



HAL
open science

Rôle de la morphologie neuronale dans la régulation des flux moléculaires de l'ECS du cortex cérébral : un mécanisme potentiel de la neuroprotection dépendante d'IGF

Claire Camus

► To cite this version:

Claire Camus. Rôle de la morphologie neuronale dans la régulation des flux moléculaires de l'ECS du cortex cérébral : un mécanisme potentiel de la neuroprotection dépendante d'IGF. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS657 . tel-04618253

HAL Id: tel-04618253

<https://theses.hal.science/tel-04618253>

Submitted on 20 Jun 2024

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

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

Sorbonne Université

Ecole doctorale 394 Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

*UMRS 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe Holzenberger, Mécanismes
neuroendocrines de la longévité et des maladies liées à l'âge*

**RÔLE DE LA MORPHOLOGIE NEURONALE DANS LA
RÉGULATION DES FLUX MOLÉCULAIRES DE L'ESPACE
EXTRACELLULAIRE DU CORTEX CÉRÉBRAL :
UN MÉCANISME POTENTIEL DE LA NEUROPROTECTION
DÉPENDANTE D'IGF**

Par Claire CAMUS

Thèse de doctorat pour obtenir le grade de Docteur de Sorbonne Université

Spécialité : Neurosciences

Dirigée par le Dr. Martin HOLZENBERGER

Co-encadrée par la Dr. Saba AÏD

Présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 2023

Membres du jury :

Pr. Fanchon BOURASSET, PU à l'Université de Bourgogne Franche-Comté (rapporteuse)

Dr. Jean-François GHERSI-EGEA, Directeur de recherche au CRNL (rapporteur)

Dr. Mario PENDE, Directeur de recherche à l'INEM (examineur)

Dr. Marie-Claude POTIER, Directrice de recherche à l'ICM (présidente du jury)

Pr. Bertrand TAVITIAN, PU-PH à l'Université Paris Cité (examineur)

Pr. Jean-Léon THOMAS, Professeur à l'Université de Yale (examineur)

REMERCIEMENTS

L'aboutissement de ces 4 années de thèse riches en expériences de tout type n'aurait pas été possible sans le concours et le soutien de mon entourage professionnel, de mes amis et de ma famille.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse. Je remercie mes deux rapporteurs, la professeure Fanchon Bourasset et le docteur Jean-François Gherzi-Egea pour avoir lu dans le menu détail et examiné mon manuscrit de thèse avec rigueur et bienveillance. Je remercie également les docteurs Marie-Claude Potier et Mario Pende ainsi que les professeurs Bertrand Tavitian et Jean-Léon Thomas pour avoir accepté avec enthousiasme de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le docteur Martin Holzenberger, ainsi qu'à mon encadrante la docteur Saba Aïd pour leur accompagnement et leur encadrement très complémentaires tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir fait confiance il y a 4 ans et de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet passionnant. Nos discussions scientifiques m'ont fait grandir et ont été riches d'enseignement. Merci Martin de m'avoir accueillie dans ton équipe, d'avoir aiguisé mon esprit critique et d'avoir été une source constante de savoir, de challenge et d'encouragement durant ces 4 années. Merci Saba pour ta rigueur qui m'a permis de toujours garder les pieds sur terre, ta bienveillante supervision, ainsi que pour m'avoir appris à valoriser au mieux mon travail et à positiver. Merci à tous les deux pour votre aide, le partage de vos connaissances et vos conseils précieux à chacune des étapes de cette thèse.

Un grand merci également à Jean-Christophe pour sa bonne humeur quotidienne et ses conseils avisés, et à Philippe, mon voisin de bureau toujours partant pour un café, un passage à l'animalerie, une session tableur Excel ou une discussion pour refaire le monde. Merci aussi à mes stagiaires Jessica, Charlotte, Hanitri, Aryana et Tiffany pour leur travail et l'aide précieuse qu'elles m'ont apportée pour mes analyses.

Je souhaite également remercier les personnels des plateformes d'animalerie et d'imagerie du centre ainsi que ceux de la plateforme IRM du PARCC. Un grand merci à Romain pour son aide au microscope,

à Gwennhael pour toute la partie acquisition des données IRM, ainsi qu'à Daniel pour le post-traitement des séquences, merci pour ta pédagogie et ta patience dans ces analyses de longue haleine.

J'ai une pensée particulière pour les équipes des laboratoires qui m'ont accueillie en licence et en master que je tiens à remercier pour avoir grandement contribué à me faire aimer la recherche et à persévérer dans cette voie. Je tiens particulièrement à remercier Lida pour m'avoir transmis sa passion de la recherche et le goût de l'expérience bien faite.

Aux Phybio, Alex, Gaétan, Rémi, Guillaume, Camille, Grouvet, Cyril, Matthieu, à mes seaqueens de coeur Maylis, Lucie et Flora et à Enzo mon binôme-témoin, parce qu'on a parcouru une partie du chemin ensemble depuis l'ENS et qu'on a tenu la distance de Paris aux US en passant par Mulhouse, Londres, Stockholm, Amsterdam et Bruxelles, je tiens à vous dire un très grand merci.

Merci à Joséphine, Charlotte, Arthur et Rémy pour leur soutien sans faille depuis 15 ans, mention à ma sosie pour nos déjeuners hebdomadaires qui faisaient retomber la pression ; à Céline et Hortense mes amies fidèles depuis la prépa ; à Mathilde qui comprend mieux que quiconque mes aller-retours médecine-science ; aux danseuses pour ces bouffées d'air frais et ces moments de grâce (ou pas) dans la semaine ; aux Nantais, d'origine ou non ; à la team corso-bruxelloise et bientôt guadeloupéenne ; à Margot, Laura, Andréa et Agathe, ma tribu de handballeuses ; et enfin à Kim, ma plus vieille amie. Merci à tous d'être vous et de faire partie de ma vie.

Pour finir, je tiens à remercier du fond du cœur ma famille pour son soutien indéfectible depuis toutes ces années. Merci à ma sœur, mon frère, François et mes parents d'être ce constant point de repère et une source d'inspiration. Merci papa d'avoir toujours cru en moi et merci maman d'avoir toujours été là.

Enfin, Charles, je te dis le plus grand des mercis pour ta tendresse, ta joie de vivre et ton énergie débordante. Merci d'être cette personne lumineuse à mes côtés, de me supporter au quotidien, de me soutenir dans tout ce que j'entreprends et d'apporter ce grain de folie et d'imprévu qu'il manquait à ma vie.

RÉSUMÉ

L'espace extracellulaire entre les cellules du tissu nerveux (ECS) est le siège de flux moléculaires constants et essentiels à la physiologie cérébrale. Ces flux sont toutefois fortement dépendants de la grande complexité des surfaces cellulaires qui délimitent l'ECS et de l'enchevêtrement de ses constituants matriciels. Initialement considéré comme relativement immuable, l'ECS est en réalité très dynamique. Son volume accessible aux solutés représente 15 à 20 % du volume cérébral et sa structure réticulaire, qui entrave leurs flux moléculaires — contrainte appelée tortuosité — varie fortement à court et long termes en fonction de l'âge, du rythme circadien et de l'environnement. Cette plasticité de l'ECS joue un rôle majeur dans la clairance cérébrale et son altération semble être impliquée dans le vieillissement cérébral ainsi que dans le développement et la progression de protéinopathies. La pathogenèse de ces maladies, comme la maladie d'Alzheimer (MA) par exemple, repose sur l'agrégation de peptides toxiques qui s'accumulent dans le parenchyme cérébral et causent la mort neuronale. On ne sait pas encore si ce phénomène est une cause ou une conséquence de la baisse de la clairance cérébrale observée dans ces pathologies. Il est en revanche certain que la diminution de ces flux d'épuration contribue à entretenir la pathologie dans les deux cas. J'ai pensé qu'une manière de lutter contre la protéotoxicité pourrait être de préserver de façon durable des flux moléculaires efficaces dans l'ECS, en régulant ce qui peut concourir à entraver la progression des molécules, c'est-à-dire en diminuant sa tortuosité. Une approche consisterait à intervenir sur la forme des parois de l'ECS, notamment sur la morphologie des prolongements et des corps cellulaires, en agissant sur des régulateurs de la taille cellulaire. Un candidat intéressant est le récepteur de type 1 des facteurs de croissance insulinosemblables, IGF1R, impliqué dans le contrôle de la taille cellulaire, et dont le knockout (KO) neuronal confère aux neurones une résistance accrue aux stress hypoxiques et protéotoxiques d'une part, et une morphologie plus compacte d'autre part. En parallèle, notre équipe a montré que des souris modèles de la MA étaient protégées contre le déclin cognitif, la mort neuronale et l'accumulation d'espèces amyloïdes dans le parenchyme cérébral quand la signalisation IGF1R neuronale était supprimée. Gontier et al. ont notamment identifié la clairance cérébrale comme un acteur de cette neuroprotection. Ces données m'ont amenée à formuler l'hypothèse que la compaction de la morphologie neuronale due au KO d'IGF1R permet de réduire la tortuosité de l'ECS de sorte à faciliter

les flux moléculaires et la clairance à long terme dans le parenchyme cérébral. J'étudie dans ma thèse la réponse fonctionnelle de l'ECS à une réduction volumique pérenne d'un de ses constituants majoritaires, la population neuronale. J'ai injecté par stéréotaxie des macromolécules paramagnétiques ou marquées par fluorescence directement dans le cortex de souris KO conditionnel inductible pour l'IGF1R neuronal (inIGF1RKO), et analysé *in et ex vivo*, par IRM et microscopie optique, leurs mouvements dans l'ECS. J'ai montré qu'une morphologie neuronale plus mince favorisait les flux moléculaires dans l'ECS en facilitant la diffusion des solutés et en réduisant sa tortuosité. J'ai prouvé que cet effet facilitateur était présent dès l'âge adulte et se maintenait tout au long de la vie et du vieillissement de la souris. Enfin, j'ai établi que ces changements neuromorphologiques contribuaient à renforcer la relation neurovasculaire par un rapprochement relatif des neurones et des vaisseaux. Dans l'ensemble, mon travail contribue à une meilleure compréhension des phénomènes de neuroprotection dépendants d'IGF-1 et identifie la morphologie neuronale comme un régulateur des flux moléculaires à travers l'ECS et comme une cible potentielle dans la prévention contre la protéotoxicité.

ABSTRACT

Continuous interstitial molecular fluxes are essential to cerebral physiology. They occur in the extracellular space (ECS) of the brain that extends between all neural and glial cells. The efficiency of these fluxes depends on the extremely complex cell surfaces that delineate the ECS and on the entanglement of its matrix components. For many years, the ECS was considered to be rather unchanging and stable, but this compartment is in fact highly dynamic. The ECS volume fraction, defined as the space accessible to interstitial solute movements, represents 15 to 20% of the brain volume. Its reticular structure that hinders molecular fluxes is defined as tortuosity. These characteristics vary over time depending on age, circadian rhythm and environment. ECS plasticity is indeed a major determinant of cerebral clearance, and its alteration is thought to be involved in brain aging as well as in the development and progression of proteinopathies. Importantly, the pathogenesis of proteinopathies such as Alzheimer disease (AD) involves the intracerebral aggregation of toxic peptides that eventually accumulate in the brain parenchyma causing neuronal death. So far, we do not know whether these processes are responsible for defective cerebral clearance identified in proteinopathies, or if they result from it. Nonetheless, it is clear in both cases that reducing fluxes that eliminate waste metabolites contributes to maintaining and even exacerbating the disease. I thought that one way to fight proteotoxicity might consist in lastingly preserving effective molecular fluxes in the ECS. This could be achieved by diminishing ECS tortuosity, namely by regulating the cellular or molecular players that are physiologically limiting ECS solute movements in the brain. To this end, altering the morphology of the ECS walls, and in particular the morphology of cell bodies and processes by targeting cell size regulators, could be an innovative strategy to manipulate tortuosity. An interesting candidate is the insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF1R) as it potently participates in the control of cell size. Knocking out this receptor in neurons leads to a noticeably compact neuronal morphology. IGF receptor is also strongly involved in the regulation of neuronal resistance to hypoxic and proteotoxic stresses. Our team showed previously that a mouse model of AD was protected against cognitive decline, neuronal loss and accumulation of amyloid species in the cerebral parenchyma when neuronal IGF1R signaling was suppressed. Importantly, Gontier *et al.* identified cerebral clearance as a functional player in this neuroprotection. Therefore, I hypothesized that the compaction of neuronal morphology resulting

from neuronal IGF1R knockout could be sufficient to reduce ECS tortuosity, and thereby improve molecular fluxes and clearance in the cerebral parenchyma. My PhD work is thus focusing on the functional response of the ECS to a lasting reduction in neuronal cell volume. For that, I injected paramagnetic and fluorescently labeled macromolecules stereotactically in the cerebral cortex of inducible, neuronspecific IGF1R knockout mice (inIGF1RKO). I analyzed the macroscopic movements of these tracers in the ECS *in vivo* by MRI and by optical microscopy. I showed that a lean neuronal phenotype favors molecular fluxes in the ECS by facilitating diffusion and by reducing ECS tortuosity. I demonstrated that this facilitating effect existed in adult mutant mice at any age and was maintained throughout aging. I also established that neuromorphological changes contributed to strengthen the neurovascular relationship specifically by bringing the capillaries closer to the neurons. Altogether, my work contributes to a better understanding of the mechanisms underlying IGF-dependent neuroprotection. It identifies neuronal morphology as an important regulator of molecular flux through the ECS and as a potential target in the prevention of proteotoxic diseases.

PUBLICATIONS

Kavian, N.; Mehlal, S.; Jeljeli, M.; Saidu, N. E. B.; Nicco, C.; Cerles, O.; Chouzenoux, S.; Cauvet, A.; **Camus, C.**; Ait-Djoudi, M.; Chéreau, C.; Kerdine-Römer, S.; Allanore, Y.; Batteux, F. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway Controls Fibrosis and Autoimmunity in Scleroderma. *Front Immunol* 2018, 9, 1896. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01896>.

Katsimpardi, L.; Kuperwasser, N.; **Camus, C.**; Moigneu, C.; Chiche, A.; Tolle, V.; Li, H.; Kokovay, E.; Lledo, P.-M. Systemic GDF11 Stimulates the Secretion of Adiponectin and Induces a Calorie Restriction-like Phenotype in Aged Mice. *Aging Cell* 2020, 19 (1), e13038. <https://doi.org/10.1111/accel.13038>.

Moigneu, C.; Abdellaoui, S.; Ramos-Brossier, M.; Pfaffenseller, B.; Wollenhaupt-Aguiar, B.; de Azevedo Cardoso, T.; **Camus, C.**; Chiche, A.; Kuperwasser, N.; Azevedo da Silva, R.; Pedrotti Moreira, F.; Li, H.; Oury, F.; Kapczinski, F.; Lledo, P.-M.; Katsimpardi, L. Systemic GDF11 Attenuates Depression-like Phenotype in Aged Mice via Stimulation of Neuronal Autophagy. *Nat Aging* 2023, 3 (2), 213–228. <https://doi.org/10.1038/s43587-022-00352-3>.

Camus, C.; Balvay, D.; Lacube, P.; Autret, G.; Aïd, S.; Holzenberger, M. Neuron size impacts molecular diffusion in the brain extracellular space. *En cours de soumission*

VALORISATION SCIENTIFIQUE

« Clearance and interstitial diffusion in brain lacking neuronal IGF-1 receptors » Journées de l'Ecole Doctorale ED394, visioconférence, mai 2021 (communication orale)

« Does neuronal IGF signaling impact brain interstitial solute movements ? » Séminaire annuel du CRSA, Lieusaint, nov. 2021 (communication orale)

Ma Thèse en 180 secondes Sorbonne Université, mars 2022, <https://www.youtube.com/watch?v=WLKJrYoWFuM&t=2778s> à 00:46:18 : 6ème candidate : Claire Camus

« IGF-dependant neuronal changes impact brain interstitial solute movements » Journées de l'Ecole Doctorale ED394, Campus des Cordeliers, mai 2022 (communication orale)

« Quantitative MRI reveals reduced interstitial tortuosity as a neuroprotective mechanism of long-term suppression of IGF-1R » Séminaire annuel du CRSA, Lieusaint, nov. 2022 (poster)
- Prix du meilleur poster

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Phylogénétique du système nerveux central (SNC) et de son système circulatoire	15
Figure 2. Reconstruction de volumes d'isocortex et de neuropile	17
Figure 3. Le neurone pyramidal : une cellule excitatrice polarisée de l'isocortex qui établit des connexions à longue distance	20
Figure 4. Le réseau vasculaire cortical et ses cellules murales	24
Figure 5. Localisation du LCR dans le CNS, de ses échanges avec l'ISF, de ses barrières et de ses voies d'efflux	28
Figure 6. Techniques biophysiques, <i>in silico</i> et ultrastructurales d'exploration de l'ECS	42
Figure 7. Avantages et inconvénients de quelques techniques d'exploration de l'ECS	47
Figure 8. Devenirs possibles d'un déchet métabolique qui diffuse dans l'ECS : les différentes voies d'élimination du parenchyme	62
Figure 9. Cinétique et homéostasie du pool d'A β 1-42 : réactions d'agrégation et leur vitesse de réaction associée	74
Figure 10. Acteurs de la régulation de la taille cellulaire	95
Figure 12. L'épaisseur corticale est moins importante chez la souris inIGF1RKO que chez le contrôle	121
Figure 13. Structure de quelques agents de contraste à base de complexes de gadolinium	124

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Compositions ioniques des fluides du SNC en mmol/L	22
Tableau 2. Maladies neurodégénératives par ordre de prévalence et caractéristiques anatomopathologiques associées	68
Tableau 3. Valeurs empiriques de coefficients de diffusion libres déterminées par IOI pour quelques dextrans en fonction de leur poids moléculaire et de leur diamètre hydrodynamique	125
Tableau 4. Comparaison des D_{free} obtenus expérimentalement et par calcul à partir des équations (1), (2) et (3) à 34°C pour quelques dextrans	126
Tableau 5. Variations de la tortuosité et de la fraction volumique de l'ECS en fonction de différentes conditions expérimentales et par rapport à leur condition contrôle respectivement	192

TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS 12

CHAPITRE I : ECS ET CLAIRANCE CÉRÉBRALE : DE LA PHYSIOLOGIE A LA PHYSIOPATHOLOGIE	13
I. Organisation fonctionnelle du cortex cérébral et transport des solutés	13
a) Structure et régionalisation de l'isocortex	13
i. Composition et organisation tissulaire	13
i. Contraintes d'espaces et de densités cellulaires	16
ii. Le neurone pyramidal : Une morphologie et une polarité adaptées à la réception, l'intégration et la retransmission d'une quantité massive d'informations.	18
b) Compartiments liquidiens, fluides et mécanismes de transport de solutés au sein du SNC	21
i. Le système vasculaire : spécificité des vaisseaux et de la microcirculation cérébrale	22
ii. Le réseau cavitaire et les mouvements du liquide céphalo-rachidien (LCR)	26
iii. Le réseau lymphatique cérébral : drainage des fluides et veille immunitaire	29
iv. L'espace extracellulaire (ECS) et le liquide interstitiel (ISF)	29
II. ECS et diffusion	32
a) Diffusion moléculaire dans l'ECS	32
i. Diffusion microscopique	32
ii. Diffusion macroscopique	32
iii. Équation de la diffusion appliquée dans l'ECS	33
iv. Place de la diffusion dans la physiologie cérébrale	35
c) Historique et techniques d'exploration de l'ECS	35
i. Microscopie électronique et étude statique de l'ultrastructure de l'ECS <i>ex vivo</i> .	36
ii. Approches biophysiques : l'étude des mouvements moléculaires dans l'ECS permet d'explorer sa structure	38
iii. L'étude <i>in silico</i> par modélisation de cet espace et de ses mouvements moléculaires	41
iv. Des techniques récentes de pointe permettent d'analyser les caractéristiques ultrastructurales et la dynamique de l'ECS, de façon directe et <i>in vivo</i>	45
v. Autres techniques	47
d) Caractéristiques structurales et dynamiques de l'ECS	48
i. L'ECS est un compartiment très hétérogène dans sa taille et sa géométrie	48
ii. La matrice extracellulaire (MEC) de l'ECS du SNC	50
iii. L'ECS est un compartiment qui présente une forte dynamique	51
III. Compartiments et mécanismes impliqués dans la clairance cérébrale	54
a) Clairance et élimination des métabolites	54
i. Définition de la clairance	54
ii. Spécificités et importance biologique de la clairance cérébrale	54
b) Mécanismes de la clairance cérébrale au niveau du parenchyme	55
i. Dégradation cellulaire dans le cytosol	56
ii. Voies d'élimination hors de l'ECS : efflux possibles d'une molécule présente dans l'ECS	57
iii. Drainage des fluides par le réseau lymphatique méningé, ultime étape de la clairance cérébrale.	63
c) Variations physiologiques de la clairance cérébrale à court, moyen et long termes	63
i. Facteurs qui influencent à très court terme les flux et le drainage des solutés	63
ii. Facteurs qui influencent à moyen terme les flux et le drainage des solutés	64

