutes. The microglia-covered area measured between t0 and t30 minutes provided a coefficient which is representative of the microglia survey activity.

The motility of microglia after laser-induced microlesion was measured under 2 different parameters: the global microglial response to the local injury and the microglial scar size. Two different areas were defined, the inner area X (30 μ m radius) and the outer area Y

(70 μm in radius) surrounding the ablation site. The global microglia response was defined as the number of microglial processes entering from the outer area Y, into the inner area X as a function of time. Every image was thresholded to account for signal intensity differences between experiments so that entire microglial cells had the maximum value and the extracellular space was set to 0. The microglial response at any time is given by $R(t) = (R_x(t) - R_x(0)) / R_y(0)$ where $R_x(t)$ is the area covered by microglia in the X zone over time and was compared with $R_x(0)$ which is the first image taken immediately after the ablation in the X zone. $R_y(0)$ corresponds to the area covered by microglia in the outer area Y, immediately after the ablation. This last parameter allows one to account for the variability in the number of microglial cells imaged in each experiment¹⁷. The microglia scar was defined as the site surrounding the laser injury, where microglia processes accumulate. The scar area was measured at the end of the 30 minutes time-lapse using intensity threshold plugin. The degree of BBB permeability was analyzed from the degree of extravascular TRITC dye signal. This signal was quantified by calculating the mean grey value on the entire image obtained after subtraction of t20min and t0 images. The analysis of the diameter of pial arterioles after somatosensory stimulations was performed by extracting arteriolar cross section line scan from 2D time-lapse images. Afterward, an intensity threshold plugin and a home-made macro were used to measure the vascular diameter over the time.

II.3.9 Statistical analyses

All experiments and data analyses were performed in blind and randomized manners. Results are represented as mean \pm standard error of the mean (SEM). ANOVA followed by HSD's test or Dunnett's t-test were employed when necessary. P values < 0.05 were considered statistically significant.

II.4 Results

II.4.1 Arterial hypertension induced organs damage

As expected, in the two models employed, namely 2K1C and AngII, mice had elevated SBP compared to normotensive controls (**Table 1**). Post-hoc analyses indicated that the SBP was increased on post operated week (POW) 2, and remained high up to POW6-8. No statistical difference in blood pressure values was found between 2K1C and AngII mice. Further, mice subjected to 2K1C developed atrophy of the right clipped kidney, hypertrophy of the left non-clipped kidney (**Table 2**). 2K1C and AngII mice developed cardiac hypertrophy, but no difference in body weight were measured compared with control mice (**Table 2**).

II.4.2 AngII-induced hypertension altered microglia morphology

Using 3D *in vivo* two-photon microscopy and brain slice fluorescent imaging, we analysed the density and the morphology of cortical microglia. In normotensive animals, microglial cells had an average density of 11074.3 ± 424.2 cells per mm^3 with a soma volume of $516.5 \pm 20.8 \mu\text{m}^3$ (**Fig. 2B and C**). Microglia branches area was $1056.1 \pm 112.1 \mu\text{m}^2$ and covered a 21-fold larger area compared to that covered by the soma (**Fig. 2D**). The first order branches, which emerged from the soma were few in number, in average 4.1 ± 0.6 per cell (**Fig. 2E**). In renovascular hypertensive mice, the density and the morphology of microglial cells were similar to normotensive animals (**Fig. 2A-E**). In contrast, AngII hypertensive mice displayed an enlargement of microglia soma volume (**Fig. 2C**) with a reduction of the microglia covered branches area compared to normotensive mice (mean of $831.0 \pm 83.6 \mu\text{m}^2$ and $726.1 \pm 76.6 \mu\text{m}^2$ respectively, $p = 0.051$, t-test) (**Fig. 2D**).

To examine whether HTN alters the microglia reactivity in conditions of induced inflammation, we subjected the animals to LPS injection 3 hours before imaging (**Fig. 1**). As

expected, in normotensive animals, LPS induced an increase of cell density and cell body volume with an average of 17847.9 ± 961.6 cells per mm^3 and $1132.5 \pm 82.0 \mu\text{m}^3$ respectively (**Fig. 2B and C**) and was associated with a reduction of area of branches which were more numerous (mean of $487.5 \pm 64.4 \mu\text{m}^2$ and 6.2 ± 0.3 processes per cell respectively) (**Fig. 2D and E**). These changes were also found in renovascular hypertensive mice after LPS treatment (**Fig. 2A-E**). In contrast, in AngII hypertensive mice, neither the cell density, nor the soma volume, nor process morphology and number were modified under LPS (**Fig. 2A-E**). These data show that AngII-induced HTN altered the microglia morphology and the microglia morphological reactivity to LPS-induced inflammation.

II.4.3 AngII-induced hypertension modified the spontaneous motility of microglia

Because microglia is the main brain housekeeper and continuously samples its microenvironment, we quantified the motility of microglia processes at the single-cell scale (**Fig. 3A**). In normotensive mice, the speed of extension was lower than that of the retraction, with an average of $1.0 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{min}$ vs $1.9 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{min}$ respectively (**Fig. 3B**) (**Movie 1 and 2 in Supplemental material**). In 2K1C hypertensive mice, the process speed motility was comparable to that observed in normotensive mice (**Fig. 3B**). In contrast, in AngII-induced HTN, microglial cells displayed a reduced velocity in extension/retraction of processes, although not statistically significant (**Fig. 3B**).

Following LPS administration, both the extension and the retraction of the processes were slower in control and 2K1C mice although this did not reach the level of statistical difference (**Fig. 3B**). Nonetheless, in AngII mice, the motility of the microglial processes was not modified after LPS administration (**Fig. 3B**).

To analyse the global space surveyed by the microglia processes, we quantified the cumulative area sampled by microglial cells during 30 minutes (**Fig. 4A**). This area was similar in normotensive and 2K1C mice (**Fig. 4B**). However, in AngII mice, the area sampled by microglia was reduced by 36 % ($p < 0.05$; **Fig. 4B**). Following administration of LPS, the relative area scanned by microglia was significantly reduced in both normotensive and 2K1C mice (**Fig. 4B**). Nevertheless, in AngII mice, the surface sampled by microglial cells was not modified after LPS treatment (**Fig. 4B**).

Overall, the data clearly show that AngII-induced HTN but not 2K1C dramatically altered the spontaneous microglial scanning activity and the microglial response to LPS treatment.

II.4.4 AngII-Induced hypertension altered microglia reactions to cortical microlesions

Microglia is also capable to initiate a prompt reaction to a brain injury. In order to analyse this reaction, a highly localized microlesion was induced by a focused laser on the cortex (**Fig. 5A**). The surface of microglial scar formed after 30 minutes following the induction of the lesion was $568.9 \pm 55.7 \mu\text{m}^2$ in normotensive mice and was comparable to that quantified in hypertensive 2K1C mice (**Fig. 5B**). In contrast, in AngII-hypertensive mice, the surface of the microglial scar was reduced to $398.0 \pm 73.7 \mu\text{m}^2$ (**Fig. 5B**). Moreover, the kinetics of the formation of the scar was significantly reduced in AngII (**Fig. 5C**).

AngII is then responsible for reduction of microglia efficiency to react to local microlesion induction.

II.4.5 AngII-induced hypertension altered the BBB permeability and reduced the vascular reactivity to whisker stimulation

Because HTN is known to induce organ damage, especially on the vascular compartment, we evaluated the impact of 2K1C and AngII on BBB permeability. Pial vessels were imaged *in vivo* after simultaneous retro-orbital injection of a small-size (FITC, 40 kDa) and large-size (TRITC, 70 kDa) fluorescent dyes. We quantified the degree of dyes leakage at 20 minutes post injection (**Fig. 6A**). In normotensive animals, no extravasation was observed, whether with the large size TRITC dye or with the small FITC dye (**Fig. 6B**). Similarly, 2K1C HTN did not modify the permeability of the pial arterioles to 70 or 40 kDa dextran compared to control mice (**Fig. 6B**). Nonetheless, in AngII hypertensive mice, an increase of extravascular signal was detected following FITC (40 kDa) administration (**Fig. 6B**). These results indicate that AngII-induced HTN altered BBB permeability.

Further, we examined the impact of HTN on pial arterioles dilation in response to whisker stimulation, i.e. functional hyperemia. In control mice, vascular dilatation measured immediately after somatosensory stimulation reached a maximal amplitude of 11.0 ± 2.6 % of the baseline (**Fig. 6C**). In 2K1C mice, arteriolar dilatation was preserved but shortened in comparison to Sham mice (**Fig. 6C**). Nevertheless, in AngII animals, there was a pronounced reduction of whisker stimulation-induced arteriolar dilatation (maximal amplitude of 4.0 ± 2.1 % of the baseline) (**Fig. 6C**).

Those results show that AngII-induced HTN reduced functional hyperemia.

II.4.6 Ischemic brain lesion is increased in AngII-induced hypertension

In control mice, ischemic brain lesion was in average 16.3 ± 2.5 % (**Fig. 7B**). The volume of infarction was increased, although without statistical significance, in 2K1C mice (**Fig. 7B**) (mean of 25.6 ± 3.5 %). In AngII hypertensive mice, however, the volume of stroke-induced lesion was significantly exacerbated compared to normotensive control mice and reached 29.4 ± 3.9 % of the ipsilateral hemispheric volume (**Fig. 7B**).

Those results indicate that HTN induced by chronic infusion of high dose of angiotensin-II increases the brain sensibility to ischemic stroke.

II.5 Figures

Figure 1

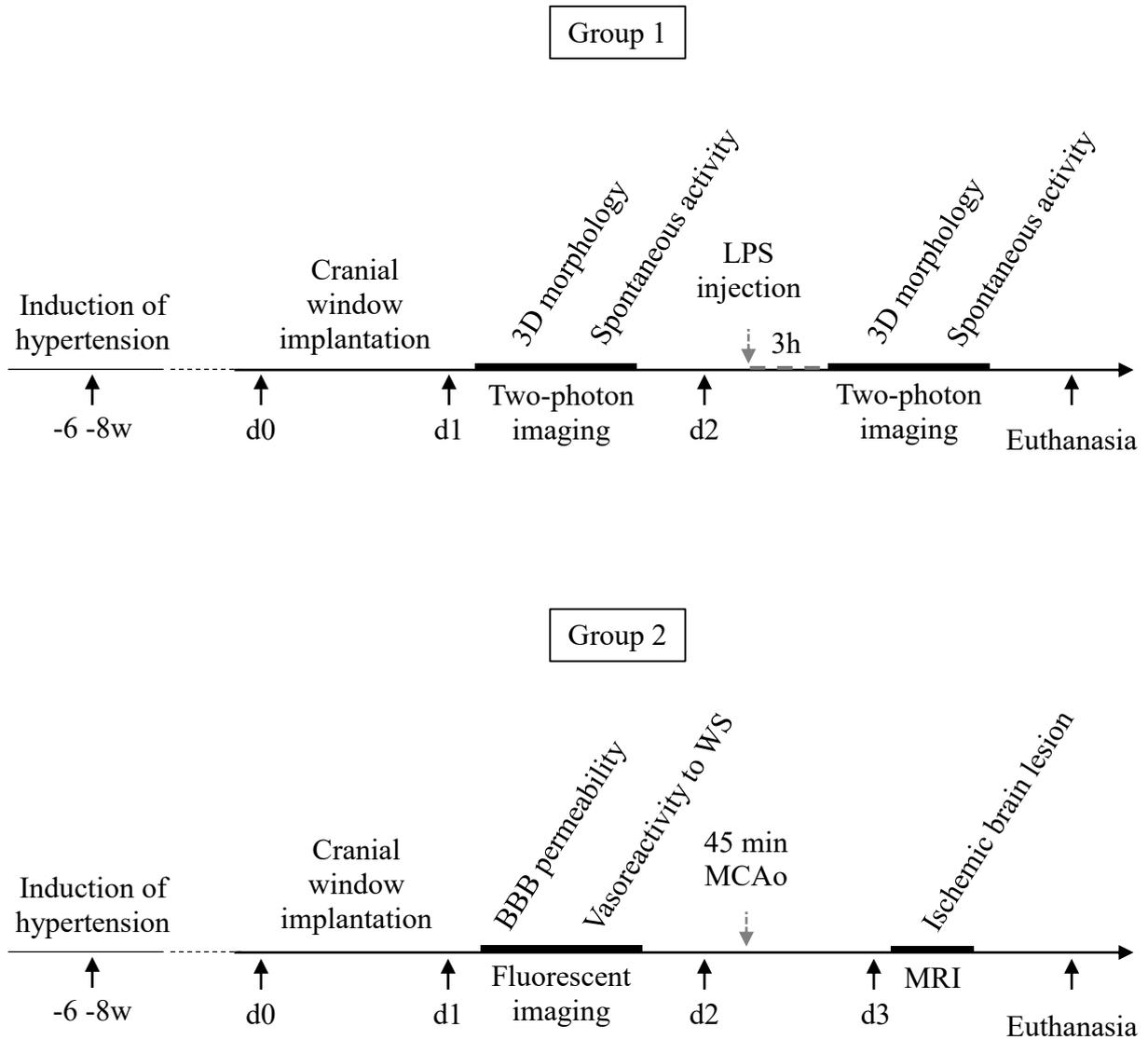


Figure 1. *In vivo* imaging experimental protocol

2K1C and AngII HTN were induced 6 to 8 weeks before *in vivo* imaging sessions. All animals were subjected to weekly measurement of blood pressure. After cranial window implantation, the imaging protocol in Group 1 (N = 46; normotensive: n = 20; 2K1C: n = 19; AngII: n = 7) corresponded to 3D microglia morphology, spontaneous and lesion activity analysis with or without LPS treatment. In the Group 2 (N = 19; normotensive: n = 7; 2K1C: n = 6; AngII: n = 6), we analyzed blood brain barrier (BBB) permeability and the cortical reactivity to whisker stimulation (WS) followed by the MRI analysis of ischemic brain volume lesion after 45 minutes of middle cerebral artery occlusion (MCAo).

Table 1

Table 1. Systolic blood pressure values in normotensive, 2K1C and AngII mice

	Normotensive	2K1C	AngII
SBP day 0	108.9 ± 2.5	109.2 ± 1.9	105.9 ± 4.2
SBP week 2	104.5 ± 3.1	122.0 ± 3.0*	142.7 ± 3.6*
SBP week 4	109.8 ± 3.3	136.3 ± 4.0*	146.8 ± 5.1*
SBP week 6	107.6 ± 2.1	133.6 ± 2.5*	149.4 ± 3.6*

Systolic blood pressure (SBP, mmHg) was measured in conscious mice by the tail-cuff method in normotensive (n = 12), 2K1C (n = 25) and AngII (n = 15) mice. Values are mean ± SEM, *(p < 0.05) normotensive vs 2K1C or normotensive vs AngII mice.

Table 2

Table 2. Weights of body and organs in normotensive, 2K1C and AngII mice

	Normotensive	2K1C	AngII
Body weight, g	27.8 ± 0.3	28.7 ± 0.4	27.4 ± 0.3
Heart, mg	161.4 ± 6.1	210.1 ± 14.5*	203.0 ± 6.4*
Cardiac weight index, mg/g BW	5.80 ± 0.2	7.3 ± 0.5*	7.3 ± 0.1*
Kidney right, mg	201.1 ± 8.5	124.0 ± 27.4*	203.0 ± 12.6
Kidney right relative, mg/g BW	7.2 ± 0.26	4.3 ± 0.9*	7.4 ± 0.5
Kidney left, mg	184.9 ± 6.6	289.0 ± 24.2*	178.4 ± 7.4
Kidney left relative, mg/g BW	6.6 ± 0.2	10.0 ± 0.8*	6.5 ± 0.3
Right kidney/left kidney ratio	1.1 ± 0.1	0.5 ± 0.1*	1.1 ± 0.1

Values, obtained at 6-8 weeks after the induction of hypertension are means ± SEM, BW indicates body weight. In 2K1C model, the right renal artery was subjected to stenosis. *(p < 0.05) normotensive (n = 10) vs 2K1C group (n = 12) or normotensive vs AngII (n = 10).

Figure 2

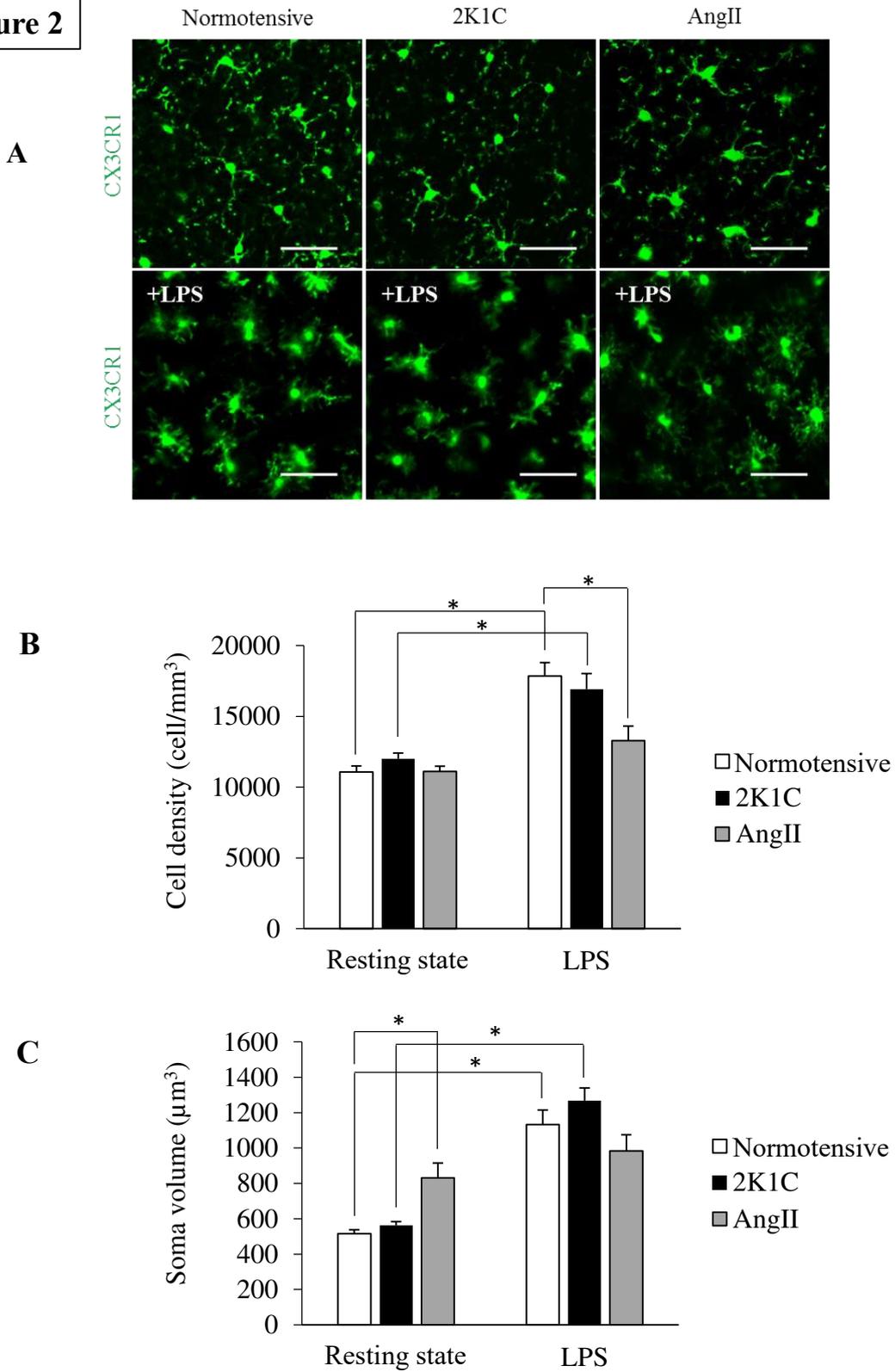
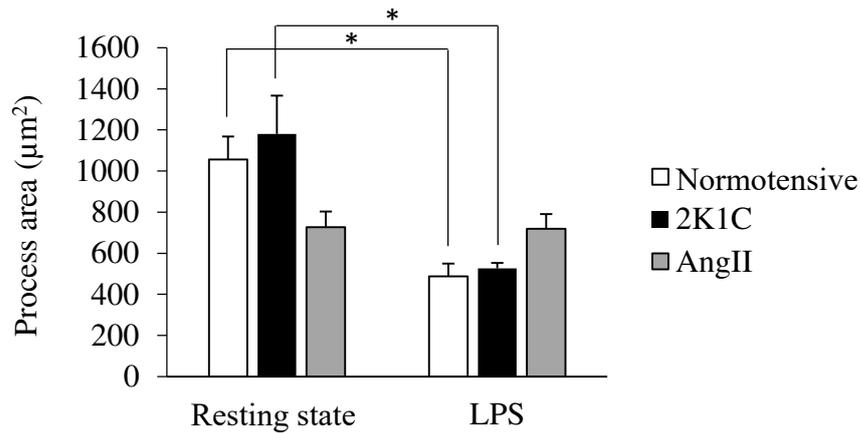


Figure 2

D



E

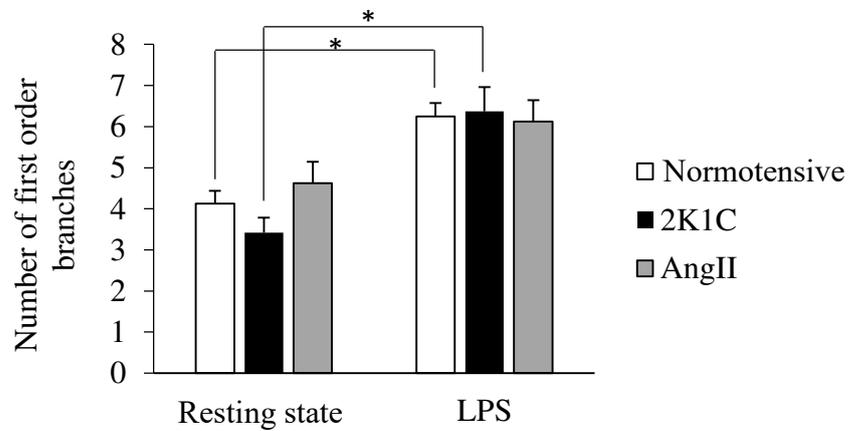


Figure 2. Effects of 2K1C- and AngII-induced hypertension on microglia phenotypes

A. Representative two-photon CX3CR1-microglia micrographs of normotensive (n = 20), 2K1C (n = 19) and AngII mice (n = 7), without and 3 hours after LPS injection. Scale bar: 50 µm. **B.** The quantitative results of microglia density and **C.** cell soma volume. **D.** Microglia process area and **E.** process number were used to assess changes in morphology in normotensive (n = 4), 2K1C (n = 4) and AngII mice (n=4). Values are mean ± SEM, *(p < 0.05).

Figure 3

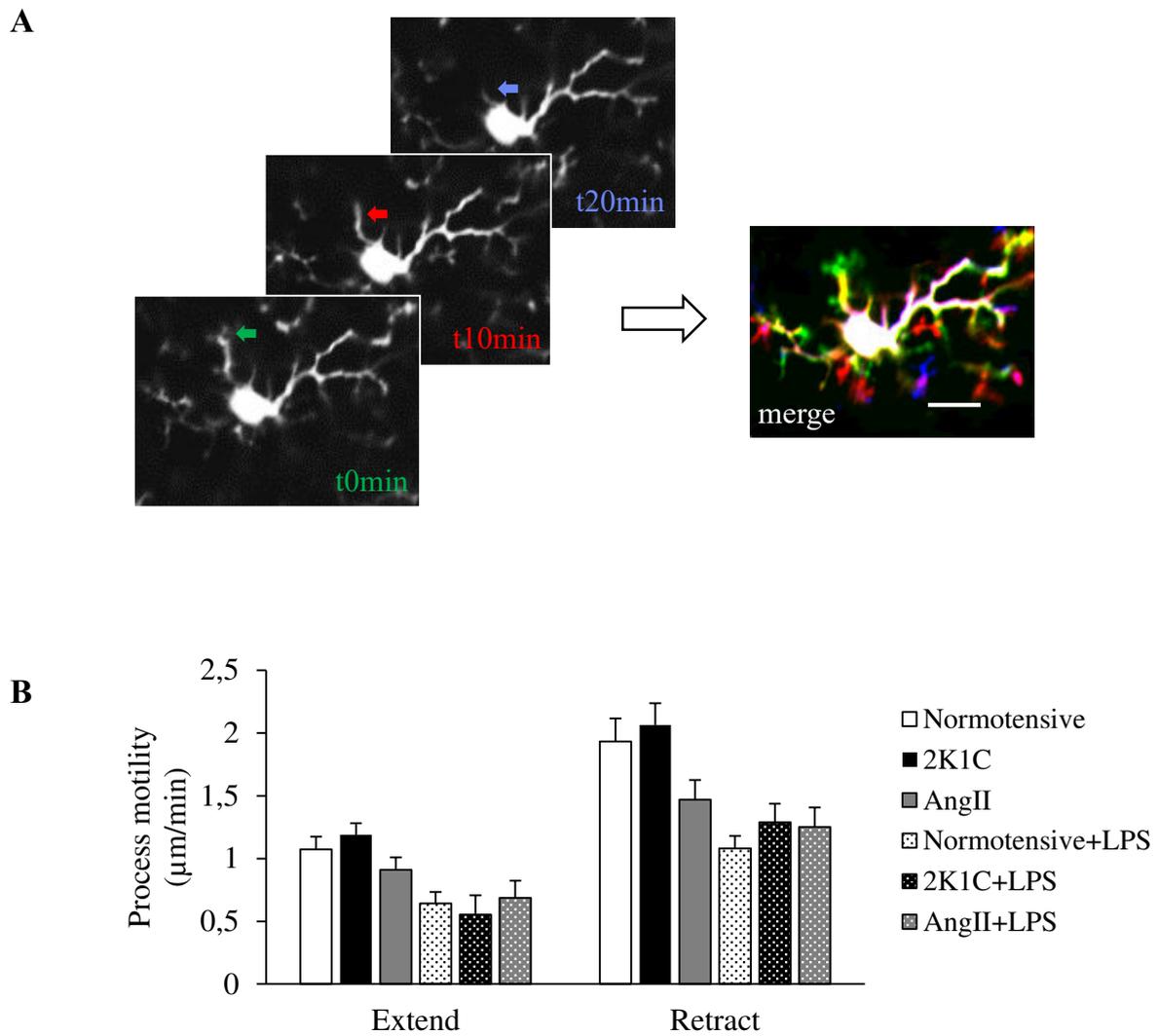
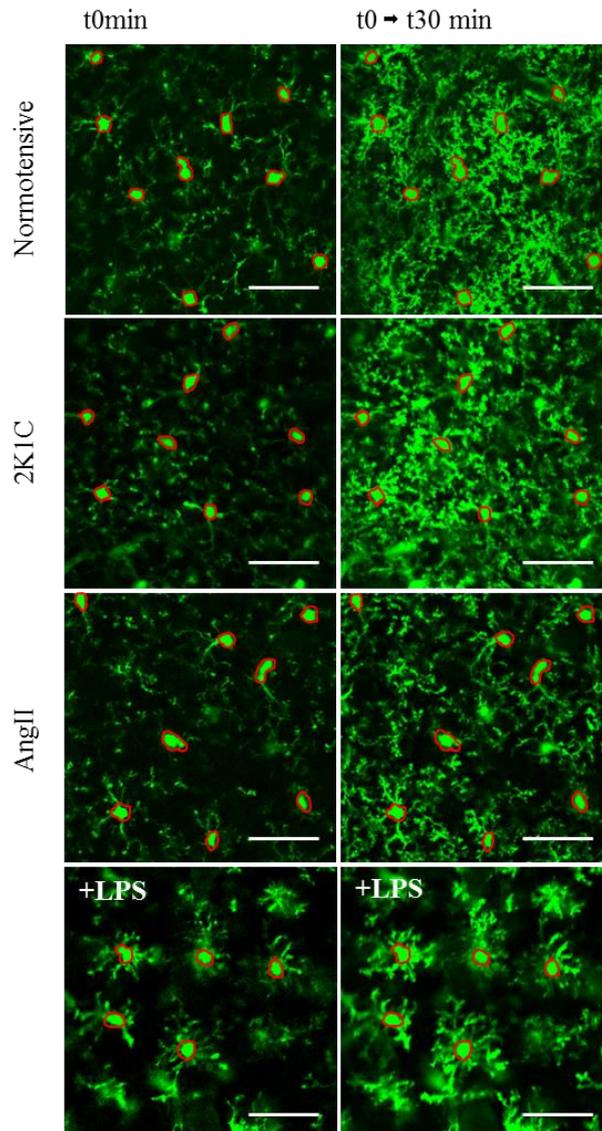


Figure 3. Effects of 2K1C- and AngII-induced hypertension on microglia spontaneous motility
A. Upper panel shows individual microglial cell (50 μm below the pia) at the beginning, 10 minutes and at 20 minutes of the transcranial time-lapse recording. Arrows point to motile process which is retracting. Overlay shows extension and retraction of processes over the time course of 20 minutes. Scale bar: 10 μm . **B.** Quantitative results of process length change speed in normotensive ($n = 20$), 2K1C ($n = 19$) and AngII mice ($n = 6$). Values are mean \pm SEM.

Figure 4

A



B

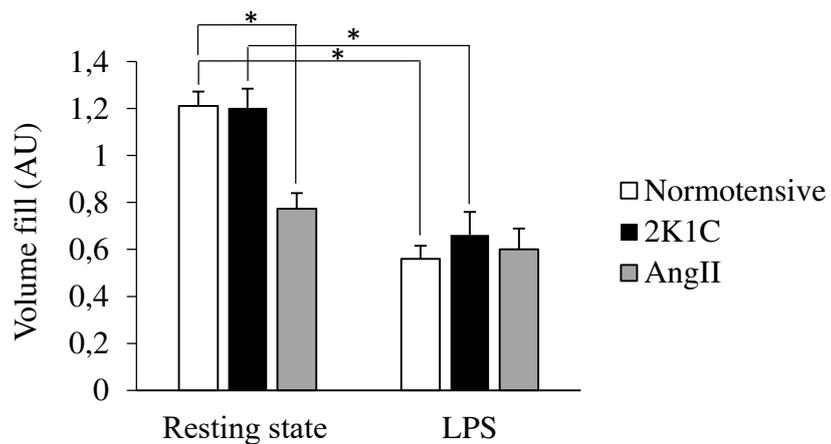
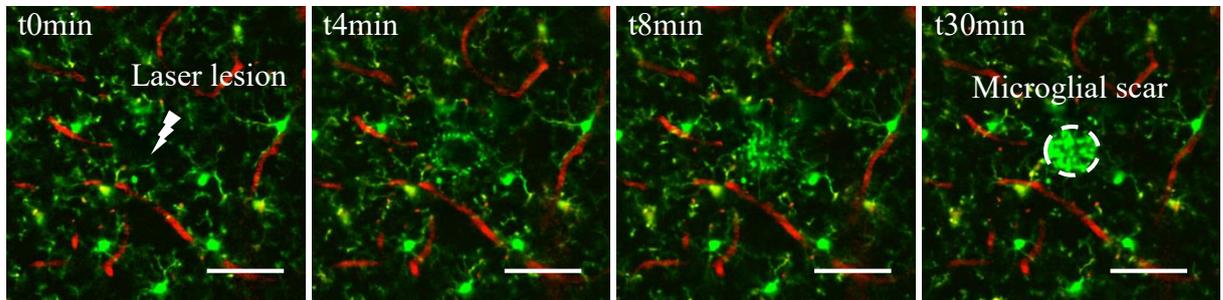


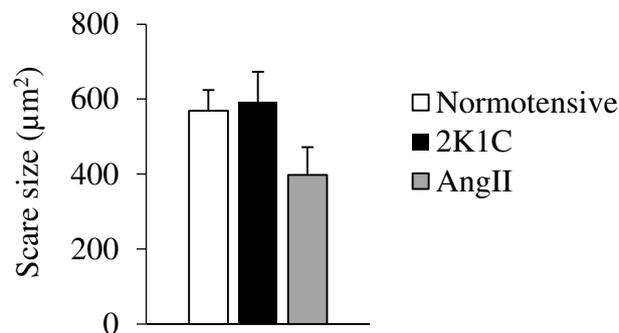
Figure 4. Effect of 2K1C- and AngII-induced hypertension on microglia microenvironment survey
A. Representative images illustrating cumulative extracellular volume sampling, in normotensive, 2K1C and AngII in resting state of under LPS treatment. Initial images at time t0 (left). Cumulative projections at a later time point, t30 minutes (right). Scale bar: 50 μ m. **B.** Quantitative results of microglial scanning activity in normotensive (n = 14), 2K1C (n = 16) and AngII mice (n = 6). Values are mean \pm SEM, *(p < 0.05).

Figure 5

A



B



C

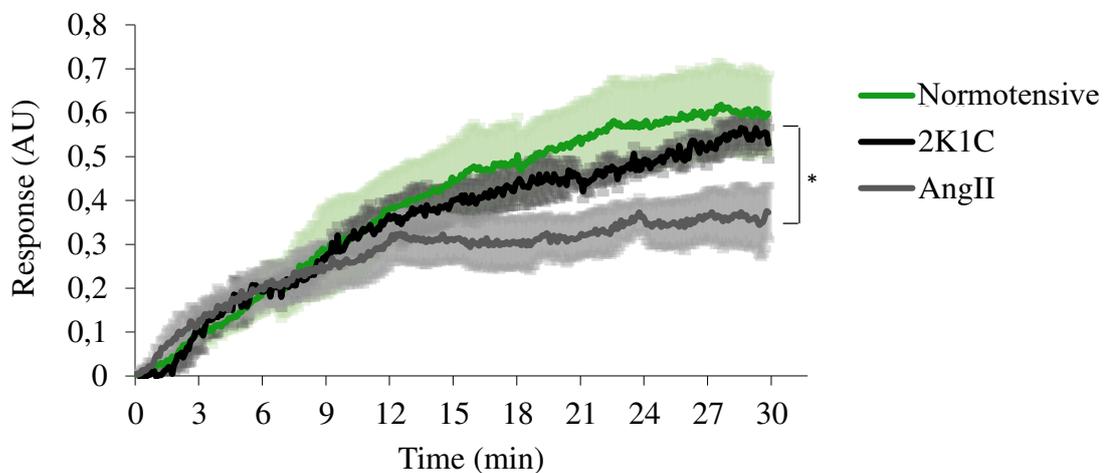


Figure 5. Effects of 2K1C- and AngII-induced hypertension on microglia response to brain microlesion

A. Representative two-photon CX3CR1-microglia micrographs before, 4, 8 and 30 minutes after a targeted laser-induced microlesion. TRITC-70 kDa (red) was injected shortly before imaging to visualize vessels and then to avoid inducing microhemorrhage. Scale bar: 50 µm. **B.** Histograms show the quantitative results of scar size in normotensive (n = 11), 2K1C (n = 10) and AngII mice (n = 6). **C.** Detailed kinetics of microglial response over 30 minutes in normotensive (n = 4), 2K1C (n = 4) and AngII (n = 4) are represented in the panel below. The plateau represents the converging processes which have reached and contained the damage. Values are mean ± SEM, *(p < 0.05) normotensive vs AngII.

Figure 6

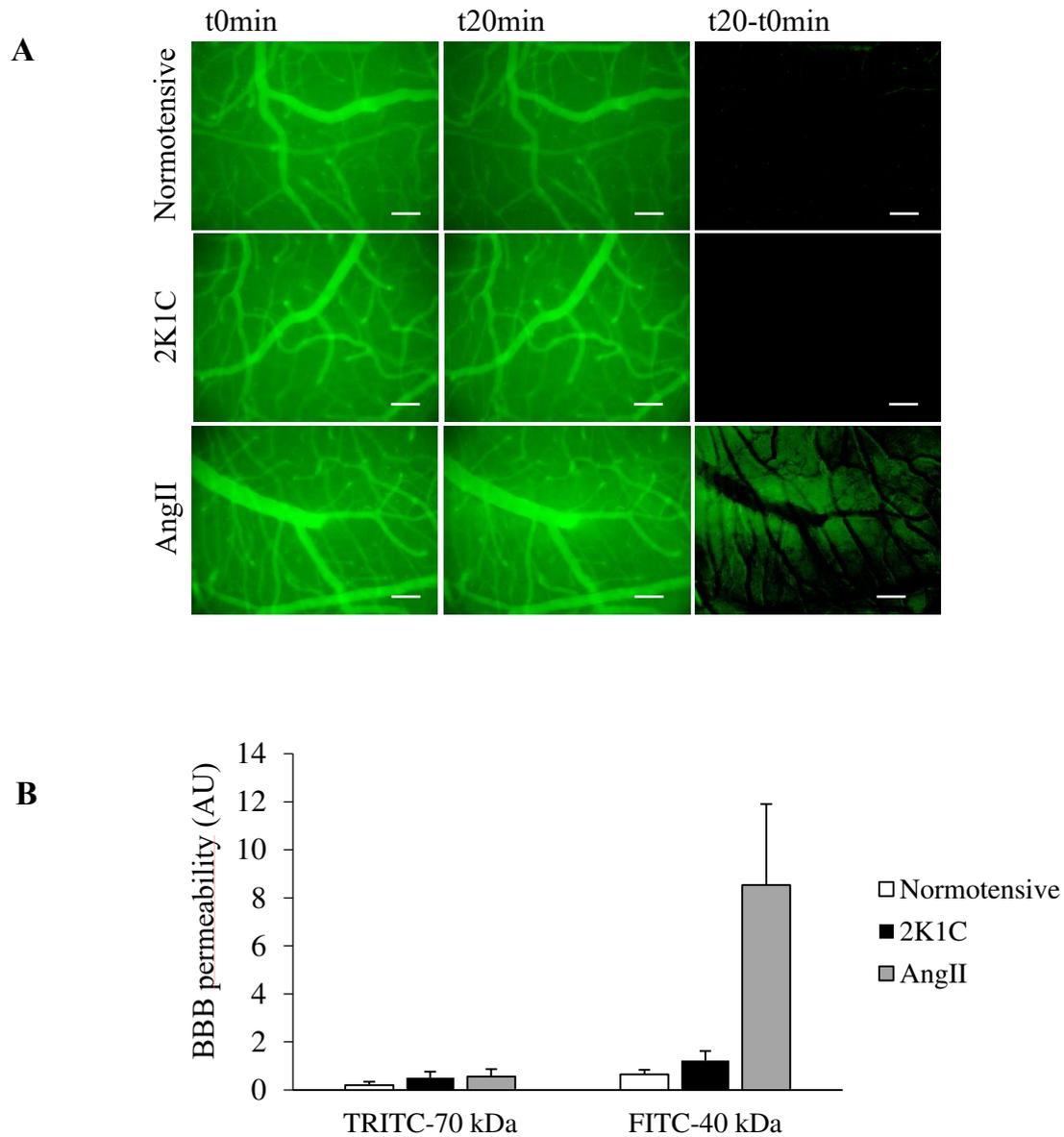


Figure 6. Effects of 2K1C- and AngII-induced hypertension on blood brain barrier permeability and arterial reactivity to whisker stimulation

A. Representative fluorescence labeled-cortical vessel micrographs at t0 and t20 minutes after fluorescent dye injection. t20 minutes – t0 minute images subtraction either showing no extravasated signal or extravasated signal, reflecting blood brain barrier permeability. Scale bar: 100 μ m. **B.** Histogram shows the quantitative results of extravasated signal after injection of two different size dyes, TRITC-70 kDa and FITC-40 kDa in normotensive mice (n = 6), 2K1C (n = 6) and AngII mice (n = 6). **C.** Whisker stimulation-evoked arteriole dilation in normotensive (n = 7), 2K1C (n = 6) and AngII mice (n = 6). Values are mean \pm SEM.

Figure 6

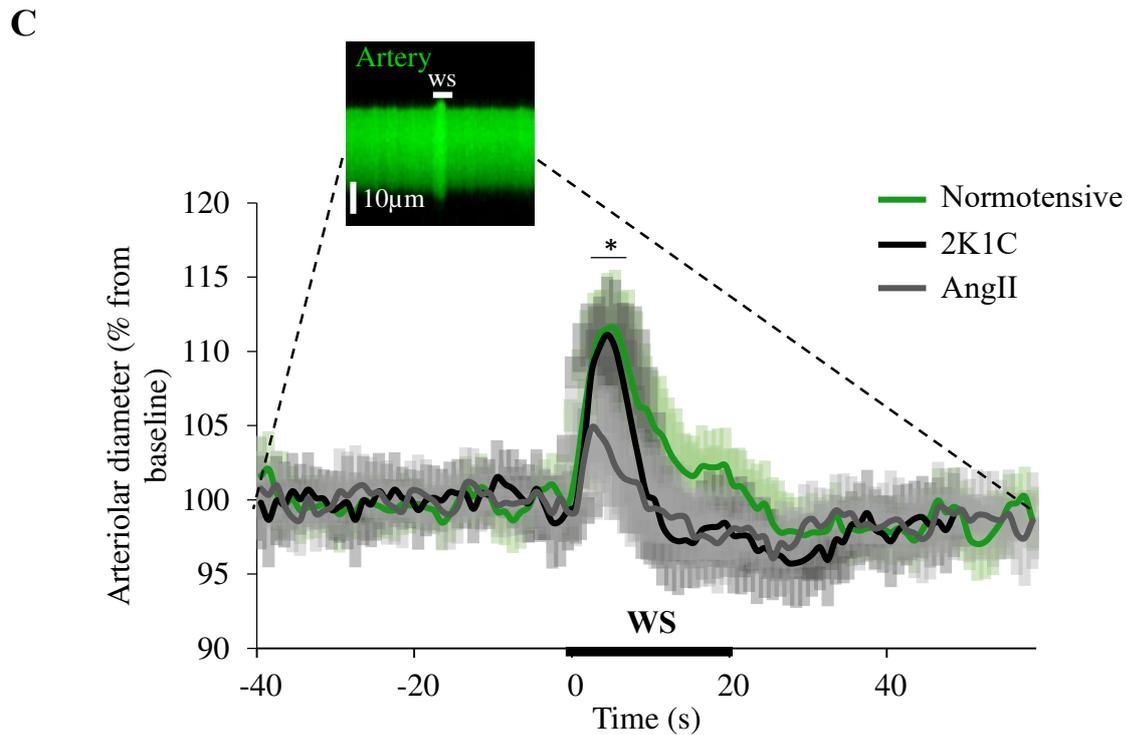
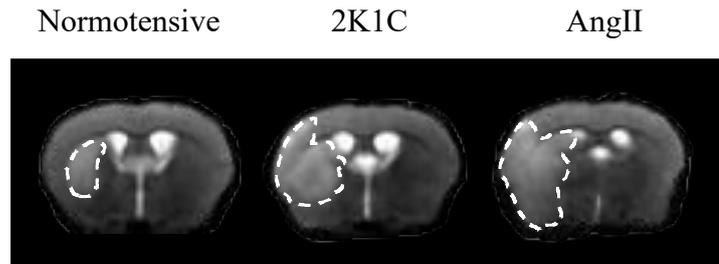


Figure 6. Effects of 2K1C- and AngII-induced hypertension on blood brain barrier permeability and arterial reactivity to whisker stimulation

A. Representative fluorescence labeled-cortical vessel micrographs at t0 and t20 minutes after fluorescent dye injection. t20 minutes – t0 minute images subtraction either showing no extravasated signal or extravasated signal, reflecting blood brain barrier permeability. Scale bar: 100 µm. **B.** Histogram shows the quantitative results of extravasated signal after injection of two different size dyes, TRITC-70 kDa and FITC-40 kDa in normotensive mice (n = 6), 2K1C (n = 6) and AngII mice (n = 6). **C.** Whisker stimulation-evoked arteriole dilation in normotensive (n = 7), 2K1C (n = 6) and AngII mice (n = 6). Values are mean ± SEM, *(p < 0.05) normotensive vs AngII, WS indicates whisker stimulation.

Figure 7

A



B

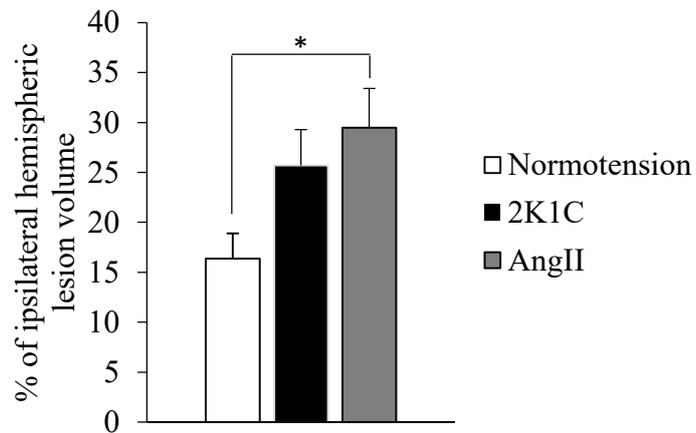
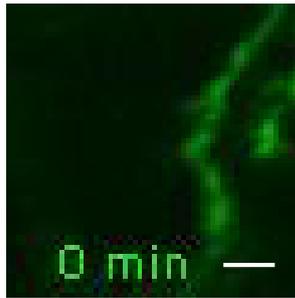
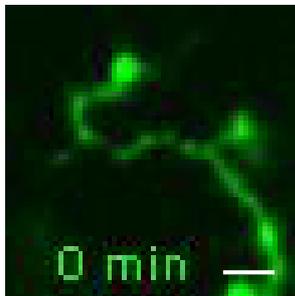


Figure 7. Ischemic brain lesions after middle cerebral artery occlusion

A. Panels show representative T2-weighted MRI imaging 24 hours post 45 minutes middle cerebral artery occlusion in normotensive (n = 6), 2K1C (n = 5) and AngII mice (n = 4). White dashed lines circumscribe ischemic lesions. **B.** Quantitative results shows volumes of ischemic lesions. Values are mean ± SEM, *(p < 0.05).

Supplementary data**Movie 1. Microglia process expansion**

Video clip showing eGFP-expressing microglia process (green) at high magnification extending through the cerebral cortex. Depth: 50 μ m, scale bar: 5 μ m.

**Movie 2. Microglia process retraction**

Time lapse taken in the cerebral cortex of an anesthetized CX3CR1^{GFP/+} mice, showing fast retraction of a single microglial fine protrusion. Depth: 50 μ m, scale bar: 5 μ m.

II.6 Discussion

It is well recognized that HTN is not only the main risk but also the most aggravating factor for stroke^{1,36,37}. This has often been attributed to HTN-induced structural and functional alterations of the cerebral vasculature and subsequent exacerbation of hypoperfusion following an arterial occlusion^{7,8}. Nonetheless, whether HTN can promote brain inflammation that may sensitize the cerebral tissue to a vascular insult, has not been definitively established. This issue is of importance since the understanding of how HTN affects the brain before the onset of permanent damage may open new avenues to prevent stroke in hypertensive patients. In the present studies, we showed that AngII-induced HTN dramatically alters cortical microglia, particularly its capacity to survey its microenvironment and to react to a microlesion. These changes in microglia may underlie, at least in part, the exacerbation of ischemia-induced brain damage in hypertensive subjects.

To address the question of the effects of HTN on changes in microglia as index of inflammation, we took advantage of the two-photon microscopy, which permits a 3D analysis of the morphology and the dynamics of cortical microglia in alive animals, in two models of HTN namely 2K1C and AngII. These two models, which are frequently employed in the studies of HTN, mimic renovascular hypertension and essential hypertension respectively²⁶. In both models, there is an overactivation of the renin-angiotensin-aldosterone system³⁸, although in AngII-induced HTN model, the level of circulating angiotensin-II increases rapidly and remains at greater levels in comparison to the 2K1C model^{27,28}.

In our experimental setting and according to the literature, the values of arterial pressure were slightly higher in AngII model compared to the 2K1C model. However, in both types of HTN, there was a similar cardiac hypertrophy, suggesting that HTN was comparably

consolidated and induced organs remodelling, as those described in hypertensive animals and patients³⁹⁻⁴¹.

In these two models, we first examined the microglial cell density and soma size, parameters which are mostly employed as markers of the microglial state^{42,43}. In the renovascular model of HTN, neither the density of the microglial cells, nor the volume of their soma, nor the length of their processes has changed compared to normotensive mice. These data suggest that renovascular hypertension, did not modify the morphology of cortical microglia, at least at this time point. Nonetheless, under AngII-induced HTN, microglia exhibited a pseudo-reactive phenotype illustrated by an enlarged soma and a reduction of process area. The results concord with those reported by Shen and colleagues²⁴, who used the same AngII model. The authors showed an activation of microglia and an increase in pro-inflammatory cytokine production in the paraventricular nucleus of hypothalamus, which is highly involved in the regulation of the blood pressure. Whether the increased level of circulating angiotensin-II is sufficient to induce brain inflammation by itself or through its increase in blood pressure, or whether the elevated blood pressure, independently of angiotensin-II mediates the inflammatory effects remains unclear. In an elegant study, Iulita and collaborators suggested that the increased level of angiotensin-II *per se*, but not only the increase in blood pressure, as induced by phenylephrine, contributes to HTN-induced microglia reactivity in the hippocampus³⁰. These findings are in agreement with those obtained in our studies since renovascular hypertensive mice did not display any changes in microglia morphology. Moreover, although in renovascular hypertensive mice, microglia was able to react to a LPS challenge and adopted an ameboid profile in the same manner as in normotensive animals, in the AngII model, microglia failed to respond to LPS-induced inflammation. This suggests that HTN induced by chronic infusion of angiotensin-II prevented the microglial capacity to adapt to its environment and to promote the resolution of induced inflammation.

To further analyse the impact of HTN on cortical microglia, we examined the dynamics of its processes at the cellular level. Microglia spend all its time to sample its microenvironment to prevent danger and to dynamically interact with different cell types. It has been well described that microglia closely interacts with neurons¹⁸ and notably contributes to important cerebral functions^{44,45}. Spontaneous motility is then one of the most important aspect for microglia functioning and the alteration of this process could have harmful impacts on the brain physiology⁴⁶. As for the morphology of microglia, renovascular hypertension did not modify the dynamics of cell processes, both in the resting state and following LPS challenge. Nonetheless, AngII-induced HTN dramatically reduced the microglial environment survey in the resting state, as evidenced by the reduction of the extracellular space covered by the processes in a given time. This limitation of space coverage by the microglia may be attributed to the reduction of the speed motility we observed in those animals. Furthermore, in AngII hypertensive mice, administration of LPS has not further altered the motility of microglia in comparison to the resting state, suggesting that AngII-induced HTN *per se*, maximally impairs the dynamics of microglia. It has been well described that microglia and neurons have a bi-directional communication and influence each other⁴⁷⁻⁴⁹. Therefore, an alteration of microglia motility may impair neuronal activity, subsequently sensitises the brain to cognitive dysfunction and exacerbates damages following a given insult.

To address this issue, we have analysed the ability of microglia to react to a circumscribed lesion. It has been shown that a laser microlesion induces an instantaneous microglia response, indicated by a shift from undirected to targeted movements of nearby processes towards the injured site to form a scar²³. The significance of the glial scar formation on the outcome of the brain tissue is still controversial⁵⁰. Some studies have indicated that the formation of a glial scar is suspected to prevent post-injury regeneration⁵¹, while others suggest that the glial scar may protect the tissue and promotes functional recovery⁵². In our

investigations, we found that renovascular hypertension did not change neither the size nor the kinetics of the acute scar formation following an induction of a microlesion in the cortex. Nevertheless, in AngII hypertensive mice, the formation of the scar was significantly slowed down in comparison to normotensive, as well as to renovascular hypertensive mice. This indicates that AngII-induced HTN reduces the capacity of microglia to form an efficient scar, which may circumscribe the lesion and restrict damage expansion. This hypothesis could be corroborated by the fact that in AngII hypertensive mice, stroke-induced brain damage was more exacerbated in comparison to normotensive animals and to a lower extent, in comparison to renovascular hypertensive mice. Furthermore, in order to examine whether alterations of microglia found in AngII-induced HTN were associated with others indices of end organ damage, we assessed the BBB permeability and the vascular response to a somatosensory stimulation. Indeed, it is well known that HTN increases BBB leakage and reduces the hemodynamic response to a functional stimulation, both in hypertensive animals and patients⁵³⁻⁵⁵. Our analyses revealed the pial vessels were more leaky in AngII hypertensive mice when compared to normotensive and renovascular hypertensive mice. Similarly and in accordance with previous studies⁵⁶, whisker stimulation resulted in a significant reduction of pial arterioles dilatation in AngII hypertensive mice.

In conclusion, our study showed that HTN, induced by an increased level of angiotensin-II, dramatically altered the morphology and the dynamics of cortical microglia. These alterations in microglia may render the brain more susceptible to ischemic brain lesions. Based on these observations, we can argue in favor of the use of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors to simultaneously lower blood pressure and to protect microglia and thus, to prevent an exacerbation of eventual brain damage in hypertensive subjects.

II.7 Bibliography

1. Campbell NR, Khalsa T, World Hypertension League Executive:, Lackland DT, Niebylski ML, Nilsson PM *et al.* High Blood Pressure 2016: Why Prevention and Control Are Urgent and Important. The World Hypertension League, International Society of Hypertension, World Stroke Organization, International Diabetes Foundation, International Council of Cardiovascular Prev. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2016; **18**: 714–7.
2. Poulter NR, Prabhakaran D, Caulfield M. Hypertension. *Lancet (London, England)* 2015; **386**: 801–12.
3. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet (London, England)* 2005; **365**: 217–23.
4. Skoog I, Gustafson D. Update on hypertension and Alzheimer’s disease. *Neurol Res* 2006; **28**: 605–11.
5. Kennelly S, Collins O. Walking the cognitive ‘minefield’ between high and low blood pressure. *J Alzheimers Dis* 2012; **32**: 609–21.
6. Levi Marpillat N, Macquin-Mavier I, Tropeano A-I, Bachoud-Levi A-C, Maison P. Antihypertensive classes, cognitive decline and incidence of dementia: a network meta-analysis. *J Hypertens* 2013; **31**: 1073–82.
7. Faraco G, Iadecola C. Hypertension: a harbinger of stroke and dementia. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 2013; **62**: 810–7.
8. Pires PW, Dams Ramos CM, Matin N, Dorrance AM. The effects of hypertension on the cerebral circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; **304**: H1598-614.
9. Caillon A, Paradis P, Schiffrin EL. Role of immune cells in hypertension. *Br J Pharmacol* 2018.
10. Norlander AE, Madhur MS, Harrison DG. The immunology of hypertension. *J Exp Med* 2018; **215**: 21–33.

11. Smykiewicz P, Segiet A, Keag M, Żera T. Proinflammatory cytokines and ageing of the cardiovascular-renal system. *Mech Ageing Dev* 2018; **175**: 35–45.
12. Harwani SC. Macrophages under pressure: the role of macrophage polarization in hypertension. *Transl Res* 2018; **191**: 45–63.
13. Mirhafez SR, Mohebati M, Feiz Disfani M, Saberi Karimian M, Ebrahimi M, Avan A et al. An imbalance in serum concentrations of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in hypertension. *J Am Soc Hypertens* 2014; **8**: 614–23.
14. Kristensen BO, Sølling K. Serum concentrations of immunoglobulins and free light chains before and after vascular events in essential hypertension. *Acta Med Scand* 1983; **213**: 15–20.
15. Oyarce MP, Iturriaga R. Contribution of Oxidative Stress and Inflammation to the Neurogenic Hypertension Induced by Intermittent Hypoxia. *Front Physiol* 2018; **9**: 893.
16. Hanisch U-K, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007; **10**: 1387–94.
17. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim J V, Zuo Y, Jung S et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat Neurosci* 2005; **8**: 752–8.
18. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science* 2005; **308**: 1314–8.
19. Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 2018; **18**: 225–242.
20. Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2012; **43**: 3063–70.
21. Ma Y, Wang J, Wang Y, Yang G-Y. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog Neurobiol* 2017; **157**: 247–272.