iii.	Âge et diminution de la clairance sur le long terme	64
IV.	Clairance pathologique et protéotoxicité	66
a)	Maladies neurodégénératives et protéotoxicité	66
b)	Stress protéotoxique et mécanismes impliqués	69
i.	Production et lieux d'agrégation des protéines impliquées en fonction des pathologies	69
ii.	Origines de l'agrégation protéique	70
iii.	Mécanismes et cinétiques de l'agrégation	72
iv.	La composante toxique des protéinopathies neurodégénératives	75
c)	Liens entre protéotoxicité et clairance cérébrale : importance de la diffusion dans l'ECS	77
 CHAPITRE II : LES MECANISMES NEUROPROTECTEURS DE LA SIGNALISATION IGF-1		79
I.	Axe somatotrope dans le développement et le vieillissement de l'organisme et dans la physiologie cérébrale	79
a)	Actions pléiotropiques des signalisations IGF et GH	79
i.	L'axe somatotrope : ses hormones et ses boucles de rétrocontrôle	79
ii.	Les cibles et mécanismes d'action de la GH et IGF-1	80
iii.	Effets pléiotropes d'IGF-1 dépendants et indépendants de la GH	81
b)	Homéostasie de la signalisation IGF au cours de la vie de l'individu	82
i.	Rôle des signalisations GH et IGF dans le développement et pathologies associées	83
ii.	Implication du système IGF dans le vieillissement et la longévité	84
c)	Signalisation IGF et cerveau	86
i.	IGF-1 et développement du système nerveux	87
ii.	La signalisation IGF1R dans les différents types cellulaires du SNC	87
iii.	Effets bénéfiques ou délétères de la signalisation IGF1R cérébrale au cours de la vie de l'individu	89
II.	Le système IGF : un régulateur de la taille cellulaire	91
a)	Détermination et physiologie de la taille cellulaire	91
b)	Les facteurs de croissance et autres protéines impliqués dans la régulation de la taille cellulaire	92
i.	Les signaux trophiques	92
ii.	Les voies de signalisation et les facteurs intracellulaires qui régulent la taille cellulaire	93
c)	Taille cellulaire et cerveau	95
i.	Ambivalence de la taille des cellules nerveuses	95
ii.	Les pathologies ou syndromes associés à une augmentation ou une diminution de la taille cellulaire	98
d)	Importance de la taille et de la plasticité neuronale dans la physiologie cérébrale	99
i.	Relations entre taille neuronale et ECS	99
ii.	Facteurs impliqués dans la régulation de la taille du soma neuronal	101
iii.	Conséquences physiologiques d'une réduction de la taille somatique du neurone	102
III.	La neuroprotection dépendante d'IGF1R : une résistance aux stress	104
a)	Stress liés à l'oxygène : stress oxydant et hypoxie	104
i.	Résistance au stress oxydant	104
ii.	Résistance à l'hypoxie	105
iii.	Origines possibles de la neuroprotection oxydative/ischémique	105

b) Protection contre la neurodégénérescence : diminution de l'inflammation et meilleure survie neuronale	107
i. Réduction systémique de la signalisation IGF1R et neuroprotection	107
ii. Suppression ciblée de la signalisation IGF1R neuronale et neuroprotection	108
iii. Effets mitigés de la suppression d'IGF1R dans les cellules gliales dans la neuroprotection	109
c) Résistance à la protéotoxicité A β : rôle d'IGF1R dans l'autophagie et la clairance cérébrale	110
i. Neuroprotection via une hyperagrégation d'A β	110
ii. Neuroprotection via une autophagie préservée et une meilleure clairance cérébrale	110
d) La neuroprotection IGF-dépendante pourrait être un mécanisme endogène de résistance déclenché par un stress protéotoxique ou par le vieillissement	112
i. Au cours du vieillissement le neurone garde sa capacité à enclencher un programme de neuroprotection	112
ii. La neuroprotection IGF-dépendante peut être un mécanisme naturellement enclenché par le vieillissement	112
CHAPITRE III : TRAVAUX DE THESE	114
I. Hypothèse de travail : mise en relation de la taille neuronale, de l'ECS et de la clairance cérébrale	114
II. Optimisation de la méthodologie	117
a) Quantification de flux de solutés <i>in vivo</i>	117
i. Analyse et quantification microscopique de la diffusion moléculaire par injection de dextrans	118
ii. Analyse de la diffusion et des propriétés de l'ECS par IRM	119
b) Optimisation des coordonnées stéréotaxiques	119
c) Conditions d'injection	121
i. Choix des traceurs	121
ii. Volumes et mode d'injection	127
iii. Contrôle des paramètres de la chirurgie et de la stabilité de l'ECS	129
III. Résultats – Article scientifique	133
CHAPITRE IV : DISCUSSION	186
BIBLIOGRAPHIE	206

ABRÉVIATIONS

AA : Acide aminé

A β : Peptide β amyloïde

AH : Acide hyaluronique

APP : *Amyloid precursor protein*

AQP4 : Aquaporine 4

BHE : Barrière hémato-encéphalique

ECS : Espace extracellulaire

GAG : Glycosaminoglycane

HTT : Protéine huntingtine

IGF-1 : *Insulin like growth factor 1*

IGF1R : *Insulin like growth factor receptor type 1*, récepteur de type 1 à l'IGF

IOI : Imagerie optique intégrative

IRM : Imagerie par résonance magnétique

IRS : *Insulin receptor substrate*

IR : *Insulin receptor*

ISF : Fluide interstitiel

LCR : Liquide céphalo-rachidien

MA : Maladie d'Alzheimer

MEC : Matrice extra-cellulaire

MH : Maladie de Huntington

MP : Maladie de Parkinson

PG : Protéoglycane

PVS : *Perivascular space*, espaces périvasculaires

RTI : *Real-time iontophoresis*, iontophorèse en temps réel

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

SN : Système nerveux

SNC : Système nerveux central

SUSHI : *Super resolution shadow imaging*

CHAPITRE I : ECS ET CLAIRANCE CEREBRALE : DE LA PHYSIOLOGIE A LA PHYSIOPATHOLOGIE

I. Organisation fonctionnelle du cortex cérébral et transport des solutés

a) Structure et régionalisation de l'isocortex

Du point de vue de l'évolution, l'émergence d'une condensation antérieure de cellules nerveuses plus ou moins démarquée du reste du tissu nerveux est un caractère neuroanatomique qui apparaît avec les bilatériens (Fig. 1) et qui peut s'assimiler à la séparation du système nerveux central (SNC) d'un tissu nerveux périphérique (Martín-Durán et Hejnol 2021). Le SNC des mammifères est constitué de l'encéphale, de la rétine et de la moelle épinière qui sont protégés par 3 barrières physiques que sont le liquide céphalo-rachidien, les méninges et l'os (crâne et vertèbres). Le cerveau est composé de plusieurs régions, dont le néocortex qui fait partie du télencéphale est la plus récente dans l'évolution du système nerveux et la plus développée chez l'homme et un certain nombre de mammifères.

i. Composition et organisation tissulaire

Le néocortex, aussi appelé isocortex, correspond à la substance grise externe de l'encéphale. Il est le siège des fonctions cognitives. Il constitue la couche externe des hémisphères cérébraux et est constitué de différentes régions anatomiques et fonctionnelles dont notamment le cortex somatosensoriel, le cortex visuel, auditif, gustatif et vestibulaire, le cortex associatif et le cortex moteur. Ces régions sont impliquées dans les fonctions exécutives, le traitement des informations sensorielles et motrices, la commande du langage, la planification du mouvement, le stockage de l'information et pour partie de la mémoire. Chez l'homme le poids moyen du cerveau est de 1 500 g et le cortex représente 82 % en masse de son poids total ; chez la souris la proportion occupée par le cortex est plus petite puisque pour un cerveau de 416 mg en moyenne chez une souris mâle adulte, le cortex ne représente que 42 % du poids total (Herculano-Houzel 2009). On peut expliquer en partie cette différence par le fait que l'homme est une espèce gyrencéphale et la souris une espèce lissencéphale. Chez l'homme le cortex a une épaisseur d'environ 2500 μm (Fischl et Dale 2000) et s'étend sur une surface très importante d'environ 0,2 m^2 car elle est fortement repliée en formant des circonvolutions afin de pouvoir être contenue dans la boîte

crânienne (Sereno et al. 2020; Schnack et al. 2015). Chez la souris en revanche l'épaisseur de cortex est importante rapportée à la taille du cerveau (1000 μm d'épaisseur), mais le cortex murin est lisse ; la surface occupée par cette structure est donc beaucoup plus petite proportionnellement, ce qui explique en partie cette grande différence.

Mis à part ces repliements, les étapes de développement de cette structure sont communes aux différentes espèces de mammifères. L'isocortex se met en place entre les semaines 9 et 18 de vie embryonnaire chez l'homme, entre les jours embryonnaires E10-E18 chez la souris, et aboutit à une organisation radiale en 6 couches corticales successives qui s'établissent chronologiquement de la zone sous-ventriculaire à la surface du cortex, mais sont anatomiquement numérotés de I à VI de la surface vers la profondeur. Ces couches sont définies anatomiquement et fonctionnellement par la morphologie, la connectivité de leurs projections et l'expression génique de leurs neurones, cellules spécialisées dans la transmission du message nerveux qui composent ces couches. Cette structure multifonctionnelle est donc hautement hiérarchisée et régionalisée.

Les neurones constituent la population majoritaire des cellules de l'isocortex comprenant des neurones inhibiteurs GABAergiques et des neurones excitateurs glutamatergiques. Ce sont les neurones excitateurs qui sont ségrégués en fonction des couches corticales et qui représentent environ deux tiers des neurones corticaux. De façon surprenante, et alors que la masse du cortex constitue la majeure partie de la masse cérébrale, sur les 86 milliards de neurones que compte en moyenne l'encéphale humain, le cortex n'en contient que 16 milliards, soit 19 % du pool total, et autant de cellules gliales (Herculano-Houzel 2009). Chez la souris, le cortex contient 17 % des neurones de l'encéphale, soit 12 millions (Herculano-Houzel, Mota, et Lent 2006). Les travaux de Herculano-Houzel ont examiné les densités neuronales et gliales dans un grand nombre d'espèces et ont permis de mettre en évidence que, si la densité neuronale était hautement variable en fonction de la région cérébrale et de l'espèce considérée, la densité gliale en revanche était un paramètre fortement conservé et très peu variable à travers les espèces de mammifères (Herculano-Houzel et Dos Santos 2018).

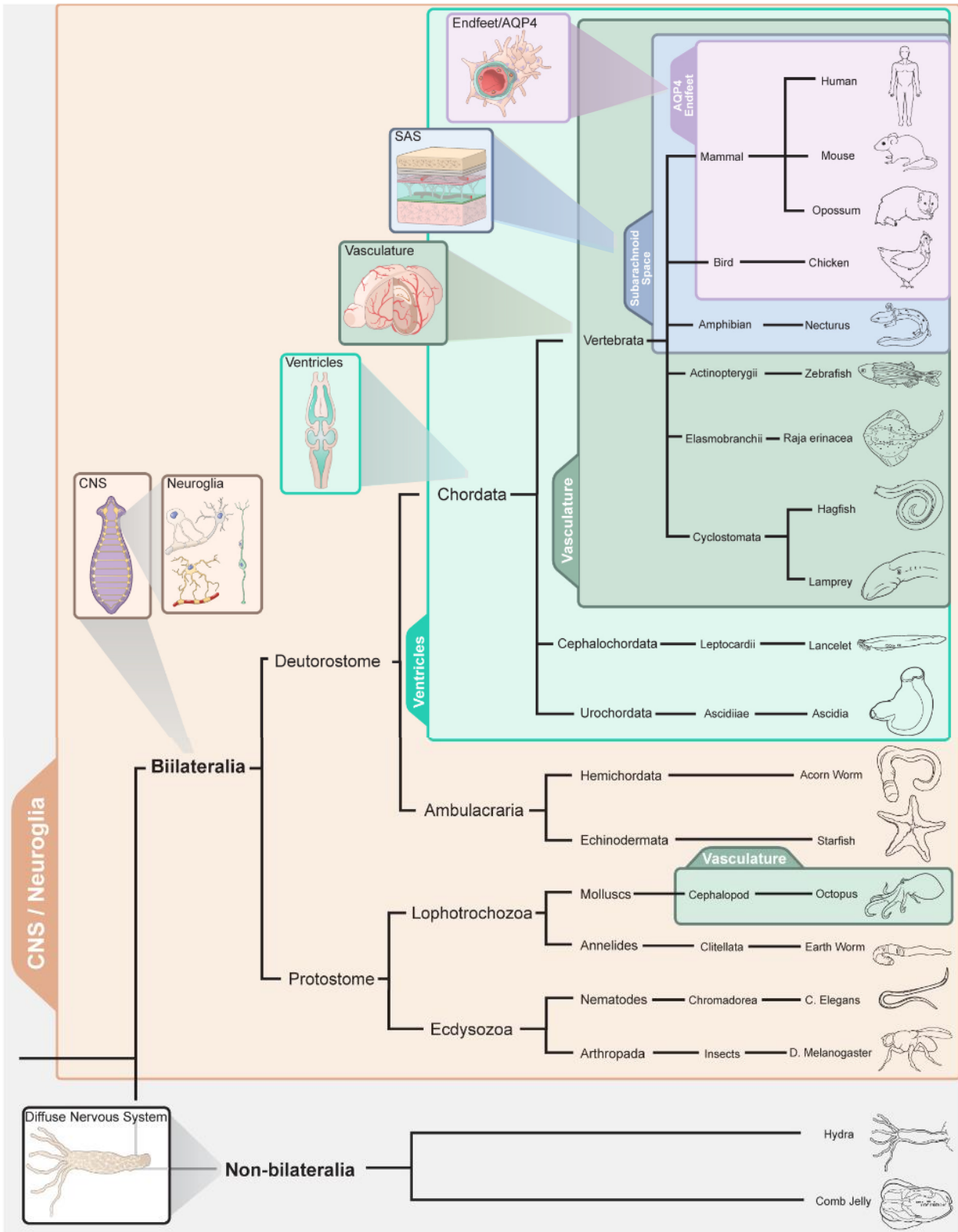


Figure 1. Phylogénétique du système nerveux central (SNC) et de son système circulatoire

SNC/neuroglia : Apparition d'un système nerveux compartimenté ainsi que de cellules support du tissu nerveux, la glie. Ventricles : Apparition d'un réseau de ventricules dans lequel circule le liquide céphalo-rachidien (LCR). Vasculature : Apparition d'un réseau vasculaire et d'une microcirculation capillaire au niveau du SNC. SAS : Présence d'un espace sous-arachnoïdien délimité par la dure-mère et la pie-mère dans lequel circule le LCR à la surface du SNC. Endfeet/AQP4 : Présence d'une enveloppe de pieds astrocytaires autour des vaisseaux cérébraux délimitant un espace périvasculaire entre la membrane basale des cellules endothéliales et le parenchyme cérébral dans lequel peut circuler du LCR pour pénétrer le parenchyme et faciliter les échanges avec le tissu. (Rasmussen, Mestre, et Nedergaard 2022)

La population gliale se décompose en astrocytes, oligodendrocytes et microglie. Les astrocytes sont le support métabolique majeur des neurones et sont impliqués dans la régulation de la transmission synaptique, la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) via les pieds astrocytaires, l'homéostasie tissulaire et la réaction inflammatoire. Les microglies sont les cellules macrophages résidentes du système immunitaire dans le cerveau et les oligodendrocytes sont des cellules productrices de myéline qui contribuent au support trophique des neurones et à l'augmentation de la vitesse de conduction du message nerveux. Enfin, on trouve des cellules endothéliales et des péricytes qui constituent le réseau vasculaire cérébral. La densité de ces différents types cellulaires varie en fonction de la couche corticale, mais également en fonction de la région du cerveau considérée.

i. Contraintes d'espaces et de densités cellulaires

Chaque couche corticale est donc constituée des somas des neurones excitateurs qui la caractérisent, d'une partie de leur arborisation dendritique, de dendrites et d'axones provenant de neurones d'autres couches corticales, de neurones inhibiteurs, de corps cellulaires et de prolongements cytoplasmiques des cellules gliales et de capillaires. L'important enchevêtrement des différents prolongements cytoplasmiques entre les corps cellulaires est appelé le neuropile.

Il faut alors s'imaginer, au sein de cette organisation corticale hautement hiérarchisée autour de l'agencement des corps cellulaires des neurones entre eux, comment viennent s'intercaler tous les autres composants cités précédemment, quelle place prend le neuropile et quel espace interstitiel peut exister entre ces structures. Pour mieux se représenter ces volumes, on peut s'appuyer sur les travaux des équipes de Lichtman et de Helmstaedter. À partir d'une succession d'images de régions corticales en microscopie électronique, l'équipe de Lichtman a reconstruit en 3D un petit volume de neuropile ($\sim 5 \times 10^2 \mu\text{m}^3$) (Fig. 2D) avec l'intégralité de sa diversité cellulaire (Kasthuri et al. 2015). Loomba et ses collègues ont quant à eux reconstruit l'ensemble des neurones présents dans des volumes plus importants ($\sim 1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$) de certaines régions du cortex (Loomba et al. 2022) pour établir le détail de leur connectivité (Fig. 2A).

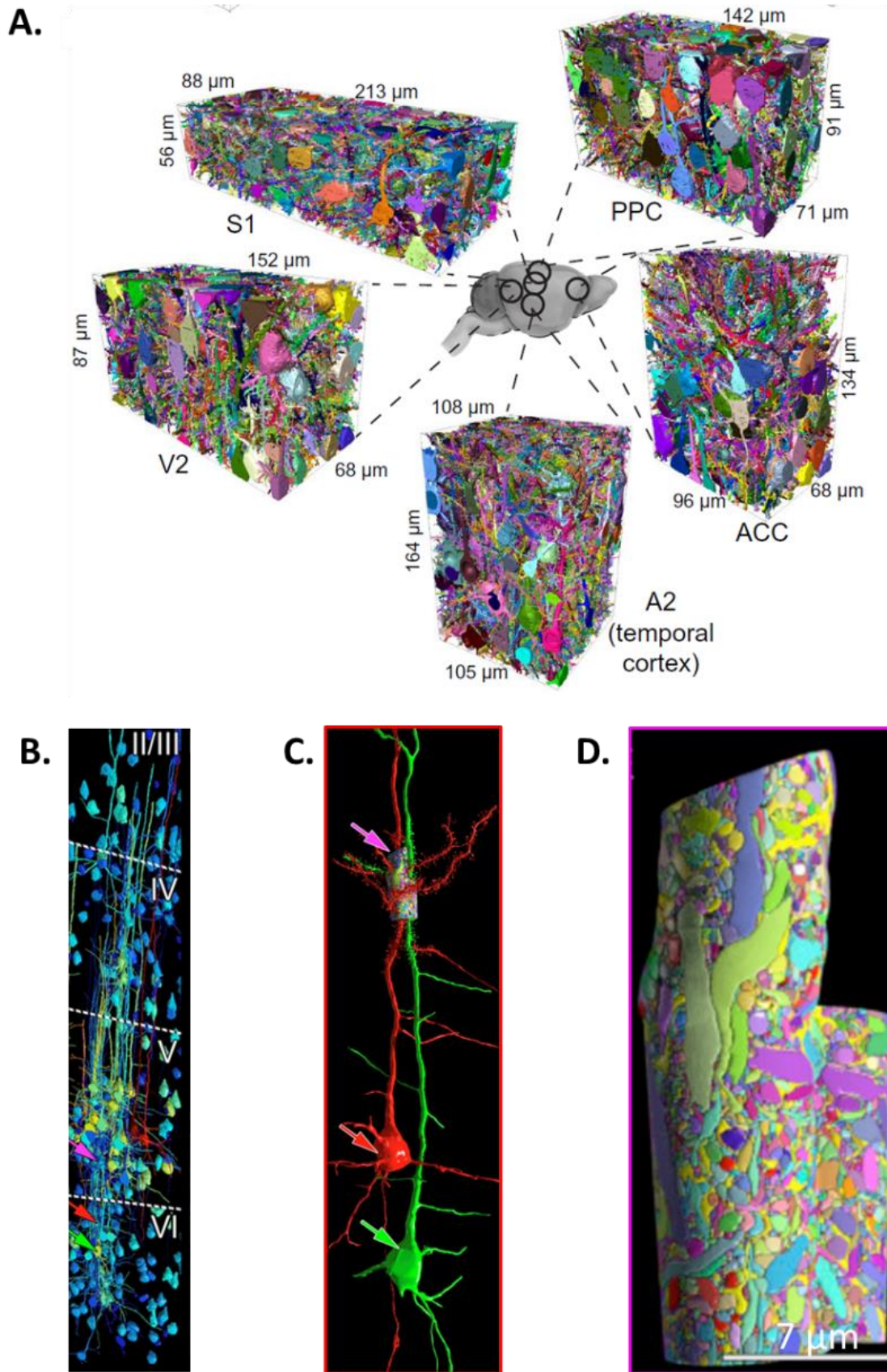


Figure 2. Reconstruction de volumes d'isocortex et de neuropile

A. Mise en évidence de la densité et de la complexité du réseau neuronal au sein du cortex, figure de (Loomba et al. 2022) **B-D.** Reconstruction 3D de la cytoarchitecture du cortex somatosensoriel et d'un volume de son neuropile (Kasthuri et al. 2015) **B.** Somas neuronaux et arborisations dendritiques. **C.** Deux neurones pyramidaux de la couche VI. **D.** Reconstruction du neuropile autour de portions des dendrites primaires des neurones pyramidaux de C.

D'après ces reconstructions, le neuropile est une structure excessivement dense et irrégulière. Contrairement à la majorité des autres tissus de l'organisme qui consistent en une répétition de groupements cellulaires identiques mis bout à bout, le cerveau présente la particularité d'être une structure non répétée. Mise à part l'organisation en colonnes des somas neuronaux excitateurs à travers les différentes couches du cortex, l'emplacement et l'organisation du reste des structures cellulaires sont très difficilement modélisables et semblent impossibles à prédire.

ii. Le neurone pyramidal : Une morphologie et une polarité adaptées à la réception, l'intégration et la retransmission d'une quantité massive d'informations.

Le neurone pyramidal constitue un type neuronal largement retrouvé dans le cortex, l'hippocampe et l'amygdale des mammifères, des oiseaux, des reptiles ou encore des poissons. Cette cellule excitatrice est le neurone le plus représenté dans l'isocortex des mammifères. Sa localisation dans des régions cérébrales associées à des fonctions cognitives complexes et ses caractéristiques cytoarchitecturales particulières conservées à travers différentes espèces de vertébrés donnent au neurone pyramidal un rôle essentiel dans l'intégration et le traitement des informations nerveuses des fonctions supérieures du cerveau (Spruston 2008).