22. Kim J-Y, Kim N, Yenari MA. Mechanisms and potential therapeutic applications of microglial activation after brain injury. *CNS Neurosci Ther* 2015; **21**: 309–19.
23. Hierro-Bujalance C, Bacskai BJ, Garcia-Alloza M. In Vivo Imaging of Microglia With Multiphoton Microscopy. *Front Aging Neurosci* 2018; **10**: 218.
24. Shen XZ, Li Y, Li L, Shah KH, Bernstein KE, Lyden P et al. Microglia participate in neurogenic regulation of hypertension. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 2015; **66**: 309–16.
25. Shi P, Grobe JL, Desland FA, Zhou G, Shen XZ, Shan Z et al. Direct pro-inflammatory effects of prorenin on microglia. *PLoS One* 2014; **9**: e92937.
26. Lin HY, Lee YT, Chan YW, Tse G. Animal models for the study of primary and secondary hypertension in humans. *Biomed reports* 2016; **5**: 653–659.
27. Lohmeier TE. Angiotensin II infusion model of hypertension: is there an important sympathetic component? *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 2012; **59**: 539–41.
28. Badyal DK, Lata H, Dadhich AP. Animal Models of Hypertension and Effect of Drugs. *Indian J Pharmacol* 2003; **35**: 349–362.
29. Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J, Pedrazzini T. Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 1997; **29**: 1025–30.
30. Iulita MF, Vallerand D, Beauvillier M, Hauptert N, A Ulysse C, Gagné A et al. Differential effect of angiotensin II and blood pressure on hippocampal inflammation in mice. *J Neuroinflammation* 2018; **15**: 62.
31. Shih AY, Mateo C, Drew PJ, Tsai PS, Kleinfeld D. A polished and reinforced thinned-skull window for long-term imaging of the mouse brain. *J Vis Exp* 2012; **32**: 4–9.
32. Xu H-T, Pan F, Yang G, Gan W-B. Choice of cranial window type for in vivo imaging affects dendritic spine turnover in the cortex. *Nat Neurosci* 2007; **10**: 549–51.

33. Shim H-J, Jung WB, Schlegel F, Lee J, Kim S, Lee J et al. Mouse fMRI under ketamine and xylazine anesthesia: Robust contralateral somatosensory cortex activation in response to forepaw stimulation. *Neuroimage* 2018; **177**: 30–44.
34. Ansari S, Azari H, McConnell DJ, Afzal A, Mocco J. Intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO) model for ischemic stroke with laser doppler flowmetry guidance in mice. *J Vis Exp* 2011.
35. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Kluge A, Bachmann A et al. Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke* 2004; **35**: 566–71.
36. Ménard B, Chazalviel L, Roussel S, Bernaudin M, Touzani O. Two-kidney one-clip is a pertinent approach to integrate arterial hypertension in animal models of stroke: Serial magnetic resonance imaging studies of brain lesions before and during cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* ; 2017: 271678X17715813.
37. Letourneur A, Roussel S, Toutain J, Bernaudin M, Touzani O. 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. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; **31**: 504–13.
38. Monassier L, Combe R, Fertak L El. Mouse models of hypertension. *Drug Discov Today Dis Model* 2006; **3**: 273–281.
39. Tomek J, Bub G. Hypertension-induced remodelling: on the interactions of cardiac risk factors. *J Physiol* 2017; **595**: 4027–4036.
40. Kang Y-M, Zhang D-M, Yu X-J, Yang Q, Qi J, Su Q et al. Chronic infusion of enalaprilat into hypothalamic paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy by restoring neurotransmitters and cytokines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014; **274**: 436–44.

41. Rizzi E, Ceron CS, Guimaraes DA, Prado CM, Rossi MA, Gerlach RF et al. Temporal changes in cardiac matrix metalloproteinase activity, oxidative stress, and TGF- β in renovascular hypertension-induced cardiac hypertrophy. *Exp Mol Pathol* 2013; **94**: 1–9.
42. Fernández-Arjona MDM, Grondona JM, Granados-Durán P, Fernández-Llebrez P, López-Ávalos MD. Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Front Cell Neurosci* 2017; **11**: 235.
43. Zanier ER, Fumagalli S, Perego C, Pischiutta F, De Simoni M-G. Shape descriptors of the ‘never resting’ microglia in three different acute brain injury models in mice. Intensive care. *Med Exp* 2015; **3**: 39.
44. Kabba JA, Xu Y, Christian H, Ruan W, Chenai K, Xiang Y et al. Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cell Mol Neurobiol* 2018; **38**: 53–71.
45. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, Lafaille JJ et al. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 2013; **155**: 1596–609.
46. Sipe GO, Lowery RL, Tremblay M-È, Kelly EA, Lamantia CE, Majewska AK. Microglial P2Y₁₂ is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex. *Nat Commun* 2016; **7**: 10905.
47. Hristovska I, Pascual O. Deciphering Resting Microglial Morphology and Process Motility from a Synaptic Prospect. *Front Integr Neurosci* 2015; **9**: 73.
48. Eyo UB, Wu L-J. Bidirectional microglia-neuron communication in the healthy brain. *Neural Plast* 2013; **2013**: 456857.
49. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 2009; **29**: 3974–80.

50. Raposo C, Schwartz M. Glial scar and immune cell involvement in tissue remodeling and repair following acute CNS injuries. *Glia* 2014; **62**: 1895–904.
51. Ohtake Y, Smith GM, Li S. Reactive astrocyte scar and axon regeneration: suppressor or facilitator? *Neural Regen Res* 2016; **11**: 1050–1.
52. Adams KL, Gallo V. The diversity and disparity of the glial scar. *Nat Neurosci* 2018; **21**: 9–15.
53. Meissner A, Minnerup J, Soria G, Planas AM. Structural and functional brain alterations in a murine model of Angiotensin II-induced hypertension. *J Neurochem* 2017; **140**: 509–521.
54. Calcinaghi N, Wyss MT, Jolivet R, Singh A, Keller AL, Winnik S et al. Multimodal imaging in rats reveals impaired neurovascular coupling in sustained hypertension. *Stroke* 2013; **44**: 1957–64.
55. Jennings JR, Zanstra Y. Is the brain the essential in hypertension? *Neuroimage* 2009; **47**: 914–21.
56. Kazama K, Wang G, Frys K, Anrather J, Iadecola C. Angiotensin II attenuates functional hyperemia in the mouse somatosensory cortex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; **285**: H1890-9.

Discussion générale

. Discussion générale

L'HTA est une pathologie silencieuse très répandue dans la population et qui touche environ 1 adulte sur 3 dans le monde. En plus d'être un facteur de risque majeur de l'AVC, des déficiences cognitives vasculaires et de la maladie d'Alzheimer, l'HTA est aussi le principal facteur aggravant de l'AVC ischémique (Faraco et Iadecola, 2013; GBD 2015 Risk Factors Collaborators, 2016; Kennelly et Collins, 2012; Marpillat *et al.*, 2013; Skoog et Gustafson, 2006). L'une des causes connues à l'origine de ce phénomène correspond au remodelage des vaisseaux cérébraux, qui augmente fortement le risque d'occlusion et compromet la perfusion cérébrale (Faraco et Iadecola, 2013; Pires *et al.*, 2013).

On sait que l'HTA sous-tend des mécanismes inflammatoires qui participent à la mise en place et le développement de la pathologie. Notamment au niveau des vaisseaux, du cœur et des reins, l'inflammation favorise l'apparition de dommages caractéristiques et ainsi, participe largement à la physiopathologie de l'HTA (Harwani, 2018). D'autre part, plusieurs études se sont intéressées à la relation entre l'HTA et l'inflammation cérébrale. En effet, à partir de modèles murins d'HTA, il a été démontré l'existence d'une intense réactivité microgliale associée à un état inflammatoire avéré dans une région hypothalamique largement impliquée dans la régulation de la PA, le PVN (Shi *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2015). Par la suite, d'autres études ont rapporté des résultats similaires issus d'autre région hypothalamique et de l'hippocampe (Shih *et al.*, 2016; Takesue *et al.*, 2017). L'angiotensine-II, acteur principal du SRAA serait largement responsable de cette installation de l'inflammation au niveau cérébral.

Lors d'un AVC, le cortex cérébral est l'une des deux régions (avec le striatum) majoritairement endommagée chez l'Homme. Le cortex est donc largement impliqué dans la physiopathologie de l'AVC et notamment dans un contexte d'hypertension. L'étude de l'état

inflammatoire au sein de cette région, avant la survenue de l'AVC en contexte d'HTA n'a toutefois jamais été réalisée.

L'objectif de ce travail de thèse a donc été d'analyser l'impact de l'HTA sur l'état inflammatoire du cortex cérébral, avant la survenue de dommages de type ischémique. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux cellules microgliales et au compartiment vasculaire. Les cellules microgliales sont les principaux acteurs du système immunitaire cérébral résident et sont des marqueurs très sensibles de l'inflammation. Le compartiment vasculaire est connu pour subir des altérations structurelles et fonctionnelles dans l'HTA et participe ainsi à l'exacerbation des dommages ischémiques en contexte d'hypertension.

La presque totalité des résultats présentés a été obtenue en microscopie biphotonique chez une souche de souris transgénique CX3CR1^{GFP/+}, largement utilisée dans la littérature et pour laquelle la microglie est intrinsèquement marquée par l'expression spécifique de la GFP (Hierro-Bujalance *et al.*, 2018). Le compartiment vasculaire a pu être analysé après injection rétro-orbitaire d'un marqueur fluorescent, le TRITC. L'utilisation de la microscopie biphotonique est très pertinente pour cette étude car elle nous a permis de réaliser une imagerie *in vivo* de la microglie et des vaisseaux chez la souris dans deux modèles différents d'HTA.

La microglie est l'une des cellules les plus dynamiques retrouvées chez les mammifères. Elle projette et rétracte incessamment ses processus pour sonder l'environnement et établir des connexions physiques avec les neurones, les astrocytes et les vaisseaux sanguins l'entourant (Davalos *et al.*, 2005; Nimmerjahn *et al.*, 2005). Sa motilité est également influencée par des signaux *On* et *Off* libérés dans l'espace extracellulaire (Hanisch et Kettenmann, 2007). Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'HTA sur la morphologie, mais aussi sur la dynamique microgliale et sur l'aspect structurel et fonctionnel des vaisseaux corticaux. L'ensemble de ces analyses n'aurait pu être réalisé en dehors d'un milieu intégré, qui

est permis par l'utilisation de la microscopie biphotonique *in vivo*. Cette technologie est également associée à une grande résolution spatio-temporelle nécessaire pour l'analyse de la motilité microgliale à l'échelle cellulaire et même à l'échelle d'un unique processus (Nimmerjahn, 2012), mais aussi pour l'analyse de la réactivité vasculaire à des stimulations somatosensorielles (Shih *et al.*, 2012).

Pour toutes ces raisons, la pertinence de l'utilisation de la microscopie biphotonique *in vivo* est clairement établie. Toutefois, elle est associée à une méthodologie très complexe qui demande de longues et très nombreuses heures d'apprentissage et de maîtrise. Chaque étape du protocole est complexe et peut faire échouer l'intégralité de l'expérience. De plus, une étape qui n'est pas parfaitement réalisée génère des données erronées. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons été confrontés à de très nombreuses contraintes techniques dont certaines n'ont pu être dépassées, ce qui a entraîné la réorientation d'une grande partie de l'étude qui devait initialement être réalisée.

A l'origine, l'objectif était de mettre au point un protocole d'imagerie séquentielle chez un même animal, permettant de suivre la cinétique d'évolution de l'HTA et de son impact sur le couplage neurovasculaire et notamment sur les astrocytes. En effet, des études précliniques ont montré que l'HTA pourrait être à l'origine d'altérations structurelles et fonctionnelles des vaisseaux, favorisant l'apparition et l'aggravation de lésion ischémique et de démences de type Alzheimer (Bloch *et al.*, 2015; Calcinaghi *et al.*, 2013). Toutefois, la cinétique de mise en place de ces anomalies vasculaires et leur impact sur le cerveau dans l'HTA sont mal connus. Dans un premier temps, la mise au point de ce protocole devait être réalisée chez le rongeur pour ensuite être adaptée chez le marmouset, un petit primate non-humain.

Nous avons d'abord été confrontés à des difficultés méthodologiques pour le marquage astrocytaire, qui selon le protocole principalement décrit dans la littérature, ne permet pas une

imagerie séquentielle sur plusieurs semaines (Nimmerjahn et al., 2004). Nous avons ainsi dû développer un modèle de fenêtre avec un accès au cortex en silicone initialement décrit par Roome (Roome et Kuhn, 2014). Le dispositif en verre avec l'accès en silicone est long et délicat à fabriquer. D'autre part, l'application du marqueur astrocytaire, le SR101, au travers du port en silicone est très compliqué à réaliser sans endommager le cortex. Nous avons finalement abandonné ce protocole, jugé trop peu reproductible. Nous avons ensuite tenté l'administration du marqueur par voie intracisternale, par voie intracérébrovasculaire et par voie intraveineuse (Appaix *et al.*, 2012) co-injecté ou non avec du mannitol, permettant la perméabilisation transitoire de la BHE. Aucun de ces protocoles n'a abouti à des résultats satisfaisants. De plus, bien que largement utilisé dans la littérature, de récentes études ont montré que le SR101 n'était pas spécifique au marquage des astrocytes et qu'il était capable d'induire des dommages excitotoxiques importants (Hill et Grutzendler, 2014; Hülsmann *et al.*, 2017; Rasmussen *et al.*, 2016).

Nous avons ainsi choisi de réorienter notre étude et d'analyser la cinétique de mise en place de l'HTA et de son impact sur la physiologie cérébrale en se rapportant à un marqueur de l'état inflammatoire du cerveau : la microglie. Nous avons tiré parti de la souche transgénique CX3CR1^{GFP/+} pour réaliser l'imagerie des cellules microgliales intrinsèquement marquées par l'expression spécifique de la GFP (Hiero-Bujalance *et al.*, 2018). Ainsi, ce protocole ne nécessite pas l'application corticale de marqueur. Pour cette étude nous avons pu mettre au point un modèle de fenêtre crânienne fermée par affinage de l'os, permettant de laisser en place la dure-mère et le crâne (Drew *et al.*, 2010; Shih *et al.*, 2012). Il a en effet été montré que ce modèle, s'il est parfaitement réalisé, permet de garantir la physiologie corticale, à l'inverse du modèle de fenêtre ouverte, qui stimule la réactivité gliale et modifie la dynamique de renouvellement des épines dendritiques localement au niveau du cortex, pendant plus de 4 semaines après la mise en place du dispositif (Xu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010).

Nous avons de nouveau été confrontés à une limite méthodologique, puisque passée une semaine après installation de la fenêtre crânienne par affinage de l'os, l'imagerie corticale de la microglie n'était plus possible à cause de l'opacification du dispositif. Ce phénomène est décrit dans la littérature et serait dû à différents facteurs : la repousse du crâne, l'épaississement de la dure-mère et très probablement une opacification de la colle utilisée. Il semblerait que dans notre modèle, ce phénomène apparait très précocement comparativement à ce qui avait été décrit (Drew *et al.*, 2010; Shih *et al.*, 2012). En conséquence, nous avons essayé différents types de colles, différentes épaisseurs de crâne fraisé, différentes techniques de fraisage et nous avons également tenté de polir le crâne avant la pose de la fenêtre. Ces différents essais n'ont pas été concluants et nous avons donc dû renoncer à réaliser une imagerie séquentielle sur plusieurs semaines pour le suivi de l'évolution de l'HTA.

L'imagerie de la microglie devait donc être réalisée à un temps bien précis après induction de l'HTA. Pour définir le délai le plus pertinent, nous nous sommes basés sur les études qui avaient précédemment observé une réactivité microgliale hypothalamique en condition d'HTA. Ces observations ont été réalisées à un temps relativement précoce, entre 4 et 8 semaines après induction de la pathologie (Shi *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2015). D'autres études ont rapporté qu'à cette étape, le cœur a déjà subi un remodelage hypertrophique caractéristique.

Nous avons donc réalisé une analyse *in vivo* de l'impact de l'HTA sur le phénotype microglial, marqueur de l'inflammation corticale, en microscopie biphotonique. Pour ce protocole, nous avons tiré parti d'un modèle de fenêtre fermée par affinage du crâne renforcé, 6 à 8 semaines après induction de l'HTA, dans 2 modèles différents de cette pathologie. Nous avons utilisé le modèle rénovasculaire 2K1C (2-kidney, one clip) et le modèle d'HTA par infusion chronique d'angiotensine-II (le modèle AngII). Ces deux modèles sont fréquemment

utilisés dans la littérature et miment respectivement l'hypertension rénovasculaire et l'hypertension essentielle (Lin *et al.*, 2016). L'hypertension rénovasculaire est une hypertension secondaire retrouvée chez 5 % des patients hypertendus et qui a pour origine une déficience rénale. Le modèle AngII mime une hypertension essentielle dont la cause est généralement liée à l'association de différents facteurs génétiques et environnementaux, elle est présente chez 95 % des patients hypertendus. Ces deux modèles sont caractérisés par une suractivation du SRAA (Monassier *et al.*, 2006), bien que dans le modèle AngII, le taux d'angiotensine-II circulante augmente rapidement et reste plus élevé que dans le modèle 2K1C (Badyal *et al.*, 2003; Lohmeier, 2012).

Dans nos conditions expérimentales et en accord avec ce qui a précédemment été décrit dans la littérature, nous avons montré une forte élévation de la PA chez les animaux hypertendus AngII, légèrement supérieure à ce que nous avons retrouvé dans le modèle 2K1C (Monassier *et al.*, 2006). Pour ces deux types d'HTA et de façon équivalente, nous avons observé la présence d'une hypertrophie cardiaque bien décrite dans les modèles précliniques et chez le patient (Kang *et al.*, 2014; Rizzi *et al.*, 2013; Tomek et Bub, 2017). Ces données suggèrent que la pathologie a été consolidée de manière comparable dans les deux modèles d'HTA. L'hypertrophie cardiaque n'est pas une simple réaction adaptative à l'élévation chronique de la PA. Au niveau du cœur, on retrouve des récepteurs AT1 à l'angiotensine-II (Bader, 2010). L'augmentation importante d'angiotensine-II circulante, associée à la surexpression et à la surstimulation de ces récepteurs au niveau du cœur et des reins favorise la fibrose et l'hypertrophie cardiaque (Crowley et Coffman, 2008; Kurdi et Booz, 2011). Ce remodelage caractéristique de la pathologie s'accompagne d'un risque cardiovasculaire accru chez le patient.

Pour rendre compte de l'état inflammatoire du cortex cérébral, dans les deux modèles d'HTA, nous avons commencé par réaliser une analyse 3D de la morphologie microgliale *in*

vivo, en examinant : la densité cellulaire, le volume somatique et la morphologie des processus. Ces paramètres ont été sélectionnés puisqu'ils sont largement utilisés comme marqueurs du phénotype microglial (Fernández-Arjona *et al.*, 2017; Zanier *et al.*, 2015). Dans le modèle rénovasculaire d'hypertension, ces différents paramètres sont similaires à ce que nous avons observé chez les animaux normotendus. Ces données suggèrent que l'hypertension rénovasculaire n'endommage pas la morphologie de la microglie corticale, du moins à ce stade d'évolution de la pathologie pour lequel, plusieurs études avaient démontré la présence d'une forte réactivité microgliale au niveau hypothalamique (Shi *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2015; Takesue *et al.*, 2017). Toutefois, une étude menée par Ménard et collaborateurs montre l'apparition de lésions spontanées de la substance blanche, qui ne sont détectables qu'à partir de 12 semaines après induction d'une hypertension rénovasculaire chez le rat (Ménard *et al.*, 2017). Ce type de lésions cérébrales est également retrouvé dans la pathologie humaine (Fazekas *et al.*, 1993).

Dans le modèle d'HTA par infusion chronique d'angiotensine-II, nous avons observé que la microglie présentait un phénotype pseudo-réactif caractérisé par un élargissement du soma et une réduction de l'aire des processus microgliaux. Les résultats concordent avec ceux rapportés par Shen et collaborateurs (Shen *et al.*, 2015). Dans un modèle AngII similaire à celui que nous avons utilisé, ces auteurs ont montré une réactivité de la microglie ainsi qu'une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires dans le PVN, fortement impliqué dans la régulation de la PA. L'origine des altérations morphologiques des cellules microgliales observées reste toutefois à définir. Elles pourraient être dues (i) à la seule augmentation du taux d'angiotensine-II circulante, (ii) à l'action hypertensive de l'angiotensine-II ou encore (iii) à l'hypertension en elle-même indépendamment de l'angiotensine-II. La question de l'origine de la réactivité microgliale et donc de l'inflammation cérébrale est primordiale pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'HTA. Ces

interrogations sont par conséquent, largement débattues dans la littérature (pour revue voir (Winklewski *et al.*, 2015)).

Dans une étude récente, Iulita et ses collaborateurs ont montré que l'HTA, dans un modèle AngII, favorise l'installation d'un état inflammatoire au niveau de l'hippocampe (Iulita *et al.*, 2018). Ici, la réactivité microgliale hippocampique associée, était uniquement due à l'élévation du niveau d'angiotensine-II circulante. En effet, l'élévation de la PA induite cette fois-ci par administration de phényléphrine et donc, indépendante de l'angiotensine-II, n'a pas modifié le phénotype microglial. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans notre étude, puisque les souris 2K1C hypertendues, pour lesquelles le taux d'angiotensine-II circulante est moins important que dans le modèle AngII, ne présentaient aucun changement morphologique de la microgliale.

Nous avons également observé que l'administration de LPS, qui induit une inflammation généralisée, favorise l'apparition d'un phénotype amiboïde de la microglie et la prolifération de ces cellules chez les animaux hypertendus 2K1C, comme retrouvé chez les normotendus et comme ce qui avait déjà été décrit (Byrnes *et al.*, 2009). Étonnamment, chez les animaux AngII, après injection de LPS, la morphologie de la microglie n'est pas modifiée par rapport à la condition "de repos". Cela peut sembler surprenant puisque plusieurs études ont montré la relation qui lie l'HTA et notamment l'angiotensine-II au TLR-4, le principal récepteur au LPS (Dange *et al.*, 2015). De Batista a par exemple montré qu'en condition d'HTA, chez une souche de rat SHR, le TLR-4 est surexprimé (De Batista *et al.*, 2014). Ainsi, si on appliquait ces résultats dans nos conditions, nous pourrions nous attendre à une sur-stimulation des TLR-4 microgliaux, qui induirait une sur-activation de la microglie. L'activation microgliale est nécessaire car elle correspond à une adaptation phénotypique à un environnement délétère. Nos résultats pourraient alors suggérer que dans le modèle AngII, l'HTA limite fortement la capacité

de la microglie à s'adapter à son environnement et à favoriser la résolution de l'inflammation induite par le LPS.

Bien que l'analyse de la morphologie microgliale soit un bon indice de l'état d'activation de ces cellules, à elle seule elle ne suffit pas. En effet, dans l'étude de Iulita et collègues, à une dose d'angiotensine-II similaire à celle que nous avons utilisée, les auteurs n'observent pas de modification du signal d'activation microglial Iba1 dans l'hippocampe. Ils observent toutefois une forte activation astrocytaire (Iulita *et al.*, 2018). Bien que faisant partie intégrante de la BHE et donc étant en première ligne pour subir l'action de l'angiotensine-II circulante, il est fort probable que l'activation astrocytaire rende compte d'un état inflammatoire qui n'est pas uniquement localisé au niveau de ces cellules, d'autant plus que les astrocytes entretiennent des connexions physiques avec les neurones et les cellules microgliales. Ainsi, dans ces conditions, bien que la morphologie microgliale ne soit pas modifiée, il est probable que son phénotype ne soit pas identique à celui retrouvé en condition physiologique. Dans cette étude et dans beaucoup d'autres réalisées *in vitro* et *ex vivo*, l'analyse de la morphologie microgliale est couplée à une analyse de l'expression de facteurs cytokiniques (Iulita *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2015a; Shi *et al.*, 2014). Toutefois, chaque stimulus provoque des profils de sécrétion unique. On ne peut donc pas se concentrer sur une ou deux cytokines, mais il faudrait évaluer cet aspect dans un ensemble, ce qui est impossible à réaliser à l'échelle cellulaire. Ainsi, notre stratégie s'est basée sur un protocole d'étude intégré de la microglie, par une analyse de l'activité spontanée et cicatricielle à l'échelle d'une seule microglie *in vivo*.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à la dynamique des processus microgliaux à l'échelle d'un unique processus. Les cellules microgliales passent la totalité de leur temps à surveiller leur microenvironnement pour prévenir d'une agression et pour interférer

de façon dynamique avec les différents types cellulaires. Il a en effet été décrit que la microglie interagit étroitement avec les neurones (Nimmerjahn *et al.*, 2005) et contribue notamment à d'importantes fonctions cérébrales (Kabba *et al.*, 2018; Parkhurst *et al.*, 2013). La motilité spontanée est en effet, un aspect essentiel du fonctionnement de la microglie. Par conséquent, l'altération de ce mécanisme pourrait avoir des effets néfastes sur la physiologie cérébrale (Sipe *et al.*, 2016). De plus, la motilité microgliale est primordiale pour la clairance des débris tissulaires (Neumann *et al.*, 2009). A l'instar des données que nous avons obtenues sur la morphologie microgliale, l'hypertension rénovasculaire ne modifie ni la motilité spontanée de la microglie, ni la dynamique microgliale suite à un challenge au LPS comparativement à ce qui est retrouvé chez les animaux normotendus.

A l'inverse, l'HTA induite par administration d'angiotensine-II réduit considérablement l'activité de surveillance du parenchyme cérébral par la microglie à l'état de repos. Cette limitation de la couverture spatiale par la microglie peut être attribuée à la réduction de la vitesse de renouvellement des processus que nous avons observée chez ces animaux et/ou à une réduction du nombre de processus motiles, ou encore à une réduction de la longueur des processus qui s'étendent. De plus, chez les souris hypertendues AngII, l'administration de LPS n'a pas amplifié la réduction de la motilité microgliale par rapport à l'état de repos, ce qui suggère que l'HTA induite par AngII, affecte au maximum la dynamique microgliale. Les cellules microgliales et les neurones ont une communication bidirectionnelle et s'influencent mutuellement (Eyo et Wu, 2013; Hristovska et Pascual, 2015; Wake *et al.*, 2009). Par conséquent, une altération de la motilité de la microglie peut endommager l'activité neuronale, sensibiliser le cerveau à un dysfonctionnement cognitif et aggraver les dommages à la suite d'une agression donnée. D'ailleurs, une réduction de la motilité spontanée microgliale a été retrouvée dans la zone péri-infarctée après induction d'un AVC ischémique et est associée à un mécanisme de neurodégénérescence secondaire (Kluge *et al.*, 2017). Ces données rendent

compte de l'importance de ce type de mécanisme et de l'importance des dégâts causés par l'HTA dans le modèle AngII.

Pour aller plus loin, nous avons voulu savoir si la réduction de la motilité microgliale était associée à une altération de la capacité de la microglie à protéger l'environnement face à des dommages tissulaires induits. Pour répondre à cette question, nous avons analysé la réactivité de la microglie à une lésion circonscrite induite par un laser focalisé. Ce type de lésion induit une réponse instantanée de la microglie, caractérisée par la réorientation des processus initialement présents dans toutes les directions, vers le site de lésion pour former une cicatrice (Hierro-Bujalance *et al.*, 2018). L'impact de la formation d'une cicatrice gliale sur le tissu cérébral reste toutefois controversé (Raposo et Schwartz, 2014). Certaines études ont indiqué que la formation d'une cicatrice gliale limite la régénération cellulaire post-traumatique (Ohtake *et al.*, 2016), alors qu'un nombre croissant de données, suggère qu'elle pourrait protéger le tissu sain et favoriser la récupération fonctionnelle (Adams et Gallo, 2018). Dans notre étude, nous avons montré que l'hypertension rénovasculaire ne modifiait ni la taille de la cicatrice gliale ni la réponse microgliale aiguë à l'induction d'une microlésion corticale. En revanche, chez les souris hypertensives AngII, la formation de la cicatrice microgliale est significativement ralentie. Cela indique que l'HTA induite par l'AngII réduit la capacité de la microglie à former une cicatrice efficace qui permettrait de circonscire la lésion et de limiter l'expansion des dommages.

Ces observations corroborent avec l'aggravation de la lésion ischémique mesurée en IRM anatomique chez les souris AngII hypertendues. Ces résultats sont également observés dans une moindre mesure chez les animaux 2K1C hypertendus. Ainsi on pourrait émettre l'hypothèse selon laquelle, la différence de taille de lésion ischémique observée entre les animaux AngII et 2K1C est due à une altération du phénotype microgliale précédemment

décrite et dont l'origine est l'HTA. Les cellules seraient alors a fonctionnelles et délétères pour l'environnement avant même l'induction de l'AVC. Précédemment, il a en effet été décrit que les cellules microgliales pouvaient arborer un phénotype amiboïde associé à la production de facteurs pro-inflammatoires et de neurotoxines favorisant la mort neuronale et l'aggravation des lésions ischémiques (Kim *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2017).

Nous avons vu que l'HTA induite par infusion chronique d'angiotensine-II favorisait un phénotype délétère de la microglie, pouvant en partie être responsable de l'exacerbation des dommages ischémiques. Dans le but de savoir si l'altération du phénotype microglial est associée à d'autres indices de dommages aux organes, pouvant également expliquer l'aggravation des lésions ischémiques en contexte d'HTA, nous avons examiné l'intégrité structurelle et fonctionnelle du compartiment vasculaire cérébral. Pour cela, nous avons évalué la perméabilité de la BHE et la réponse des artères corticales à des stimulations somatosensorielles dans nos deux modèles d'HTA. Ces deux paramètres analysés sont connus pour être dérégulés dans des modèles précliniques et chez le patient (Calcinaghi *et al.*, 2013; Meissner *et al.*, 2017). Nos analyses ont révélé que chez les souris AngII hypertendues, les vaisseaux piémériens présentent à la fois un défaut de perméabilité et une forte altération du mécanisme d'hyperhémie fonctionnelle. Ces résultats sont en accord avec ce qui avait précédemment été décrit dans la littérature (Kazama *et al.*, 2003). Il est en effet largement décrit qu'une altération structurelle et fonctionnelle vasculaire est retrouvée dans l'HTA et favorise grandement l'apparition et l'aggravation de lésions ischémiques. Les mécanismes responsables des dommages vasculaires font intervenir l'action mécanique des fortes valeurs de PA sur la paroi artérielle, mais aussi des processus inflammatoires ainsi qu'une action directe de l'angiotensine-II sur ses récepteurs endothéliaux.

Puisque l'angiotensine-II ne passe pas la BHE, nous pouvons donc émettre l'hypothèse selon laquelle indépendamment de la hausse de la PA, elle pourrait agir indirectement sur la microglie, en agissant sur ses récepteurs AT1 présents au niveau de la BHE. Ainsi, elle pourrait stimuler des signaux de transduction aboutissant à la libération intra-parenchymateuse de signaux *On* de type cytokiniques, stimulateurs du phénotype pro-inflammatoire de la microglie. En agissant à ce niveau, l'angiotensine-II, favorise également une altération de la BHE, lui permettant ainsi l'accès au parenchyme cérébral. Les récepteurs AT1 sont présents au niveau des cellules microgliales. Ainsi, l'angiotensine-II pourrait également agir directement sur la microglie et ainsi favoriser la mise en place d'une inflammation corticale. Les deux mécanismes ne sont pas exclusifs entre eux, mais pourraient avoir des cinétiques différentes. Nous pouvons émettre l'hypothèse que dans un premier temps, l'angiotensine-II circulante stimule la libération de facteurs inflammatoires au niveau du cortex cérébral *via* les cellules endothéliales constituant la BHE. Dans le même temps, l'angiotensine-II pourrait favoriser son propre accès en altérant la perméabilité de la BHE, lui permettant dans un second temps d'agir directement sur les cellules microgliales au sein du parenchyme cérébral. Le phénotype délétère de la microglie en condition d'HTA, pourrait alors être responsable en partie de l'aggravation des lésions ischémiques retrouvées chez les patients hypertendus.

En conclusion, notre étude a montré que l'HTA, induite par une augmentation du taux d'angiotensine-II, modifiait considérablement la morphologie et la dynamique microgliale au niveau du cortex cérébral. Ces altérations du phénotype microglial pourraient rendre le cerveau plus vulnérable aux lésions cérébrales ischémiques. Il existe aujourd'hui plusieurs types d'agents antihypertenseurs utilisés en cliniques. Toutefois, ces différentes molécules n'ont pas les mêmes effets sur l'amélioration des dommages aux organes cibles et sur le risque ischémique retrouvé chez les patients hypertendus. Il est de plus en plus reconnu que certains traitements antihypertenseurs peuvent avoir des effets protecteurs directs sur le cerveau,

parallèlement à la diminution de la PA (Oprisiu-Fournier *et al.*, 2009). Sur la base des observations que nous avons réalisées, nous pouvons plaider en faveur de l'utilisation des inhibiteurs du SRAA pour simultanément améliorer la PA, garantir le bon fonctionnement des cellules microgliales et ainsi prévenir une exacerbation éventuelle de lésions cérébrales chez des sujets hypertendus. Enfin, les données présentées ici renforcent l'idée, selon laquelle il est primordial d'intégrer l'HTA dans les études précliniques conçues pour tester l'efficacité d'agents thérapeutiques pour l'amélioration de l'AVC.

Bibliographie

. Bibliographie

- Ackermann, U. (2004). Regulation of arterial blood pressure. *Surgery (Oxford)*, *5*, 120a–120f.
- Adams, K. L., & Gallo, V. (2018). The diversity and disparity of the glial scar. *Nature Neuroscience*, *1*, 9–15.
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., & Rossi, F. M. V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature Neuroscience*, *12*, 1538–1543.
- Alosco, M. L., Gunstad, J., Xu, X., Clark, U. S., Labbe, D. R., Riskin-Jones, H. H., ... Sweet, L. H. (2014). The impact of hypertension on cerebral perfusion and cortical thickness in older adults. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*, *8*, 561–570.
- Ammarguella, F., Larouche, I., & Schiffrin, E. L. (2001). Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin ET(A) receptor antagonism. *Circulation*, *2*, 319–324.
- Ando, H., Zhou, J., Macova, M., Imboden, H., & Saavedra, J. M. (2004). Angiotensin II AT1 receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, *7*, 1726–1731.
- Appaix, F., Girod, S., Boisseau, S., Römer, J., Vial, J.-C., Albrieux, M., ... van der Sanden, B. (2012). Specific in vivo staining of astrocytes in the whole brain after intravenous injection of sulforhodamine dyes. *PLoS One*, *4*, e35169.
- Arlier, Z., Basar, M., Kocamaz, E., Kiraz, K., Tanriover, G., Kocer, G., ... Demir, N. (2015). Hypertension alters phosphorylation of VASP in brain endothelial cells. *The International Journal of Neuroscience*, *4*, 288–297.
- Armstrong, T., Bettcher, D., Branca, F., Lauer, J., Mace, C., Mendis, S., ... Wild, C. P. (2014). Rapport sur la situation mondiale des maladies non transmissibles 2014.
- Askew, K., & Gomez-Nicola, D. (2018). A story of birth and death: Insights into the formation and dynamics of the microglial population. *Brain, Behavior, and Immunity*, *69*, 9–17.
- Askew, K., Li, K., Olmos-Alonso, A., Garcia-Moreno, F., Liang, Y., Richardson, P., ... Gomez-Nicola, D. (2017). Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Reports*, *2*, 391–405.
- Astrup, J., Symon, L., Branston, N. M., & Lassen, N. A. (1977). Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke*, *1*, 51–57.
- Attwell, D., Buchan, A. M., Charkpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B. A., & Newman, E. A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, *7321*, 232–243.
- Attwell, D., & Laughlin, S. B. (2001). An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *10*, 1133–1145.
- Bader, M. (2010). Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological

- therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50, 439–465.
- Badyal, D. K., Lata, H., & Dadhich, A. P. (2003). Animal Models of Hypertension and Effect of Drugs. *Indian Journal of Pharmacology*, 35, 349–362.
- Banks, W. A. (2005). Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. *Current Pharmaceutical Design*, 8, 973–984.
- Banks, W. a., & Robinson, S. M. (2010). Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood-brain barrier. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1, 102–109.
- Bardgett, M. E., Holbein, W. W., Herrera-Rosales, M., & Toney, G. M. (2014). Ang II-salt hypertension depends on neuronal activity in the hypothalamic paraventricular nucleus but not on local actions of tumor necrosis factor- α . *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 3, 527–534.
- Barhoumi, T., Kasal, D. A., Li, M. W., Shbat, L., Laurant, P., Neves, M. F., ... Schiffrin, E. L. (2011). T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 3, 469–476.
- Baumbach, G. L., Heistad, D. D., & Siems, J. E. (1989). Effect of sympathetic nerves on composition and distensibility of cerebral arterioles in rats. *The Journal of Physiology*, 3, 123–140.
- Baumbach, G. L., Sigmund, C. D., & Faraci, F. M. (2004). Structure of cerebral arterioles in mice deficient in expression of the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Circulation Research*, 8, 822–829.
- Beason-Held, L. L., Moghekar, A., Zonderman, A. B., Kraut, M. A., & Resnick, S. M. (2007). Longitudinal changes in cerebral blood flow in the older hypertensive brain. *Stroke*, 6, 1766–1773.
- Bechmann, I., & Woodrooffe, N. (2014). Immune Privilege of the Brain. *Neuroinflammation and CNS Disorders*, 1–8.
- Benicky, J., Sánchez-Lemus, E., Honda, M., Pang, T., Orecna, M., Wang, J., ... Saavedra, J. M. (2011). Angiotensin II AT1 receptor blockade ameliorates brain inflammation. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 4, 857–870.
- Bergmann, O., Spalding, K. L., & Frisén, J. (2015). Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7, a018994.
- Biancardi, V. C., Son, S. J., Ahmadi, S., Filosa, J. A., & Stern, J. E. (2014). Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood-brain barrier. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 3, 572–579.
- Biber, K., Neumann, H., Inoue, K., & Boddeke, H. W. G. M. (2007). Neuronal “On” and “Off” signals control microglia. *Trends in Neurosciences*, 11, 596–602.
- Bilbo, S. D., & Schwarz, J. M. (2009). Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 14.
- Bloch, S., Obari, D., & Girouard, H. (2015). Angiotensin and neurovascular coupling: beyond

- hypertension. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 3, 159–167.
- Brayden, J. E., Earley, S., Nelson, M. T., & Reading, S. (2008). Transient receptor potential (TRP) channels, vascular tone and autoregulation of cerebral blood flow. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 9, 1116–1120.
- Burrows, F. E., Bray, N., Denes, A., Allan, S. M., & Schiessl, I. (2015). Delayed reperfusion deficits after experimental stroke account for increased pathophysiology. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35, 277–284.
- Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., ... Weiner, H. L. (2014). Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature Neuroscience*, 1, 131–143.
- Byrne, J. A., Grieve, D. J., Bendall, J. K., Li, J.-M., Gove, C., Lambeth, J. D., ... Shah, A. M. (2003). Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circulation Research*, 9, 802–805.
- Byrnes, K. R., Stoica, B., Riccio, A., Pajooohesh-Ganji, A., Loane, D. J., & Faden, A. I. (2009). Activation of metabotropic glutamate receptor 5 improves recovery after spinal cord injury in rodents. *Annals of Neurology*, 1, 63–74.
- Caillon, A., Paradis, P., & Schiffrin, E. L. (2018). Role of immune cells in hypertension. *British Journal of Pharmacology*.
- Calcinaghi, N., Wyss, M. T., Jolivet, R., Singh, A., Keller, A. L., Winnik, S., ... Weber, B. (2013). Multimodal imaging in rats reveals impaired neurovascular coupling in sustained hypertension. *Stroke*, 7, 1957–1964.
- Campbell, N. R., Khalsa, T., World Hypertension League Executive:, Lackland, D. T., Niebylski, M. L., Nilsson, P. M., ... International Society of Nephrology. (2016). High Blood Pressure 2016: Why Prevention and Control Are Urgent and Important. The World Hypertension League, International Society of Hypertension, World Stroke Organization, International Diabetes Foundation, International Council of Cardiovascular Prev. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)*, 8, 714–717.
- Cardona, A. E., Pioro, E. P., Sasse, M. E., Kostenko, V., Cardona, S. M., Dijkstra, I. M., ... Ransohoff, R. M. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience*, 7, 917–924.
- Caso, J. R., Pradillo, J. M., Hurtado, O., Lorenzo, P., Moro, M. A., & Lizasoain, I. (2007). Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation*, 12, 1599–1608.
- Chakravarty, S., & Herkenham, M. (2005). Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 7, 1788–1796.
- Cheang, M. Y., Manning, N., Churilov, L., Mitchell, P., Dowling, R., & Yan, B. (2014). Recanalisation success is associated with good clinical outcome despite advanced age and stroke severity in patients treated with the Solitaire stentriever. *Journal of Clinical*

- Neuroscience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 3, 401–405.
- Chen, Z., Jalabi, W., Shpargel, K. B., Farabaugh, K. T., Dutta, R., Yin, X., ... Trapp, B. D. (2012). Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32, 11706–11715.
- Chrissobolis, S., & Sobey, C. G. (2006). Recent evidence for an involvement of rho-kinase in cerebral vascular disease. *Stroke*, 8, 2174–2180.
- Chýlová, M., Mořovská, Z., Osmančík, P., Procházka, B., & Kalvach, P. (2015). The effect of different doses and different routes of acetylsalicylic acid administration on platelet aggregation in healthy volunteers and ischemic stroke patients. *Translational Stroke Research*, 2, 160–165.
- Cohen, R. A. (2007). Hypertension and cerebral blood flow: implications for the development of vascular cognitive impairment in the elderly. *Stroke*, 6, 1715–1717.
- Crain, J. M., Nikodemova, M., & Watters, J. J. (2013). Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and female mice. *Journal of Neuroscience Research*, 9, 1143–1151.
- Crowley, S. D., & Coffman, T. M. (2008). In hypertension, the kidney breaks your heart. *Current Cardiology Reports*, 6, 470–476.
- Cserr, H. F., Harling-Berg, C. J., & Knopf, P. M. (1992). Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 4, 269–276.
- Dahlöf, B. (2007). Prevention of stroke in patients with hypertension. *The American Journal of Cardiology*, 3, 17–24.
- Dahlöf, B., Devereux, R. B., Kjeldsen, S. E., Julius, S., Beevers, G., de Faire, U., ... LIFE Study Group. (2002). Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet (London, England)*, 9311, 995–1003.
- Dange, R. B., Agarwal, D., Teruyama, R., & Francis, J. (2015). Toll-like receptor 4 inhibition within the paraventricular nucleus attenuates blood pressure and inflammatory response in a genetic model of hypertension. *Journal of Neuroinflammation*, 18, 12–31.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., ... Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 6, 752–758.
- De Batista, P. R., Palacios, R., Martín, A., Hernanz, R., Médici, C. T., Silva, M. A. S. C., ... Alonso, M. J. (2014). Toll-like receptor 4 upregulation by angiotensin II contributes to hypertension and vascular dysfunction through reactive oxygen species production. *PLoS One*, 8, e104020.
- de la Torre, J. C. (2012). Cardiovascular risk factors promote brain hypoperfusion leading to cognitive decline and dementia. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, 4, 367516.

- De Miguel, C., Das, S., Lund, H., & Mattson, D. L. (2010). T lymphocytes mediate hypertension and kidney damage in Dahl salt-sensitive rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *4*, 1136-1142.
- Dénes, A., Ferenczi, S., Halász, J., Környei, Z., & Kovács, K. J. (2008). Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *10*, 1707–1721.
- Denes, A., Vidyasagar, R., Feng, J., Narvainen, J., McColl, B. W., Kauppinen, R. A., & Allan, S. M. (2007). Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *12*, 1941–1953.
- Di Rienzo, M., Parati, G., Radaelli, A., & Castiglioni, P. (2009). Baroreflex contribution to blood pressure and heart rate oscillations: time scales, time-variant characteristics and nonlinearities. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, *1892*, 1301–1318.
- Didion, S. P., & Faraci, F. M. (2003). Angiotensin II produces superoxide-mediated impairment of endothelial function in cerebral arterioles. *Stroke*, *8*, 2038–2042.
- Didion, S. P., Sigmund, C. D., & Faraci, F. M. (2000). Impaired endothelial function in transgenic mice expressing both human renin and human angiotensinogen. *Stroke*, *3*, 760–4.
- Dilger, R. N., & Johnson, R. W. (2008). Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, *4*, 932–939.
- Ding, G., Zhang, Z., Chopp, M., Li, L., Zhang, L., Li, Q., ... Jiang, Q. (2014). MRI evaluation of BBB disruption after adjuvant AcSDKP treatment of stroke with tPA in rat. *Neuroscience*, *271*, 1–8.
- Ding, J., Zhou, D., Sui, M., Meng, R., Chandra, A., Han, J., ... Ji, X. (2018). The effect of normobaric oxygen in patients with acute stroke: a systematic review and meta-analysis. *Neurological Research*, *30*, 1–12.
- Drew, P. J., Shih, A. Y., Driscoll, J. D., Knutsen, P. M., Blinder, P., Davalos, D., ... Kleinfeld, D. (2010). Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull. *Nature Methods*, *12*, 981–984.
- Efimova, I. Y., Efimova, N. Y., Triss, S. V., & Lishmanov, Y. B. (2008). Brain perfusion and cognitive function changes in hypertensive patients. *Hypertension Research : Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, *4*, 673–678.
- Eliasson, M. J., Huang, Z., Ferrante, R. J., Sasamata, M., Molliver, M. E., Snyder, S. H., & Moskowitz, M. a. (1999). Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *14*, 5910–5918.
- Eyo, U. B., Gu, N., De, S., Dong, H., Richardson, J. R., & Wu, L.-J. (2015). Modulation of microglial process convergence toward neuronal dendrites by extracellular calcium. *The*

- Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 6, 2417–2422.
- Eyo, U. B., Mo, M., Yi, M.-H., Murugan, M., Liu, J., Yarlagadda, R., ... Wu, L.-J. (2018). P2Y₁₂R-Dependent Translocation Mechanisms Gate the Changing Microglial Landscape. *Cell Reports*, 4, 959–966.
- Eyo, U. B., & Wu, L.-J. (2013). Bidirectional microglia-neuron communication in the healthy brain. *Neural Plasticity*, 456857.
- Faraco, G., & Iadecola, C. (2013). Hypertension: a harbinger of stroke and dementia. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 5, 810–817.
- Fazekas, F., Kleinert, R., Offenbacher, H., Schmidt, R., Kleinert, G., Payer, F., ... Lechner, H. (1993). Pathologic correlates of incidental MRI white matter signal hyperintensities. *Neurology*, 9, 1683–1689.
- Fernández-Arjona, M. D. M., Grondona, J. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., & López-Ávalos, M. D. (2017). Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 11–235.
- Ferrante, G., Nuzzi, N. P., Stefanini, G. G., Asteggiano, F., Marcheselli, S., Condorelli, G., & Reimers, B. (2016). Endovascular treatment vs. intravenous thrombolysis alone for ischaemic stroke: a meta-analysis of randomised controlled trials. *EuroIntervention : Journal of EuroPCR in Collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*, 2, e271–81.
- Flamant, M., Placier, S., Dubroca, C., Esposito, B., Lopes, I., Chatziantoniou, C., ... Lehoux, S. (2007). Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. *Hypertension*, 212–218.
- Forouzanfar, M. H., Liu, P., Roth, G. A., Ng, M., Biryukov, S., Marczak, L., ... Murray, C. J. L. (2017). Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mm Hg, 1990–2015. *JAMA*, 2, 165–182.
- Fournier, A. P., Quenault, A., Martinez de Lizarrondo, S., Gauberti, M., Defer, G., Vivien, D., ... Macrez, R. (2017). Prediction of disease activity in models of multiple sclerosis by molecular magnetic resonance imaging of P-selectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 23, 6116–6121.
- Franco, M. C. P., Higa, E. M. S., D’Almeida, V., de Sousa, F. G., Sawaya, A. L., Fortes, Z. B., & Sesso, R. (2007). Homocysteine and nitric oxide are related to blood pressure and vascular function in small-for-gestational-age children. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 2, 396–402.
- Fumagalli, S., Perego, C., Ortolano, F., & De Simoni, M.-G. (2013). CX3CR1 deficiency induces an early protective inflammatory environment in ischemic mice. *Glia*, 6, 827–842.
- Gareau, R. J., & Cartier, G. E. (1955). Histological study of 55 renal biopsies in hypertensive patients. *L’union Medicale Du Canada*, 10, 1134–1142.
- Gąsecki, D., Kwarciany, M., Nyka, W., & Narkiewicz, K. (2013). Hypertension, brain damage

- and cognitive decline. *Current Hypertension Reports*, 6, 547–558.
- GBD 2015 Risk Factors Collaborators. (2016). Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet (London, England)*, 10053, 1659–1724.
- Geloso, M. C., Corvino, V., Marchese, E., Serrano, A., Michetti, F., & D’Ambrosi, N. (2017). The Dual Role of Microglia in ALS: Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 242.
- Gerriets, T., Stolz, E., Walberer, M., Müller, C., Kluge, A., Bachmann, A., ... Bachmann, G. (2004). Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke*, 2, 566–571.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., ... Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, 6005, 841–845.
- GOLDBLATT, H. (1960). Direct determination of systemic blood pressure and production of hypertension in the rabbit. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 105, 213–216.
- Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzal, R. F., & Summerville, W. W. (1934). Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *The Journal of Experimental Medicine*, 3, 347–379.
- Green, D. R., & Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science (New York, N.Y.)*, 5684, 626–629.
- Greter, M., & Merad, M. (2013). Regulation of microglia development and homeostasis. *Glia*, 1, 121–127.
- Guha, M., & Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling*, 2, 85–94.
- Guo, X., Cheng, S., Taylor, K. D., Cui, J., Hughes, R., Quiñones, M. J., ... Rotter, J. I. (2005). Hypertension genes are genetic markers for insulin sensitivity and resistance. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 4, 799–803.
- Guzik, T. J., Hoch, N. E., Brown, K. A., McCann, L. A., Rahman, A., Dikalov, S., ... Harrison, D. G. (2007). Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *The Journal of Experimental Medicine*, 10, 2449–2460.
- Hanisch, U.-K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, 11, 1387–1394.
- Harrison, D. G., Widder, J., Grumbach, I., Chen, W., Weber, M., & Searles, C. (2006). Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *Journal of Internal Medicine*, 4, 351–363.
- Harry, G. J. (2013). Microglia during development and aging. *Pharmacology & Therapeutics*,

- 3, 313–326.
- Harwani, S. C. (2018). Macrophages under pressure: the role of macrophage polarization in hypertension. *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 191, 45–63.
- Harwani, S. C., Chapleau, M. W., Legge, K. L., Ballas, Z. K., & Abboud, F. M. (2012). Neurohormonal modulation of the innate immune system is proinflammatory in the prehypertensive spontaneously hypertensive rat, a genetic model of essential hypertension. *Circulation Research*, 9, 1190–1197.
- Haspula, D., & Clark, M. A. (2018). Neuroinflammation and sympathetic overactivity: Mechanisms and implications in hypertension. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 210, 10–17.
- Hassan, A., & Markus, H. S. (2000). Genetics and ischaemic stroke. *Brain : A Journal of Neurology*, 123, 1784–1812.
- Haynes, S. E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M. E., Gan, W.-B., & Julius, D. (2006). The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature Neuroscience*, 12, 1512–1519.
- Hickman, S. E., Kingery, N. D., Ohsumi, T. K., Borowsky, M. L., Wang, L., Means, T. K., & El Khoury, J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, 12, 1896–1905.
- Hierro-Bujalance, C., Bacsikai, B. J., & Garcia-Alloza, M. (2018). In Vivo Imaging of Microglia With Multiphoton Microscopy. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 218.
- Hill, R. a, & Grutzendler, J. (2014). In vivo imaging of oligodendrocytes with sulforhodamine 101. *Nature Methods*, 11, 1081–1082.
- Hoek, R. M., Ruuls, S. R., Murphy, C. A., Wright, G. J., Goddard, R., Zurawski, S. M., ... Sedgwick, J. D. (2000). Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science (New York, N.Y.)*, 5497, 1768–1771.
- Hossmann, K.-A. (2006). Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26, 1057–1083.
- Hristovska, I., & Pascual, O. (2015). Deciphering Resting Microglial Morphology and Process Motility from a Synaptic Prospect. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 19, 9-73.
- Hsieh, C. L., Koike, M., Spusta, S. C., Niemi, E. C., Yenari, M., Nakamura, M. C., & Seaman, W. E. (2009). A role for TREM2 ligands in the phagocytosis of apoptotic neuronal cells by microglia. *Journal of Neurochemistry*, 4, 1144–1156.
- Hu, X., Leak, R. K., Shi, Y., Suenaga, J., Gao, Y., Zheng, P., & Chen, J. (2015). Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. *Nature Reviews. Neurology*, 1, 56–64.
- Hu, X., Li, P., Guo, Y., Wang, H., Leak, R. K., Chen, S., ... Chen, J. (2012). Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 11, 3063–3070.

- Hua, F., Ma, J., Ha, T., Xia, Y., Kelley, J., Williams, D. L., ... Li, C. (2007). Activation of Toll-like receptor 4 signaling contributes to hippocampal neuronal death following global cerebral ischemia/reperfusion. *Journal of Neuroimmunology*, *190*, 101–111.
- Huang, J., Sun, X., Mao, Y., Zhu, X., Zhang, P., Zhang, L., ... Qiu, X. (2008). Expression of immunoglobulin gene with classical V-(D)-J rearrangement in mouse brain neurons. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *8*, 1604–1615.
- Hughson, M. D., Gobe, G. C., Hoy, W. E., Manning, R. D., Douglas-Denton, R., & Bertram, J. F. (2008). Associations of glomerular number and birth weight with clinicopathological features of African Americans and whites. *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, *1*, 18–28.
- Hülsmann, S., Hagos, L., Heuer, H., & Schnell, C. (2017). Limitations of Sulforhodamine 101 for Brain Imaging. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *28*, 11-44.
- Hyakkoku, K., Hamanaka, J., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Tanaka, H., Uematsu, S., ... Hara, H. (2010). Toll-like receptor 4 (TLR4), but not TLR3 or TLR9, knock-out mice have neuroprotective effects against focal cerebral ischemia. *Neuroscience*, *1*, 258–267.
- Iadecola, C., & Davisson, R. L. (2008). Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell Metabolism*, *6*, 476–484.
- Iadecola, C., & Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature Neuroscience*, *11*, 1369–1376.
- Iida, S., Baumbach, G. L., Lavoie, J. L., Faraci, F. M., Sigmund, C. D., & Heistad, D. D. (2005). Spontaneous stroke in a genetic model of hypertension in mice. *Stroke*, *6*, 1253–1258.
- Immink, R. V., van den Born, B.-J. H., van Montfrans, G. A., Koopmans, R. P., Karemaker, J. M., & van Lieshout, J. J. (2004). Impaired cerebral autoregulation in patients with malignant hypertension. *Circulation*, *15*, 2241–2245.
- Intengan, H. D., & Schiffrin, E. L. (2000). Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, *3*, 312–318.
- Ito, T., Yamakawa, H., Bregonzio, C., Terrón, J. A., Falcón-Neri, A., & Saavedra, J. M. (2002). Protection against ischemia and improvement of cerebral blood flow in genetically hypertensive rats by chronic pretreatment with an angiotensin II AT1 antagonist. *Stroke*, *9*, 2297–2303.
- Iulita, M. F., & Girouard, H. (2017). Treating Hypertension to Prevent Cognitive Decline and Dementia: Re-Opening the Debate. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *956*, 447–473.
- Iulita, M. F., Vallerand, D., Beauvillier, M., Hauptert, N., A Ulysse, C., Gagné, A., ... Girouard, H. (2018). Differential effect of angiotensin II and blood pressure on hippocampal inflammation in mice. *Journal of Neuroinflammation*, *1*, 62.
- Izzard, A. S., Horton, S., Heerkens, E. H., Shaw, L., & Heagerty, A. M. (2006). Middle cerebral artery structure and distensibility during developing and established phases of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Journal of Hypertension*, *5*, 875–880.