La cellule pyramidale est un neurone glutamatergique, qui relargue au niveau de ses synapses du glutamate (Fig. 3C), un neurotransmetteur excitateur qui, en se fixant à des récepteurs NMDA ou AMPA en post-synaptique, produit une dépolarisation de la membrane du neurone post-synaptique. Le neurone pyramidal tient son nom de la forme de son corps cellulaire, qui a une forme pyramidale arrondie ou en « goutte d'eau », dont la pointe est orientée vers l'extérieur de la structure et dont la base est parallèle au corps calleux dans l'isocortex. Autour de son soma s'organise une arborisation dendritique extrêmement développée et régionalisée qui assure une grande surface de contacts synaptiques, nécessaires à la réception et à l'intégration des signaux excitateurs et inhibiteurs en provenance de l'ensemble des couches corticales (Fig. 3AB). Cette cellule polarisée possède un réseau de dendrites relativement courts au niveau basal et une dendrite apicale qui se ramifie et se subdivise en dendrites proximales et obliques, dendrites distales et enfin en dendrites terminales qui peuvent pour certains

atteindre la couche moléculaire du cortex (Fig. 3B,D). Enfin, son axone, qui émerge au niveau basal, projette de nombreuses collatérales qui peuvent s'étendre de quelques millimètres jusqu'à une dizaine de centimètres à travers le cerveau. Ces prolongements axonaux constituent la substance blanche de l'encéphale. À la surface de l'ensemble de son réseau dendritique, somatique et axonal, le neurone peut établir des synapses, qui constituent d'un point de vue purement morphologique de petites excroissances membranaires autour desquelles viennent s'envelopper des prolongements astrocytaires pour former des synapses tripartites et réguler leur fonctionnement (Fig. 3B,C). Si la morphologie générale du neurone pyramidal est conservée au sein du cortex, son degré d'arborisation et sa connectivité en revanche varient en fonction de la couche corticale considérée.

Dans les couches corticales II/III, les neurones pyramidaux ont de petits somas et une importante arborisation dendritique locale, car ils établissent des connexions cortico-corticales (Fig. 3D). Les neurones pyramidaux présents dans la couche V sont les cellules les plus grandes de l'isocortex. Ils sont caractérisés par de grands somas et de très longues projections axonales. Les régions cibles de ces projections permettent de distinguer deux sous-groupes neuronaux de la couche V. L'axone du neurone pyramidal intratélencéphalique projette vers le striatum et d'autres régions du cortex en ipsi- ou contralatéral et les neurones du faisceau pyramidal projettent des collatérales vers des régions cérébrales encore plus éloignées, comme le thalamus et les régions du tronc cérébral. (Fig. 3D,E)

Au-delà des barrières membranaires lipidiques qui délimitent les éléments cellulaires précédemment cités, l'isocortex est essentiellement composé de fluides, compartimentés de façon stricte et de composition finement contrôlée. L'organisme humain est composé en moyenne à 60 % d'eau, en masse. Cette eau se répartit au 2/3 dans le compartiment intracellulaire et 1/3 en extracellulaire. De cette eau extracellulaire, 25 % se trouvent dans le plasma, 7 % dans les flux transcellulaires et les 68 % restant constituent le liquide interstitiel (Henderson, Gillon, et Al-Haddad 2021).

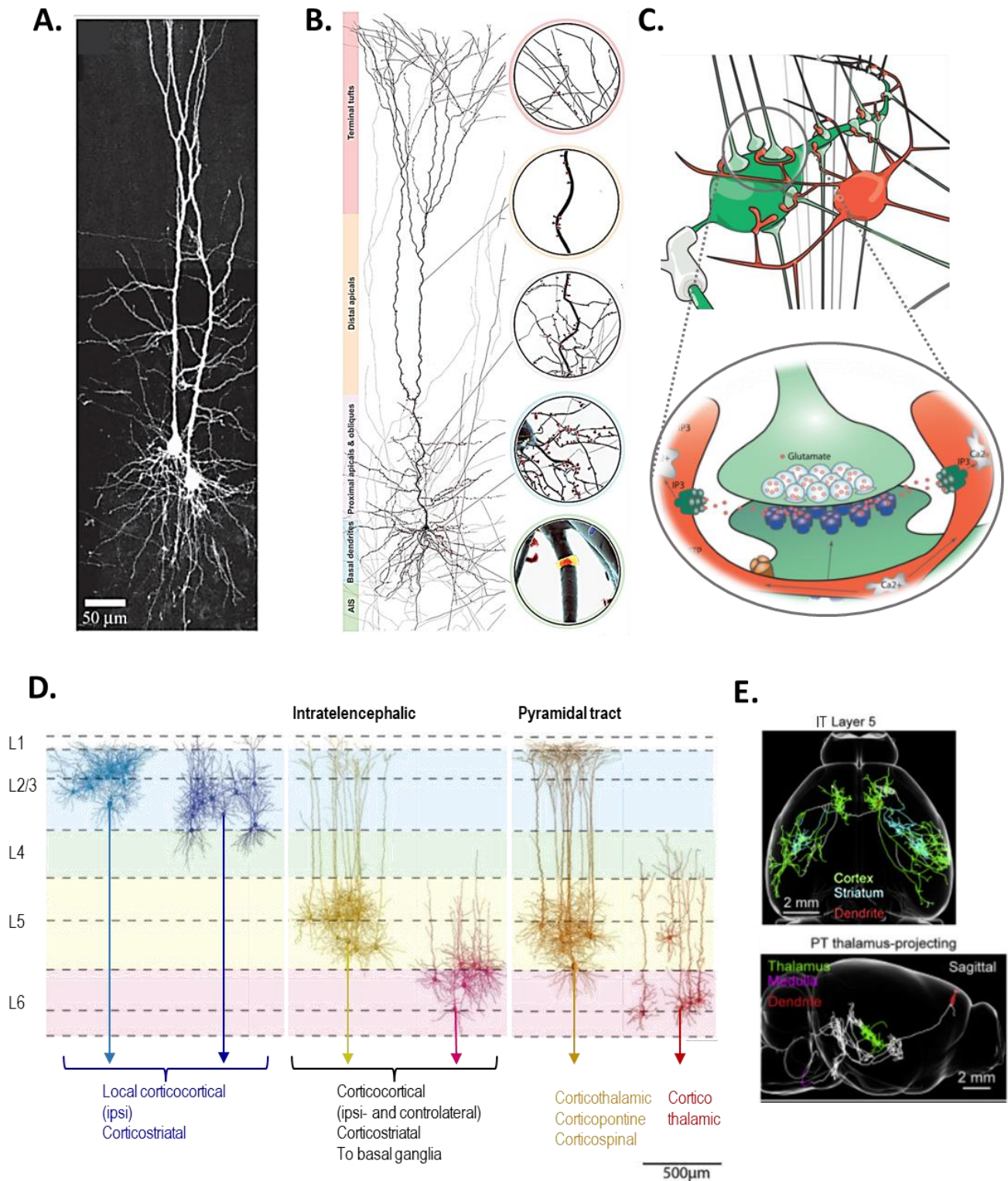


Figure 3. Le neurone pyramidal : une cellule excitatrice polarisée de l'isocortex qui établit des connexions à longue distance

A. Neurones pyramidaux en microscopie confocale, tiré de Kalisman et al. (Kalisman, Silberberg, et Markram 2005). **B.** Morphologie des différents compartiments cytoplasmiques du neurone pyramidal et mise en évidence de la densité synaptique en fonction de la localisation de l'arbre dendritique (en rouge). AIS : *Axon initial segment* (Ramaswamy et Markram 2015). **C.** Les contacts neuronaux (en vert) s'établissent au niveau du soma et des dendrites du neurone pyramidal (haut) en formant des synapses qui sont également au contact de pieds astrocytaires (en rouge) qui régulent notamment la concentration de glutamate dans la fente synaptique (bas) adapté de Tasker et al. (Tasker et al. 2012) **D.** Arborisation et connectivité des neurones pyramidaux de l'isocortex en fonction de leur localisation, adapté de Oberlaender et al. (Oberlaender et al. 2012). **E.** Exemple de projections d'un neurone pyramidal intratélencéphalique (haut) et d'un neurone du faisceau pyramidal (bas) de la couche V d'après Winnubst et al. (Winnubst et al. 2019).

b) Compartiments liquidiens, fluides et mécanismes de transport de solutés au sein du SNC

Chez les Vertébrés, les solutés du système nerveux central se répartissent dans 4 compartiments liquidiens, le compartiment intracellulaire d'une part et le compartiment extracellulaire d'autre part, qui se subdivise en 3 milieux circulants et interstitiels : le plasma contenu dans le réseau vasculaire, le liquide céphalo-rachidien qui enveloppe et traverse l'ensemble du SNC et le milieu interstitiel de l'espace extracellulaire dans lequel baignent les cellules et la matrice extracellulaire. Pour de petits organismes pluricellulaires ou des espèces peu épaisses comme le ver plat, où les cellules les plus profondes sont à quelques centaines de μm de la surface d'échange extérieure, les processus de diffusion permettent d'approvisionner l'intégralité des cellules de l'organisme en nutriments et oxygène et d'éliminer les déchets métaboliques. En revanche, au cours de l'évolution l'apparition d'organismes plus volumineux et complexes s'est accompagnée de contraintes physiques limitant ces phénomènes purement diffusifs et pouvant expliquer la mise en place de circulations cloisonnées et dédiées à l'approvisionnement métabolique des cellules et à l'élimination des déchets. On peut dater la séparation du milieu interstitiel d'un deuxième compartiment fluide dans le SNC avec l'apparition des chordés où on retrouve un système ventriculaire chez les espèces issues de cet embranchement (Fig. 1). Ce n'est qu'au sein des espèces vertébrées que l'on observe ensuite systématiquement la présence d'une vascularisation du SNC (Fig.1) (Rasmussen, Mestre, et Nedergaard 2022). On peut penser que le réseau ventriculaire est un système circulatoire primitif qui permet de faciliter la distribution de nutriments et l'élimination des métabolites. L'apparition plus tardive du système vasculaire dénote la nécessité pour certains organismes de suppléer ce premier réseau en développant un système spécialisé et très finement régulé à différents étages pour apporter avec une grande efficacité les nutriments et gaz essentiels au métabolisme cellulaire.

Tableau 1. Compositions ioniques des fluides du SNC en mmol/L

Ions	Compartiment		Compartiment extracellulaire	
	Intracellulaire	Interstitiel	LCR	Plasma
Na+	15	145	147	150-142
K+	140	4-5	2,9	4,6
Cl-	10-30	115	113	100
HCO ₃ ⁻	10-16	25-30	23	27
pH	7,2	7,4	7,3	7,4

Les valeurs sont extraites des références suivantes : (B. M. Koeppen et B.A. Stanton 6th Edition; Walter F. Boron et Emile L. Boulpaep 2012; Rasmussen, Mestre, et Nedergaard 2022; Tagluk et Tekin 2014)

i. Le système vasculaire : spécificité des vaisseaux et de la microcirculation cérébrale

- Mise en place du réseau vasculaire

Chez la souris, l'angiogenèse cérébrale débute avec la mise en place du SN au cours du développement embryonnaire et se termine au 14^e jour post embryonnaire. À la 20^e semaine de vie embryonnaire, la majorité du réseau vasculaire est également en place chez l'homme. Le réseau vasculaire conserve néanmoins une grande plasticité au cours du développement ultérieur et de la vie post-embryonnaire de l'individu, qui lui permet de croître et de se remodeler en s'adaptant aux contraintes et besoins énergétiques des cellules. Les premières ébauches vasculaires du SN se développent autour du tube neural en formant un plexus vasculaire dorsal au niveau de la pie-mère et un plexus ventral périventriculaire (Vasudevan et al. 2008). Ensuite, la vascularisation de l'isocortex et de l'ensemble du cortex antérieur débute au niveau de ce plexus ventral et pénètre dans le parenchyme et les couches corticales par bourgeonnement vers la zone dorsale du télencéphale. Chronologiquement, durant le développement, la substance grise est la dernière région du cortex à se vasculariser. *In fine*, les vaisseaux du cerveau forment un réseau vasculaire extrêmement dense pour garantir l'apport énergétique de l'ensemble des neurones. La densité de vaisseaux dans l'isocortex murin est de 880 mm/mm³ (Tsai et al. 2009) et ne représente qu'une faible fraction du volume total du cerveau, soit 1,5 % en moyenne dans l'isocortex de la souris par exemple (Schmid et al. 2019).

- Description anatomique du réseau

Anatomiquement les artères cérébrales recouvrent la surface du cerveau au niveau des méninges. Les artères présentes dans l'espace sous-arachnoïdien pénètrent le parenchyme par une invagination locale de la pie-mère. Ces artères se ramifient en artérioles une fois dans le parenchyme et établissent un plexus vasculaire composé d'anastomoses capillaires (Marín-Padilla 2012). En miroir du réseau artériel, les capillaires débouchent sur des veinules qui fusionnent pour former les veines qui rejoignent ensuite le sinus veineux situé dorsalement, via l'espace sous-arachnoïdien (Fig. 4B,C).

- Les espaces périvasculaires (PVS) et la barrière hématoencéphalique (BHE)

Le cerveau est un organe particulièrement fragile, car dépourvu d'un système immunitaire aussi développé que dans le reste de l'organisme qui lui permettrait de lutter contre des agressions de pathogènes ou de substances toxiques. Les barrières physiques qui séparent le SNC du milieu extérieur (cf. 1^{er} § Partie I) et celles qui l'isole des perturbations du milieu intérieur sanguin permettent de limiter ces agressions. Cette dernière barrière est appelée la barrière hématoencéphalique (BHE) et constitue une frontière régulant finement les échanges entre le sang et le milieu interstitiel. Considérons la composition cellulaire d'un vaisseau cérébral de sa lumière vers sa périphérie. La première couche cellulaire des vaisseaux est composée de cellules endothéliales. À l'exception des vaisseaux du plexus choroïde et des régions circumventriculaires, où les capillaires sont fenestrés, l'ensemble du réseau vasculaire cérébral est constitué de capillaires continus. En effet, la particularité de ces vaisseaux repose sur les jonctions serrées existant entre cellules endothéliales, qui rendent complètement étanche cette jonction paracellulaire et qui constituent la première barrière physique de la BHE. On trouve ensuite la membrane basale des cellules endothéliales. Les couches suivantes dépendent des cellules murales associées aux vaisseaux, qui sont différentes en fonction du tronçon vasculaire considéré. Les artères et artérioles possèdent une couche externe contractile formée de cellules musculaires lisses qui permettent de réguler le flux sanguin (Fig. 4C gauche) et les capillaires sont associés à des péricytes qui jouent localement le rôle de sphincters vasculaires (Fig. 4C milieu).

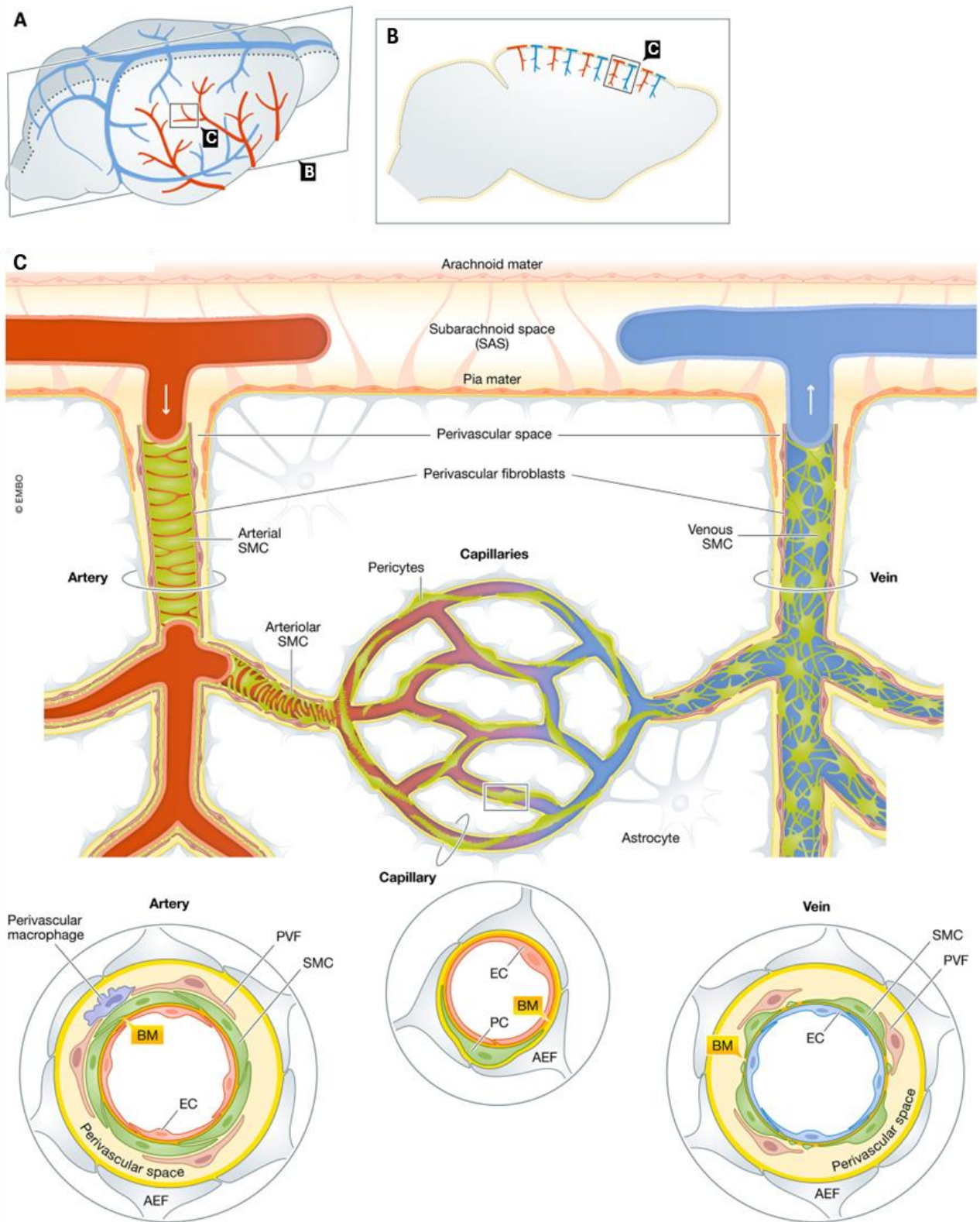


Figure 4. Le réseau vasculaire cortical et ses cellules murales

(A) Schéma d'un cerveau de souris où les artères sont représentées en rouge et les veines en bleu, et (B) d'une coupe sagittale où les artères et les veines pénétrantes dans le parenchyme sont visualisées. (C) Représentation du réseau vasculaire de l'espace sous-arachnoïde en surface du cortex à la profondeur du parenchyme, au niveau des anastomoses capillaires. De gauche à droite dans les bulles, détails de la composition des parois des vaisseaux en sections transversales en fonction du tronçon vasculaire considéré (artère, capillaire, veine). SMC, *smooth muscle cell*, cellule musculaire lisse; EC, *endothelial cell*, cellule endothéliale; PVF, *perivascular fibroblast*, fibroblaste périvasculaire; BM, *basement membrane*, membrane basale; AEF, *astrocytic endfeet*, pieds astrocytaires; PC, *pericyte*, péricyte (Lendahl, Nilsson, et Betsholtz 2019)

Enfin, les pieds astrocytaires constituent la dernière enveloppe de la BHE et ménagent entre la membrane basale des cellules endothéliales/musculaires et la membrane astrocytaire un espace appelé espace périvasculaire (PVS) ou espace de Virchow-Robin. On trouve également dans la composition cellulaire des vaisseaux cérébraux, quelques fibroblastes et macrophages périvasculaires (Fig.4). Si la présence des pieds astrocytaires est communément admise et a été mise en évidence de nombreuses fois expérimentalement en ce qui concerne le réseau artérioveineux (Iloff et al. 2012), on ne trouve pas encore de consensus concernant une couverture complète de la fraction capillaire. Hannocks et al. ont montré qu'ils étaient capables de détecter des IgG injectées en intrathécale et de détecter des marqueurs de membrane basale astrocytaire jusqu'au niveau capillaire (Hannocks et al. 2018). Néanmoins, les autres études s'étant penchées sur la question n'ont pas mis en évidence de réels PVS au niveau capillaire et attribuent cette disparition à une fusion des membranes basales astrocytaires et endothéliales (Bedussi, Almasian, et al. 2017). C'est donc au niveau des capillaires, où le débit sanguin est le plus lent et où la BHE pourrait être réduite à la stricte imperméabilité endothéliale, que peuvent avoir lieu la majorité des échanges, de façon contrôlée entre le sang et le milieu interstitiel.

- Composition du sang et du plasma

Le sang est un milieu circulant mis en mouvement par le muscle creux cardiaque au sein du système fermé qu'est le réseau vasculaire. Il est constitué d'une fraction cellulaire, qui contient les hématies (anucées), les cellules de l'immunité et les plaquettes (fragments de cellules), et d'une fraction liquidienne, le plasma sanguin. Le sang transporte des gaz et notamment l'O₂ et le CO₂ sous forme liée à l'hémoglobine dans les hématies et il transporte dans sa fraction plasmatique des ions, du glucose, des protéines (albumine, lipoprotéines, hormones...), des gaz respiratoires sous forme dissoute, etc. Les gaz diffusent librement dans les membranes et se retrouvent rapidement sous forme dissoute dans le milieu interstitiel. En revanche, du fait de l'étanchéité entre les cellules endothéliales, l'intégralité des échanges de solutés entre le sang et le milieu interstitiel passe par voie transcellulaire et repose, pour toutes les molécules hydrophiles ou chargées qui ne peuvent pas traverser la bicouche lipidique, sur des transporteurs spécifiques à la membrane des cellules endothéliales sur les faces luminale et interstitielle. Le détail de ces transports sera abordé dans la partie III de ce chapitre. La composition ionique du plasma

est assez proche de celle du milieu interstitiel (Tableau 1). Toutefois, la concentration en glucose du plasma est près de 100 fois supérieure à celle que l'on trouve dans le compartiment interstitiel, et la concentration en protéines est également plus importante. Pour ces molécules les flux sont donc majoritairement orientés de la lumière vers le compartiment interstitiel.

ii. Le réseau cavitaire et les mouvements du liquide céphalo-rachidien (LCR)

- Des ventricules aux espaces périvasculaires : le contenant du LCR

La première description approfondie du LCR, aussi appelé liquide céphalo-spinal, et de ses localisations a été faite par le physiologiste François Magendie en 1815. Il a détaillé l'ensemble des structures anatomiques qui contenaient le LCR (ventricules, citernes et canal de la moëlle épinière) et mis en évidence la communication du système ventriculaire avec l'espace sous-arachnoïdien. L'espace sous-arachnoïdien devient l'espace périvasculaire quand les vaisseaux pénètrent dans le parenchyme. Il existe donc un continuum des espaces contenant le LCR, au moins jusqu'au niveau capillaire, qui assure une couverture liquidienne interne et externe du SNC (Fig. 5). Il existe des liens étroits entre le LCR et le liquide interstitiel (ISF) et de nombreuses localisations cérébrales, où les échanges se font librement entre ces deux fluides. Chez l'homme, le volume de LCR est d'environ une centaine de mL, contre environ 35 μ L chez la souris. Rapporté au débit de production qui est d'environ 0,3 mL/min chez l'homme et environ 0,108 μ L/min chez la souris (G. Liu et al. 2020), le LCR est donc renouvelé plusieurs fois par jour chez l'homme comme chez la souris.