- Jayaraman, T., Paget, A., Shin, Y. S., Li, X., Mayer, J., Chaudhry, H., ... Berenstein, A. (2008). TNF-alpha-mediated inflammation in cerebral aneurysms: a potential link to growth and rupture. *Vascular Health and Risk Management*, 4, 805–817.
- Jennings, J. R., Muldoon, M. F., Ryan, C., Price, J. C., Greer, P., Sutton-Tyrrell, K., ... Meltzer, C. C. (2005). Reduced cerebral blood flow response and compensation among patients with untreated hypertension. *Neurology*, 8, 1358–1365.
- Jennings, J. R., & Zanstra, Y. (2009). Is the brain the essential in hypertension? *NeuroImage*, 3, 914–921.
- Jezova, D., Ochedalski, T., Kiss, A., & Aguilera, G. (1998). Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress. *Journal of Neuroendocrinology*, 1, 67–72.
- Jin Yang, & Clark, J. W. (2015). On the roles of vascular smooth muscle contraction in cerebral blood flow autoregulation - a modeling perspective. *Conference Proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference, 2015*, 7796–7799.
- Johar, S., Cave, A. C., Narayanapanicker, A., Grieve, D. J., & Shah, A. M. (2006). Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9, 1546–1548.
- Johnson, V. E., Stewart, J. E., Begbie, F. D., Trojanowski, J. Q., Smith, D. H., & Stewart, W. (2013). Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. *Brain : A Journal of Neurology*, 136, 28–42.
- Jolivel, V., Bicker, F., Binamé, F., Ploen, R., Keller, S., Gollan, R., ... Schmidt, M. H. H. (2015). Perivascular microglia promote blood vessel disintegration in the ischemic penumbra. *Acta Neuropathologica*, 2, 279–295.
- Jordan, J. D., & Powers, W. J. (2012). Cerebral autoregulation and acute ischemic stroke. *American Journal of Hypertension*, 9, 946–950.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A., & Littman, D. R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and Cellular Biology*, 11, 4106–4114.
- Kabba, J. A., Xu, Y., Christian, H., Ruan, W., Chenai, K., Xiang, Y., ... Pang, T. (2018). Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1, 53–71.
- Kang, Y.-M., Zhang, D.-M., Yu, X.-J., Yang, Q., Qi, J., Su, Q., ... Qin, D.-N. (2014). Chronic infusion of enalaprilat into hypothalamic paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy by restoring neurotransmitters and cytokines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 3, 436–444.
- Kapoor, K., Bhandare, A. M., Nedoboy, P. E., Mohammed, S., Farnham, M. M. J., & Pilowsky, P. M. (2016). Dynamic changes in the relationship of microglia to cardiovascular neurons in response to increases and decreases in blood pressure. *Neuroscience*, 329, 12–29.

- Kasal, D. A. B., & Schiffrin, E. L. (2012). Angiotensin II, Aldosterone, and Anti-Inflammatory Lymphocytes: Interplay and Therapeutic Opportunities. *International Journal of Hypertension*, 2012, 829786.
- Katholi, R. E., Naftilan, A. J., & Oparil, S. (1980). Importance of renal sympathetic tone in the development of DOCA-salt hypertension in the rat. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 3, 266–273.
- Kaur, C., & Ling, E.-A. (2017). The circumventricular organs. *Histology and Histopathology*, 9, 879–892.
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, 25, 5-461.
- Kazama, K., Wang, G., Frys, K., Anrather, J., & Iadecola, C. (2003). Angiotensin II attenuates functional hyperemia in the mouse somatosensory cortex. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 5, 1890–1899.
- Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P. K., & He, J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet (London, England)*, 9455, 217–223.
- Kennelly, S., & Collins, O. (2012). Walking the cognitive “minefield” between high and low blood pressure. *Journal of Alzheimer’s Disease : JAD*, 3, 609–621.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 2, 461–553.
- Kety, S. S., & Hafkenschiel, J. H. (1948). The blood flow, vascular resistance, and oxygen consumption of the brain in essential hypertension. *The Journal of Clinical Investigation*, 4, 511–514.
- Kida, S., Pantazis, A., & Weller, R. O. (1993). CSF drains directly from the subarachnoid space into nasal lymphatics in the rat. Anatomy, histology and immunological significance. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 6, 480–488.
- Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E. G., ... Prinz, M. (2013). Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nature Neuroscience*, 3, 273–280.
- Kierdorf, K., & Prinz, M. (2013). Factors regulating microglia activation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 23, 7-44.
- Kim, J.-Y., Kim, N., & Yenari, M. A. (2015). Mechanisms and potential therapeutic applications of microglial activation after brain injury. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 4, 309–319.
- Kitagawa, K. (2010). Cerebral blood flow measurement by PET in hypertensive subjects as a marker of cognitive decline. *Journal of Alzheimer’s Disease : JAD*, 3, 855–859.
- Kitamura, Y., Takata, K., Inden, M., Tsuchiya, D., Yanagisawa, D., Nakata, J., & Taniguchi, T. (2004). Intracerebroventricular injection of microglia protects against focal brain ischemia. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2, 203–206.

- Kluge, M. G., Kracht, L., Abdolhoseini, M., Ong, L. K., Johnson, S. J., Nilsson, M., & Walker, F. R. (2017). Impaired microglia process dynamics post-stroke are specific to sites of secondary neurodegeneration. *Glia*, *12*, 1885–1899.
- Koeglsperger, T., Li, S., Brenneis, C., Saulnier, J. L., Mayo, L., Carrier, Y., ... Weiner, H. L. (2013). Impaired glutamate recycling and GluN2B-mediated neuronal calcium overload in mice lacking TGF- β 1 in the CNS. *Glia*, *6*, 985–1002.
- Kohman, R. A., DeYoung, E. K., Bhattacharya, T. K., Peterson, L. N., & Rhodes, J. S. (2012). Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, *5*, 803–810.
- Kohman, R. A., & Rhodes, J. S. (2013). Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, *1*, 22–32.
- Korpai, A. K., Brown, C. H., & Schwenke, D. O. (2018). Assessing the role of hypothalamic microglia and blood vessel disruption in the development of angiotensin II-dependent hypertension in Cyp1a1-Ren2 rats. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, *6*, 883–895.
- Kraft, A. D., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2009). Heterogeneity of microglia and TNF signaling as determinants for neuronal death or survival. *Neurotoxicology*, *5*, 785–793.
- Krstic, D., Madhusudan, A., Doehner, J., Vogel, P., Notter, T., Imhof, C., ... Knuesel, I. (2012). Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. *Journal of Neuroinflammation*, *1*, 151.
- Kuhn, S. A., van Landeghem, F. K. H., Zacharias, R., Färber, K., Rappert, A., Pavlovic, S., ... Kettenmann, H. (2004). Microglia express GABA(B) receptors to modulate interleukin release. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *2*, 312–322.
- Kurdi, M., & Booz, G. W. (2011). New take on the role of angiotensin II in cardiac hypertrophy and fibrosis. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, *6*, 1034–1038.
- Laflamme, N., & Rivest, S. (2001). Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *1*, 155–163.
- Lai, T. W., Zhang, S., & Wang, Y. T. (2014). Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, *115*, 157–188.
- Lalancette-Hébert, M., Gowing, G., Simard, A., Weng, Y. C., & Kriz, J. (2007). Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *10*, 2596–2605.
- Lambertsen, K. L., Meldgaard, M., Ladeby, R., & Finsen, B. (2005). A quantitative study of microglial-macrophage synthesis of tumor necrosis factor during acute and late focal cerebral ischemia in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *1*, 119–135.

- Lauro, C., Catalano, M., Trettel, F., & Limatola, C. (2015). Fractalkine in the nervous system: neuroprotective or neurotoxic molecule? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1351, 141–148.
- Law, M. R., Morris, J. K., & Wald, N. J. (2009). Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 19, 338-1665.
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 1, 151–170.
- Lee, Y., Lee, S.-R., Choi, S. S., Yeo, H.-G., Chang, K.-T., & Lee, H. J. (2014). Therapeutically targeting neuroinflammation and microglia after acute ischemic stroke. *BioMed Research International*, 2014, 297241.
- Lerman, L. O., Chade, A. R., Sica, V., & Napoli, C. (2005). Animal models of hypertension: an overview. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 3, 160–173.
- Lerman, L. O., Schwartz, R. S., Grande, J. P., Sheedy, P. F., & Romero, J. C. (1999). Noninvasive evaluation of a novel swine model of renal artery stenosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 7, 1455–1465.
- Letourneur, A., Roussel, S., Toutain, J., Bernaudin, M., & Touzani, O. (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 : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2, 504–513.
- Levi Marpillat, N., Macquin-Mavier, I., Tropeano, A.-I., Bachoud-Levi, A.-C., & Maison, P. (2013). Antihypertensive classes, cognitive decline and incidence of dementia: a network meta-analysis. *Journal of Hypertension*, 6, 1073–1082.
- Lewington, S., Clarke, R., Qizilbash, N., Peto, R., Collins, R., & Prospective Studies Collaboration. (2002). Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet (London, England)*, 9349, 1903–1913.
- Li, Y., Du, X.-F., Liu, C.-S., Wen, Z.-L., & Du, J.-L. (2012). Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Developmental Cell*, 6, 1189–1202.
- Liang, K. J., Lee, J. E., Wang, Y. D., Ma, W., Fontainhas, A. M., Fariss, R. N., & Wong, W. T. (2009). Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 9, 4444–4451.
- Lin, H. Y., Lee, Y. T., Chan, Y. W., & Tse, G. (2016). Animal models for the study of primary and secondary hypertension in humans. *Biomedical Reports*, 6, 653–659.
- Lindholm, L. H., Ibsen, H., Dahlöf, B., Devereux, R. B., Beevers, G., de Faire, U., LIFE Study Group. (2002). Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet (London, England)*, 9311, 1004–1010.

- Liu, G. J., Nagarajah, R., Banati, R. B., & Bennett, M. R. (2009). Glutamate induces directed chemotaxis of microglia. *The European Journal of Neuroscience*, *6*, 1108–1118.
- Liu, H., Leak, R. K., & Hu, X. (2016). Neurotransmitter receptors on microglia. *Stroke and Vascular Neurology*, *2*, 52–58.
- Liu, Z., & Chopp, M. (2016). Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Progress in Neurobiology*, *144*, 103–120.
- Lohmeier, T. E. (2012). Angiotensin II infusion model of hypertension: is there an important sympathetic component? *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, *3*, 539–541.
- Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S., & Cummins, R. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, *1*, 84–91.
- Lou, N., Takano, T., Pei, Y., Xavier, A. L., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2016). Purinergic receptor P2RY12-dependent microglial closure of the injured blood–brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *4*, 1074–1079.
- Louveau, A., Harris, T. H., & Kipnis, J. (2015). Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends in Immunology*, *10*, 569–577.
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., ... Kipnis, J. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, *7560*, 337–341.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, *2*, 145–151.
- Lynch, M. A. (2015). Neuroinflammatory changes negatively impact on LTP: A focus on IL-1 β . *Brain Research*, *1621*, 197–204.
- Ma, Y., Wang, J., Wang, Y., & Yang, G.-Y. (2017). The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Progress in Neurobiology*, *157*, 247–272.
- Macrez, R., Ali, C., Toutirais, O., Le Mauff, B., Defer, G., Dirnagl, U., & Vivien, D. (2011). Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *The Lancet. Neurology*, *5*, 471–480.
- Maggi, L., Scianni, M., Branchi, I., D’Andrea, I., Lauro, C., & Limatola, C. (2011). CX(3)CR1 deficiency alters hippocampal-dependent plasticity phenomena blunting the effects of enriched environment. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *19*, 5-22.
- Malpas, S. C. (2010). Sympathetic Nervous System Overactivity and Its Role in the Development of Cardiovascular Disease. *Physiology Reviews*, *2*, 513–557..
- Marchal, G., Serrati, C., Rioux, P., Petit-Taboué, M. C., Viader, F., de la Sayette, V., ... Orgogozo, J. M. (1993). PET imaging of cerebral perfusion and oxygen consumption in acute ischaemic stroke: relation to outcome. *Lancet (London, England)*, *8850*, 925–927.
- Marvar, P. J., Lob, H., Vinh, A., Zarreen, F., & Harrison, D. G. (2011). The central nervous system and inflammation in hypertension. *Current Opinion in Pharmacology*, *2*, 156–161.
- Mattson, D. L. (2014). Infiltrating immune cells in the kidney in salt-sensitive hypertension and

- renal injury. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 5, 499-508.
- McKinley, M. J., Albiston, A. L., Allen, A. M., Mathai, M. L., May, C. N., McAllen, R. M., ... Chai, S. Y. (2003). The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 6, 901-918.
- Mead, E. L., Mosley, A., Eaton, S., Dobson, L., Heales, S. J., & Pocock, J. M. (2012). Microglial neurotransmitter receptors trigger superoxide production in microglia; consequences for microglial-neuronal interactions. *Journal of Neurochemistry*, 2, 287-301.
- MEDAWAR, P. B. (1948). Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *British Journal of Experimental Pathology*, 1, 58-69.
- Meissner, A., Minnerup, J., Soria, G., & Planas, A. M. (2017). Structural and functional brain alterations in a murine model of Angiotensin II-induced hypertension. *Journal of Neurochemistry*, 3, 509-521.
- Ménard, B., Chazalviel, L., Roussel, S., Bernaudin, M., & Touzani, O. (2017). Two-kidney one-clip is a pertinent approach to integrate arterial hypertension in animal models of stroke: Serial magnetic resonance imaging studies of brain lesions before and during cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 271678X17715813.
- Mervaala, E., Müller, D. N., Schmidt, F., Park, J. K., Gross, V., Bader, M., ... Luft, F. C. (2000). Blood pressure-independent effects in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 2, 587-594.
- Messerli, F. H., Williams, B., & Ritz, E. (2007). Essential hypertension. *Lancet (London, England)*, 9587, 591-603.
- Mirhafez, S. R., Mohebati, M., Feiz Disfani, M., Saberi Karimian, M., Ebrahimi, M., Avan, A., ... Ghayour-Mobarhan, M. (2014). An imbalance in serum concentrations of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*, 9, 614-623.
- Mittelbronn, M., Dietz, K., Schluesener, H. J., & Meyermann, R. (2001). Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathologica*, 3, 249-255.
- Möller, K., Boltze, J., Pösel, C., Seeger, J., Stahl, T., & Wagner, D.-C. (2014). Sterile inflammation after permanent distal MCA occlusion in hypertensive rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2, 307-315. 9
- Monassier, L., Combe, R., & Fertak, L. El. (2006). Mouse models of hypertension. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 3, 273-281.
- Morrison, H. W., & Filosa, J. A. (2013). A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *Journal of Neuroinflammation*, 1, 4.
- Moustafa, R. R., & Baron, J.-C. (2008). Pathophysiology of ischaemic stroke: insights from

- imaging, and implications for therapy and drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 153, 44-54.
- Mullins, L. J., Bailey, M. A., & Mullins, J. J. (2006). Hypertension, kidney, and transgenics: a fresh perspective. *Physiological Reviews*, 2, 709–746.
- Murphy, B. D., Fox, A. J., Lee, D. H., Sahlas, D. J., Black, S. E., Hogan, M. J., ... Lee, T.-Y. (2006). Identification of penumbra and infarct in acute ischemic stroke using computed tomography perfusion-derived blood flow and blood volume measurements. *Stroke*, 7, 1771–1777.
- Murugan, M., Ling, E.-A., & Kaur, C. (2013). Glutamate receptors in microglia. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 6, 773–784.
- Murugan, M., Sivakumar, V., Lu, J., Ling, E.-A., & Kaur, C. (2011). Expression of N-methyl D-aspartate receptor subunits in amoeboid microglia mediates production of nitric oxide via NF- κ B signaling pathway and oligodendrocyte cell death in hypoxic postnatal rats. *Glia*, 4, 521–539.
- Navascués, J., Calvente, R., Marín-Teva, J. L., & Cuadros, M. A. (2000). Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 1, 91–102.
- Nayak, D., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2014). Microglia development and function. *Annual Review of Immunology*, 32, 367–402.
- Neher, J. J., Emmrich, J. V., Fricker, M., Mander, P. K., Théry, C., & Brown, G. C. (2013). Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 43, E4098-107.
- Neumann, H., Kotter, M. R., & Franklin, R. J. M. (2009). Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain : A Journal of Neurology*, 132, 288–295.
- Nimmerjahn, A. (2012). Two-photon imaging of microglia in the mouse cortex in vivo. *Cold Spring Harbor Protocols*, 5, 594–603.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 5726, 1314–1318.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J. N. D., & Helmchen, F. (2004). Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nature Methods*, 1, 31–37.
- Nogueira, R. G., Jadhav, A. P., Haussen, D. C., Bonafe, A., Budzik, R. F., Bhuva, P., DAWN Trial Investigators. (2018). Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *The New England Journal of Medicine*, 1, 11–21.
- Norden, D. M., & Godbout, J. P. (2013). Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 1, 19–34.
- Obst, M., Gross, V., & Luft, F. C. (2004). Systemic hemodynamics in non-anesthetized L-

- NAME- and DOCA-salt-treated mice. *Journal of Hypertension*, 10, 1889–1894.
- Ohsawa, K., Irino, Y., Sanagi, T., Nakamura, Y., Suzuki, E., Inoue, K., & Kohsaka, S. (2010). P2Y12 receptor-mediated integrin-beta1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia*, 7, 790–801.
- Ohtake, Y., Smith, G. M., & Li, S. (2016). Reactive astrocyte scar and axon regeneration: suppressor or facilitator? *Neural Regeneration Research*, 7, 1050–1051.
- Oprisiu-Fournier, R., Faure, S., Mazouz, H., Boutitie, F., Serot, J.-M., Achard, J.-M., ... Fournier, A. (2009). Angiotensin AT1-receptor blockers and cerebrovascular protection: do they actually have a cutting edge over angiotensin-converting enzyme inhibitors? *Expert Review of Neurotherapeutics*, 9, 1289–1305.
- Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology*, 4, 649–665.
- Owens, T., Babcock, A. A., Millward, J. M., & Toft-Hansen, H. (2005). Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 2, 178–184.
- Pabon, M. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Gemma, C., & Bickford, P. C. (2011). CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 25, 8-9.
- Paiardi, S., Rodella, L. F., De Ciuceis, C., Porter, E., Boari, G. E. M., Rezzani, R., ... Agabiti-Rosei, E. (2009). Immunohistochemical evaluation of microvascular rarefaction in hypertensive humans and in spontaneously hypertensive rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 4, 259–268.
- Palmer, A. J., Bulpitt, C. J., Fletcher, A. E., Beevers, D. G., Coles, E. C., Ledingham, J. G., Webster, J. (1992). Relation between blood pressure and stroke mortality. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 5, 601–605.
- Panek, R. L., Ryan, M. J., Weishaar, R. E., & Taylor, D. G. (1991). Development of a high renin model of hypertension in the cynomolgus monkey. *Clinical and Experimental Hypertension. Part A, Theory and Practice*, 8, 1395–1414.
- Pardon, M. C. (2015). Lipopolysaccharide hyporesponsiveness: protective or damaging response to the brain? *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 3, 903–913.
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., Lafaille, J. J., ... Gan, W. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, 7, 1596–1609.
- Paschen, W. (2003). Shutdown of translation: lethal or protective? Unfolded protein response versus apoptosis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 7, 773–779.
- Paulson, O. B., Strandgaard, S., & Edvinsson, L. (1990). Cerebral autoregulation. *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews*, 2, 161–192.
- Paulson, O. B., & Waldemar, G. (1991). Role of the local renin-angiotensin system in the

- autoregulation of the cerebral circulation. *Blood Vessels*, 28, 231–235.
- Perego, C., Fumagalli, S., & De Simoni, M.-G. (2011). Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 1, 174.
- Perrine AL, Lecoffre C, Blacher J, O. V. (2018). 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. *Bull Epidemiol Hebd*, 10, 170–179.
- Piccio, L., Buonsanti, C., Mariani, M., Cella, M., Gilfillan, S., Cross, A. H., ... Panina-Bordignon, P. (2007). Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *European Journal of Immunology*, 5, 1290–1301.
- Pinteaux-Jones, F., Sevastou, I. G., Fry, V. A. H., Heales, S., Baker, D., & Pocock, J. M. (2008). Myelin-induced microglial neurotoxicity can be controlled by microglial metabotropic glutamate receptors. *Journal of Neurochemistry*, 1, 442–454.
- Pires, P. W., Dams Ramos, C. M., Matin, N., & Dorrance, A. M. (2013). The effects of hypertension on the cerebral circulation. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 12, H1598-614.
- Poulter, N. R., Prabhakaran, D., & Caulfield, M. (2015). Hypertension. *Lancet (London, England)*, 9995, 801–812.
- Powers, W. J. (1991). Cerebral hemodynamics in ischemic cerebrovascular disease. *Annals of Neurology*, 3, 231–240.
- Qin, L., Li, G., Qian, X., Liu, Y., Wu, X., Liu, B., ... Block, M. L. (2005). Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. *Glia*, 1, 78–84.
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, 8, 987–991.
- Raposo, C., & Schwartz, M. (2014). Glial scar and immune cell involvement in tissue remodeling and repair following acute CNS injuries. *Glia*, 11, 1895–1904.
- Rapsomaniki, E., Timmis, A., George, J., Pujades-Rodriguez, M., Shah, A. D., Denaxas, S., ... Hemingway, H. (2014). Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1·25 million people. *Lancet (London, England)*, 9932, 1899–1911.
- Rasmussen, R., Nedergaard, M., & Petersen, N. C. (2016). Sulforhodamine 101, a widely used astrocyte marker, can induce cortical seizure-like activity at concentrations commonly used. *Scientific Reports*, 26, 6-30433.
- Raźny, K., Bednarski, M., Sapa, J., Gdula-Argasińska, J., Tyszka-Czochara, M., Librowski, T., & Sałat, K. (2014). Animal Models for Hypertension Research Short Review. *Acta biologica cracoviensla, Series Zoologia*, 5556, 124–129.
- Re-examining Acute Eligibility for Thrombolysis (TREAT) Task Force:, Levine, S. R., Khatri,

- P., Broderick, J. P., Grotta, J. C., Kasner, S. E., ... NINDS rt-PA Stroke Trial Investigators. (2013). Review, historical context, and clarifications of the NINDS rt-PA stroke trials exclusion criteria: Part 1: rapidly improving stroke symptoms. *Stroke*, *9*, 2500–2505.
- Resaie, P., & Hanish, U.-K. (2014). *Microglia in health and disease*.
- Rizzi, E., Ceron, C. S., Guimaraes, D. A., Prado, C. M., Rossi, M. A., Gerlach, R. F., & Tanus-Santos, J. E. (2013). Temporal changes in cardiac matrix metalloproteinase activity, oxidative stress, and TGF- β in renovascular hypertension-induced cardiac hypertrophy. *Experimental and Molecular Pathology*, *1*, 1–9.
- Rizzoni, D., Porteri, E., Boari, G. E. M., De Ciuceis, C., Sleiman, I., Muiesan, M. L., ... Agabiti-Rosei, E. (2003). Prognostic Significance of Small-Artery Structure in Hypertension. *Circulation*, *18*, 2230–2235.
- Rogers, J. T., Morganti, J. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Peters, M. M., Grimmig, B. A., ... Gemma, C. (2011). CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *45*, 16241–16250.
- Roome, C. J., & Kuhn, B. (2014). Chronic cranial window with access port for repeated cellular manipulations, drug application, and electrophysiology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*, 8-379.
- Rosand, J., & Schwamm, L. H. (2001). Management of Brain Edema Complicating Stroke. *Journal of Intensive Care Medicine*, *3*, 128–141.
- Rosenberg, G. A. (1999). Ischemic brain edema. *Progress in Cardiovascular Diseases*, *3*, 209–216.
- Rothwell, N., Allan, S., & Toulmond, S. (1997). The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. *The Journal of Clinical Investigation*, *11*, 2648–2652.
- Saavedra, J. M. (2012). Angiotensin II AT(1) receptor blockers ameliorate inflammatory stress: a beneficial effect for the treatment of brain disorders. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *5*, 667–681.
- Saavedra, J. M., & Benicky, J. (2007). Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. *Stress*, *2*, 185–193.
- Saavedra, J. M., Benicky, J., & Zhou, J. (2006). Angiotensin II: multitasking in the brain. *Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension*, *24*, 131-137.
- Sadakane, O., Masamizu, Y., Watakabe, A., Terada, S.-I., Ohtsuka, M., Takaji, M., ... Yamamori, T. (2015). Long-Term Two-Photon Calcium Imaging of Neuronal Populations with Subcellular Resolution in Adult Non-human Primates. *Cell Reports*, *9*, 1989–1999.
- Sandoo, A., van Zanten, J. J. C. S. V., Metsios, G. S., Carroll, D., & Kitas, G. D. (2010). The endothelium and its role in regulating vascular tone. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, *1*, 302–312.

- Sato, K. (2015). Effects of Microglia on Neurogenesis. *Glia*, 8, 1394–1405.
- Schiffrin, E. L. (2004). Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *American Journal of Hypertension*, 17, 1192–1200.
- Schilling, T., Nitsch, R., Heinemann, U., Haas, D., & Eder, C. (2001). Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K⁺ channel expression in microglia via distinct signalling pathways. *The European Journal of Neuroscience*, 3, 463–473.
- Schlager, G. (1994). Biometrical genetic analysis of blood pressure level in the genetically hypertensive mouse. *Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y. : 1993)*, 6, 809–824.
- Schlager, G., & Sides, J. (1997). Characterization of hypertensive and hypotensive inbred strains of mice. *Laboratory Animal Science*, 3, 288–292.
- Schwartz, M., & Raposo, C. (2014). Protective Autoimmunity: A Unifying Model for the Immune Network Involved in CNS Repair. *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 4, 343–358.
- Schwarz, J. M., Hutchinson, M. R., & Bilbo, S. D. (2011). Early-life experience decreases drug-induced reinstatement of morphine CPP in adulthood via microglial-specific epigenetic programming of anti-inflammatory IL-10 expression. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 49, 17835–17847.
- Shen, X. Z., Li, Y., Li, L., Shah, K. H., Bernstein, K. E., Lyden, P., & Shi, P. (2015). Microglia participate in neurogenic regulation of hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 2, 309–316.
- Shi, P., Diez-Freire, C., Jun, J. Y., Qi, Y., Katovich, M. J., Li, Q., Raizada, M. K. (2010). Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 2, 297–303.
- Shi, P., Grobe, J. L., Desland, F. A., Zhou, G., Shen, X. Z., Shan, Z., Summers, C. (2014). Direct pro-inflammatory effects of prorenin on microglia. *PloS One*, 9, e92937.
- Shih, A. Y., Driscoll, J. D., Drew, P. J., Nishimura, N., Schaffer, C. B., & Kleinfeld, D. (2012). Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 7, 1277–1309.
- Shih, A. Y., Mateo, C., Drew, P. J., Tsai, P. S., & Kleinfeld, D. (2012). A polished and reinforced thinned-skull window for long-term imaging of the mouse brain. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 61, 4–9.
- Shih, Y.-H., Tsai, S.-F., Huang, S.-H., Chiang, Y.-T., Hughes, M. W., Wu, S.-Y., Kuo, Y.-M. (2016). Hypertension impairs hippocampus-related adult neurogenesis, CA1 neuron dendritic arborization and long-term memory. *Neuroscience*, 322, 346–357.
- Shim, H.-J., Jung, W. B., Schlegel, F., Lee, J., Kim, S., Lee, J., & Kim, S.-G. (2018). Mouse fMRI under ketamine and xylazine anesthesia: Robust contralateral somatosensory cortex activation in response to forepaw stimulation. *NeuroImage*, 177, 30–44.

- Shin, H. K., Dunn, A. K., Jones, P. B., Boas, D. A., Lo, E. H., Moskowitz, M. A., & Ayata, C. (2007). Normobaric hyperoxia improves cerebral blood flow and oxygenation, and inhibits peri-infarct depolarizations in experimental focal ischaemia. *Brain: A Journal of Neurology*, *130*, 1631–1642.
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J. P., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, *7*, 483–495.
- Siesjö, B. K., Elmér, E., Janelidze, S., Keep, M., Kristián, T., Ouyang, Y. B., & Uchino, H. (1999). Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure. *Acta Neurochirurgica. Supplement*, *73*, 7–13.
- Sipe, G. O., Lowery, R. L., Tremblay, M.-È., Kelly, E. A., Lamantia, C. E., & Majewska, A. K. (2016). Microglial P2Y₁₂ is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex. *Nature Communications*, *7*, 10905.
- Skoog, I., & Gustafson, D. (2006). Update on hypertension and Alzheimer's disease. *Neurological Research*, *6*, 605–611.
- Small, H. Y., Migliarino, S., Czesnikiewicz-Guzik, M., & Guzik, T. J. (2018). Hypertension: Focus on autoimmunity and oxidative stress. *18*, 30938-30939.
- Smith, H. K., Russell, J. M., Granger, D. N., & Gavins, F. N. E. (2015). Critical differences between two classical surgical approaches for middle cerebral artery occlusion-induced stroke in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, *249*, 99–105.
- Sokolova, I. A., Manukhina, E. B., Blinkov, S. M., Koshelev, V. B., Pinelis, V. G., & Rodionov, I. M. (1985). Rarefication of the arterioles and capillary network in the brain of rats with different forms of hypertension. *Microvascular Research*, *1*, 1–9.
- Sriram, K., Matheson, J. M., Benkovic, S. A., Miller, D. B., Luster, M. I., & O'Callaghan, J. P. (2006). Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF-alpha. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *6*, 670–682.
- Sriramula, S., Cardinale, J. P., & Francis, J. (2013). Inhibition of TNF in the brain reverses alterations in RAS components and attenuates angiotensin II-induced hypertension. *PLoS One*, *5*, e63847.
- Steinman, L. (2004). Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nature Immunology*, *6*, 575–581.
- Stetter, C., Hirschberg, M., Nieswandt, B., Ernestus, R.-I., Heckmann, M., & Sirén, A.-L. (2013). An experimental protocol for in vivo imaging of neuronal structural plasticity with 2-photon microscopy in mice. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, *5*-9.
- Stocchetti, N., Taccone, F. S., Citerio, G., Pepe, P. E., Le Roux, P. D., Oddo, M., ... Vincent, J.-L. (2015). Neuroprotection in acute brain injury: an up-to-date review. *Critical Care (London, England)*, *1*, 186.
- Stocker, S. D., Kinsman, B. J., & Sved, A. F. (2017). Recent Advances in Neurogenic

- Hypertension: Dietary Salt, Obesity, and Inflammation. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 3, 474–478.
- Strandgaard, S., & Paulson, O. B. (1989). Cerebral blood flow and its pathophysiology in hypertension. *American Journal of Hypertension*, 2, 486–492.
- Sun, L., Strelow, H., Mies, G., & Veltkamp, R. (2011). Oxygen therapy improves energy metabolism in focal cerebral ischemia. *Brain Research*, 1415, 103–108.
- Szalay, G., Martinecz, B., Lénárt, N., Környei, Z., Orsolits, B., Judák, L., ... Dénes, Á. (2016). Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nature Communications*, 7, 11499.
- Takesue, K., Kishi, T., Hirooka, Y., & Sunagawa, K. (2017). Activation of microglia within paraventricular nucleus of hypothalamus is NOT involved in maintenance of established hypertension. *Journal of Cardiology*, 1, 84–88.
- Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 2, 1181–1194.
- Thiel, A., & Heiss, W.-D. (2011). Imaging of microglia activation in stroke. *Stroke*, 2, 507–512.
- Thored, P., Heldmann, U., Gomes-Leal, W., Gisler, R., Darsalia, V., Taneera, J., ... Lindvall, O. (2009). Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia*, 8, 835–849.
- Thurston, H., & Swales, J. D. (1976). Influence of sodium restriction upon two models of renal hypertension. *Clinical Science and Molecular Medicine*, 3, 275–279.
- Tomek, J., & Bub, G. (2017). Hypertension-induced remodelling: on the interactions of cardiac risk factors. *The Journal of Physiology*, 12, 4027–4036.
- Toth, P., Tucsek, Z., Sosnowska, D., Gautam, T., Mitschelen, M., Tarantini, S., ... Ungvari, Z. (2013). Age-related autoregulatory dysfunction and cerebrovascular injury in mice with angiotensin II-induced hypertension. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 11, 1732–1742.
- Touyz, R. M. (2004). Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 8, 1263–1273.
- Touyz, R. M., & Schiffrin, E. L. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological Reviews*, 4, 639–672.
- Touyz, R. M., & Schiffrin, E. L. (2004). Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochemistry and Cell Biology*, 4, 339–352.
- Traon, A. P.-L., Costes-Salon, M.-C., Galinier, M., Fourcade, J., & Larrue, V. (2002). Dynamics of cerebral blood flow autoregulation in hypertensive patients. *Journal of the*

- Neurological Sciences*, 2, 139–144.
- Tremblay, M.-È., Lowery, R. L., & Majewska, A. K. (2010). Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biology*, 11, e1000527.
- Tremblay, M.-È., & Majewska, A. K. (2011). A role for microglia in synaptic plasticity? *Communicative & Integrative Biology*, 2, 220–222.
- Tyagi, N., Moshal, K. S., Lominadze, D., Ovechkin, A. V., & Tyagi, S. C. (2005). Homocysteine-dependent cardiac remodeling and endothelial-myocyte coupling in a 2 kidney, 1 clip Goldblatt hypertension mouse model. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 7, 583–594.
- Unité de surveillance et d'épidémiologie nutritionnelle (Usen). (2007). Étude Nationale Nutrition Nanté (ENNS , 2006) - Situation nutritionnelle en France en 2006 selon les indicateurs d'objectif et les repères du Programme National Nutrition et Santé (PNNS), 74.
- Verney, C., Monier, A., Fallet-Bianco, C., & Gressens, P. (2010). Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *Journal of Anatomy*, 4, 436–448.
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S., & Nabekura, J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13, 3974–3980.
- Wang, G., Zhang, J., Hu, X., Zhang, L., Mao, L., Jiang, X., ... Chen, J. (2013). Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 12, 1864–1874.
- Wei, S.-G., Yu, Y., Zhang, Z.-H., & Felder, R. B. (2015). Proinflammatory cytokines upregulate sympathoexcitatory mechanisms in the subfornical organ of the rat. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 5, 1126–1133.
- Wei, S.-G., Zhang, Z.-H., Beltz, T. G., Yu, Y., Johnson, A. K., & Felder, R. B. (2013). Subfornical organ mediates sympathetic and hemodynamic responses to blood-borne proinflammatory cytokines. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 1, 118–125.
- Wendt, S., Wogram, E., Korvers, L., & Kettenmann, H. (2016). Experimental Cortical Spreading Depression Induces NMDA Receptor Dependent Potassium Currents in Microglia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23, 6165–6174.
- Wiesel, P., Mazzolai, L., Nussberger, J., & Pedrazzini, T. (1997). Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 4, 1025–1030.
- Wilson, C., & Byrom, F. B. (1939). Renal changes in malignant hypertension. *The Lancet*, 6021, 136–139.
- Winklewski, P. J., Radkowski, M., & Demkow, U. (2016). Neuroinflammatory mechanisms of

- hypertension: potential therapeutic implications. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 5, 410–416.
- Winkiewski, P. J., Radkowski, M., Wszedybyl-Winklewska, M., & Demkow, U. (2015). Brain inflammation and hypertension: the chicken or the egg? *Journal of Neuroinflammation*, 1, 85.
- Winship, I. R. (2015). Cerebral collaterals and collateral therapeutics for acute ischemic stroke. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 3, 228–236.
- Wollmer, M. A., Lucius, R., Wilms, H., Held-Feindt, J., Sievers, J., & Mentlein, R. (2001). ATP and adenosine induce ramification of microglia in vitro. *Journal of Neuroimmunology*, 2, 19–27.
- Wright, F. A., O'Connor, D. T., Roberts, E., Kutey, G., Berry, C. C., Yoneda, L. U., ... Schlager, G. (1999). Genome scan for blood pressure loci in mice. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 34, 625–630.
- Wu, K. L. H., Chan, S. H. H., & Chan, J. Y. H. (2012). Neuroinflammation and oxidative stress in rostral ventrolateral medulla contribute to neurogenic hypertension induced by systemic inflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 1, 212.
- Wu, L.-J., Vadakkan, K. I., & Zhuo, M. (2007). ATP-induced chemotaxis of microglial processes requires P2Y receptor-activated initiation of outward potassium currents. *Glia*, 8, 810–821.
- Xie, P. L., McDowell, T. S., Chapleau, M. W., Hajduczuk, G., & Abboud, F. M. (1991). Rapid baroreceptor resetting in chronic hypertension. Implications for normalization of arterial pressure. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 1, 72–79.
- Xu, H.-T., Pan, F., Yang, G., & Gan, W.-B. (2007). Choice of cranial window type for in vivo imaging affects dendritic spine turnover in the cortex. *Nature Neuroscience*, 5, 549–551.
- Yang, G., Pan, F., Parkhurst, C. N., Grutzendler, J., & Gan, W.-B. (2010). Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nature Protocols*, 2, 201–208.
- Youn, J.-C., Yu, H. T., Lim, B. J., Koh, M. J., Lee, J., Chang, D.-Y., ... Park, S. (2013). Immunosenescent CD8⁺ T cells and C-X-C chemokine receptor type 3 chemokines are increased in human hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 1, 126–133.
- Zaleska, M. M., Mercado, M. L. T., Chavez, J., Feuerstein, G. Z., Pangalos, M. N., & Wood, A. (2009). The development of stroke therapeutics: promising mechanisms and translational challenges. *Neuropharmacology*, 2, 329–341.
- Zanier, E. R., Fumagalli, S., Perego, C., Pischiutta, F., & De Simoni, M.-G. (2015). Shape descriptors of the “never resting” microglia in three different acute brain injury models in mice. *Intensive Care Medicine Experimental*, 1, 39.
- Zimmerman, M. C., Lazartigues, E., Sharma, R. V., & Davisson, R. L. (2004). Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circulation Research*, 2, 210–216.

Zipfel, W. R., Williams, R. M., & Webb, W. W. (2003). Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, *11*, 1369–1377.

Annexe 1

Falzone et al., 2018

***Dosimetric evaluation of radionuclides for VCAM-1- targeted
radionuclide therapy of early brain metastases***

Theranostics

Dosimetric evaluation of radionuclides for VCAM-1- targeted radionuclide therapy of early brain metastases

Falzone et al., 2018

Les métastases cérébrales se développent fréquemment chez les patients atteints d'un cancer du sein et leur traitement représente un défi thérapeutique majeur. La molécule d'adhésion vasculaire-1 (VCAM-1) est surexprimée à la membrane des cellules endothéliales du cerveau pendant les premiers stades d'invasion métastatique et constitue ainsi une cible pour la détection et le traitement des métastases cérébrales précoces.

L'injection intraveineuse de radioisotopes couplés à des anticorps anti-VCAM1 permettrait de cibler directement les métastases à un temps précoce tout en limitant le dépôt de dose et donc les dommages au tissu sain environnant. L'objectif de cette étude *in silico* était d'évaluer l'efficacité de radioisotopes émetteurs de particules α - ou β , possédant des propriétés de dépôt de dose différents, comme thérapie précoce des métastases cérébrales.

Dans un premier temps, la microscopie biphotonique a été un outil essentiel pour l'analyse 3D de la disposition des métastases cérébrales au sein du parenchyme cérébral et notamment l'analyse de leur distance maximale aux vaisseaux sanguins. L'imagerie *in vivo* a été réalisée sur des souris *nude*, dans un modèle de métastases cérébrales précoces, après injection intracardiaque de cellules tumorales.

L'analyse morphologique 3D a permis par la suite de réaliser une simulation Monte-Carlo, où la conformation géométrique de la disposition des cellules tumorales par rapport à celle du compartiment vasculaire cérébral est modélisée.

A partir de cette simulation, le dépôt de dose des différents types de radioisotope a été analysé et a montré que le ^{212}Pb , un émetteur de particules α serait le radioisotope le plus intéressant dans l'approche thérapeutique proposée.

Une étude *in vivo* est actuellement en cours pour analyser l'efficacité du ^{212}Pb sur ce même modèle murin de métastases cérébrales précoces et pourrait par la suite être envisagé pour un transfert au niveau clinique.



Research Paper

Dosimetric evaluation of radionuclides for VCAM-1-targeted radionuclide therapy of early brain metastases

Nadia Falzone^{1*}, Nicole L. Ackerman^{2*}, Liset de la Fuente Rosales³, Mario A. Bernal³, Xiaoxuan Liu¹, Sarah GJA Peeters¹, Manuel Sarmiento Soto¹, Aurélien Corroyer-Dulmont^{1,4}, Myriam Bernaudin⁴, Elisa Grimoin⁴, Omar Touzani⁴, Nicola R. Sibson¹, Katherine A. Vallis¹

1. CR-UK/MRC Oxford Institute for Radiation Oncology, Department of Oncology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom;
2. Department of Physics and Astronomy, Agnes Scott College, Decatur, GA, United States of America;
3. Departamento de Física Aplicada, Instituto de Física "Gleb Wataghin", UNICAMP, Campinas, Brazil;
4. Normandie Univ, UNICAEN, CEA, CNRS, ISTCT/CERVOxy group, Caen, France.

* Joint first authors

✉ Corresponding author: Nadia Falzone, PhD, CRUK/MRC Oxford Institute for Radiation Oncology, Department of Oncology, University of Oxford, Old Road Campus Research Building, Off Roosevelt Drive, Oxford. OX3 7LJ. T: +44 (0)1865 225841 F: +44 (0) 1865 857127 Email: nadia.falzone@oncology.ox.ac.uk

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

Received: 2017.08.03; Accepted: 2017.10.02; Published: 2018.01.01

Abstract

Brain metastases develop frequently in patients with breast cancer, and present a pressing therapeutic challenge. Expression of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is upregulated on brain endothelial cells during the early stages of metastasis and provides a target for the detection and treatment of early brain metastases. The aim of this study was to use a model of early brain metastasis to evaluate the efficacy of α -emitting radionuclides, ^{149}Tb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{213}Bi and ^{225}Ac ; β -emitting radionuclides, ^{90}Y , ^{161}Tb and ^{177}Lu ; and Auger electron (AE)-emitters ^{67}Ga , ^{89}Zr , ^{111}In and ^{124}I , for targeted radionuclide therapy (TRT).

METHODS: Histologic sections and two photon microscopy of mouse brain parenchyma were used to inform a cylindrical vessel geometry using the Geant4 general purpose Monte Carlo (MC) toolkit with the Geant4-DNA low energy physics models. Energy deposition was evaluated as a radial function and the resulting phase spaces were superimposed on a DNA model to estimate double-strand break (DSB) yields for representative β - and α -emitters, ^{177}Lu and ^{212}Pb . Relative biological effectiveness (RBE) values were determined by only evaluating DNA damage due to physical interactions.

RESULTS: ^{177}Lu produced 2.69 ± 0.08 DSB per GbpGy, without significant variation from the lumen of the vessel to a radius of 100 μm . The DSB yield of ^{212}Pb included two local maxima produced by the 6.1 MeV and 8.8 MeV α -emissions from decay products, ^{212}Bi and ^{212}Po , with yields of 7.64 ± 0.12 and 9.15 ± 0.24 per GbpGy, respectively. Given its higher DSB yield ^{212}Pb may be more effective for short range targeting of early micrometastatic lesions than ^{177}Lu .

CONCLUSION: MC simulation of a model of early brain metastases provides invaluable insight into the potential efficacy of α -, β - and AE-emitting radionuclides for TRT. ^{212}Pb , which has the attributes of a theranostic radionuclide since it can be used for SPECT imaging, showed a favorable dose profile and RBE.

Key words: radionuclides, VCAM-1, brain metastases

Introduction

The development of brain metastases is a frequent complication of several common cancers. For example, it occurs in ~30% of breast cancer patients, with a particularly high risk among patients with

triple-negative and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive disease [1]. The management of brain metastases is complex and, depending on the clinical situation, may include surgical resection, whole-brain radiation therapy (WBRT), stereotactic radiosurgery (SRS), chemotherapy and molecularly targeted agents or combinations of these. Patients with multiple metastases, uncontrolled systemic disease, and poor functional status are typically treated with WBRT alone, whereas surgery and SRS may be used to achieve local control in those patients with single or oligo-metastases and good functional status [2]. Surgery and WBRT are sometimes used in conjunction with chemotherapy, anti-estrogen or HER2-targeted therapies depending on patient and tumor characteristics [3-7]. Despite these therapeutic options, brain metastases remain a significant cause of morbidity and mortality among breast cancer patients and novel approaches to their management are needed.

Targeted radionuclide therapy (TRT) allows precise delivery of systemically administered radioactivity to disseminated cancer cells. Unlike conventional, non-radiolabeled targeted therapies, which only affect cells that express the relevant molecular target [8], TRT may damage tumour cells even if they lack the specific tumor-associated antigen or receptor through cross-fire or bystander effects [9]. This unique feature extends the tumoricidal capacity of TRT beyond the physical location of the radionuclide [10]. An added advantage of this therapy is that many of the α -, β - and Auger electron (AE)-emitting radionuclides used for TRT permit simultaneous diagnostic radioimaging through emission of γ and annihilation photons that can be detected using single photon emission computed tomography (SPECT) or positron emission tomography (PET). The use of TRT in the treatment of primary brain tumors or metastasis has been reported previously. ^{131}I -labeled L19SIP (radretumab) is a small immunoprotein directed against the extracellular-B domain of fibronectin, which is present in the extracellular matrix surrounding newly formed blood vessels, such as in solid tumors. L19SIP has shown therapeutic benefit in patients with brain metastases originating from non-small cell lung cancer or breast carcinoma [11, 12]. This radiopharmaceutical is being developed as a treatment in combination with WBRT and as a companion PET imaging agent; ^{124}I -labeled L19SIP is used to inform dosimetry of the therapeutic [13]. TRT has also been described in the treatment of high grade gliomas. For example, substance P, a ligand of the transmembrane receptor neurokinin

type-1 (NK-1), which is consistently overexpressed in gliomas, has been labeled with ^{90}Y , ^{177}Lu or ^{213}Bi , and has shown little toxicity and improved neurologic status in clinical trials [14, 15]. Antitnascin antibodies labelled with ^{131}I , ^{90}Y or ^{211}At have been instilled into resection cavities following surgery for malignant central nervous system (CNS) tumors [16-18]. Both β - (^{131}I and ^{90}Y) and α - (^{211}At) emitting constructs were well tolerated with little associated toxicity, promising antitumor benefit in patients.

It is known that vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is highly expressed on endothelial cells during the initial stages of metastatic seeding to the brain [19], and plays a key role in tumor cell adhesion to the vascular endothelium and subsequent transendothelial migration [19, 20]. VCAM-1 could, therefore, act as a target for TRT of early stage brain metastases. Indeed, a radiolabeled VCAM-1 specific peptide has been identified as a viable imaging probe in a mouse model of ovarian cancer peritoneal metastasis [21]. Therefore, a theranostic radionuclide targeted to VCAM-1 could be used to simultaneously image and treat early brain metastases. However, to avoid normal brain cell damage and associated loss of brain function, the range of the particulate emissions from the radionuclide used should reflect the extent of metastasis penetration into the brain parenchyma [22] while still providing a high absorbed radiation dose and uniform dose distribution [23]. Thus, a biologically informed Monte Carlo (MC) model could provide invaluable insights into the selection of a radionuclide with a favourable dose profile.

The choice of therapeutic radionuclides is often limited by commercial availability and chemical suitability for attachment to a particular carrier molecule. In this paper we evaluate the merits of commercially available radionuclides for early brain metastasis targeting, by considering their absorbed dose profiles and DNA damaging potential in a geometric model that is based on information derived from a murine model of brain metastases (Fig. 1). Event-by-event MC simulation of the complete radiation spectra of α -emitting radionuclides, namely ^{149}Tb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{213}Bi and ^{225}Ac ; β -emitting radionuclides, ^{90}Y , ^{161}Tb and ^{177}Lu ; and AE-emitters ^{67}Ga , ^{89}Zr , ^{111}In and ^{124}I , affords exquisite detail of their absorbed dose profiles and obviates the need to evaluate all of their effects individually in animal models. Using an atomistic model to simulate radiation-DNA interaction [24, 25], we are then able to evaluate the merits of the most favourable radionuclides for potential use in the treatment of early brain metastasis.

Material and Methods

In Vivo Models

A GFP-tagged sub-clone of a triple negative human breast carcinoma cell line that preferentially metastasizes to the brain, MDA231BR, was used [19, 26, 27]. Briefly, female SCID mice (n = 3), 7–8 weeks old, were anesthetized and received intra-cardiac injections of 1×10^5 MDA231BR cells in 100 μ L PBS. At 21 days after tumour cell injection, animals were terminally anaesthetized with 0.3 mL sodium pentobarbitone and transcardially perfusion-fixed using intra-cardiac injections of 0.9% heparinised saline followed by 10 mL of periodate lysine paraformaldehyde with 0.01% glutaraldehyde. Brains were cryoprotected, frozen in isopentane and 10–20 μ m thick sections were cut. All *in vivo* experiments were approved by the UK Home Office and the French regional committee on animal ethics (CENOMEXA).

Immunohistochemistry

The expression of VCAM-1 and CD31, a marker of endothelial cells, were assessed in brain tissue as previously described [19, 20]. Briefly, sections were rehydrated in phosphate-buffered saline (PBS;

Thermo Fisher Scientific, UK; pH 7.4), quenched with 1% hydrogen peroxide (Sigma Aldrich, UK) in methanol and blocked in 10% normal goat serum for VCAM-1 expression or normal horse serum for CD31. Primary antibody was incubated overnight at 4° C, using 1:250 dilution for VCAM-1 (rat anti-mouse, Cambridge Bioscience, 1510-14) or 1:100 dilution for CD31 (goat anti-mouse, Bio-Techne R&D, AF3628). Samples were then incubated for 1 h at room temperature using a biotinylated goat anti-rat (1:100, vectorlabs, CA, USA) or biotinylated horse anti-goat secondary antibody (1:200, vectorlabs). After amplification using the ABC reaction, staining was detected using standard DAB/hydrogen reaction. Sections were counterstained using cresyl violet and mounted using DPX mounting solution (Thermo Fisher Scientific, UK). Slides were scanned using an Aperio brightfield scanner (Leica Biosystems) and analysed using ImageScope®. Histologic sections of mouse brain parenchyma were used to measure the diameter of CD31-stained blood vessels and the depth of cancer cell infiltration into brain tissue. These data were used to generate a geometric model for MC simulation that reflected the dimensions of brain metastases at 21 days following intracardiac injection in the MDA231BR model.

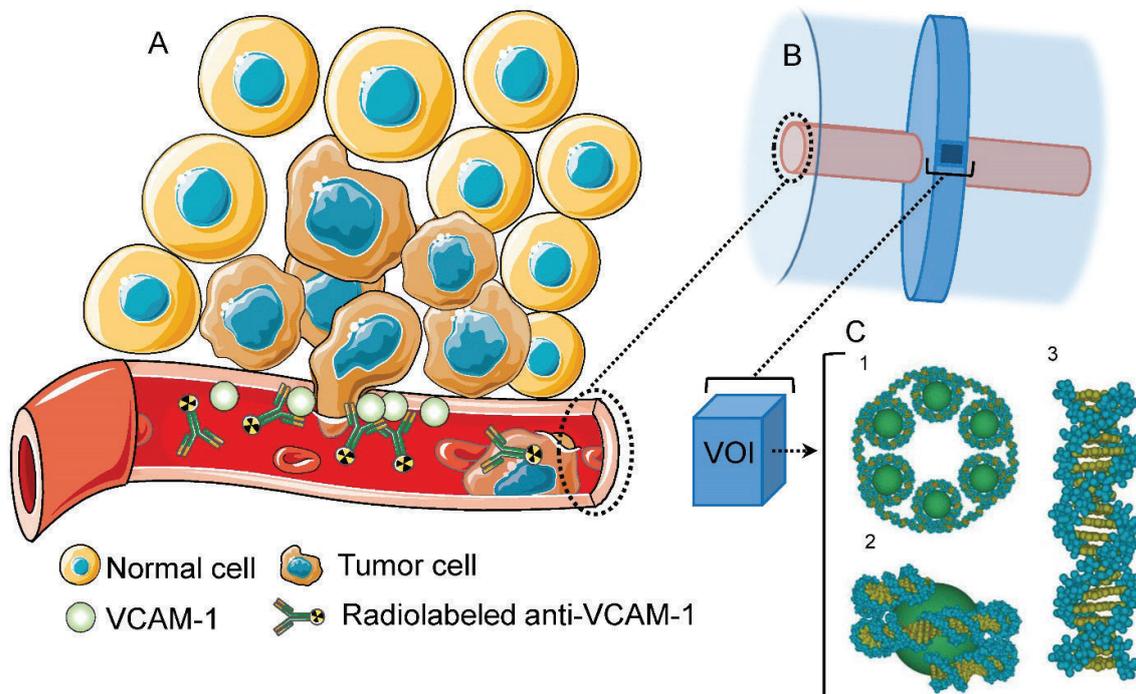


Figure 1. (A) VCAM-1 mediated cancer infiltration into the brain parenchyma; anti-VCAM-1 radionuclide immunoconstruct binds VCAM-1 and irradiates the metastasis. (B) Geant4 geometry: The inner cylinder (red) depicts the vessel and the outer cylinder (blue) the volume in which energy deposition was recorded. The disk around the vessel shows the volume where Geant4-DNA physics models were applied and (C) contains the atomistic geometrical model of the B-DNA configuration for DNA [25]. Each VOI is filled with 30 nm chromatin fibers (5.47 Gbp). These are formed by a helix with 6 nucleosomes/turn. Two adjacent nucleosomes are bound by a DNA fragment containing 46 bp. (1) Fragment of the 30 nm chromatin fiber containing 6 nucleosomes (one helix pitch). (2) Two helicoidal loops with 77 bp each folded around a sphere simulating a histone. (3) Sample of a straight fragment of the B-DNA double helix containing 20 bp.

Two Photon microscopy

Animals ($n = 3$) were injected intracardially with GFP-positive MDA231BR cells. After 21 days, animals were anesthetized using isoflurane (5% in an O_2/N_2O mixture for induction and 1.0-1.5% during surgery). Analgesic (tolfedine, 4 mg/kg), was administrated subcutaneously. The rectal temperature was monitored and maintained at 37.5°C using a heating pad. A circular region over the somatosensory cortex (2×2 mm in size) was gently thinned to ~ 50 μm with a high speed drill. The thinned region was coated with a drop of cyanoacrylate glue to facilitate a viewing window [28]. *In vivo* two-photon imaging was performed on a Leica DM6000 stand (CYCERON biomedical imaging platform) with a 25x/0.95 water HCX IRAPO objective and laser excitation wavelength centered at 900 nm. Animals were positioned during microscopy using a custom built cradle and received an intravenous (i.v.) injection of tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC-dextran, 70 kDA, 10 mg/mL) (Sigma-Aldrich) to visualize the vascular compartment.

Monte Carlo Modeling – Geant4-DNA

Monte Carlo modeling of radiation transport was performed using the Geant4.10.02.p02 toolkit [29]. The coupled transport of charged particles and photons were evaluated for α -emitting radionuclides (^{149}Tb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{213}Bi and ^{225}Ac), β -emitting radionuclides (^{90}Y , ^{161}Tb and ^{177}Lu) and AE-emitters (^{67}Ga , ^{89}Zr , ^{111}In and ^{124}I). Energy losses were tallied when the complete decay spectra of each radionuclide, including daughters in the various α decay schemes, interacted with liquid water (density scaled to 1.06 g/cm^3). Each energy deposit was associated with a particle produced in the decay, differentiating electron ionization events downstream of α -particles or electrons produced from the initial decay. The geometry consisted of a cylinder representing a blood vessel with point sources randomly distributed on its luminal surface, simulating binding of a radiolabeled anti-VCAM-1 antibody to the VCAM-1 receptor (Fig. 1).

Energy deposits were recorded in a 3.5 μm thick virtual disk, centred with respect to the vessel volume, extending from the vessel wall to a radius of 110 μm (Fig. 1B). This geometry was specifically chosen such that recorded energy deposition could be superimposed on an atomistic resolution DNA geometrical model contained in a rectangular prism (Fig. 1C) [30]. The Geant4-DNA models were used for electromagnetic processes involving electron energies < 1 MeV in this volume as well as a buffer region extending at least 3.0 μm in all directions. Throughout

the entire simulation, the Geant4-DNA processes were enabled for helium, single-ionized helium (α^+), and doubly-ionized helium (α) particles. The Livermore electromagnetic models were used for γ -rays in the whole simulation volume, for high energy electrons in the target plus buffer region, and for all electrons outside this region. The secondary electron production threshold was set to 990 eV outside the target plus buffer region, which corresponds to a range of approximately 1 μm . Electrons were tracked down to an energy of 8.0 eV, at which point the energy was deposited locally. Energy deposition in this geometry was converted to absorbed dose (Gy) and binned at 1 μm intervals. Statistical uncertainties were calculated by dividing the simulation results into batches (5 for the Geant4 simulations and 10 for the DNA damage simulations) and calculating the standard deviation of the results. The effect of variation in vessel diameter and active vessel length (i.e., the longitudinal section of the vessel with randomly distributed point sources) on absorbed dose calculation was also considered. Cylinder diameters were 5 , 10 and 15 μm and the active vessel length for a cylinder of diameter 15 μm was varied from 20 to 100 μm . The DNA strand break yields of a selected α -emitter, ^{212}Pb , and β -emitter, ^{177}Lu , were evaluated from these simulations.