- Composition du LCR

Le LCR semble être un fluide mixte d'une composition qualitativement intermédiaire entre le plasma et l'ISF, qui peut s'expliquer par les échanges privilégiés entre ces compartiments qu'on retrouve à certains endroits du SNC. Les régions anatomiques au niveau de *glia limitans* externe, pieds astrocytaires au niveau de la pie-mère, des espaces périvasculaires et au niveau des cellules épendymaires des ventricules (Fig. 5) sont des zones poreuses entre LCR et ISF, ce qui explique leurs compositions biochimiques similaires (Tableau1). Bien qu'en plus faibles quantités, le LCR comme le plasma contiennent des protéines et des nutriments. Les échanges entre ces deux compartiments sont particulièrement

importants au niveau des cellules épithéliales des plexus choroïdes, qui constituent une interface plasma/LCR plus perméable qu'au niveau de la BHE. Le débit sanguin élevé et la fenestration des capillaires au niveau de ces cellules épithéliales permettent l'afflux massif d'une large gamme de molécules au niveau basal de ces cellules (Gherzi-Egea et al. 2018). D'autre part, bien que les transports moléculaires soient finalement régulés, les flux nets de molécules vers le LCR sont favorisés par la vaste surface membranaire apicale des cellules épithéliales choroïdales.

- Mise en mouvement et circulation du LCR

À l'instar du plasma, le LCR est un fluide circulant. Le LCR est majoritairement produit par le plexus choroïde au niveau des ventricules latéraux, du 3^e ventricule et du 4^e ventricule et également sécrété par les cellules endothéliales de la BHE. Il circule selon un flux de masse, *bulk flow* en anglais, au sein du système ventriculaire, de la *cisterna magna*, dans l'espace sous-arachnoïdien, le long de la moelle épinière et dans les espaces périvasculaires. Le LCR est ensuite réabsorbé à différents niveaux du cerveau, notamment au niveau des granulations arachnoïdiennes, du sinus veineux, le long des nerfs crâniens et au niveau des vaisseaux lymphatiques présents dans la dure-mère (Fig. 5) (Rasmussen, Mestre, et Nedergaard 2022).

La mise en mouvement globale du LCR n'est pas clairement établie. On peut penser que la combinaison de la production au niveau du plexus choroïde et des cellules endothéliales d'une part, et de l'élimination constante de LCR au niveau des vaisseaux lymphatiques d'autre part induirait des différences de pression osmotique permettant de mettre en mouvement ce fluide. L'équipe de Nedergaard suggère que le flux de LCR pourrait aussi être pulsatile et dépendant du rythme cardiaque, de la pression artérielle et du diamètre des artères (Mestre et al. 2018; Holstein-Rønsbo et al. 2023a). Le flux de LCR le long des PVS est également amplifié par l'anesthésie et le sommeil (Lulu Xie et al. 2013) ou, au contraire, limité en cas d'hypertension (Mestre et al. 2018). Les flux d'eau, entre les pieds astrocytaires et via leurs aquaporines (AQP4), pourraient également être impliqués dans les mouvements de bulk flow, à la fois du liquide en lui-même et de ses solutés.

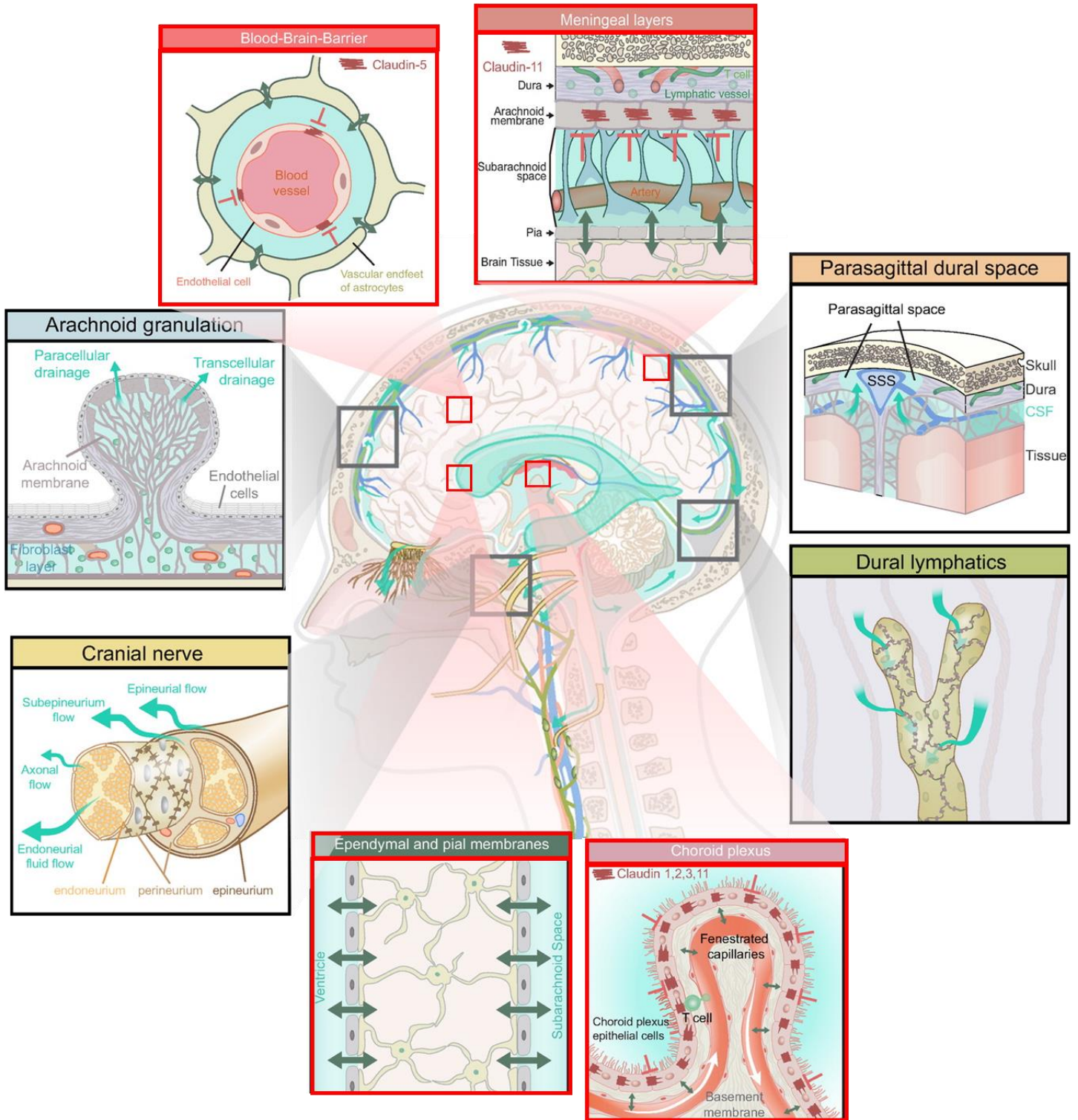


Figure 5. Localisation du LCR dans le CNS, de ses échanges avec l'ISF, de ses barrières et de ses voies d'efflux
 Encarts rouges : Localisation des frontières perméables (flèches vertes) et étanches (flèches rouges) entre le LCR et l'ISF, visualisation des zones d'échanges symbolisées par les flèches vertes. Encarts noirs : Voies d'efflux du LCR hors du cerveau. (d'après Rasmussen, Mestre, et Nedergaard 2022).

iii. Le réseau lymphatique cérébral : drainage des fluides et veille immunitaire

Malgré la connaissance de l'existence d'une surveillance immunitaire du SNC au niveau méningé, la communauté scientifique a longtemps pensé que le SNC était dépourvu de système lymphatique. Les équipes de Kipnis et Alitalo ont néanmoins récemment mis en évidence l'existence de vaisseaux lymphatiques au niveau du cerveau, localisés à proximité du sinus veineux dans la dure mère (Fig. 5) et reliés aux ganglions cervicaux lymphatiques (Aspelund et al. 2015; Louveau et al. 2015). Ces vaisseaux assurent le drainage de cellules immunitaires et des fluides extracellulaires, dont notamment une partie du LCR. Le fonctionnement et la structure de ce réseau lymphatique méningé est en partie commun à l'homme et à la souris. Néanmoins, les travaux de Jacob et al. suggèrent que certains vaisseaux lymphatiques chez la souris seraient spécialisés dans l'efflux du LCR sous-arachnoïdien et d'autres dans l'efflux du LCR en provenance des PVS, c'est-à-dire d'un LCR « chargé » en métabolites à éliminer (Jacob et al. 2022). Le débit du drainage lymphatique du LCR est cependant plus lent que la filtration qui a lieu au niveau du sinus veineux par les granulations arachnoïdes (Louveau et al. 2015). D'autre part, le fait que ces vaisseaux soient cantonnés à l'espace méningé les place en fin de chaîne dans le drainage du parenchyme puisqu'ils restent à la surface du cerveau, sans pénétrer dans le parenchyme.

iv. L'espace extracellulaire (ECS) et le liquide interstitiel (ISF)

Le dernier compartiment liquidien du SNC que nous n'avons pas encore décrit et qui nous intéressera particulièrement dans la suite de ce chapitre est le liquide interstitiel (ISF), contenu dans l'espace extracellulaire (ECS) du parenchyme cérébral. Par définition, l'ECS est l'espace qui est compris entre les membranes cellulaires. Cet espace est en constante évolution et en remodelage tout au long de la vie de l'individu. En construction au cours du développement du système nerveux, il est dans un premier temps assez volumineux puis, avec la densification du parenchyme cérébral et la prolifération des prolongements cytoplasmiques neuronaux et gliaux, il se réduit dans les 20 jours suivant la naissance chez le rongeur, et se complexifie (Lei et al. 2017).

- Composition de l'ISF

Le liquide interstitiel (ISF) est une véritable interface liquidienne de l'organisme, car il est en échanges constants avec les différents compartiments sanguins, cellulaires, lymphatiques et également céphalo-rachidiens pour le SN. Il est essentiellement composé d'eau, qui représente environ 15 % de l'eau totale présente dans l'organisme, et contient des ions, des sucres, peu de protéines et des hormones circulants. La concentration ionique et l'osmolarité de l'ISF sont finement contrôlées et leur maintien est essentiel au bon fonctionnement cérébral. En moyenne dans l'organisme, la répartition ionique entre les compartiments intra- et extracellulaire est stable et systématiquement caractérisée par une concentration en ions sodium Na^+ majoritairement extracellulaire et par des ions potassium K^+ à fortes concentrations intracellulaires comme indiqué dans le (Tableau 1). Ces différences de concentrations confèrent à chaque cellule de l'organisme un potentiel membranaire de repos, qui varie en fonction de la perméabilité membranaire des cellules à certains ions et qui règle les flux transmembranaires de solutés.

- Importance physiologique de la stabilité de l'ISF

Encore plus que partout ailleurs dans l'organisme, l'ISF du SN doit garder une composition ionique particulièrement stable, car c'est elle qui détermine la capacité des neurones à réagir de façon adaptée aux stimuli. En ce qui concerne les neurones, leur potentiel de repos se situe à -65 mV. Dans les conditions physiologiques de fonctionnement, le maintien de ce potentiel de repos dans une gamme de valeurs très resserrée est assuré en premier lieu grâce à la stabilité des concentrations de solutés dans le plasma et le LCR. Deuxièmement, cette différence de potentiel est maintenue grâce au fonctionnement des pompes Na/K ATPase et des autres transporteurs impliqués dans les flux ioniques transmembranaires qui maintiennent un constant déséquilibre des concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane. Enfin, les flux d'eau entre les différents compartiments qui s'accompagnent de mouvements d'ions sont limités par l'osmolarité globale relativement constante du tissu cérébral et du plasma. Ces valeurs nominales de concentrations (Tableau 1) permettent au neurone de localement se dépolariser ou de s'hyperpolariser de façon adaptée en réponse aux signaux chimiques qu'il reçoit sur ses synapses. Elles garantissent ainsi une intégration appropriée des signaux, afin de délivrer ou non une réponse neuronale standardisée sous la forme de potentiels d'action.

- Mouvements moléculaires au sein de l'ISF

Brièvement, et à l'inverse des autres fluides circulants de l'organisme dont nous avons parlé précédemment, l'ISF n'est pas mis en mouvement. C'est un lieu de transit dans lequel les molécules solubles circulent essentiellement par diffusion. Les gaz comme l'O₂ et le CO₂ transitent sous forme gazeuse à travers les membranes et sous forme dissoute dans l'ISF par diffusion, pour atteindre les cellules du parenchyme pour la part de l'O₂, de la même manière que le glucose, et pour rejoindre le sang veineux pour la part du CO₂. L'ISF est également le lieu de la transmission volumique ou *volume transmission*, nom donné à la diffusion des neurotransmetteurs légèrement au-delà de la fente synaptique (recapture par les astrocytes), mais également à la transmission de messagers neuropeptidiques ou hormonaux à plus grande distance par diffusion simple (Soria, Miguelez, et al. 2020a). En outre, l'ISF est le milieu dans lequel les cellules excrètent les métabolites qui ne sont pas dégradés ou recyclés en interne. L'ISF contient donc de façon transitoire des déchets métaboliques potentiellement toxiques. Les mouvements moléculaires au sein de l'ISF, notamment des métabolites à éliminer, font débat depuis une dizaine d'années, puisque certains argumentent en faveur de flux convectifs traversant l'ECS qui mettent en mouvement les solutés de l'ISF (Iloff et al. 2012), tandis que d'autres maintiennent que les mouvements moléculaires au sein de l'ISF se font purement par diffusion (Smith et al. 2017; B.-J. Jin, Smith, et Verkman 2016). Nous verrons plus en détails par la suite l'état de l'art concernant ces questions biophysiques.

Il est important de noter la discontinuité anatomique du réseau neuronal. La continuité du réseau neuronal n'est que fonctionnelle et c'est l'ECS qui assure la mise en relation du compartiment pré- et post-synaptique. L'ISF étant au contact direct des neurones, des vaisseaux et des cellules gliales, l'ECS est donc à la fois un intermédiaire dans la transmission synaptique, une interface dans la communication neuro-glio-vasculaire, mais il intervient aussi en réalité dans toutes les signalisations intercellulaires (mises à part celles qui ont lieu via des jonctions *gap*), dans l'approvisionnement des cellules en substrats énergétiques et dans l'élimination de leurs métabolites. De par ces rôles aussi pléiotropiques qu'essentiels à tous les processus biologiques cérébraux, la physiologie de l'ECS est au cœur du fonctionnement cérébral et donne toute son importance à l'étude de ce compartiment.

II. ECS et diffusion

a) Diffusion moléculaire dans l'ECS

i. Diffusion microscopique

À l'échelle microscopique, la diffusion d'une molécule dans l'ECS est le résultat de ses mouvements aléatoires/browniens (*random walks*) qui consistent en une succession continue de collisions avec les molécules d'eau avoisinantes et avec les obstacles qu'elle rencontre tels que les membranes cellulaires, les constituants de la MEC ou les autres molécules circulantes du liquide interstitiel (Syková et Nicholson 2008). A chaque temps t on peut décrire selon un axe x , la distribution du nuage de particules par l'équation d'une gaussienne :

$$G_t(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_x^2}} e^{-\frac{x^2}{2\sigma_x^2}}$$

Avec $\sigma_x^2 = 2Dt$, où σ_x (l'écart-type) représente l'étalement de la gaussienne, t le temps et D le coefficient de diffusion de la particule. On constate que la distance moyenne parcourue par les particules est proportionnelle à \sqrt{t} .

ii. Diffusion macroscopique

À l'échelle macroscopique, ce sont la première et la deuxième loi de Fick qui permettent de décrire le comportement d'un large nombre de molécules qui diffusent. La première loi de Fick prend en compte la dimension spatiale de la diffusion et établit que les molécules diffusent du compartiment le plus concentré au moins concentré selon un flux d'autant plus important que le gradient de concentration est fort. La deuxième loi de Fick intègre la dimension temporelle du processus de diffusion à la première loi et s'appuie sur le principe fondamental de conservation de la masse selon l'équation suivante dans un espace à 1 dimension :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

Où C est la concentration de la molécule d'intérêt et D son coefficient de diffusion libre.

Cette équation correspond à la diffusion de molécules dans le temps et dans un espace unidimensionnel en supposant que la diffusion est libre, c'est-à-dire qu'elle a lieu dans un milieu sans contraintes. Or l'ECS est un espace tridimensionnel contraint, à géométrie complexe et encombré de nombreuses structures cellulaires et protéiques.

Considérons le parenchyme comme une membrane poreuse. On définit l'épaisseur de cette membrane particulière par la distance entre le site d'injection, d'où on délivre des molécules, et la surface corticale par exemple. Les pores de cette membrane correspondent à l'ECS. D'après les lois de Fick, le flux de molécules qui traverse cette membrane par diffusion est proportionnel au coefficient de diffusion de ces molécules, à leur gradient de concentration, au diamètre des pores de la membrane et inversement proportionnel à l'épaisseur de cette membrane (dans le cas où les canaux sont rectilignes et perpendiculaires au plan défini par la surface de cette membrane). Plus l'épaisseur de la membrane est importante et plus le flux moléculaire diminue. Des canaux tortueux augmentent la distance à parcourir pour traverser la membrane. Donc une membrane d'épaisseur E avec des canaux tortueux correspond à une membrane d'épaisseur E' avec des canaux rectilignes où $E' > E$; c'est le paramètre que nous appellerons par la suite tortuosité. D'après l'analogie ci-dessus, la perméabilité du parenchyme dépend du diamètre de ses pores, donc des canaux de l'ECS, de son épaisseur totale, et de la trajectoire de ses canaux. En somme, moins la membrane est épaisse et ses canaux rectilignes, et plus le flux de particules sera augmenté. On constate qu'il y a donc un certain nombre de paramètres supplémentaires à intégrer dans l'équation précédente.

iii. Équation de la diffusion appliquée dans l'ECS

L'équation de la diffusion a donc été modifiée pour prendre en compte la complexité de cet espace dans ses dimensions physiques (complexité géométrique et dimensions spatiales) et fonctionnelles (existence de flux convectifs, viscosité, clairance systémique et *uptake* cellulaires des molécules) (Tønnesen, Hrabětová, et Soria 2023b). Ces équations intègrent la notion de tortuosité de l'espace, caractérisée par λ , qui correspond à la gêne au déplacement moléculaire, et le volume de cet espace caractérisé par α .

Les équations suivantes sont applicables dans le cas où la source peut être assimilée à une source ponctuelle.

Équation de la diffusion modifiée pour l'ECS (Charles Nicholson et Hrabětová 2017) :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \underbrace{\frac{D}{\lambda^2} \nabla^2 C}_{(a)} + \underbrace{\frac{Q}{\alpha}}_{(b)} - \underbrace{v \cdot \nabla C}_{(c)} - \underbrace{\frac{f(C)}{\alpha} - k' C}_{(d)}$$

Où C est la concentration de la molécule dans l'ISF qui dépend du temps et de sa position dans l'espace (x,y,z) en coordonnées cartésiennes. ∇ et ∇^2 sont les dérivées spatiales de premier et second ordre dans le même espace. (a) Le coefficient de diffusion libre D est modulé par le facteur $1/\lambda^2$ qui prend en compte la tortuosité de l'ECS. (b) est le terme qui prend en compte la source ponctuelle Q de molécules, qui diffusent dans le volume d'ECS qui leur est accessible et qui est caractérisé par α . Le terme (c) représente la composante du *bulk flow* qui peut influencer sur le mouvement des molécules et dépend de la vitesse du flux v. La fonction f(C) représente les différentes cinétiques de liaisons possibles des molécules à la matrice, aux récepteurs et aux transporteurs présents dans le volume α d'ECS accessible. Par abus de langage, j'emploierai indifféremment dans la suite de ce manuscrit les termes α , fraction volumique et volume de l'ECS pour faire référence à l'espace extracellulaire du parenchyme accessible à la diffusion moléculaire. Enfin, le terme (d) correspond à la composante de la clairance de la molécule hors de l'ECS (élimination systémique et *uptake* cellulaire). Grâce au terme (a), on définit pour une molécule donnée son coefficient de diffusion apparent dans l'ECS, D^* , par l'équation $\lambda = \sqrt{\frac{D}{D^*}}$. Si on considère une molécule inerte (f(C)=0) qui est relarguée dans le milieu de façon quasi instantanée, qui n'est pas éliminée de l'ECS pendant la période d'étude (k'=0), et que l'on admet que le bulk flow est négligeable dans la région analysée (v=0), les termes (c), (d) et f(C) sont négligés et l'équation est ramenée à :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D^* \nabla^2 C + \frac{Q}{\alpha}$$

(Charles Nicholson, Kamali-Zare, et Tao 2011b)

Les expériences de mesure de la diffusion sont essentiellement réalisées avec des solutés qui remplissent ces conditions.

iv. Place de la diffusion dans la physiologie cérébrale

La diffusion libre d'une molécule dans un espace sans obstacles ne dépend que de sa taille, son poids, sa charge et sa forme. Si on décompose ce transport passif de molécules, il est multidirectionnel au niveau unitaire et chaque molécule se déplace selon un mouvement brownien aléatoire. Les flux nets par diffusion sont lents et sont d'autant plus ralentis que la taille moléculaire est importante et la température basse. Dans un environnement contraint, la diffusion dépend à la fois des caractéristiques structurales et biochimiques de la molécule mais également de celles du milieu dans lequel elle diffuse. Cela est d'autant plus important à prendre en compte quand on mesure l'étendue de la gamme de tailles, de charges et de formes des molécules qui circulent dans l'ECS. Les molécules qui diffusent sont les molécules solubles comme les ions, les sucres, les peptides, le cholestérol, les neurotransmetteurs et messagers hormonaux, mais également certaines macromolécules exogènes comme des dextrans ou des médicaments. Les molécules non solubles peuvent également diffuser par l'intermédiaire de protéines de transport comme l'albumine et les lipoprotéines auxquelles elles se lient. Pour un même gradient de concentration et une même composition de l'ECS, on peut intuitivement dire que de petites molécules comme des ions et des neurotransmetteurs vont diffuser rapidement et que de plus grosses molécules comme des polypeptides et des macromolécules vont être retardées. Nous verrons par la suite que plus une molécule est volumineuse et plus son D^* s'écarte de son D , c'est-à-dire que la tortuosité de l'ECS augmente avec la taille de la molécule qui diffuse.

c) Historique et techniques d'exploration de l'ECS

Depuis le milieu du XXe siècle, les scientifiques ont commencé à s'intéresser non plus uniquement aux cellules qui composaient le SNC, mais à l'espace qui pouvait exister entre elles. La première description de l'architecture de l'espace extracellulaire s'approchant le plus de la réalité biologique a été donnée en 1964 par des neuroscientifiques d'Harvard qui ont assimilé cette structure à une mousse dans laquelle la phase aqueuse représenterait l'ECS et les bulles de gaz les cellules (Kuffler et Potter 1964). En raison

des dimensions subcellulaires de ce compartiment de l'ordre de la dizaine de nanomètres, les premières études ont été confrontées à de nombreuses limitations techniques de la microscopie existant à l'époque. On peut classer les techniques d'exploration de l'ECS en deux grandes catégories : les approches directes structurales par microscopie *ex vivo* et *in vivo*, et les approches indirectes, biophysiques *in vivo* et par modélisation *in silico*.