To have comparable statistical uncertainties in the DSB yields for ^{177}Lu and ^{212}Pb , the number of events for ^{177}Lu was increased to achieve comparable dose. Energy deposition phase spaces for ^{177}Lu and ^{212}Pb were superimposed on the DNA geometrical model to estimate direct DSB yields, reported per unit of absorbed dose (Gy) and 10^9 base pairs (Gbp). The DNA geometrical model was filled with chromatin fibers containing 5.47 Gbp. Each rectangular prism ($3.085 \times 3.085 \times 3.383$ μm^3) represents a volume of interest (VOI), which were spaced 5 μm apart radially within the disk. The number of VOIs varied based on the vessel radius. A single strand break (SSB) was recorded if an energy transfer greater than 8.0 eV occurs within a DNA sugar-phosphate group. A DSB was recorded if two SSB on opposed DNA strands were separated by no more than 10 bp [31]. In this study, DSB yield was used as the biological endpoint to estimate the relative biological effectiveness (RBE) of the radionuclides being investigated. RBE was determined with respect to ^{60}Co radiation, for which the DSB yield is 3.60 ± 0.05 (per GbpGy) [32, 33].

Results

Immunohistochemistry

In total, 929 brain tissue vessels identified by CD31 immunostaining from 3 animals were analysed

(Fig. 2A). To account for variation in vessel diameter in the mouse model of brain metastasis and to provide realistic dimensions for MC simulation, vessel diameters were grouped as $< 5 \mu\text{m}$, $5\text{-}10 \mu\text{m}$, and $> 10 \mu\text{m}$, with corresponding mean \pm SD diameters measured as $4.04 \pm 0.64 \mu\text{m}$, $6.16 \pm 1.00 \mu\text{m}$ and $13.25 \pm 3.19 \mu\text{m}$. The maximal penetration of MDA231BR cells into the brain parenchyma was evaluated at day 21. In mice that received intracardiac injections of MDA231BR cells, tumors grew into the cerebral parenchyma from blood vessels with maximum penetration depths of $30.6 \mu\text{m}$, $47.8 \mu\text{m}$ and $23.2 \mu\text{m}$ from the vessel wall, for vessel diameters of $< 5 \mu\text{m}$, between 5 and $10 \mu\text{m}$, and $> 10 \mu\text{m}$ respectively (Fig. 2B). Two photon microscopy images (Fig. 2C) confirmed the penetration depths and co-optive growth of MDA231BR-GFP cells around vessels.

Dose deposition profiles

A summary of the normalized absorbed dose profiles of AE-, β - and α -emitting radionuclides as a function of distance from a vessel of diameter $15 \mu\text{m}$ and active length of $40 \mu\text{m}$ is shown in Fig. 3. The maximum penetration depth of brain metastasis as noted from the immunohistochemistry results at day 21 is $\sim 50 \mu\text{m}$ from the edge of the vessel. Thus, the dose profiles of the different radionuclides were evaluated in terms of dose deposition over this

distance from a vessel. Apart from ^{177}Lu , ^{161}Tb , and ^{67}Ga , the absorbed dose of all other electron emitters (AE and β emitters) decreased by more than 2 orders of magnitude over the first $50 \mu\text{m}$ from the vessel (Fig. 3A). The ranking order of the electron emitters from highest to lowest total dose over the $50 \mu\text{m}$ distance were ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{67}Ga , ^{111}In , ^{124}I and ^{89}Zr . If all of the electron-emitting radionuclides are constrained to have the same dose at the vessel (i.e., the normalized dose plot) the highest dose contribution over this distance arises from ^{177}Lu . In the $40\text{-}60 \mu\text{m}$ region the dose deposition from ^{177}Lu was comparable to that of ^{90}Y , but otherwise the normalized dose from ^{177}Lu exceeded that of ^{90}Y . On the other hand, for α -emitters (Fig. 3B), only ^{149}Tb showed a decrease greater than 2 orders of magnitude over this distance. The ranking for α -emitters was ^{225}Ac , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{213}Bi and ^{149}Tb . ^{225}Ac imparted an absorbed dose ~ 4 times higher than the other α -emitters for most distances, since it has 4 α -particles in its decay chain. The differences between ^{211}At , ^{212}Pb , and ^{213}Bi (in terms of absolute dose) were small. The dose fall off from ^{212}Pb was the furthest from the vessel compared to all other α -emitters, since it has the most energetic α -particle component. Dose decreased by 2 orders of magnitude from the vessel to about $85 \mu\text{m}$, then another 2 orders of magnitude to $\sim 100 \mu\text{m}$.

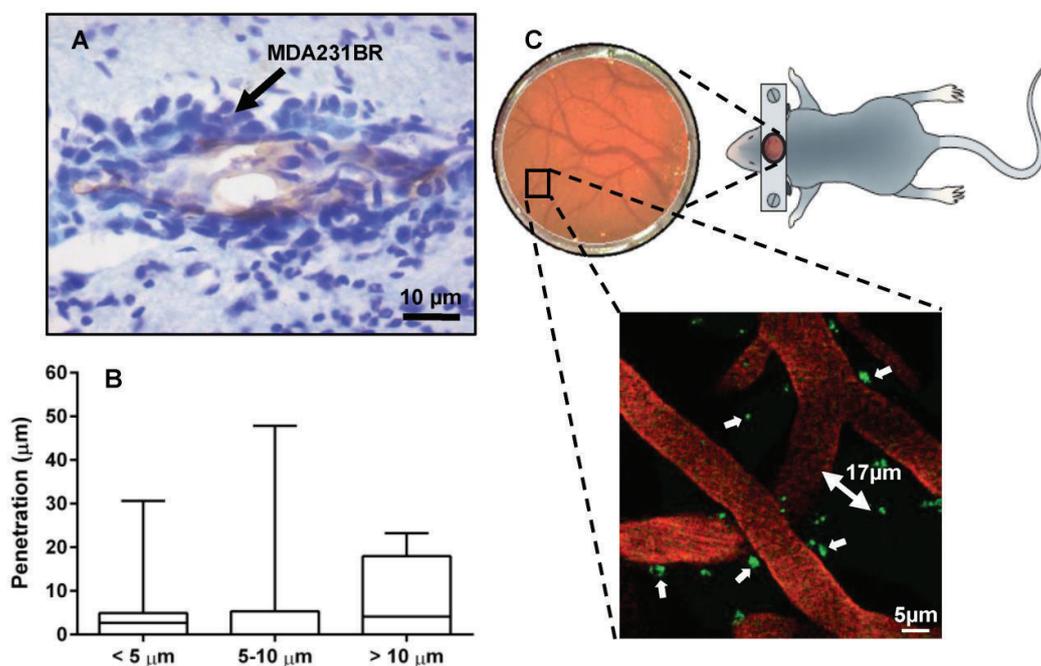


Figure 2. (A) Immunohistochemical detection of brain metastases. Photomicrograph of tumor colonies showing co-localization of VCAM-1 (brown) with brain metastasis (violet) at day 21 after intra-cardiac injection of MDA231BR cells. (B) Summary statistics of the depth of penetration of cancer cells for vessels of different diameters. Box and whiskers plots of minimum to maximum values, showing the median and SD at each vessel diameter grouping. (C) 2-Photon microscopy of brain parenchyma and vessels (seen through viewing window) showing co-optive growth (white arrows) of GFP MDA231BR cells (green) around vessels (orange - TRITC) with maximal penetration from the vessel lumen in this slice, $17 \mu\text{m}$.

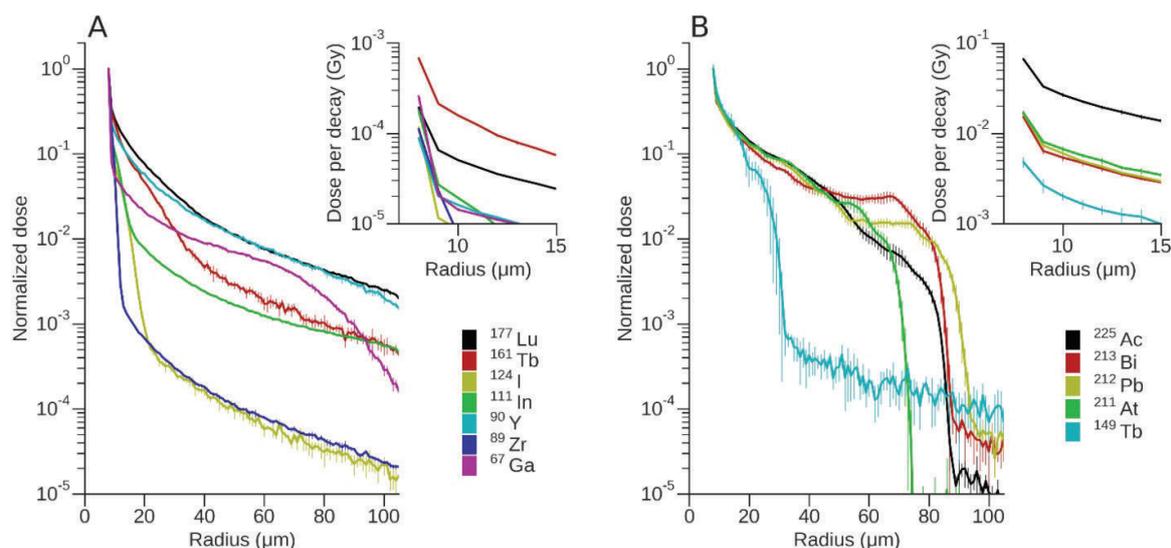


Figure 3. Absorbed dose profiles of each radionuclide for a vessel of 15 μm radius and length of 40 μm . Dose was normalised to the first bin with bin width set at 1 μm . Data points represent the average and SD of 5 runs. Absorbed dose profiles for (A) AE and β -emitting radionuclides and (B) α -emitting radionuclides. Insets show the non-normalized dose (in Gy) per event.

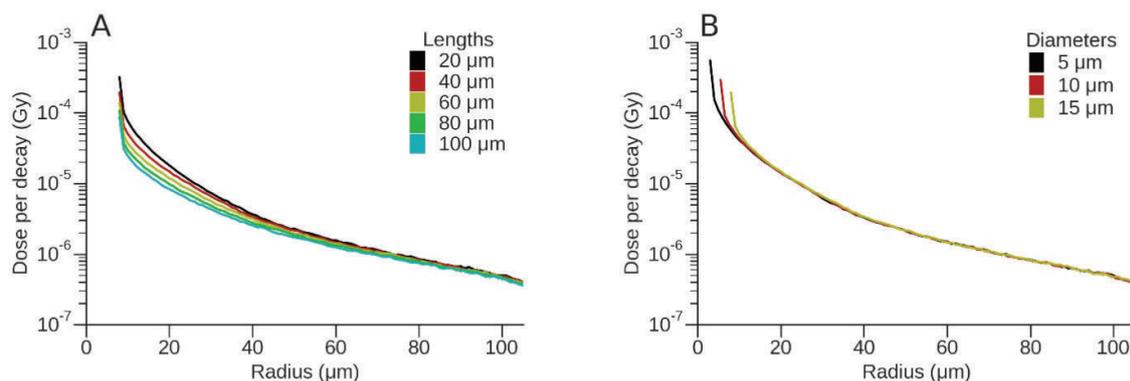


Figure 4. Dose per decay (Gy) for ^{177}Lu . (A) Variation of absorbed dose (Gy) for a 15 μm diameter vessel as a function of vessel length. (B) Variation of absorbed dose (Gy) for a vessel of length 40 μm as a function of vessel diameter.

To evaluate the effect of vessel diameter and active vessel length on absorbed dose, the dose deposition profiles for ^{177}Lu and ^{212}Pb are shown (Figs. 4 and 5). For ^{177}Lu , the dose per decay for longer vessels was lower than that of shorter vessels. For example, for vessel lengths of 20 μm and 100 μm this difference decreased from 73% at the vessel wall to 21% at a radius of 57.5 μm (50 μm from vessel wall) (Fig. 4A). Increasing vessel diameter resulted in an almost 3-fold decrease in dose per decay over the first 10 μm from the vessel wall; however, the difference was < 8% for radial distances between 20 μm and 100 μm (Fig. 4B). Similarly for ^{212}Pb , the difference between the dose per event for vessel lengths of 20 μm and 100 μm decreased from 72% at the vessel wall to 15% at a radius of 57.5 μm (Fig. 5A), while the dose per event decreased up to 3-fold from a vessel length of 20 μm to 100 μm . An increase in vessel diameter

resulted in a radial shift of dose deposition with a 59% decrease in dose per decay immediately adjacent to the vessel for the largest versus the smallest vessel radii. For greater distances the difference between the vessel diameters was typically smaller than the dose uncertainty, other than the steep fall off, which shifted in position based on the difference of diameters (Fig. 5B).

DNA strand break yield and RBE

A summary of the DSB induction potential of ^{177}Lu vs. that of ^{212}Pb is presented in Fig. 6. For ^{177}Lu (Fig. 6A), the VOI dose contribution from photons over the considered range was negligible when compared to that from electrons. The total dose and DSB yield (Fig 6C) was mostly due to the contribution of electrons (β^- -particles). On average, ^{177}Lu produced 2.69 ± 0.08 DSB per GbpGy. Over the distance

considered, contributions from major groups of electrons to DSB induction resulted in fluctuations of < 10%.

To fully understand the DSB profile of ^{212}Pb , it is necessary to consider its physical decay scheme. ^{212}Pb (10.6 h half-life) does not directly emit α -particles, but its daughters ^{212}Bi and ^{212}Po emit two α -particles during their decay. ^{212}Pb decays to ^{212}Bi via β -emission. In turn ^{212}Bi (60 min half-life) decays to stable ^{208}Pb through one of two possible paths, each of which passes through one intermediate nuclide, releasing one α -particle and one β -particle. For 36% of

the time, ^{212}Bi emits an α -particle of 6.1 MeV and decays to ^{208}Tl , which in turn decays to ^{208}Pb via β -emission. For the other 64% of the time, ^{212}Bi decays to ^{212}Po via β -emission, and ^{212}Po then decays in microseconds to ^{208}Pb by emission of an 8.8 MeV α -particle. The β -particles from ^{212}Pb itself are lower energy (573 keV) than the β -particles from ^{212}Bi (2.3 MeV) and ^{208}Tl (5 MeV), while the frequency and cumulative energy from the γ -emissions is < 12% of that from the α -particles. However a 238.6 keV γ -ray, with a 43% yield, can be exploited for imaging [34].

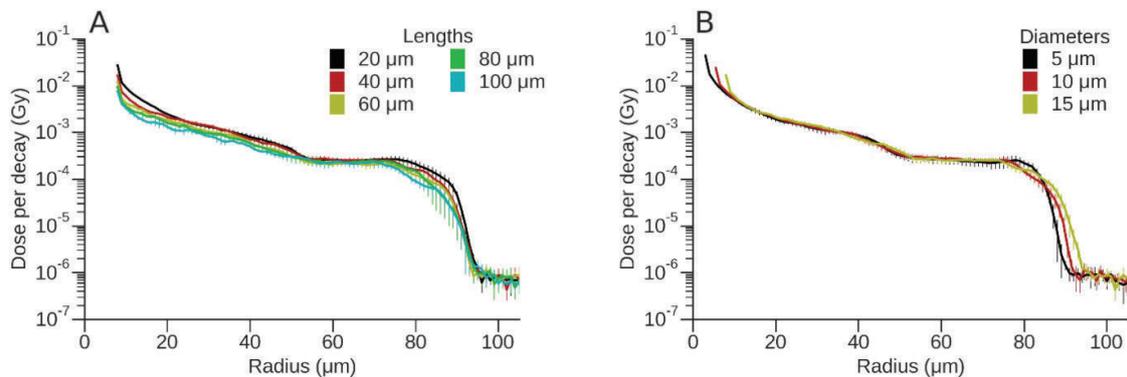


Figure 5. Dose per event (Gy) for ^{212}Pb . (A) Variation of absorbed dose (Gy) for a 15 μm diameter vessel as a function of vessel length. (B) Variation of absorbed dose (Gy) for a vessel of length 40 μm as a function of vessel diameter.

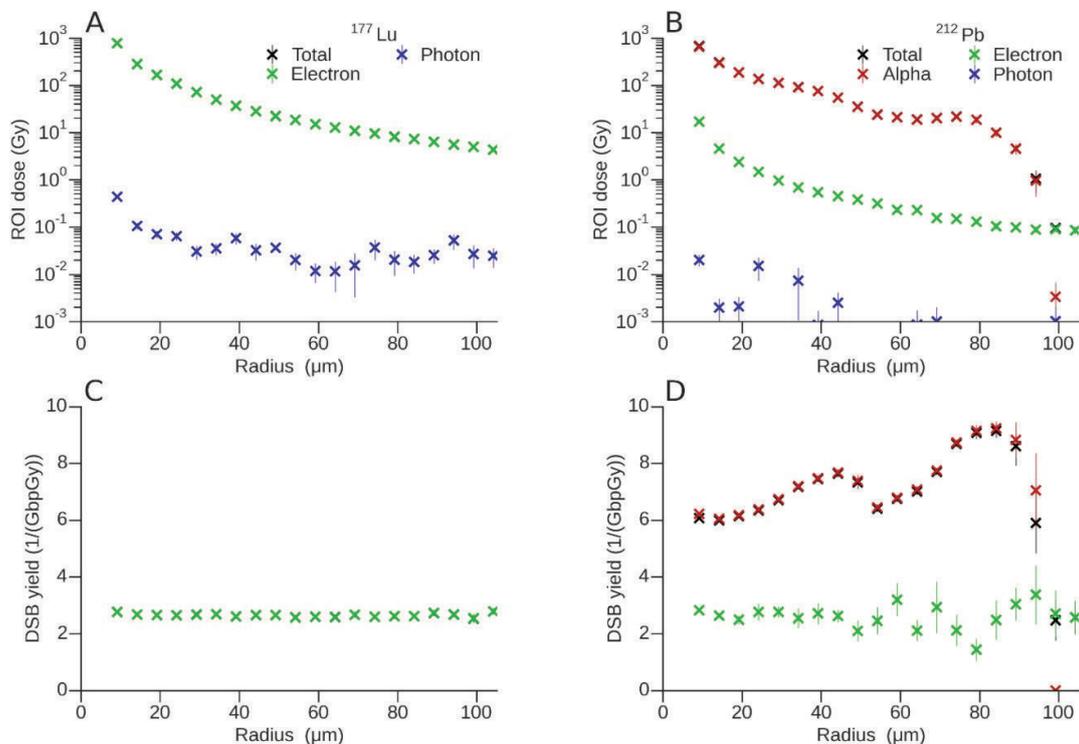


Figure 6. A summary of the total dose (Gy) delivered by (A) ^{177}Lu and (B) ^{212}Pb in each VOI as a function of radial distance from a vessel with diameter 15 μm and active vessel length of 40 μm , DSB yield (per GbpGy) for (C) ^{177}Lu and (D) ^{212}Pb . Both the dose and DSB break yields were discriminated according to the associated primary decay particle, however contributions from electrons (green) and α -particles (red) may be superimposed on the total yield (black).

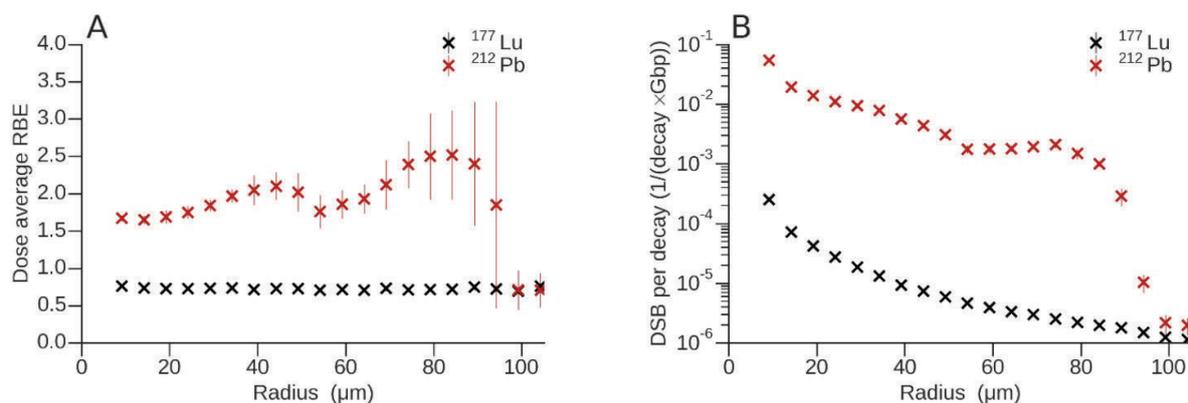


Figure 7. (A) Dose-average relative biological effectiveness for ^{177}Lu and ^{212}Pb . **(B)** Total number of DSB per decay and Gbp of ^{177}Lu and ^{212}Pb as a function of radius.

As would be predicted, the main contribution to the VOI dose from the decay of ^{212}Pb was due to the 6.1 and 8.8 MeV α -emissions from ^{212}Bi and ^{212}Po respectively (Fig. 6B). Electron doses are about two orders of magnitude lower than dose attributable to α -particles and decrease exponentially on a log scale with distance. As shown in Fig. 6B, 6D, and 7B, the dose/DSB from the electrons continued on smoothly past 100 μm , but at orders of magnitude lower than dose/DSB due to α -particles. The contribution from photons to the dose and DSB yield (Fig. 6D) was negligible and the associated uncertainties were very high. For this reason, the contribution from photons was omitted from the DSB plot. The VOI dose fluctuated with radial distance, with two local maxima observed at ~ 40 μm and ~ 80 μm . These two regions are most evident in the DSB yields shown in Fig 6D. The peaks can be explained by the presence of the two α -particles arising from the decay of ^{212}Bi and ^{212}Po , with projected ranges of 50.1 μm and 91.0 μm and associated DSB yields per GbpGy of 7.64 ± 0.12 and 9.15 ± 0.24 respectively. It is important to note that the observed maxima are a consequence of the superposition of multiple Bragg peaks resulting from isotropically emitted α -particles on the vessel wall, and not a simple projection of ranges. DSB yields for electrons also show a very complex behaviour since there are many β and Auger components in the decay spectrum with different associated ranges. As a result, the electron DSB yield changes with distance from the vessel wall.

Estimated RBE values were determined by only evaluating DNA damage due to physical interaction of the radionuclides in question. This was done in a consistent way, using the same biophysical model for the isotopes studied. The RBE obtained for each particle type at a given distance from the vessel axis was weighted by the corresponding dose fraction (Fig. 7A). For ^{177}Lu , the contribution of electrons only,

and for ^{212}Pb the contributions of electrons and α -particles, were considered. In contrast to ^{212}Pb , the dose-average RBE for ^{177}Lu was lower than 1 (0.73 ± 0.02), which means that electrons emitted during this decay have a RBE lower than that of ^{60}Co . In addition, this was verified for photons where an RBE = 1 was obtained for the first 4 data points that had acceptable uncertainties (data not shown). The presence of α -particles in the ^{212}Pb spectrum produced an appreciable departure of the dose-average RBE from 1, i.e., 2.10 ± 0.18 and 2.52 ± 0.60 , mainly around the maxima as a result of the superposition of the Bragg peaks. To appreciate the difference in DSB yield between ^{177}Lu and ^{212}Pb , the total number of DSB per decay and Gbp are shown in Fig. 7B. The DSB yield of ^{212}Pb per decay varies as a function of linear energy transfer (LET) and radial distance from the vessel. The DSB yield per decay ratio between ^{212}Pb and ^{177}Lu increases to 607.34 ± 60.40 and 826.09 ± 102.11 at the local maxima produced by the 6.1 MeV and 8.8 MeV α -emissions from ^{212}Bi and ^{212}Po respectively.

Discussion

The upregulation of cellular adhesion molecules on the endothelium of cerebral blood vessels, which results from tumor cell extravasation into the brain parenchyma, presents a promising biomarker for diagnosis and therapy [21, 35]. In particular, the use of radionuclide-based theranostic agents directed against adhesion molecules is an attractive prospect. However, extensive *in vivo* experimentation to elucidate which radiopharmaceutical could potentially offer the best dose-profile and therapeutic effect for this distinctive tumour morphology would be both time consuming and costly. These obstacles can be overcome, and the most promising radionuclides selected for further study, through the use of MC simulations applied to models that accurately represent the architecture of brain

metastases. In the clinic, brain metastases frequently show a co-optive growth pattern irrespective of the primary tumour type and grow circumferentially around blood vessels [36]. The preclinical *in vivo* model MDA213BR, used in the current study, is entirely consistent with this pattern of growth. Realistic representations of MDA213BR metastases were constructed for MC simulation, reflecting the co-optive growth pattern and the depth of penetration of cancer cells as determined by immunohistochemistry and live 2-photon imaging (Fig. 2). Simulations were performed to evaluate the dose profiles of a panel of radionuclides. It is clear from the dose profiles (Fig. 3A and B) that the α -emitters offer an advantage over β - and AE-emitters. Interestingly, the normalized dose profile of ^{67}Ga compared favourably with that of ^{90}Y and ^{177}Lu . However, the very low dose imparted by the AE-emitting nuclides ^{89}Zr and ^{124}I precludes them as therapeutic radionuclides in this situation but would make them suitable for PET imaging purposes. ^{177}Lu and ^{212}Pb were then selected for further comparison and simulation as they showed the most uniform deposition of dose over 50 μm from the vessel wall, while ^{212}Pb showed the furthest penetration ($\sim 100 \mu\text{m}$).

A vessel diameter of 15 μm , at the upper end of the range for venous radii in mouse brain, was chosen for MC simulation to facilitate direct comparison with analogous vessel diameters in human brain (median range 16–32 μm) [37]. In fact, a change in vessel radius had only a minor effect on dose profiles as a function of radial distance for the two radionuclides chosen for in-depth study, ^{177}Lu and ^{212}Pb (Fig. 4 and 5). Furthermore, a 40 μm active vessel length was used for MC simulation although tumor growth was observed in up to 5 consecutive histology sections (section thickness of 20 μm – data not shown). This choice was informed not only by computation time, but also as a direct result of the simulation results (Fig. 4 and 5) where varying active vessel length due to the symmetry in the geometry did not greatly affect the dose profiles of ^{177}Lu and ^{212}Pb . In addition, as the dose measurement was limited to a disk of width 3.5 μm to enable direct comparison with the dose measurement in the atomic DNA geometry model, the variation of dose for ^{177}Lu and ^{212}Pb was also measured over an active vessel length of 100 μm . Dose per decay showed a slight decrease at the edge of the active vessel due to the lack of charged particle equilibrium (Fig. S1). For both ^{177}Lu and ^{212}Pb , dose decreased by 25% from the mid-point to the end of the active vessel. However the initial falloff for ^{177}Lu was slightly faster compared with that of ^{212}Pb . The geometric model that was used captures the salient

features of brain vasculature and the results of simulations were robust to changes in geometry. We infer that our results can be generalized from the mouse-model measurements to the human scale relevant to a clinical scenario.

For theranostic purposes, the dose imparted per decay by α -emitting ^{212}Pb was typically two orders of magnitude higher than for β -emitting ^{177}Lu and this translated into higher DNA damage yields (Fig. 6). The short path length of α -particles render them particularly suitable for the treatment of micro-metastases or neoplastic disease that is present as single layers or sheets of cells on compartment surfaces [38]. High-LET radiation like α -particles produce dense ionizations along a linear track and generate multiply damaged sites in DNA. This is reflected in the higher DSB yields obtained for ^{212}Pb (Fig. 6D) when compared to ^{177}Lu (Fig. 6C). DSB yield (per GbpGy) for the former can be up to three times higher than for the latter. Supplementary Fig. S2 shows the total strand break (TSB) yield, which is the total number of SSB produced by ^{177}Lu or ^{212}Pb , including those leading to DSB. As shown by others, SSB depends weakly on the incident radiation quality [39, 40]. Thus, regardless of the type of primary particle and its associated energy, a similar number of SSB per unit absorbed dose and base pair are produced. This, however, does not translate into the same RBE since the number of SSB that lead to DSB tends to increase with particle LET.

The biophysical model used in the current study shows that ^{177}Lu has a dose-average RBE lower than 1 (0.73 ± 0.02), which means that it is less effective than ^{60}Co radiation (the reference quality used). Although the associated photons yielded an RBE = 1, they only had a negligible impact on the dose-averaged RBE. Indeed, the calculated RBE based on DSB yields from physical damage only is in good agreement with an experimentally determined RBE of 1 for ^{177}Lu -DOTATOC using ^{137}Cs γ -radiation as the reference radiation [41]. On the other hand, the RBE of ^{212}Pb varied with radial distance and increased to 2.10 ± 0.18 and 2.52 ± 0.60 at the local maxima of the 6.1 MeV and 8.8 MeV α -emissions from ^{212}Bi and ^{212}Po respectively. These values yield a relative $^{212}\text{Pb}/^{177}\text{Lu}$ RBE of 2.87 and 3.45, respectively. The RBE of α -particles ranges from 2 to 7, and therefore, α -particle irradiation is 2–7 times more therapeutically effective, or toxic, per unit of absorbed dose than photons or electron [38, 42, 43]. Furthermore, DSB yields per decay for ^{212}Pb varies with depth and LET and can be up to two orders of magnitude higher than those for ^{177}Lu at the local maxima of the α -emissions from ^{212}Bi and ^{212}Po . This new metric (DSB yield per decay), could be clinically

more informative than DSB yield per unit of absorbed dose, since the former can be directly estimated from the administered activity and does not require convoluted dose calculations.

Considering the favorable dose profile and DNA damage yields of ^{212}Pb , it is a good potential candidate for TRT in early brain metastasis treatment and imaging. It has an intermediate physical half live of 10.64 h compatible with clinical use [44] and emits γ -rays suitable for SPECT [45]. Furthermore, it is a practical choice because it is produced in a generator ($^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}$ generator), and stable chelation is possible using TCMC (2-(4-isothiocyanatobenzyl-1,4,7,10-tetraaza-1,4,7,10-tetra-(2-carbamonylmethyl)-cyclododecane) [46]. Meredith and co-workers recently demonstrated the efficacy of intraperitoneal ^{212}Pb -TCMC-trastuzumab in a phase I trial in ovarian cancer patients with HER-2 expressing tumors [34]. Encouragingly the treatment caused little toxicity during follow-up for 1 year [47], possibly because of the containment of the radioimmunoconjugate within the peritoneal cavity. In addition, a decrease in tumor-associated glycoprotein 72 (TAG-72) and tumor growth was associated with increasing administered radioactivity. However, a potential problem when using an α -emitter with serial decay to α -emitting daughters, is that the recoil energy is sufficient to detach the daughters from the targeting vector [38]. In the case of ^{212}Pb , the mononuclear complex produced between ^{212}Pb and TCMC results in an extremely stable compound for in vivo use [48].

All systemically administered therapeutics, including radiopharmaceuticals, that are designed to treat brain metastases face common obstacles: the need for delivery across the blood-brain barrier (BBB) and the need to reach the molecular target in adequate concentration [49]. The issue of access to metastatic sites behind an intact BBB is being addressed using a number of different approaches. For example, Connell *et al.* demonstrated that it is possible to selectively permeabilize the BBB at metastatic sites through systemic cytokine administration, thus facilitating delivery of therapeutic agents across the BBB [50]. Similarly, a recent proof-of-concept study using convection-enhanced delivery of an AE-emitting radionuclide in an orthotopic xenograft glioblastoma model showed great promise to overcome the limitations of systemic delivery of TRTs [51]. However, the intrinsic sensitivity of tumor cells to the radio-pharmacologic agent is likely to be the most important determinant of its therapeutic success [4]. In this regard targeted α -particle therapy offers a distinct advantage.

Conclusion

The dimensions and 3D shape of early brain metastasis and their associated blood vessels were used to build an *in silico* replica. The model was designed to mimic targeting of VCAM-1, an endothelial marker of cancer cell invasion, by radioimmunoconjugates. In this respect, MC simulation has allowed selection of the radioisotope with the most suitable dose profile for treatment in a specific case, that is, early brain metastases. However, it would be possible to apply a similar approach to cancer lesions at other anatomical sites that have different morphology provided that the location of the target molecule and the physical dimensions of relevant structures such as blood vessels are known. ^{212}Pb , which has the attributes of a theranostic radionuclide since it can be used for SPECT imaging, showed a favorable dose profile and RBE.

Abbreviations

AE: Auger electron; BBB: blood-brain barrier; CNS: central nervous system; DNA: deoxyribonucleic acid; DSB: double-strand break; GFP: green fluorescent protein; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; MC: Monte Carlo; PET: positron emission tomography; RBE: relative biological effectiveness; VOI: volume of interest; SPECT: single photon emission computed tomography; SRS: stereotactic radiosurgery; SSB: single strand break; TRT: targeted radionuclide therapy; VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1; WBRT: whole-brain radiation therapy.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Cancer Research UK (CRUK) (C5255/A15935), the Medical Research Council (MRC) (MC_PC_12004) and the CRUK Oxford Centre. This work was also supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the French National Agency for Research "Investissements d'Avenir" n°ANR-11LABX0018-01 and the Conseil Régional de Normandie. M. A. Bernal and L. de la Fuente acknowledge the support received from the Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, for financing their research activities through the projects 306775/2015-8 and 190154/2013-6, respectively. S. Peeters acknowledges the support received by Engineering and Physical Sciences Research Council (EPSRC) under Programme Grant EP/L024012/1 (OxCD3: Oxford Centre for Drug Delivery Devices).

Supplementary Material

Supplementary figures.

<http://www.thno.org/v08p0292s1.pdf>

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

References

- Leone JP, Leone BA. Breast cancer brain metastases: the last frontier. *Exp Hematol Oncol*. 2015; 4: 33.
- Lu-Emerson C, Eichler AF. Brain metastases. *Continuum (Minneapolis)*. 2012; 18: 295-311.
- Krop IE, Lin NU, Blackwell K, Guardino E, Huober J, Lu M, et al. Trastuzumab emtansine (T-DM1) versus lapatinib plus capecitabine in patients with HER2-positive metastatic breast cancer and central nervous system metastases: a retrospective, exploratory analysis in EMILIA. *Ann Oncol*. 2015; 26: 113-9.
- Lim E, Lin NU. Updates on the management of breast cancer brain metastases. *Oncology (Williston Park)*. 2014; 28: 572-8.
- Niwinska A, Murawska M, Pogoda K. Breast cancer brain metastases: differences in survival depending on biological subtype, RPA RTOG prognostic class and systemic treatment after whole-brain radiotherapy (WBRT). *Ann Oncol*. 2010; 21: 942-8.
- Swain SM, Baselga J, Kim SB, Ro J, Semiglazov V, Campone M, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2015; 372: 724-34.
- Swain SM, Baselga J, Miles D, Im YH, Quah C, Lee LF, et al. Incidence of central nervous system metastases in patients with HER2-positive metastatic breast cancer treated with pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel: results from the randomized phase III study CLEOPATRA. *Ann Oncol*. 2014; 25: 1116-21.
- Gill MR, Falzone N, Du Y, Vallis KA. Targeted radionuclide therapy in combined-modality regimens. *Lancet Oncol*. 2017; 18: e414-23.
- Pouget J-P, Navarro-Teulon I, Bardies M, Chouin N, Cartron G, Pelegrin A, et al. Clinical radioimmunotherapy: the role of radiobiology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011; 8: 720-34.
- Enger SA, Hartman T, Carlsson J, Lundqvist H. Cross-fire doses from beta-emitting radionuclides in targeted radiotherapy. A theoretical study based on experimentally measured tumor characteristics. *Phys Med Biol*. 2008; 53: 1909-20.
- Erba PA, Sollini M, Orciuolo E, Traino C, Petrini M, Paganelli G, et al. Radioimmunotherapy with radretumab in patients with relapsed hematologic malignancies. *J Nucl Med*. 2012; 53: 922-7.
- Sauer S, Erba PA, Petrini M, Menrad A, Giovannoni L, Grana C, et al. Expression of the oncofetal ED-B-containing fibronectin isoform in hematologic tumors enables ED-B-targeted 131I-L19SIP radioimmunotherapy in Hodgkin lymphoma patients. *Blood*. 2009; 113: 2265-74.
- Poli GL, Bianchi C, Virota G, Bettini A, Moretti R, Trachsel E, et al. Radretumab radioimmunotherapy in patients with brain metastasis: a ¹²⁴I-L19SIP dosimetric PET study. *Cancer Immunol Res*. 2013; 1: 134-43.
- Kniefel S, Cordier D, Good S, Ionescu MC, Ghaffari A, Hofer S, et al. Local targeting of malignant gliomas by the diffusible peptidic vector 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric acid-4,7,10-triacetic acid-substance p. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 3843-50.
- Cordier D, Forrer F, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Apostolidis C, Good S, et al. Targeted alpha-radionuclide therapy of functionally critically located gliomas with ²¹³Bi-DOTA-[Thi8, Met(02)11]-substance P: a pilot trial. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010; 37: 1335-44.
- Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, Herndon JE, 2nd, et al. Salvage radioimmunotherapy with murine iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 for patients with recurrent primary and metastatic malignant brain tumors: phase II study results. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 115-22.
- Reardon DA, Zalutsky MR, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Herndon JE, 2nd, et al. A pilot study: ¹³¹I-antitenascin monoclonal antibody 81C6 to deliver a 44-Gy resection cavity boost. *Neuro Oncol*. 2008; 10: 182-9.
- Zalutsky MR, Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, et al. Clinical experience with alpha-particle emitting ²¹¹At: treatment of recurrent brain tumor patients with ²¹¹At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. *J Nucl Med*. 2008; 49: 30-8.
- Soto MS, Serres S, Anthony DC, Sibson NR. Functional role of endothelial adhesion molecules in the early stages of brain metastasis. *Neuro Oncol*. 2014; 16: 540-51.
- Serres S, Mardiguian S, Campbell SJ, McAteer MA, Akhtar A, Krapitchev A, et al. VCAM-1-targeted magnetic resonance imaging reveals subclinical disease in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J*. 2011; 25: 4415-22.
- Scalici JM, Thomas S, Harrer C, Raines TA, Curran J, Atkins KA, et al. Imaging VCAM-1 as an indicator of treatment efficacy in metastatic ovarian cancer. *J Nucl Med*. 2013; 54: 1883-9.
- Hindie E, Zanotti-Fregonara P, Quinto MA, Morgat C, Champion C. Dose deposits from ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ¹¹¹In, and ¹⁶¹Tb in micrometastases of various sizes: Implications for radiopharmaceutical therapy. *J Nucl Med*. 2016; 57: 759-64.
- Champion C, Quinto MA, Morgat C, Zanotti-Fregonara P, Hindie E. Comparison between three promising beta-emitting radionuclides, (⁶⁷Cu), (⁴⁷Sc) and (¹⁶¹Tb), with emphasis on doses delivered to minimal residual disease. *Theranostics*. 2016; 6: 1486-8.
- Bernal MA, Liendo JA. An investigation on the capabilities of the PENELOPE MC code in nanodosimetry. *Med Phys*. 2009; 36: 620-5.
- Bernal MA, Sikansi D, Cavalcante F, Incerti S, Champion C, Ivanchenko V, et al. An atomistic geometrical model of the B-DNA configuration for DNA-radiation interaction simulations. *Comp Phys Comm*. 2013; 184: 2840-7.
- Yoneda T, Williams PJ, Hiraga T, Niewolna M, Nishimura R. A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res*. 2001; 16: 1486-95.
- Larkin JR, Dickens AM, Claridge TD, Bristow C, Andreou K, Anthony DC, et al. Early Diagnosis of brain metastases using a biofluids-metabolomics approach in mice. *Theranostics*. 2016; 6: 2161-9.
- Shih AY, Mateo C, Drew PJ, Tsai PS, Kleinfeld D. A polished and reinforced thinned-skull window for long-term imaging of the mouse brain. *J Vis Exp*. 2012; 61: e3791-42.
- Agostinelli S, Allison J, Amako K, Apostolakis J, Araujo H, Arce P, et al. Geant4—a simulation toolkit. *Nucl Instrum Methods Phys Res A*. 2003; 506: 250-303.
- Incerti I, Baldacchino G, Bernal M, Capra R, Champion C, Francis Z, et al. The Geant4-DNA project. *Int J Model Simul Sci Comput*. 2010; 01: 157-78.
- Friedland W, Jacob P, Paretzke HG, Merzagora M, Ottolenghi A. Simulation of DNA fragment distributions after irradiation with photons. *Radiat Environ Biophys*. 1999; 38: 39-47.
- Friedland W, Jacob P, Bernhardt P, Paretzke HG, Dingfelder M. Simulation of DNA damage after proton irradiation. *Radiat Res*. 2003; 159: 401-10.
- Natale F, Rapp A, Yu W, Maiser A, Harz H, Scholl A, et al. Identification of the elementary structural units of the DNA damage response. *Nat Commun*. 2017; 8: 15760.
- Meredith R, Torgue J, Shen S, Fisher DR, Banaga E, Bunch P, et al. Dose escalation and dosimetry of first-in-human alpha radioimmunotherapy with ²¹²Pb-TCMC-trastuzumab. *J Nucl Med*. 2014; 55: 1636-42.
- Serres S, Soto MS, Hamilton A, McAteer MA, Carbonell WS, Robson MD, et al. Molecular MRI enables early and sensitive detection of brain metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109: 6674-9.
- Berghoff AS, Rajky O, Winkler F, Bartsch R, Furtner J, Hainfellner JA, et al. Invasion patterns in brain metastases of solid cancers. *Neuro-Oncology*. 2013; 15: 1664-72.
- Jochimsen TH, Ivanov D, Ott DVM, Heinke W, Turner R, Möller HE, et al. Whole-brain mapping of venous vessel size in humans using the hypercapnia-induced BOLD effect. *NeuroImage*. 2010; 51: 765-74.
- Elgqvist J, Frost S, Pouget JP, Albertsson P. The potential and hurdles of targeted alpha therapy - clinical trials and beyond. *Front Oncol*. 2014; 3: 324.
- Bernal MA. Evaluation of the mean energy deposit during the impact of charged particles on liquid water. *Phys Med Biol*. 2012; 57: 1745-57.
- Bernal MA, deAlmeida CE, Sampaio C, Incerti S, Champion C, Nieminen P. The invariance of the total direct DNA strand break yield. *Med Phys*. 2011; 38: 4147-53.
- Nayak TK, Norenberg JP, Anderson TL, Prossnitz ER, Stabin MG, Atcher RW. Somatostatin-receptor-targeted alpha-emitting ²¹³Bi is therapeutically more effective than beta(-)-emitting ¹⁷⁷Lu in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Nucl Med Biol*. 2007; 34: 185-93.
- Friedrich T, Scholz U, Elsasser T, Durante M, Scholz M. Systematic analysis of RBE and related quantities using a database of cell survival experiments with ion beam irradiation. *J Radiat Res*. 2013; 54: 494-514.
- Graf F, Fahrner J, Maus S, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Venkatchalam S, et al. DNA double strand breaks as predictor of efficacy of the alpha-particle emitter Ac-225 and the electron emitter Lu-177 for somatostatin receptor targeted Radiotherapy. *PLoS ONE*. 2014; 9: e88239.
- Mulford DA, Scheinberg DA, Juric JG. The promise of targeted alpha-particle therapy. *J Nucl Med*. 2005; 46 (Suppl 1): 199S-204S.
- Meredith RF, Torgue J, Azure MT, Shen S, Saddekni S, Banaga E, et al. Pharmacokinetics and imaging of ²¹²Pb-TCMC-trastuzumab after intraperitoneal administration in ovarian cancer patients. *Cancer Biother Radiopharm*. 2014; 29: 12-7.
- Baidoo KE, Milenic DE, Brechbiel MW. Methodology for labeling proteins and peptides with Lead-212 (²¹²Pb). *Nucl Med Biol*. 2013; 40: 592-9.
- Meredith RF, Torgue JJ, Rozgaja TA, Banaga EP, Bunch PW, Alvarez RD, et al. Safety and outcome measures of first-in-human intraperitoneal alpha radioimmunotherapy with ²¹²Pb-TCMC-Trastuzumab. *Am J Clin Oncol*. 2016; [Epub ahead of print].
- Yong K, Brechbiel MW. Towards translation of (²¹²Pb) as a clinical therapeutic; Getting the lead in! *Dalton Trans*. 2011; 40: 6068-76.
- Siegal T. Which drug or drug delivery system can change clinical practice for brain tumor therapy? *Neuro Oncol*. 2013; 15: 656-69.

50. Connell JJ, Chatain G, Cornelissen B, Vallis KA, Hamilton A, Seymour L, et al. Selective permeabilization of the blood-brain barrier at sites of metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 2013; 105: 1634-43.
51. Thisgaard H, Halle B, Aaberg-Jessen C, Olsen BB, Therkelsen AS, Dam JH, et al. Highly Effective Auger-Electron therapy in an orthotopic glioblastoma xenograft model using convection-enhanced delivery. *Theranostics.* 2016; 6: 2278-91.

Annexe 2

CURRICULUM VITAE

Elisa GRIMOIN

6 novembre 1992

ADRESSE PROFESSIONNELLE

Equipe CERVOxy,
GIP CYCERON
Boulevard Henri Becquerel, BP 5529
14074 CAEN Cedex
Tel : 02 31 47 01 51
Email : grimoin@cyceron.fr

ADRESSE PERSONNELLE

44 rue du marathon
14000 CAEN
Tel : 07 50 98 09 39
Email : elisa.grimoin@hotmail.fr

POSITION ACTUELLE

Etudiante en 3^{ème} année de doctorat de biologie au sein du laboratoire ISTCT (Imagerie et Stratégies Thérapeutiques des pathologies Cérébrales et Tumorales), équipe CERVOxy (Hypoxie, physiopathologies cérébrovasculaire et tumorale), Caen, France.

DIPLÔMES

- 2015-2017 Doctorat de Biologie, Médecine et Santé-Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**
Ecole doctorale normande de biologie intégrative, santé et environnement (EdNBISE)
Sous la direction du Pr Omar TOUZANI
«Étude en imagerie biphotonique *in vivo* de l'impact de l'hypertension artérielle chronique sur la dynamique des cellules microgliales»
Financement : Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Avenant annuel au contrat doctoral 2016/2017.
- 2013-2015 Master Sciences Biomédicales option Neurosciences**
Université de Caen (M2) – Mention Bien (2/13)
Université de Rouen (M1) – Mention A. Bien (7/15)
- 2010-2013 Licence de Biochimie, Biologie moléculaire, Biologie Cellulaire et Physiologie**
Université de Rouen

FORMATIONS

- 2018 Ma Thèse en 180 secondes** (Normandie Université)
Finaliste régionale 
- 2018 Doctoriales Vallée de Seine** (Normandie Université, Saint Vallery en Caux)
1^{er} prix de communication orale
- 2017 Séminaire Créer Innover** (Normandie Université, Rouen)
- 2017 Formation IRM petit animal, Bruker 7 Teslas** (Plateforme d'imagerie Cyceron, Caen)

- 2016** **Formation à la mission d'enseignement** (Normandie Université, Caen)
- 2016** **DU « Expérimentation animale appliquée à la recherche biomédicale »**
(Université de Caen)
- 2015** **Stage hygiène et sécurité en laboratoire** (Université de Caen)

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

- 2015** **UMR 6301, Imagerie et Stratégies Thérapeutiques des pathologies Cérébrales et Tumorales**
Stage de M2 **Pr Omar Touzani – Centre Cyceron, Caen**
(1+6 mois) Implication des astrocytes dans le couplage neurovasculaire
Étude en microscopie biphotonique (rat, marmouset).
- 2014** **Inserm U982, Différenciation & Communication Neuronale & Neuroendocrine (DC2N)**
Stage de M1 **Dr Julien Chuquet – Université de Rouen, Rouen**
(3 mois) Caractérisation en microscopie biphotonique *in vivo* de l'effet de l'ODN sur l'activité calcique astrocytaire (souris).
- 2013** **Center for Studies in Behavioral Neurobiology (CSBN)**
Stage de L3 **Dr Uri Shalev - Université Concordia, Montréal**
(3 mois) Étude de l'impact du stress sur les mécanismes cérébraux qui sous-tendent la rechute et la recherche de drogue (héroïne, cocaïne), après une période d'abstinence chez le rongeur.

COMPETENCES TECHNIQUES

Expérimentation animale

- Manipulation des animaux (souris, rats, marmouset)
- Chirurgie : cathétérisation fémorale, caudale et carotidienne, cannulation intracrânienne, modèle intraluminal d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne, craniotomie, fenêtre crânienne : modèle craniotomie et modèle d'os affiné
- Tests comportementaux : boîte de Skinner, conditionnement de la place préférée, labyrinthe en croix surélevé, reconnaissance d'objets, tests de locomotion

Imagerie

- Microscopie biphotonique *in vivo*
- Immunohistochimie
- IRM petit animal 7 Teslas

Informatique

- ImageJ, FIJI (traitement et analyse d'images)
- JMP (analyse statistique)
- Microsoft office

 ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT ET D'ENCADREMENT

- 2017** Encadrement de deux étudiants de Licence 3 (1 semaine) et d'un étudiant de Master 1 (2 mois) dans le domaine de la physiopathologie glio-neurovasculaire *in vivo*
- 2017** Référente doctorante de 2 comités de suivi individuel de thèse
- 2016-2017** **Activités d'enseignement à l'Université de Caen dans le cadre d'un avenant enseignement au contrat doctoral :**
- CM 18h, Licence 3 Biologie, Bases de Neurosciences
 - TP 14h, Licence 3 Biologie, Bases de Neurosciences
 - TD 18h, Licence 1 Psychologie, Psychobiologie
 - Rotation en laboratoire 14h, Master 1 Neurosciences, Suivi d'un protocole expérimental en laboratoire
- 2016** Encadrement d'un étudiant de licence 3 (1 semaine) dans le domaine de la physiopathologie glio-neurovasculaire *in vivo*
- 2015-2018** Membre de 4 jurys de Licence 3 Biologie, option Neurosciences et 3 jurys de Master 1 Valorisation des Innovations Biologiques (VIB) – Université de Caen Normandie
- 2015** Encadrement de deux étudiants de licence 3 (1 semaine et 1 mois) dans le domaine de la physiopathologie glio-neurovasculaire *in vivo*
- 2013** Tutorat : Physique/Optique, étudiants de L1 Biologie - *Université de Rouen*
- 2009-2013** Cours particuliers : Mathématiques/Physique-Chimie/SVT, élèves de 6ème à 1^{ère} S

 PUBLICATIONS

Grimoin E, Chazalviel L, Brunaud C, Bernaudin M, Touzani O. Effects of chronic arterial hypertension on cortical microglia dynamics, 2018, *JCBFM*. (*en preparation*).

Falzone N, Ackerman NL, Fuente Rosales L, Liu X, Peeters SGJA, Bernal M, Soto MS, Corroyer-Dulmont A, Bernaudin M, Grimoin E, Touzani O, Sibson NR, Vallis KA. Dosimetric evaluation of radionuclides for VCAM-1-targeted radionuclide therapy of early brain metastases, 2018, *Theranostics*.

 COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Communications affichées :

- 2018** **E. Grimoin, L. Chazalviel, C. Brunaud, M. Bernaudin, O. Touzani.** *In vivo* microglia dynamics in hypertensive mice, *Keystone Symposia – Keystone, CO, USA*

- 2017** **E. Grimoin , L. Chazalviel , F. Potzaha, M. Bernaudin , O. Touzani.** *In vivo* imaging of microglia activity under hyperoxia, *Jacques Monod Conferences– Roscoff*
- 2016** **E. Grimoin , L. Chazalviel , M. Bernaudin , O. Touzani.** Brain diving and inflammation imaging: *In vivo* two-photon microscopy analysis of the microglial dynamics in chronic arterial hypertension, *Journées de l’Ecole Doctorale – Le Havre*
- 2016** **E. Grimoin , L. Chazalviel , M. Bernaudin , O. Touzani.** *In vivo* two photon microscopy of microglia under renovascular hypertension, *LARC Neuroscience - Rennes*
(Prix de la meilleure communication affichée)
- 2014** **E. Grimoin , J. Maucotel , D. Vaudry , J. Leprince, J. Chuquet.** *In vivo* calcium Imaging of single astrocyte activity, *congrès de l’IRIB - Evreux*

Communications orales :

- 2017** **E. Grimoin , L. Chazalviel , M. Bernaudin , O. Touzani.** *In vivo* two photon microscopy of microglia under renovascular hypertension,, *Séminaire Cyceron – Caen*
- 2016** **E. Grimoin , L. Chazalviel , M. Bernaudin , O. Touzani.** Astrocytic calcium dynamism and the neurovascular coupling: *in vivo* two photon microscopy studies, *congrès annuel de la Société Cerveau et Maladies Cérébrovasculaires – Paris*
- 2016** **E. Grimoin , L. Chazalviel , M. Bernaudin , O. Touzani.** Involvement of astrocytes in the neurovascular coupling: two photon microscopy studies in the rodent, *Séminaire Cyceron – Caen*

VULGARISATION SCIENTIFIQUE

- 2015-18** Fête de la science – *Caen*
- 2015** Semaine du Cerveau – *Caen*
- 2014** Semaine de la mémoire - *Caen*

RESPONSABILITES ANNEXES

- 2017-2018** Représentante doctorante élue au du conseil de l’EDnBISE
- 2017-2018** Membre du conseil d’administration de l’association Relais d’sciences, Le Dôme
- 2017-2018** Bénévole au centre régional de tir de Normandie

Étude en imagerie biphotonique *in vivo* de l'impact de l'hypertension artérielle chronique sur la dynamique des cellules microgliales.

L'hypertension artérielle chronique représente le premier facteur de risque de l'AVC ischémique, mais elle en est aussi le principal facteur aggravant. Les mécanismes à l'origine du risque ischémique lié à l'hypertension ne sont pas encore entièrement compris. Plusieurs études ont montré l'existence d'une forte composante inflammatoire délétère impliquée dans la physiopathologie de l'hypertension. Au niveau cérébral, la présence d'une intense réactivité microgliale hypothalamique, participant à l'aggravation de la pathologie a été observé. Dans le travail présenté ici, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'hypertension artérielle sur l'état inflammatoire du cortex cérébral, une région particulièrement touchée lors d'un AVC ischémique chez le patient. Nous avons tiré parti de la souche transgénique de souris CX3CR1^{GFP/+} pour l'imagerie de la dynamique microgliale, principal acteur de l'immunité cérébrale. Par une analyse *in vivo* réalisée en microscopie biphotonique, nous avons montré que l'hypertension induite par infusion chronique d'angiotensine-II altère la morphologie de la microglie, mais surtout sa capacité de surveillance du parenchyme cérébral et sa capacité cicatricielle. Nous avons aussi montré que ce type d'hypertension endommage la structure et la fonctionnalité des vaisseaux corticaux. L'ensemble de ces résultats pourrait expliquer, au moins en partie, la sensibilisation du cerveau aux lésions ischémiques par l'hypertension artérielle, avant même la survenue de l'AVC.

***In vivo* two-photon microscopy imaging for studying the impact of chronic arterial hypertension on microglial cells dynamics**

Chronic high blood pressure is ischemic stroke's leading risk factor, but it is also its main aggravating factor. The mechanisms underlying hypertension-induced ischemic brain lesion exacerbation are not yet fully understood. Several studies highlighted the existence of a strong inflammatory component in the pathophysiology of hypertension. In the brain, the presence of intense hypothalamic microglial reactivity, contributing to the pathology worsening has been shown. In this work, we focused on the impact of high blood pressure on the inflammatory state of the cerebral cortex, a region particularly affected by ischemic stroke in the patient. We took advantage of the CX3CR1^{GFP/+} mice transgenic strain for imaging microglia dynamics. By using *in vivo* two-photon microscopy, we have shown that hypertension induced by chronic infusion of angiotensin-II alters the microglia morphology, especially its parenchymal surveilling activity and its cicatricial capacity. We have also shown that this type of hypertension disrupts the structure and the functioning of cortical vessels. All of these results can explain, at least in part, the brain sensitization to ischemic lesions under arterial hypertension, before the onset of stroke.