Je détaillerai dans les paragraphes suivants les avantages et inconvénients de ces différentes techniques, qui seront résumés dans la Figure 7 également.

i. Microscopie électronique et étude statique de l'ultrastructure de l'ECS *ex vivo*.

L'avènement de la microscopie électronique dans les années 40 va permettre de décrypter les premières ultrastructures protéiques et cellulaires. En moins de 20 ans, la communauté scientifique obtient une description ultrastructurale complète de l'ensemble des constituants de la cellule, de ses compartiments, organites, noyau et chromosomes en 2D (Harris 2015). Il faudra attendre la fin des années 60 pour voir apparaître les premières reconstructions 3D et les années 80 pour gagner encore en résolution avec la cryo-microscopie électronique. La première visualisation de l'ECS découle de l'avènement de cette microscopie électronique, mais amène les chercheurs à des conclusions erronées sur ce compartiment.

En effet, on considère à cette époque l'ECS comme presque inexistant. La première étude qui s'intéresse aux relations interneuronales et à l'environnement immédiat du neurone (Wyckoff et Young 1956) détermine que l'espace qui n'est pas occupé par les neurones est intégralement occupé par les cellules gliales et qu'il n'y a pas d'espace « vide » entre eux. Quelques années plus tard, d'autres travaux font apparaître un fin liseré clair aux électrons entre les membranes cellulaires et mettent ainsi en évidence la présence d'espaces intercellulaires qui séparent les membranes gliales et neuronales d'une dizaine de nanomètres (Villegas et Fernández 1966). Rapidement cependant, les chercheurs soulèvent la question de la préparation de l'échantillon qui pourrait altérer certaines caractéristiques structurales de cet espace. Les travaux de Vanharreveld pointent notamment les phénomènes de gonflement cellulaires, suite à l'anoxie induite par le sacrifice de l'animal, comme pouvant être responsables de la « disparition » de l'ECS dans certaines préparations. La déshydratation de l'échantillon qui accompagne la congélation,

la mise en paraffine ou encore la fixation, contribuent également à réduire « artificiellement » les compartiments liquidiens comme l'ECS. En effet, dans le but initial de préserver la structure et l'apparence des tissus proches de celles *in vivo*, les échantillons sont figés par une perfusion de fixateurs comme les aldéhydes. Mais cette fixation introduit de nombreux artéfacts, car la prise d'effet des fixateurs intervient trop tardivement par rapport aux flux d'eau engendrés par les phénomènes d'osmose post-anoxie et d'arrêt des échanges ioniques. Pour pallier ce problème et préserver la distribution des volumes d'eau dans le tissu, de Vanharreveld et collègues proposent notamment la congélation rapide de l'échantillon après l'arrêt cardio-respiratoire (Vanharreveld, Crowell, et Malhotra 1965). Néanmoins, cette technique ne permet de fixer et de préserver que les structures très superficielles du cerveau (Fig. 6A) (Tønnesen, Hrabětová, et Soria 2023b).

Il a clairement été démontré depuis que les protocoles de préparation des tissus tels que la cryofixation ou la fixation chimique introduisent effectivement d'importants artéfacts structuraux et réduisent dans une certaine mesure le volume de l'ECS (Fig. 6A). La cryofixation permet effectivement de se rapprocher des conditions physiologiques et a permis d'estimer le volume de l'ECS à 15 % du volume total du cerveau (Fig.7) (Korogod, Petersen, et Knott 2015). Cette même étude de 2015 s'est penchée sur la différence d'effet entre la cryofixation des échantillons et la fixation chimique par perfusion d'aldéhyde sur les différents éléments tissulaire. Korogod et al. ont établi que la fixation chimique réduisait substantiellement (de 5 à 10 %) les compartiments neuronaux et gliaux par rapport à la cryofixation, mais que l'effet majeur concernait l'espace extracellulaire et le réduisait à seulement quelques pourcents du volume tissulaire (Korogod, Petersen, et Knott 2015). Très récemment, l'équipe de Lichtman a mis au point un protocole de fixation permettant de préserver le volume de l'ECS (préalablement suggéré par la perfusion avec le sucrose de (Cragg 1980)) en dissociant le gonflement cellulaire du processus de fixation. Pour cela ils remplacent le fluide extracellulaire par un milieu hyperosmotique contenant du mannitol, qui ne rentre pas dans les cellules ni ne traverse la BHE. Ils induisent néanmoins brièvement un choc hyperosmotique avec une forte concentration pour ouvrir la BHE et permettre au mannitol d'entrer dans l'ECS puis rajoutent un fixatif toujours avec un peu de mannitol (Fig. 6A) (Lu et al. 2023). L'ensemble des techniques mises en œuvre pour réduire ces biais

ont permis d'estimer avec la microscopie électronique que le volume de l'ECS occupe en moyenne 15 à 20 % du volume total du cerveau.

ii. Approches biophysiques : l'étude des mouvements moléculaires dans l'ECS permet d'explorer sa structure

La distribution d'une molécule dans un tissu dépend de sa production, de sa diffusion, de son advection dans les fluides circulants, de son élimination systémique, de son absorption cellulaire ou encore de sa liaison à des récepteurs circulants ou membranaires. Si on exclut les phénomènes qui contribuent à la clairance de la molécule, c'est essentiellement la diffusion qui détermine sa distribution dans l'ECS cérébral. Aussi de nombreux chercheurs ont-ils utilisé les propriétés de diffusion de différents traceurs moléculaires dans l'ECS pour explorer de manière indirecte sa structure (distribution dans l'espace) et sa dynamique (distribution dans le temps). Les traceurs utilisés dans les différentes techniques que nous allons détailler, sont systématiquement des molécules inertes chimiquement, qui restent dans le compartiment dans lequel elles sont injectées, qui ne peuvent traverser les membranes, qui sont peu éliminées ou recaptées par les cellules, et qui sont détectables de façon quantitative. Les molécules doivent être suffisamment petites pour explorer différentes régions de l'ECS, mais sans l'être trop pour pouvoir rester suffisamment longtemps dans l'ECS pour être détectables. Elles ne doivent pas être toxiques ni affecter l'osmolarité de l'ECS. Il faut également bien prendre en compte la charge de la molécule étudiée. Étant donné que la MEC est chargée négativement, une molécule chargée pourrait avoir un comportement différent dans l'ECS en fonction de sa charge positive ou négative et conduire à des erreurs d'interprétation. Elles doivent bénéficier d'une bonne sensibilité et sélectivité de détection.

- La iontophorèse et l'étude de la diffusion d'ions

La iontophorèse en temps réel (RTI) est la technique standard de choix pour étudier les propriétés de l'ECS. Elle consiste à injecter localement dans le parenchyme, par un microcapillaire en verre, une solution contenant un ion inerte, c'est-à-dire non transporté au niveau des membranes, le tétra-méthyl-ammonium (TMA^+), et à enregistrer à une distance prédéfinie de la source la quantité de TMA^+ détectable en fonction du temps, à l'aide d'une microélectrode qui détecte spécifiquement l'ion

(Fig. 6B). La RTI permet d'extraire deux paramètres de l'ECS : sa fraction volumique α et sa tortuosité λ . Cette technique est applicable *in vivo* aussi bien sur des coupes de cerveau que dans le parenchyme cérébral *in situ*. Elle a une bonne résolution temporelle, qui permet de réaliser plusieurs mesures successives sur un même échantillon, et elle est hautement reproductible. En revanche, la distance entre les deux électrodes n'excédant pas la centaine de μm (environ $150 \mu\text{m}$), sa résolution spatiale est très faible (Fig. 7). Les mesures de α et λ obtenues sont donc des valeurs très locales, qui peuvent correspondre à des valeurs moyennes dans un tissu homogène, mais qui ne sont pas extrapolables quand il s'agit d'un tissu fortement anisotrope comme l'hippocampe. Cette technique ne permet pas non plus de visualiser l'ECS et utilise une gamme très restreinte de molécules, de petite taille (d_h TMA $\sim 0,5 \text{ nm}$ (Hrabe et Hrabetova 2019) et chargées, qui n'est représentative ni des espèces biochimiques ni des tailles moléculaires qui circulent physiologiquement dans l'ECS.

- L'Imagerie optique intégrative ou *integrative optical imaging* (IOI)

L'IOI repose sur l'utilisation de macromolécules fluorescentes, qui sont injectées dans le tissu et imagées par une caméra à haute résolution couplée à un microscope à épifluorescence, dont l'objectif est immergé dans la solution d'incubation. La distribution de la macromolécule couplée à un fluorophore, comme la fluorescéine ou le Texas Red[®] par exemple, est évaluée dans le parenchyme à différents temps pendant une courte période de l'ordre de quelques dizaines de millisecondes à quelques secondes (Fig. 6C). Le volume injecté est de l'ordre du nL, ce qui permet d'assimiler le volume injecté à une source ponctuelle comme dans la RTI et d'appliquer le même type d'équations (C. Nicholson et Tao 1993). Dans cette technique ce n'est plus la concentration d'une molécule qui est directement enregistrée, mais un signal fluorescent associé. Le suivi de la distribution spatiale et temporelle de l'intensité de ce signal permet d'extraire les paramètres α et λ de l'ECS. Si la fraction volumique reste invariable en fonction de la molécule utilisée, l'utilisation d'une grande variété de molécules avec l'IOI permet de montrer que la tortuosité λ était fortement dépendante de la taille des molécules qui diffusent dans l'ECS. Cette technique est très résolutive par bien des aspects, mais présente comme inconvénients majeurs, d'avoir une faible résolution spatiale à l'instar de la RTI et de n'évaluer que la première

centaine de microns d'ECS sous la surface de la coupe ou du cerveau, ce qui limite considérablement les régions atteignables chez l'animal *in vivo* (Fig.7).

- L'Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'utilisation de l'IRM en recherche clinique et expérimentale repose sur la propriété intrinsèque des molécules d'eau à entrer en résonance sous l'influence d'un champ magnétique. Cette signature magnétique des protons de l'eau permet de visualiser les différents compartiments liquidiens d'un tissu et délimitations physiques. Ainsi, la première utilisation possible de l'IRM pour étudier l'ECS consiste de façon non invasive à enregistrer le coefficient de diffusion apparent des molécules d'eau du tissu, ADC, avec des séquences pondérées en diffusion (Fig. 6D.a). L'inconvénient majeur de cette approche : la difficulté à isoler la contribution de l'eau extracellulaire par rapport à l'intracellulaire dans le signal récupéré. Pour cibler et étudier plus spécifiquement le compartiment ECS, l'expérimentateur a recours à l'injection d'agents de contraste dans le parenchyme. L'agent de contraste diffuse dans l'ECS et augmente le temps de relaxation des protons des molécules d'eau à proximité. La différence de contraste entre l'acquisition pré- et post-injection est mesurée en fonction du temps et permet un suivi dynamique des concentrations locales d'agent de contraste (Fig. 6D.b). Ces distributions permettent d'extraire le coefficient de diffusion de l'agent injecté et la tortuosité de l'ECS correspondante. L'avantage majeur de l'IRM repose sur la largeur des champs étudiés, mais avec une relativement faible résolution spatiale et temporelle et des temps d'acquisition particulièrement longs. Une autre technique d'IRM permettant d'accéder à certaines propriétés de l'ECS est l'IRM du sodium. Des chercheurs sont capables de déterminer précisément chez l'homme les faibles concentrations intracellulaires de Na^+ , tout en connaissant le volume total occupé par le Na^+ et ainsi d'en déduire le volume de l'ECS (Madelin et al. 2014). Cette méthode a l'avantage d'être non invasive, mais elle ne permet de mesurer que le volume de l'ECS et surtout, elle a une faible sensibilité (10 % de celle obtenue avec IRM classique). En effet, le rapport signal sur bruit du Na^+ est bas, du fait de ses faibles quantités *in vivo*, et ses temps de relaxation sont deux ordres de grandeur plus faibles que ceux des protons. Une IRM 3T convient pour la détermination des concentrations de Na^+ dans un cerveau humain, mais il faut un champ magnétique près de 5 fois plus important pour que ces concentrations soient détectables chez la souris (Zaric et al.

2021). Actuellement l'intérêt de l'IRM du sodium pour l'étude de l'ECS est limité chez le petit animal en recherche expérimentale. Cette technique apparaît toutefois comme très prometteuse en recherche clinique, pour déterminer quelques caractéristiques de l'ECS *in vivo* et de manière non invasive chez l'homme.

iii. L'étude *in silico* par modélisation de cet espace et de ses mouvements moléculaires

- Intérêts de la modélisation

Parmi les multiples intérêts de la modélisation, on peut citer son intérêt prédictif, pour faciliter la formulation d'hypothèses avant une validation expérimentale. La modélisation peut également combler les défauts techniques des approches expérimentales et tenter d'expliquer certains résultats en testant différents modèles hypothétiques qui permettraient de retrouver le résultat expérimental. La modélisation permet de tester l'implication de différents paramètres biologiques dans les mesures réalisées. En ce qui concerne l'ECS et le mouvement des solutés interstitiels, les modélisations mathématique et informatique ont permis d'établir un certain nombre de paramètres qui influent sur la diffusion à différentes échelles (Tønnesen, Hrabětová, et Soria 2023b).

- Modélisation de l'ECS et simulation de la diffusion

Les modèles utilisés intègrent les dimensions spatiales et la géométrie complexe de l'ECS, les flux, les mécanismes d'absorption cellulaires, qui sont souvent difficilement identifiables expérimentalement, mais également des tailles et des formes définies de molécules. C'est grâce à la définition de tous ces paramètres d'entrée que l'on peut tenter de décomposer les différents facteurs impliqués dans la tortuosité de l'ECS. La construction de ces modèles peut être basée sur des images de microscopie à partir desquelles est reconstruit du neuropil en 3D (Holter et al. 2017; Kinney et al. 2013).

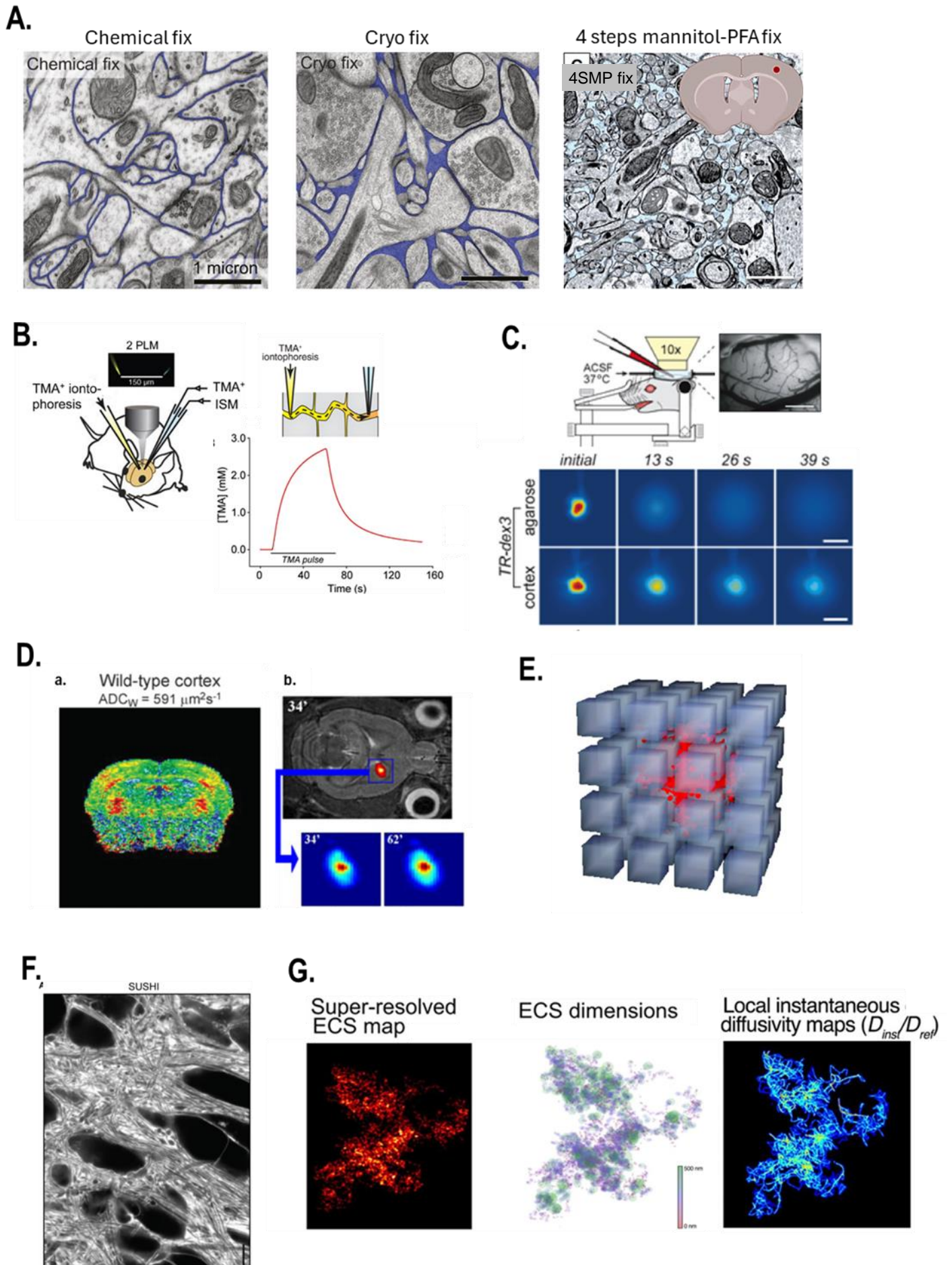


Figure 6. Techniques biophysiques, *in silico* et ultrastructurales d'exploration de l'ECS

Légende Fig.6. A. Images de microscopie électronique en fonction de différents protocoles de fixation. De gauche à droite : fixation chimique, cryofixation (Korogod, Petersen, et Knott 2015) et perfusion-fixation en 4 étapes avec ajout de mannitol (Lu et al. 2023). **B.** Iontophorèse. **C.** *Integrative optical imaging* avec description des tâches de fluorescence, barre d'échelle 200 μm (Thorne et Nicholson 2006) **D.** (a) IRM pondérée en diffusion où la *heatmap* du cortex représente le coefficient de diffusion de l'eau en fonction des régions. (Eva Syková, Vorisek, et al. 2005). (b) Détermination de la diffusion d'un agent de contraste injecté en intraparenchymal (Marty et al. 2013). **E.** Simulation Monte-Carlo dans une construction 3D de cellules cubiques faiblement espacées pour représenter l'ECS. Les particules rouges représentent les molécules libérées au centre de la structure, qui se dispersent et explorent la structure en réalisant des mouvements aléatoires successifs (Eva Syková et Nicholson 2008a). **F.** Image du neuropil d'un hippocampe de souris obtenu par la technique SUSHI. L'ECS apparait en blanc et les zones noires correspondent aux corps cellulaires. (Tønnesen, Inavalli, et Nägerl 2018). **G.** Étapes de l'analyse du tracking de nanotubes en carbone dans une coupe de cerveau de rat, qui permettent d'extraire les dimensions de l'ECS et une carte qui représente la vitesse de diffusion instantanée des nanotubes dans l'ECS. (Paviolo et al. 2020)

Une autre méthode, considérablement simplifiée pour représenter le parenchyme cérébral consiste à considérer toutes les cellules de tailles et de formes identiques. En modélisant les cellules par des formes géométriques simples on peut construire en 3D un environnement simplifié qui s'apparente au parenchyme. Un tel ensemble 3D est basé sur la répétition d'un motif, à savoir une structure cellulaire basique entourée d'une couche d'ISF, répétée à intervalle régulier dans les 3 dimensions de l'espace (Charles Nicholson, Kamali-Zare, et Tao 2011a). La simulation consiste ensuite à délivrer in silico un nombre fini de molécules à une certaine coordonnée du modèle et à les laisser exécuter une succession de mouvements aléatoires (Fig.6E). Pour cela on emploie l'algorithme de Monte-Carlo qui permet de simuler des procédés aléatoires comme le mouvement brownien et qui renvoie une distribution de probabilité de positions (Charles Nicholson et Kamali-Zare 2020).

- Mise en évidence des composantes de la tortuosité de l'ECS

Des simulations sur des constructions à géométrie simple ont permis de déterminer la part de la composante géométrique dans les déterminants de la tortuosité de l'ECS et d'établir une relation simple entre la tortuosité et la fraction volumique de l'ECS :

$$\lambda = \sqrt{\frac{3 - \alpha}{2}}$$

Or, étant donné que $0 < \alpha < 1$, la valeur de tortuosité que l'on trouve est systématiquement inférieure à 1,225, ce qui est bien en dessous des valeurs expérimentales en moyenne supérieures ou égales à 1,6 – 1,8. Cette différence souligne la limite des modèles géométriques simples pour représenter l'ECS. Jin et al ont montré, à partir d'un modèle basé sur des cubes complexes avec des angles modifiés amputés

d'un petit volume cubique qui corroborait des données expérimentales de diffusion obtenues par FRAP, que les contraintes géométriques de l'ECS sont en partie responsables de la diffusion ralentie des solutés et macromolécules dans l'ECS, donc de la tortuosité systématique $> 1,225$ retrouvée, mais qu'elles n'en sont pas les seuls déterminants pour autant (S. Jin, Zador, et Verkman 2008).

Le logiciel open source MCell (<https://mcell.org/index.html>) a justement été conçu pour simuler la microphysiologie cellulaire et étudier la diffusion de molécules dans les compartiments cellulaires et extracellulaires (initialement programmé pour évaluer la diffusion de neurotransmetteurs au niveau d'une synapse de la jonction neuromusculaire). Il permet d'intégrer les différentes composantes du problème, à savoir la géométrie complexe de l'ECS et les cinétiques des nombreuses interactions et réactions possibles, avec des centaines de surfaces différentes et de fixer des conditions limites. Le logiciel permet ainsi de générer un modèle 3D qui prend en compte la fraction volumique, la taille cellulaire, la géométrie de l'espace intercellulaire, l'existence de cavités et leurs dimensions et la taille moléculaire des particules ou molécules diffusibles.

Grâce à MCell, des chercheurs ont pu modéliser des géométries locales ponctuelles qui s'écartent du motif basique et qui introduisent des « espaces morts » dans le volume 3D. Ces espaces morts constituent des microdomaines de l'ECS dans lesquels les molécules peuvent être retardées et qui contribuent à augmenter la tortuosité de l'ECS. Ils pourraient prendre la forme de dilatations locales de l'ECS ou de culs-de-sac interstitiels entre un processus neuronal et une enveloppe gliale (Charles Nicholson et Hrabětová 2017). La modélisation a également été utilisée pour confirmer la place de la diffusion comme mécanisme de transport principal des solutés au sein de l'ECS par rapport aux mécanismes de convection possibles de l'ISF sous l'influence des flux périvasculaires (B.-J. Jin, Smith, et Verkman 2016) et pour démontrer que cela s'appliquait aussi bien aux petites particules qu'aux macromolécules (Holter et al. 2017).

iv. Des techniques récentes de pointe permettent d'analyser les caractéristiques ultrastructurales et la dynamique de l'ECS, de façon directe et *in vivo*

- La microscopie biphotonique

La microscopie biphotonique bénéficie d'une grande résolution dans l'axe z par rapport à la microscopie plein champ et d'une plus grande résolution en (x,y) grâce au sectionnement optique des coupes. Elle permet de suivre *in vivo* le mouvement de molécules fluorescentes dans l'ECS, mais également de suivre les solutés fluorescents qui y pénètrent et ceux qui en sortent (Fig.7). Malgré ces avantages la microscopie biphotonique ne donne pas d'informations sur la structure et la géométrie de l'ECS. La résolution optique du biphoton ne descend pas en deçà de 400 nm dans le plan (x,y) et n'est donc toujours pas suffisante pour détailler l'ensemble des prolongements cytoplasmiques dans le volume imagé. Cette technique est plus couramment employée pour imager les flux dans les espaces périvasculaires plutôt que directement dans l'ECS.

- La microscopie à superrésolution : SUSHI

C'est avec les dernières techniques de pointe en microscopie que la résolution suffisante pour imager le détail de l'ECS a été atteinte grâce à la microscopie à superrésolution. Une possibilité pour atteindre cette superrésolution est d'utiliser la microscopie à déplétion par émission stimulée ou STED (*stimulated emission depletion*) dont la mise au point a valu le prix Nobel de Chimie à Stephen Hell en 2014. Elle consiste à balayer un échantillon avec un double faisceau de lasers. Pour chaque champ, le premier laser va stimuler des fluorophores sur une certaine surface puis le deuxième laser va dépléter le signal excédentaire qui « floute » l'image en désactivant de façon sélective les fluorophores à la périphérie du point focal au centre du champ. De cette manière la microscopie STED s'affranchit de la diffraction de la lumière et permet d'obtenir une résolution de 50 nm dans le plan (x,y) et 150 nm dans l'axe z. Grâce à la microscopie STED, l'équipe de Valentin Nägerl a mis au moins un protocole appelé SUSHI qui fait ressortir en négatif l'ensemble des structures cellulaires du neuropile en injectant un fluorophore non perméant aux membranes, l'ATTO514, dans l'ISF (Fig. 6F), et permet ainsi de caractériser la structure et la géométrie de l'ECS, *in vivo* et à une résolution encore jamais atteinte en microscopie optique (Fig.7)

(Tønnesen, Inavalli, et Nägerl 2018). Cette technique ne donne en revanche aucune information sur la dynamique de l'ECS et de ses mouvements moléculaires ; c'est une analyse statique.

- Tracking unitaire de nanotubes en carbone dans l'ECS

Une autre technique impliquant la microscopie à super-résolution est le tracking de nanotubes en carbone fluorescent, qui permet d'obtenir simultanément des données de diffusion et les dimensions et caractéristiques de l'ECS. Des nanotubes en carbone (SWCNT), de diamètre de l'ordre du nm, émettant dans l'infrarouge proche (NIR) sont injectés dans le parenchyme ou dans les ventricules et visualisés sur coupes *in vitro* (Fig. 6G). Les nanotubes ont un très faible diamètre, ce qui leur permet d'accéder à l'ECS et d'en explorer une grande fraction. Cependant, en fonction de leur longueur et de leur rigidité, leur accès à certains petits espaces peut aussi s'en trouver restreint. Avec cette méthode, chaque particule peut être suivie individuellement. L'enregistrement de la dynamique en temps réel des nanotubes permet d'obtenir des cartes de viscosité et des cartes de diffusion instantanée locales (Fig. 6G) et ainsi de décrypter comment ces molécules se déplacent dans les interstices nanoscopiques de l'ECS (Paviolo et al. 2020; Godin et al. 2017). Très récemment des chercheurs de la même équipe ont utilisé cette technique en remplaçant les nanotubes par des nanoparticules de type *quantum dots* (QD) de 22 nm de diamètre (Grassi et al. 2023). Ces QD sont des nanocristaux dotés d'une fluorescence très intense. De par leur forme globulaire ils se déplacent différemment des nanotubes et explorent potentiellement d'autres espaces non accessibles aux SWCNT. Ces QD à une échelle ultrastructurale sont gros, car pour pouvoir suivre les mouvements unitaires de ces nanoparticules leur diffusion dans l'ECS ne doit pas être trop rapide. Le principal désavantage de cette technique, liée à l'observation de mouvements unitaires dans un espace très contraint, réside dans son champ d'étude très restreint (Fig. 7).

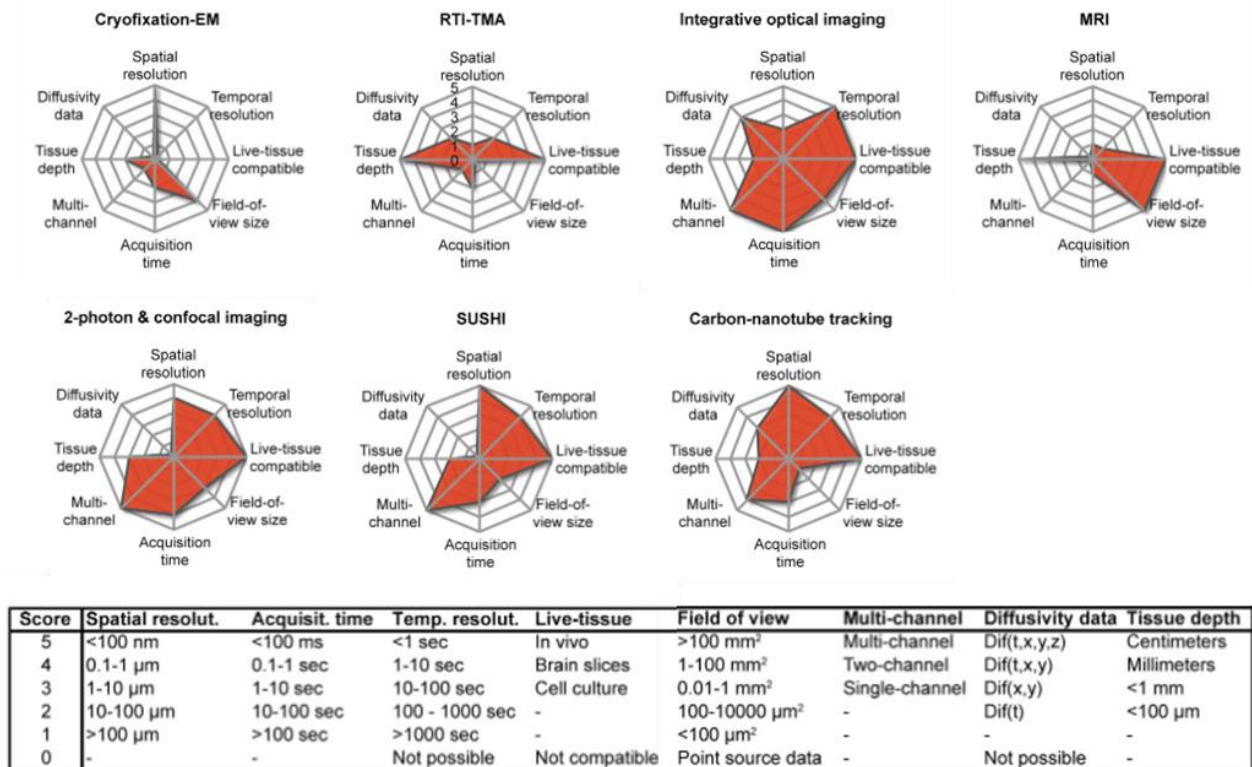


Figure 7. Avantages et inconvénients de quelques techniques d'exploration de l'ECS

Haut (de gauche à droite) : la microscopie électronique après cryofixation ; l'iontophorèse en temps réel avec l'ion TMA⁺, l'imagerie optique intégrative (IOI) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Bas (de gauche à droite) : Imagerie confocale et bi-photonique; l'imagerie super-résolutive à contraste inversé et le tracking de nanotubes de carbone. Adapté de (Soria, Miguelez, et al. 2020a).

v. Autres techniques

Je me suis focalisée sur les techniques les mieux décrites et les plus couramment utilisées et citées dans la littérature pour explorer l'ultrastructure et les propriétés dynamiques de l'ECS. Il convient de citer ici quelques variantes des techniques précédemment décrites. Les premières études sur la diffusion de molécules dans l'ECS ont été réalisées avec des radiotraceurs. Dans la RTI, au lieu d'une stimulation électrique pour délivrer la solution dans le milieu, on peut injecter la molécule d'intérêt sous pression (RTP). Une technique proche de l'IOI permet de s'affranchir de l'injection d'agent en se basant uniquement sur les propriétés de réfraction du tissu, mais elle est très peu résolutive. La technique de FRAP, ou récupération de la fluorescence après photoblanchiment, est basée sur la diffusion des fluorophores et permet d'obtenir des coefficients de diffusion de l'ECS lors du repeuplement de la zone blanchie par les fluorophores de la périphérie. Enfin, une dernière technique récente consiste à imager l'anisotropie de fluorescence de molécules fluorescentes injectées dans le milieu avec à la fois une grande résolution spatiale et une forte résolution temporelle. Cette technique permet de récupérer des

données de diffusion de l'ECS de façon très résolutive dans les 4 dimensions. Bien que cette technique ait un score supérieur à 3 dans tous les paramètres de détection listés en Figure 7 (Soria, Miguelez, et al. 2020a), elle n'a été utilisée pour l'instant qu'une seule fois, pour évaluer la tortuosité de la fente synaptique et les propriétés de diffusion dans les compartiments pré- et postsynaptiques (Zheng et al. 2017).

d) Caractéristiques structurales et dynamiques de l'ECS

i. L'ECS est un compartiment très hétérogène dans sa taille et sa géométrie

Grâce aux différentes techniques détaillées dans la partie précédente, l'ultrastructure de l'ECS est décryptée de plus en plus précisément avec une avancée majeure sur les cinq dernières années. Les paramètres les plus couramment utilisés pour décrire ce milieu réticulaire sont la largeur de ses espaces, sa fraction volumique α , et sa tortuosité λ .

- Géométrie des espaces interstitiels

L'aspect très fin et homogène de l'ECS sur les premières images de microscopie électronique a rapidement évolué vers une vue d'ensemble beaucoup plus hétérogène de cet espace et dont la taille n'était plus négligeable. La technique SUSHI a mis en évidence un compartiment à la fois très dense et compact et, par endroit, lacunaire et relâché notamment à proximité des corps cellulaires ou en péri-synaptique (Tønnesen, Hrabětová, et Soria 2023b). Ces observations ont été faites dans l'hippocampe et dans les noyaux de la substance noire. L'étude de Nicholson et Hrabětová suggère que ces microdomaines existent à travers tout le parenchyme (Charles Nicholson et Hrabětová 2017) et que ces observations sont donc très probablement transposables à d'autres régions cérébrales comme le cortex, par exemple. La géométrie de l'ECS est donc très difficilement modélisable, mais peut être vue comme une succession non répétée de tunnels/canaux interstitiels, d'impasses, de structures lamellaires, de petits réservoirs liquidiens et de lacs de rétention.

En 2006, Thorne et Nicholson montrent par IOI que des quantum dots de 35 nm de diamètre sont capables de diffuser dans le parenchyme cortical et en concluent que la majorité des canaux de l'ECS

font au moins 40 nm de large (Thorne et Nicholson 2006). Cette valeur a été largement réévaluée depuis et on estime à ce jour la largeur de ce compartiment réticulaire comme pouvant aller de 25 nm, fente synaptique, (Soria, Miguelez, et al. 2020a) à 500 nm et parfois jusqu'au μm de large (Tønnesen, Inavalli, et Nägerl 2018). La moitié des espaces interstitiels ont une largeur comprise entre 50 et 220 nm en moyenne (Paviolo et al. 2020).

- La fraction volumique α

La fraction α est une caractéristique intrinsèque de l'ECS qui correspond au volume occupé par l'ECS rapporté au volume total du cerveau ($\alpha = \frac{V_{ECS}}{V_{cerveau}}$). On sait aujourd'hui, grâce aux déterminations par RTI, SUSHI, SWCNT et *4-step perfusion* MET, que la fraction volumique moyenne occupée par l'ECS dans le cerveau adulte est de 20 %. Cette fraction peut néanmoins varier en fonction de la région cérébrale étudiée et varier au sein d'une même structure fonctionnelle. La technique la plus extensivement utilisée pour déterminer α est la RTI, qui a relevé des valeurs moyennes entre 13 et 25 % dans le cortex de souris, 12 % dans l'hippocampe de rat et jusqu'à 25 % au niveau du cortex chez des individus adultes (Eva Syková et Nicholson 2008a). L'équipe de Nägerl a montré des variations de α entre 5 et 36 % dans la région CA1 de l'hippocampe (Tønnesen, Inavalli, et Nägerl 2018) et une augmentation du volume occupé par l'ECS dans la région CA3 par rapport à la région CA1 (Grassi et al. 2023). En revanche en étudiant le mouvement de particules marquées dans cet environnement, ils ont constaté qu'en dépit d'un ECS plus large, les particules étaient moins mobiles, ce qui suggère une complexité et une tortuosité de l'ECS plus importante dans cette région. α et λ sont deux paramètres qui peuvent donc manifestement varier indépendamment l'un de l'autre contrairement à ce que concluait une modélisation simplifiée de l'ECS (cf Chapitre I, partie II.b)iii.) ce qui montre les limites de la modélisation simple de l'ECS.

- La tortuosité λ

La tortuosité λ représente la gêne au déplacement des molécules et quantifie le degré d'obstruction à la diffusion dans l'ECS par rapport à une diffusion dans un milieu sans contraintes. Comme nous l'avons vu précédemment dans la partie II.a)iii., pour une molécule donnée, $\lambda = \sqrt{\frac{D}{D^*}}$ avec D son coefficient de

diffusion dans un milieu sans contraintes et D^* son coefficient de diffusion dans l'ECS. La tortuosité dépend à la fois de la géométrie de l'ECS, de la viscosité de l'ISF et de la taille des molécules qui diffusent. La tortuosité dépend donc de facteurs intrinsèques à l'ECS, mais elle dépend également de facteurs extrinsèques comme nous le verrons par la suite. Les études par RTI-TMA retrouvent en moyenne une tortuosité de l'ECS comprise entre 1,3 et 1,8 et ce, dans différentes régions avec des structures extrêmement différentes comme le cortex, le corps calleux, l'hippocampe ou le cervelet. Ces valeurs semblent également conservées à travers différentes espèces comme le rat, la souris, l'homme et la tortue (Eva Syková et Nicholson 2008a). En revanche, si on considère des molécules plus volumineuses comme les macromolécules utilisées en IOI, les valeurs de tortuosité peuvent être beaucoup plus élevées et devenir variables en fonction de la région cérébrale. Pour un dextran de 70 kDa, Nicholson et Tao ont trouvé une tortuosité de 2,25 dans le cortex de rat (C. Nicholson et Tao 1993). D'autres études plus récentes utilisant le tracking de nanotubes ont permis de montrer des variations des propriétés de diffusion de l'ECS à l'échelle du bouton synaptique, en mettant en évidence une tortuosité plus élevée au niveau de la fente synaptique qu'en périphérie de celle-ci (Zheng et al. 2017).

ii. La matrice extracellulaire (MEC) de l'ECS du SNC

La matrice extracellulaire fait partie intégrante de l'ECS et est un régulateur de sa taille et de sa tortuosité. Contrairement à la MEC des tissus en périphérie, celle du SNC ne contient presque pas de collagène et est essentiellement composée de longues chaînes d'acide hyaluronique, de protéoglycanes et de molécules d'adhésion. La composition de la MEC du cerveau diffère légèrement au niveau des méninges et des membranes basales périvasculaires par rapport au reste du parenchyme, puisque les molécules d'adhésion comme la fibronectine et la laminine ne sont présentes que dans la MEC de ces régions. Dans le reste de l'ECS, au voisinage des neurones et des astrocytes, c'est la ténascine qu'on retrouve majoritairement (Krishnaswamy et al. 2019). Les protéoglycanes de type chondroïtin-sulfate, qui sont majoritaires dans le cerveau, ou héparane-sulfate sont composés d'un cœur protéique sur lequel sont branchés des glycosaminoglycanes (GAG) de type neurocan, brevican, versican et aggrecan. Ces GAG sont produits par les astrocytes et les neurones et sont hautement sulfatés, ce qui leur confère une

charge fortement négative et une forte capacité d'hydratation (Rasmussen, Mestre, et Nedergaard 2022). L'acide hyaluronique (AH) est produit par les neurones directement dans l'ECS et sa quantité est finement régulée par la présence de hyaluronidases dans le milieu. Les chaînes d'AH peuvent être libres ou ancrées aux membranes cellulaires par des récepteurs comme CD44 ou d'autres molécules d'adhésion. Les PG et l'AH interagissent entre eux et avec les membranes cellulaires pour former un réseau dense et hydraté au sein d'un compartiment tout aussi dense et réticulé ce qui contribue d'autant à la tortuosité de l'ECS. Ces composants et ces enzymes modulatrices sont continuellement renouvelés, ce qui confère une grande dynamique structurale à la MEC (Krishnaswamy et al. 2019). Étant donné son ancrage aux structures cellulaires, la MEC a un rôle essentiel de support structural de l'ECS, car toute modification morphologique cellulaire entraîne par couplage mécanique des répercussions au niveau de la MEC et donc de l'ECS. À l'inverse, des modifications des constituants de la MEC altèrent les propriétés de l'ECS. Par exemple, une diminution de la production d'acide hyaluronique entraîne une réduction de la fraction volumique de l'ECS (Arranz et al. 2014). En plus de ce rôle de support, la MEC a également un rôle dans la signalisation au sein de l'ISF et elle influe sur la viscosité de l'ISF via son degré d'hydratation (Tønnesen, Hrabětová, et Soria 2023b). Une augmentation de la concentration d'acide hyaluronique augmente la viscosité de l'ECS, par exemple (Rasmussen, Mestre, et Nedergaard 2022) et aura donc des répercussions sur la diffusion des molécules.

iii. L'ECS est un compartiment qui présente une forte dynamique

La dynamique de l'ECS résulte de la dynamique des prolongements neuronaux et gliaux en fonction de leur état d'activation, de leur gonflement et de leur plasticité, mais également de la dynamique de la MEC. Ces variations peuvent être de l'ordre de quelques millisecondes ou durer plusieurs heures. L'ensemble de ces processus plastiques peut donc imposer des changements de propriétés à l'ECS à plus ou moins long terme (Tønnesen, Hrabětová, et Soria 2023b).

- Dynamique physiologique

Au cours du développement, l' α de l'ECS passe de 40 % dans le cerveau d'un rat nouveau-né à 21 % au bout de 21 jours postnatal, sans s'accompagner d'un changement de tortuosité, qui reste constante à

1,6 (Charles Nicholson et Hrabětová 2017). Le rythme circadien est également un régulateur des propriétés de l'ECS. Xie et collègues ont observé une dilatation du volume de l'ECS lors de la phase de sommeil par rapport à l'état de veille (23 % versus 14 %) sans modification de sa tortuosité (Lulu Xie et al. 2013). L'activité neuronale s'accompagne de modifications morphologiques des astrocytes et des neurones, qui gonflent et réduisent le volume de l'ECS en conséquence. De la même manière, l'activation sélective par des agonistes β adrénergiques augmente le volume astrocytaire transitoirement, ce qui réduit α de 22 à 18 % (Sherpa et al. 2016). Le vieillissement semble s'accompagner d'une réduction pérenne et significative du volume de l'ECS chez les femelles (- 6 %) et chez les mâles (-4 %) (Eva Syková, Vorísek, et al. 2005).

- Dynamique réactionnelle et pathologique

Au-delà de cette dynamique physiologique de l'ECS, un certain nombre de facteurs environnementaux et de pathologies peuvent modifier les propriétés de l'ECS. À très court terme, un stress osmotique peut provoquer aussi bien une réduction drastique du volume intracellulaire au profit de l'extracellulaire que l'inverse. À moyen terme, l'ischémie provoque un gonflement cellulaire majeur (Rungta et al. 2015) qui réduit le volume de l'ECS à 5 %, diminue la taille de ses canaux et augmente en parallèle sa tortuosité à 2 pour l'ion TMA (Hrabětová, Hrabe, et Nicholson 2003). À l'instar des changements engendrés par l'ischémie, l'absence de certains constituants de la MEC comme la tenascin-R ou l'AH synthase diminuent également de plusieurs pourcents la fraction volumique de l'ECS dans le cortex (Charles Nicholson et Hrabětová 2017). À l'inverse, une intervention comme l'anesthésie favorise l'expansion du compartiment extracellulaire (Lulu Xie et al. 2013). On retrouve des modifications de l'ECS dans un certain nombre de pathologies neurodégénératives. Chez des modèles murins d'Alzheimer et dans des modèles de la maladie de Parkinson, une augmentation de la fraction volumique de l'ECS par rapport à des sujets contrôles a été montré dans le cortex et dans la substance noire respectivement (Eva Syková, Vorísek, et al. 2005; Soria, Paviolo, et al. 2020). Cette augmentation peut s'expliquer en partie par la neurodégénérescence qui est associée à ces deux pathologies. Chez des souris femelles modèles d'Alzheimer, l'augmentation de α s'accompagne d'une augmentation significative de la tortuosité de l'ECS qui pourrait être attribuée aux dépôts d'A β extracellulaires qui entravent d'autant plus la diffusion

que leur concentration augmente dans l'ECS avec la progression de la pathologie (Eva Syková, Vorísek, et al. 2005). À l'inverse, la synucléinopathie associée à la maladie de Parkinson augmente le coefficient de diffusion de nanotubes dans l'ECS de la substance noire, car elle contribue à dégrader l'acide hyaluronique de la MEC, ce qui diminue les obstacles au mouvement des nanotubes et diminue donc la tortuosité de l'ECS (Soria, Paviolo, et al. 2020).

Nous avons pu voir dans cette partie que diffusion et ECS sont étroitement liés et que la diffusion moléculaire dans l'ECS est essentielle à la physiologie cérébrale. Pour ne citer qu'un exemple, la communication intercellulaire emblématique du système nerveux - la transmission synaptique - repose sur la diffusion des neurotransmetteurs dans l'ECS de la fente synaptique. Cette diffusion a également lieu à plus large échelle comme en atteste le fait que ce phénomène soit utilisé extensivement comme moyen d'étude des propriétés de l'ECS. Pour résumer, dans le cerveau la diffusion d'une molécule extracellulaire dépend : de la géométrie de l'ECS, de son α , de sa λ , des gradients électrochimiques existants à proximité des membranes, de la composition biochimique et de la viscosité de l'ISF et de la MEC, et enfin des liaisons possibles qu'elle peut établir avec les récepteurs et les transporteurs présents dans le milieu (Tønnesen, Hrabětová, et Soria 2023b). Progresser dans le cerveau est donc un long chemin semé d'embûches pour une molécule quelle qu'elle soit. C'est également le cas pour des molécules qui doivent atteindre des sites d'élimination, comme les capillaires ou les cellules phagocytaires, distants de leur lieu de production dans l'ECS. Cela est à fortiori vrai quand ces molécules sont des métabolites toxiques ayant des propriétés pro-agrégantes. Ces considérations mettent en avant l'importance physiologique majeure de l'ECS et de la diffusion moléculaire de ce compartiment dans la clairance cérébrale.

III. Compartiments et mécanismes impliqués dans la clairance cérébrale

a) Clairance et élimination des métabolites

i. Définition de la clairance

Conceptuellement, la clairance est la capacité d'un organe ou d'un tissu à éliminer une substance donnée de l'organisme. En physiologie, la clairance d'une molécule se définit par le volume de fluide capable d'être épuré de cette molécule par unité de temps. La clairance correspond donc à la vitesse à laquelle une molécule est éliminée d'un fluide, en mg/min, rapportée à sa concentration dans ce même fluide, en mg/mL (Horde et Gupta 2023). A l'échelle systémique, les organes spécialisés dans cette fonction d'épuration sont le foie et le rein chez les mammifères. Le foie dégrade en grande partie les métabolites du sang et les détoxifie puis, en fin de chaîne, le rein filtre le sang et élimine la fraction toxique et l'excès de métabolites hors de l'organisme. A l'échelle des organes, ce sont les fluides biologiques interstitiels et intracellulaires qui doivent être épurés. La majorité des organes de l'organisme possèdent un réseau vasculaire et lymphatique perméable qui leur permet d'éliminer efficacement leurs métabolites dans la circulation systémique, et qui assure ainsi le drainage des déchets des organes producteurs vers le foie et le rein.

ii. Spécificités et importance biologique de la clairance cérébrale

Concernant le drainage des fluides et des métabolites, le cerveau a une double particularité en ce sens qu'il ne possède pas de réseau lymphatique qui pénètre en profondeur le parenchyme d'une part, et que son réseau vasculaire est essentiellement imperméable du fait de l'existence de la barrière hémato-encéphalique d'autre part. La clairance cérébrale est donc un processus contrarié par rapport à la clairance du reste des organes de l'organisme.

Le cerveau consomme à lui seul 20 % des calories de l'organisme, dont 80 % sont consommées par les neurones, ce qui en fait l'un des organes les plus consommateurs d'énergie avec le foie et les muscles squelettiques. Rapporté à sa masse c'est même le plus grand consommateur d'oxygène et de glucose de l'organisme, et ce de façon globalement constante au cours du temps (Padamsey et Rochefort 2023). En

effet, le cerveau a un métabolisme très important et continu. Il produit donc en permanence des métabolites et des produits de clivage et de dégradations protéiques qui, s'ils s'accumulent dans la cellule ou dans son environnement proche, peuvent rapidement devenir toxiques. La clairance cérébrale désigne donc l'aptitude du cerveau à se débarrasser des substances potentiellement toxiques présentes dans le fluide intracellulaire et dans l'ISF de l'ECS.

Par ailleurs, contrairement à d'autres organes comme le foie, les cellules musculaires ou la peau, les cellules nerveuses ne sont pas renouvelables. La neurogenèse adulte existe dans le cerveau des mammifères de façon très localisée dans la zone sous-ventriculaire et le gyrus denté de l'hippocampe, mais elle est à la fois peu active et, surtout, elle ne permet pas de reconstruire un réseau neuronal complet. Les néo-neurones de la zone sous-ventriculaire s'intègrent au bulbe olfactif chez la souris et ceux de l'hippocampe au gyrus denté en nombre beaucoup plus faible (Ming et Song 2011), mais en aucun cas les chercheurs n'ont pour le moment mis en évidence de néo-neurones qui pourraient s'intégrer au niveau du cortex, par exemple. De plus, si actuellement les progrès de la médecine permettent de greffer cœur, foie, reins ou poumons, le cerveau reste bien évidemment l'organe unique et irremplaçable de l'organisme. Du fait de ces caractéristiques majeures et du caractère permanent de toute potentielle perte neuronale, il est essentiel que les déchets métaboliques soient éliminés efficacement et rapidement. La clairance cérébrale a donc un rôle indispensable dans la physiologie du cerveau pour maintenir un environnement sain autour des neurones et des cellules gliales afin d'assurer leur survie et le maintien de signalisations électriques et chimiques efficaces.

b) Mécanismes de la clairance cérébrale au niveau du parenchyme

La clairance cérébrale a différentes composantes : une composante cellulaire qui permet de dégrader des protéines en intracellulaire et une composante extracellulaire qui fait intervenir l'ISF, le LCR, la BHE et le sang. Ces différentes voies concourent de manière indépendante à l'élimination des déchets métaboliques du parenchyme. Pour une molécule ou une protéine donnée, elles peuvent être toutes ou seulement en partie impliquées dans son élimination.

i. Dégradation cellulaire dans le cytosol

Afin d'assurer le maintien de la protéostasie, un certain nombre de déchets protéiques comme les protéines mal repliées ou des agrégats protéiques doivent être éliminés au sein même de la cellule. Deux mécanismes majeurs sont impliqués cette clairance cellulaire : l'UPS (système ubiquitine-protéasome) et l'autophagie.

- Ubiquitylation et rôle du protéasome dans la clairance cytosolique et nucléaire

Un premier mécanisme qui permet à la cellule de dégrader des protéines mal repliées ou des agrégats protéiques fait intervenir le système ubiquitine-protéasome. Les protéines cibles subissent une polyubiquitylation de leur extrémité C terminale par des ubiquitine-ligases, et sont ainsi adressées à la sous-unité 20S protéolytique du protéasome qui les dégrade. Des chercheurs ont récemment mis en évidence que ce système de clairance UPS agissait également dans le noyau cellulaire via des chaperonnes spécifiques et des *heat shock* protéines (HSP) (Hjerpe et al. 2016).

- Autophagie

L'autophagie est le second mécanisme d'élimination intracellulaire impliqué dans le traitement de gros agrégats protéiques. L'UPS ne peut pas dégrader des complexes protéiques ou des agrégats de grande taille du fait de la dimension restreinte de la sous-unité protéolytique du protéasome. Différents mécanismes sont impliqués dans l'autophagie, mais ils aboutissent tous à la dégradation de la molécule cible dans le lysosome, organelle contenant un grand panel de protéases capables de dégrader la majorité des substrats. Ces différentes voies de l'autophagie sont : 1) La formation d'un autophagosome autour des structures cytosoliques à éliminer qui fusionne ensuite avec un lysosome, appelée macroautophagie. 2) L'adressage des agrégats directement au lysosome par des chaperonnes de types HSP et l'internalisation via le récepteur LAMP2A, appelée CPA pour *chaperone-mediated autophagy*. 3) L'internalisation de petits volumes cytosoliques par le lysosome directement au niveau de sa membrane, appelée micro-autophagie. (Labbadia et Morimoto 2015)

ii. Voies d'élimination hors de l'ECS : efflux possibles d'une molécule présente dans l'ECS

Tout déchet métabolique qui n'est pas dégradé ou recyclé dans la cellule est le plus souvent, en condition physiologique du moins, relargué dans le milieu extracellulaire. Dans le cas du cerveau, la molécule en question est donc libérée dans l'ECS. Soit X le nom de cette molécule. Une fois dans l'ISF, la molécule X va diffuser selon son gradient de concentration et a alors plusieurs devenir possibles qui sont récapitulés dans la Figure 8.

- Export dans le sang par la BHE

L'un des devenir possibles de la molécule X dans l'ECS est d'atteindre par diffusion un capillaire. Au niveau du capillaire, la BHE est toujours présente, mais uniquement composée d'une combinaison de pieds astrocytaires-péricytes-cellules endothéliales et de leurs lames basales composées de collagène, perlecan, laminines et de récepteurs aux intégrines (Rasmussen, Mestre, et Nedergaard 2022). Les gaz et les petites molécules lipophiles (< 400 Da) comme les hormones stéroïdiennes, l'urée, l'éthanol, les vitamines A et D, diffusent librement à travers cet assemblage essentiellement membranaire et protéique, mais le reste des solutés nécessite des transporteurs pour franchir cette barrière. On trouve un certain nombre de transporteurs au niveau des péricytes et des pieds astrocytaires, mais leur rôle et leur importance dans les flux entre sang et ISF ne sont pas encore établis (Sweeney et al. 2019). De plus, ces cellules ne sont pas jointes de façon étanche et des flux moléculaires paracellulaires de l'ISF jusqu'à la face interstitielle des cellules endothéliales peuvent avoir lieu. Concernant les pieds astrocytaires, des modélisations permettent de supposer que la couverture de pieds astrocytaires jouerait un premier rôle de filtre sélectif des substances qui traversent la BHE (Koch, Vinje, et Mardal 2023), mais cela n'a pas encore été démontré expérimentalement (Rasmussen, Mestre, et Nedergaard 2022).

Au niveau des cellules endothéliales, les claudines, notamment la claudine 5, et les protéines de la *zona occludens* assurent l'étanchéité des jonctions serrées. Les cadhérines, β -caténines, Pecam-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule 1*), ESAM et JAM (*endothelial cell et junctional adhesion molecule* respectivement) maintiennent quant à elles, une cohésion plus ou moins lâche, d'environ 20 nm, du reste des contacts membranaires (Sweeney et al. 2019). Du fait de l'existence de cette batterie de molécules

de jonction et d'adhérence entre les cellules endothéliales, qui rend cette dernière barrière endothéliale imperméable aux flux paracellulaires, tout transport moléculaire est nécessairement transcellulaire et finement régulé par des récepteurs et transporteurs.

L'endothélium assure les échanges ioniques de sodium, potassium, calcium, chlore et bicarbonates entre le sang et l'ISF par des canaux (K^+), des transports facilités en symport (NKCC1) ou antiport (Cl^-/HCO_3^-) et des transport actifs primaires comme la pompe Na^+/K^+ ATPase. Il existe toute une batterie de transporteurs spécialisés dans l'import de solutés du sang vers l'ECS mais nous ne relèverons par la suite que les protéines impliquées peu ou prou dans l'efflux de ces solutés de l'ISF vers le sang. De nombreux transporteurs comme GLUT1 (transporteur du glucose de type 1), les LAT et CAT (*L-type* et *cationic amino acid transporters* respectivement), MCT1 (*monocarboxylate transporter 1*) et d'autres fonctionnent de façon bidirectionnelle entre le sang et l'ISF en étant présents sur la face luminale des cellules endothéliales et sur la face opposée côté ISF. Ils transportent respectivement les molécules comme le glucose, les acides aminés, le lactate, la glutamine, les hormones thyroïdiennes et les ions organiques. Le flux net de ces transporteurs est néanmoins le plus souvent orienté vers l'ISF. L'efflux de solutés est également assuré par des transporteurs unidirectionnels spécialisés dans l'export de ces métabolites de l'ISF vers le sang. On peut citer notamment les transporteurs d'acides aminés Na^+ dépendants ASCT1/2, EAAT1/2/3, GLYT1, TAUT et de nucléotides CNT2, et les transporteurs de glutamine SNAT1/2 et d'anions (OAT3) et de cations (PMAT) organiques (*Alanine transporter 1/2 ; Excitatory amino acid transporter 1/2/3 ; Glycine transporter 1, Taurine transporter ; Concentrative nucleotide transporter 2 ; Sodium coupled neutral amino acid transporter 1/2 ; Organic anion transporter 3 et Plasma membrane mono-amine transporter* respectivement). Les plus grosses molécules comme l'insuline, l'IGF-1, la transferrine et l'hormone anti-diurétique sont transportées vers le sang ou vers l'ISF par transcytose par l'intermédiaire de leur liaison à leurs récepteurs (IR, IGF1R, TfR, V1) sur la face extracellulaire. Les protéines LRP1 et LRP2 sont deux récepteurs spécialisés dans le guidage transendothélial et l'efflux des peptides $A\beta$ et des isoformes de la protéine APOE impliqués notamment dans la maladie d'Alzheimer. Enfin, les transporteurs ABC pour *ATP-binding cassette* sont des transporteurs actifs, localisés sur la face luminale endothéliale, et spécialisés dans l'efflux d'une

large gamme de molécules telles que les xénobiotiques et autres médicaments qui ne sont pas métabolisées par le parenchyme afin d'éviter leur accumulation dans l'ECS (Sweeney et al. 2019). L'efflux de molécules de l'ISF vers le sang au niveau de la BHE est donc assuré *in fine* par les protéines membranaires des cellules endothéliales.

- Efflux par les compartiments périartériels (IPAD) ou périveineux (flux glymphatique)

Que la molécule X possède un transporteur spécifique qui lui permette de traverser la BHE ou non, elle peut aussi atteindre par diffusion dans l'ECS un vaisseau doté d'un espace périvasculaire (PVS). L'étude de ces espaces, qui contiennent le LCR, et de leur rôle physiologique dans la clairance cérébrale a débuté dans les années 80 avec les travaux d'Helen Cserr notamment (Cserr, Cooper, et Milhorat 1977). Une nouvelle description de l'importance physiologique de ces PVS est proposée en 2012 par l'équipe de Nedergaard. Ils nomment alors ces flux de LCR qui favorisent l'élimination de métabolites hors du cerveau, le système glymphatique, en référence aux cellules gliales qui compartimentent cet espace et dont le rôle s'apparente à celui d'un réseau lymphatique (Iliff et al. 2012). Par injection de dextrans dans la *cisterna magna*, ils ont montré que le LCR pénétrait dans le parenchyme le long des artères, que des dextrans de poids moléculaires distincts pénétraient ensuite dans le parenchyme tous à la même vitesse, et qu'au bout d'un temps long on retrouvait ces traceurs au niveau des veinules. En parallèle, des traceurs injectés en intraparenchymateux étaient également observés à la surface des veinules et des veines au bout d'une heure. L'hypothèse glymphatique qui en a découlé peut se décrire comme suit :

- 1) Entrée de LCR le long des PVS artériels.
- 2) Pénétration du LCR dans l'ECS via les pieds astrocytaires de façon AQP4 dépendante.
- 3) Entrée et mélange du LCR à l'ISF qui engendrent des mouvements de convection, ou *bulk-flow* de l'ISF dans le parenchyme.
- 4) Entraînement des solutés de l'ISF, et de la molécule X dans notre cas, vers les PVS veineux par *bulk flow*.
- 5) Drainage de ces solutés dans le LCR périveineux vers l'espace sous-arachnoïdien.

Si les premières étapes de cette succession d'évènements sont communément admises aujourd'hui, les trois dernières sont toujours sujettes à controverse et restent des questions ouvertes : comment décrire

précisément le mouvement des solutés dans l'ISF ? Quel est le compartiment de drainage emprunté par les solutés de l'ISF ?

Concernant les mouvements moléculaires, le groupe de Verkman a remis en cause l'existence d'un bulk-flow de l'ISF en 2017. En injectant des dextrans de différents poids moléculaires en intraparenchymateux et en quantifiant leur distribution *ex vivo* par microscopie optique et *in vivo* par FRAP et vidéomicroscopie, ils ont montré que des dextrans se déplaçaient par diffusion simple dans le parenchyme sur plusieurs centaines de microns (Smith et al. 2017). Cette conclusion était déjà largement soutenue par des modélisations mathématiques et informatiques (Holter et al. 2017; Hrabe, Hrabetová, et Segeth 2004), mais également par le fait que, d'après la loi de Poiseuille la force nécessaire pour mettre en mouvement un fluide doit être d'autant plus importante que l'espace est confiné (Hladky et Barrand 2018). Les forces nécessaires pour entrainer un flux convectif ne seraient physiologiquement pas compatible avec un milieu contraint comme l'ECS. Les scientifiques s'accordent maintenant sur le fait qu'à l'échelle du tissu, les mouvements moléculaires sont régis par une combinaison de diffusion et d'advection (Abbott et al. 2018). Dans un rayon de 10 à 50 μm , distance moyenne entre un corps cellulaire neuronal ou glial et un capillaire, c'est la diffusion qui domine, et au-delà du millimètre, ce sont des processus mêlant diffusion et advection qui ont lieu (Hladky et Barrand 2014; Koundal et al. 2020). Une fois libérés dans l'ECS, les métabolites diffusent dans un premier temps sur une distance de quelques dizaines de microns. Ils sont soit alors éliminés par la BHE au niveau d'un capillaire, soit ils diffusent un peu plus en amont ou en aval et sont alors entraînés par advection par des mouvements convectifs de fluides à proximité des artérioles, veinules et des plus gros vaisseaux. La diffusion assure un transport à courte distance dans l'ECS, et les mouvements convectifs qui ont lieu dans des régions de moindre résistance (PVS, vaisseaux...) prennent en charge le transport longue distance et le drainage des métabolites hors du parenchyme.

Concernant les voies de drainage de l'ISF et de ses solutés, les travaux de Weller et Carare ont mis en évidence un trajet intramural, périartériel et rétrograde de l'ISF par rapport au flux sanguin (Morris et al. 2016; Engelhardt et al. 2016). Cette voie d'élimination a été nommée IPAD pour *intramural periarterial drainage*. Après injection de nanoparticules dans l'hippocampe, Morris et al. détectaient

après quelques minutes la présence des nanoparticules dans les membranes basales des capillaires et des cellules musculaires lisses de la *tunica media* des artérioles. Quand les nanoparticules étaient injectées dans le LCR de la *cisterna magna*, elles étaient par la suite détectées uniquement au niveau des membranes basales entre les cellules de la pie-mère et la glia limitans des artères (Morris et al. 2016). À partir de ces observations, les auteurs ont déduit que le LCR entrant et l'ISF-CSF sortant du parenchyme empruntaient des voies physiquement distinctes, mais localisées toutes les deux au niveau des parois artérielles (Albargothy et al. 2018). Selon leur modèle, le LCR circule dans la paroi artérielle au niveau des PVS, c'est-à-dire entre les pieds astrocytaires et la membrane basale de la musculature, de l'espace sous-arachnoïdien vers le parenchyme. L'ISF est quant-à lui drainé hors de l'ECS entre les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales des artérioles et des artères, le long de leurs membranes basales, vers l'espace sous-arachnoïdien. Les détracteurs de ce modèle avancent que la méthodologie pourrait introduire des artefacts de mesure comme l'injection de gros volumes à forte pression qui pourrait notamment exercer une pression suffisante pour visualiser un reflux des traceurs de façon rétrograde le long des artères. Le flux glymphatique et l'IPAD sont donc deux mécanismes possibles d'élimination de la molécule X hors de l'ECS. La question reste ouverte quant à la coexistence de ces deux mécanismes pour drainer l'ISF.

- Autres voies d'élimination possibles ou accumulation dans l'ECS

Si la molécule X n'a pu emprunter l'une des voies de sortie de l'ECS précédemment citée, elle peut encore être recaptée et phagocytée par un astrocyte ou une microglie ou bien être dégradée par des protéases extracellulaires dans le cas où la molécule X est une protéine (Wilson, Satapathy, et Vendruscolo 2023). Cependant, si aucune de ces voies d'élimination ne permet au cerveau de se débarrasser de cette molécule ou bien si ces processus sont ralentis ou défectueux, la molécule X commence alors à s'accumuler dans l'ECS. Cette accumulation peut aboutir à son agrégation et engendrer une toxicité cellulaire. Je discuterai plus en détail des causes et conséquences de ces phénomènes dans la partie IV de ce chapitre.

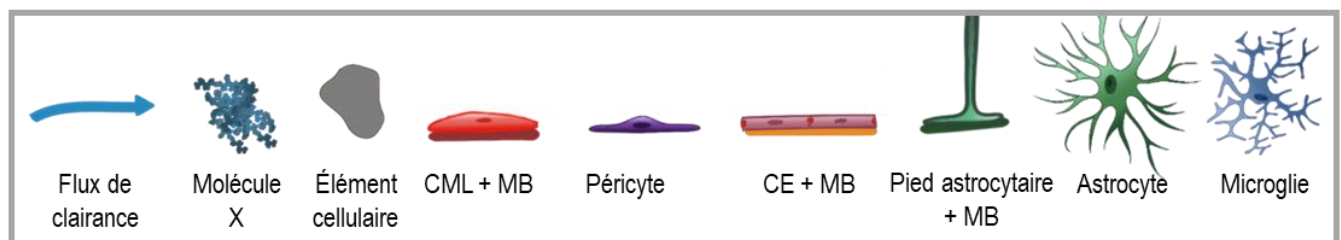
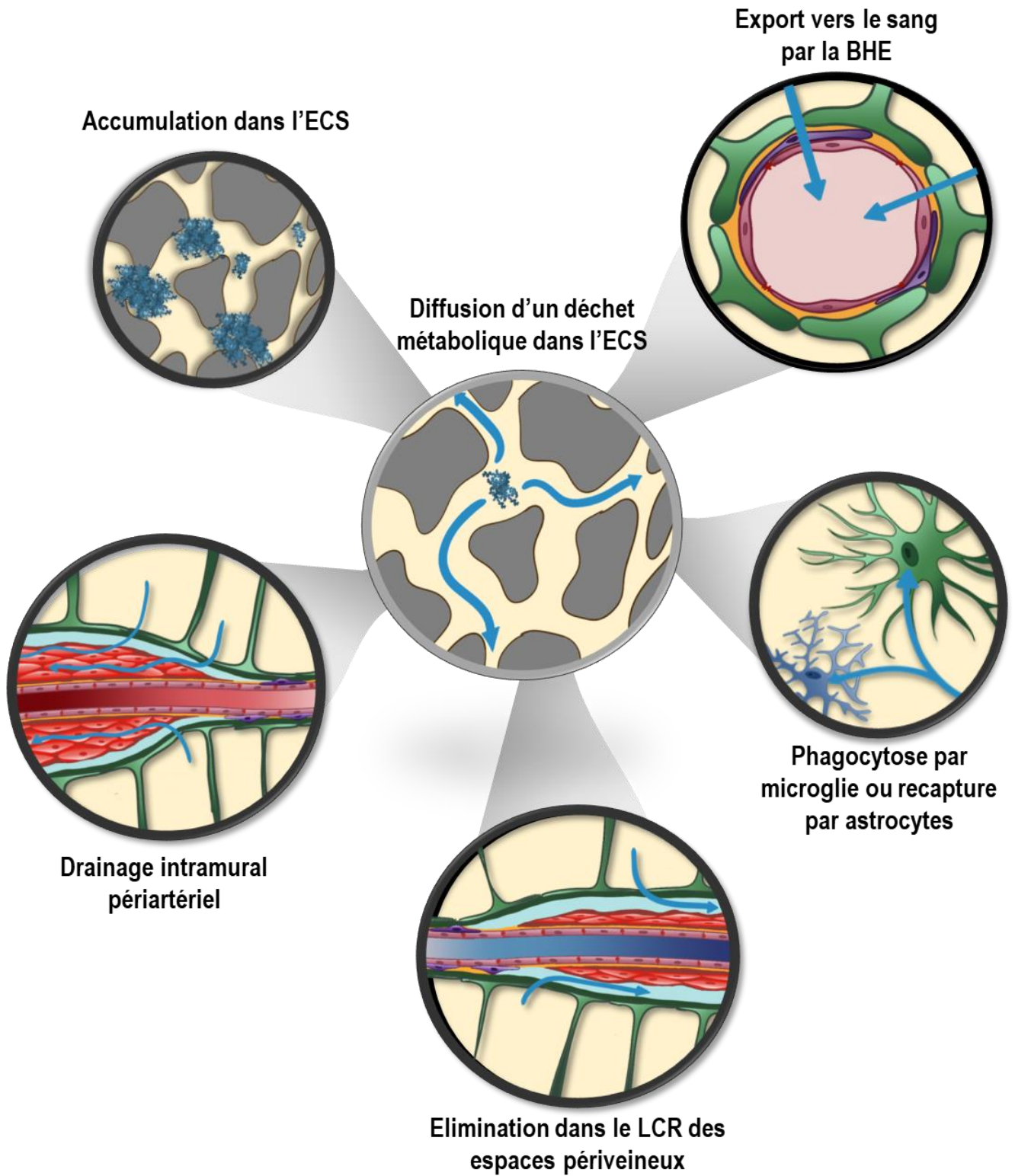


Figure 8. Devenirs possibles d'un déchet métabolique qui diffuse dans l'ECS : les différentes voies d'élimination du parenchyme

CML, cellule musculaire lisse ; MB, membrane basale ; CE, cellule endothéliale.

iii. Drainage des fluides par le réseau lymphatique méningé, ultime étape de la clairance cérébrale.

Si les mouvements de fluides et échanges entre LCR et ISF au niveau du parenchyme sont encore largement débattus, leur drainage terminal hors du SNC semble faire consensus. Le LCR et l'ISF sont réabsorbés au niveau des vaisseaux lymphatiques méningés (Fig. 5) (Thomas, Jacob, et Boisserand 2019). Le drainage des fluides le plus efficace a lieu au niveau des vaisseaux lymphatiques situés latéralement et au niveau ventral du crâne, car dans ces régions les capillaires lymphatiques à proximité de l'espace sous-arachnoïde sont dotés de valves et possèdent une morphologie particulièrement adaptée à l'absorption et au drainage du LCR (Ahn et al. 2019).

c) Variations physiologiques de la clairance cérébrale à court, moyen et long termes

Les facteurs systémiques qui régulent le flux de LCR dans le SNC sont les oscillations hémodynamiques (pression artérielle, rythme cardiaque, vasomotricité), la fréquence respiratoire, l'état de veille et la position du corps (Benveniste, Liu, et al. 2019). À l'échelle tissulaire et cellulaire, l'expression et la polarisation des AQP4 au niveau des pieds astrocytaires régulent les flux de LCR au niveau des espaces périvasculaires (Salman et al. 2022), et la présence de macrophages périvasculaires appelés *parenchymal border macrophages* au niveau de la pie mère est nécessaire à l'influx efficace de LCR dans les PVS (Drieu et al. 2022). La dynamique des flux dans la clairance cérébrale peut donc être impactée à court terme, de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes, à moyen terme sur quelques heures et à long terme sur plusieurs jours voire des années.

i. Facteurs qui influencent à très court terme les flux et le drainage des solutés

Iliff et Mestre ont montré que la clairance dépendait de la pulsatilité artérielle, elle-même dépendante du débit sanguin pulsatile (Iliff et al. 2013; Mestre et al. 2018). A contrario, l'équipe ayant découvert la voie IPAD, montrait par modélisation que ce mécanisme lié au débit sanguin n'était pas suffisant pour expliquer la mise en mouvement des fluides et entrainer une clairance efficace des solutés (Diem et al. 2017). Ce sont les cellules musculaires lisses et leur vasomotricité spontanée qui ont depuis été identifiées comme les acteurs principaux de l'efflux péri-artériel (Aldea et al. 2019; van Veluw et al.

2020a). En effet, van Veluw et al. ont montré que l'augmentation de la vasomotricité des artères parenchymateuses, en réponse à une hyperémie, augmentait la clairance périartérielle de traceurs présents dans l'ISF chez des souris éveillées, et ce indépendamment de la pulsativité du flux sanguin (van Veluw et al. 2020a).

ii. Facteurs qui influencent à moyen terme les flux et le drainage des solutés

Xie et al. ont montré que l'état de veille influençait considérablement la clairance cérébrale. Ils ont montré par l'injection de différents traceurs et molécules d'intérêt comme A β que les flux de LCR et la clairance de ces solutés hors du cerveau était beaucoup plus importante et plus rapide pendant la phase de sommeil par rapport à la phase d'éveil (Lulu Xie et al. 2013). La même équipe a également montré que la position du corps influait sur la clairance et qu'une position latérale allongée favorisait la clairance par rapport à un décubitus dorsal et qu'à l'inverse, un décubitus ventral était plutôt défavorable (Lee et al. 2015). En 2020, Pulido et al. ont montré que l'activité neuronale était capable de réguler l'expression de transporteurs d'efflux au niveau de la BHE et des gènes du rythme circadien dans les cellules endothéliales. Ils ont notamment montré que l'expression endothéliale des transporteurs ABC étaient inversement corrélée à l'activité neuronale (Pulido et al. 2020).

iii. Âge et diminution de la clairance sur le long terme

Au cours du vieillissement, la clairance cérébrale diminue. L'équipe de Nedergaard a montré une diminution liée à l'âge de 40 % de la clairance du peptide A β quand il est injecté dans le parenchyme cérébral de souris âgées par rapport à leurs contrôles jeunes (Kress et al. 2014). La cause de cette baisse de clairance est probablement multifactorielle. L'augmentation des facteurs de l'inflammation qui accompagne le vieillissement a notamment été mise en cause dans la déstabilisation de l'intégrité de la BHE via une activation astrocytaire (Keep et al. 2023). L'augmentation de la rigidité des parois artérielles, et la diminution de leur *compliance* avec l'âge (Benveniste, Liu, et al. 2019) contribue également à diminuer la vasomotricité et à favoriser l'hypertension, deux phénomènes qui concourent à réduire le drainage de l'ISF (Mestre et al. 2018; van Veluw et al. 2020a). Drieu et al. ont remarqué une

dysfonction des macrophages périvasculaires au cours du vieillissement qui se traduisait par une diminution de la clairance et une accumulation de protéines de la MEC. Chez l'homme, une étude IRM a mis en évidence que la réduction de l'efflux lymphatique liée à l'âge s'accompagnait d'un épaissement des vaisseaux lymphatiques et d'une atrophie des ganglions lymphatiques cervicaux (Albayram et al. 2022).

La clairance cérébrale est un processus continu, sujet à des variations d'amplitude en fonction de différents paramètres intrinsèques, comme le cycle veille/sommeil, ou extrinsèques, comme la stimulation visuelle ou l'hyperémie réactionnelle par exemple, nécessaire au SNC pour assurer et maintenir un environnement sain autour de ses cellules. Il implique une bonne dynamique des flux périvasculaires de LCR, des échanges entre LCR et ISF dans l'ECS et/ou au niveau des PVS, des transports efficaces au niveau de la BHE, une diffusion interstitielle non entravée des molécules à éliminer, un drainage paravasculaire artériel ou veineux efficient et enfin un drainage lymphatique actif au niveau méningé. En cas de dysfonction de ce système à une ou plusieurs de ces étapes, le cerveau s'expose à l'accumulation de molécules potentiellement toxiques. Physiologiquement la clairance cérébrale perd en efficacité avec l'âge et on suppose que ce mécanisme pourrait être à l'origine de l'apparition de certaines maladies liées à l'âge comme les neurodégénérescences de type Alzheimer et Parkinson. C'est ce potentiel lien que nous étudierons dans la partie suivante.

IV. Clairance pathologique et protéotoxicité

a) Maladies neurodégénératives et protéotoxicité

Les maladies neurodégénératives regroupent un ensemble de pathologies du système nerveux qui se caractérisent par une perte progressive et irréversible des cellules nerveuses ou par une dégénérescence de leurs terminaisons dans le SNC et/ou le SNP. On peut citer parmi elles, par ordre de prévalence dans la société la maladie d'Alzheimer (MA) et les autres formes de démence, la maladie de Parkinson (MP), la sclérose en plaque (SEP), la sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou encore la maladie de Huntington (MH). Les symptômes associés à la MA sont cognitifs, ceux associés à la SLA sont exclusivement moteurs, la SEP a des symptômes moteurs et sensitifs et les symptômes de la MP sont majoritairement moteurs, mais également cognitifs dans les formes avancées (Tableau 2). Qu'ils affectent les fonctions motrices, sensitives ou cognitives, ces symptômes sont extrêmement invalidants et ils s'aggravent au cours du temps. Le fait que ces pathologies se chronicisent, qu'elles soient le plus souvent de longue durée, à l'exception de la SLA, et qu'elles soient actuellement incurables en fait un véritable fléau à la fois pour les patients et pour leurs aidants. D'autre part, l'âge étant le principal facteur de risque, avec le vieillissement global de la population l'incidence de ces pathologies est en constante augmentation et entraîne de lourdes répercussions médicales, économiques et sociétales.

L'étiologie de la majorité de ces pathologies reste inconnue à jour. Elles sont le plus souvent sporadiques, mais peuvent aussi avoir des origines génétiques comme la maladie de Huntington, la SLA ou certaines formes familiales de MA. Si la symptomatologie des pathologies qui touchent directement des cellules nerveuses, comme dans la MA, la MP, la SLA et la MH, est variée, on retrouve néanmoins une caractéristique histopathologique commune à ces 4 neurodégénérescences : l'implication d'une protéine dont l'accumulation et l'agrégation sont responsables de la mort neuronale (Tableau 2). Quatre des maladies neurodégénératives les plus répandues sont donc des protéinopathies causées par un stress protéotoxique.

Nous avons vu précédemment que la clairance cérébrale était un élément clé dans la régulation de la protéostasie. Or, il se trouve que la clairance cérébrale est déficiente dans la MA, la MP et la MH.

Différents groupes ont pu identifier plus précisément quelques acteurs physiologiquement impliqués dans la clairance cérébrales qui se trouvaient altérés dans la MA et la MP. Ils ont en effet montré que les flux de LCR étaient diminués dans ces pathologies. En outre, ils ont mis en évidence que l'efflux d'A β , de Tau et d' α -synucléine le long des PVS, ainsi que leur drainage au niveau des vaisseaux lymphatiques étaient altérés. Enfin, au niveau cellulaire, ils ont constaté que les astrocytes perdaient la polarisation des protéines AQP4 au niveau de leur *end-feet* périvasculaires (Rasmussen, Mestre, et Nedergaard 2022). Ces mécanismes sont altérés de façon similaire au cours du vieillissement. Ils pourraient donc préexister par rapport à l'apparition de la pathologie et concourir à la pathogénèse. D'un autre côté, il a été démontré que les protéines toxiques comme A β et l' α -synucléine altéraient directement ces mêmes mécanismes. Ces défauts de clairance contribuent donc, d'une part, à entretenir la pathologie et à favoriser sa progression et, d'autre part, ils pourraient être aussi bien la cause que la conséquence de la protéotoxicité.

Tableau 2. Maladies neurodégénératives par ordre de prévalence et caractéristiques anatomopathologiques associées

Pathologie	Prévalence dans le monde	Nombre de malades en France	Symptômes	Cellules cibles	Régions lésionnelles du SN	Protéine impliquée	Caractéristiques histopathologiques
Maladie d'Alzheimer	25 000 000	900 000	Cognitifs	Cellules pyramidales	Hippocampe Cortex	A β Tau	Plaques amyloïdes dans l'ECS et dégénérescence neurofibrillaire intraneuronale
Maladie de Parkinson	6 300 000	150 000	Moteurs Cognitifs	Neurones dopaminergiques	Noyaux de la substance noire	α -synucléine	Corps de Lewy intracellulaires et intraaxonaux
Sclérose en plaque	2 800 000	80 000	Moteurs	Oligodendrocytes et cellules de Schwann	SNC et SNP	-	-
Sclérose latérale amyotrophique	120 000	8 000	Moteurs Sensitives	Motoneurones	Moelle épinière Tronc cérébral Cortex Moteur	TDP-43 SOD1	Inclusions cytoplasmiques
Maladie de Huntington	3 / 100 000	6000	Moteurs Cognitifs Psychiatriques	Neurones de projection GABAergiques du striatum	Ganglions de la base ³	Htt	Agrégats intracytoplasmiques au niveau du corps cellulaire ³

D'après les données publiées sur le site de l'ICM. *(Reiner, Dragatsis, et Dietrich 2011)

b) Stress protéotoxique et mécanismes impliqués

i. Production et lieux d'agrégation des protéines impliquées en fonction des pathologies

La production des protéines impliquées dans les protéinopathies sporadiques est le plus souvent physiologique. Du fait de certaines mutations retrouvées dans des formes familiales de MA ou de MP, il apparaît que, en plus de favoriser une conformation proagrégante, la mutation peut également augmenter la production de la protéine et d'autant plus favoriser son accumulation et son agrégation. La maladie de Huntington est une maladie génétique à expansion de triplets dans laquelle la protéine huntingtine (htt) est mutée. Cette mutation, qui allonge sa queue polyQ, est à la fois une perte de fonction physiologique et un gain de fonction toxique puisqu'elle favorise un mauvais repliement et l'agrégation de la forme mutée. La htt est ubiquitaire mais elle est fortement exprimée dans le SNC. Elle est physiologiquement impliquée dans un grand nombre de processus biologiques, notamment la régulation de l'expression génique, la survie cellulaire ou le transport axonal dans le neurone (Schulte et Littleton 2011). L'htt mutée forme des inclusions intracytoplasmique et intranucléaires, mais on retrouve également des agrégats extracellulaires dans le cerveau de patients malades. Caron *et al.* ont démontré que les dépôts extracellulaires n'étaient pas le résultat uniquement d'une fuite de htt mutée lors de la mort neuronale, mais que l'htt qu'elle soit mutante ou non était sécrétée activement dans l'ECS par les neurones. Ils retrouvent par la suite la présence de cette htt dans le LCR, preuve qu'elle se déplace dans l'ECS et atteint les espaces de drainage (Caron et al. 2021). Dans la SLA, la super-oxyde dismutase SOD-1 est mal conformée. On la retrouve sous formes de dimères ou d'oligomères cytosoliques essentiellement, mais qui peuvent également être sécrétés dans l'ECS (Mondola et al. 2016). TDP-43 forme, pour sa part, des inclusions dans les neurones moteurs corticaux et spinaux, dans les astrocytes et les oligodendrocytes (Tsuboguchi et al. 2023) et n'est sécrétée dans l'ECS qu'au sein d'exosomes (Casarotto et al. 2022). Concernant la maladie de Parkinson, l'accumulation et l'agrégation d' α -synucléine ont lieu dans le cytosol des neurones dopaminergiques de la substance noire. On retrouve des inclusions appelés corps de Lewy au niveau des corps cellulaires, mais également dans le compartiment axonal des neurones. Il a été démontré que l' α -synucléine était également libérée dans

l'ECS (Abeliovich et Gitler 2016) et éliminée dans le LCR et les vaisseaux lymphatiques (Zou et al. 2019). Dans la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau hyperphosphorylée s'agrège dans les neurones corticaux et hippocampiques. La présence extracellulaire d'agrégats protéiques toxiques dans ces trois pathologies est donc la conséquence, soit d'un dépassement des mécanismes de dégradation cellulaires, soit d'un mécanisme cellulaire de neuroprotection pour diminuer la charge protéotoxique intracellulaire, soit encore la conséquence de la mort neuronale et de la libération du contenu cytosolique dans l'ECS.

La maladie d'Alzheimer a donc une caractéristique particulière en ce sens qu'une des protéines impliquées dans la protéotoxicité peut être directement produite dans l'ECS. Dans la MA, le peptide A β résulte du clivage successif de l'APP par la β -sécrétase puis du fragment transmembranaire β CTF par la γ -sécrétase qui libère le peptide dans la lumière de l'endosome ou dans l'ECS. L'agrégation d'A β débute dans les endosomes ou dans l'ECS. Le peptide A β est également retrouvé dans les différents fluides du SNC, dans le LCR, le sang et le compartiment lymphatique en plus de l'ISF. L'A β possède des transporteurs spécifiques au niveau de la BHE spécialisés dans l'export d'A β vers le sang (LRP1 et LRP2), mais également un récepteur spécialisé dans l'influx, RAGE. Le peptide A β est produit majoritairement en local au niveau du corps cellulaire, des axones et des dendrites, mais il peut également être produit ailleurs dans l'organisme et se retrouver dans l'ECS par l'intermédiaire de sa distribution sanguine et de son transporteur RAGE.

La clairance de tout peptide qui se retrouve dans l'ECS ne repose donc plus que sur la clairance glymphatique dans son sens large, à savoir une diffusion efficace et un drainage actif par le LCR et les vaisseaux lymphatiques méningés. Quelle que soit la protéinopathie en cause, une fraction de la charge protéique pathologique ou sa totalité se retrouve à un moment donné dans l'ECS. Une des étapes de sa clairance passe donc systématiquement par sa diffusion dans l'ECS.

ii. Origines de l'agrégation protéique

Une des origines du caractère pro-agrégant de certaines protéines est la déstabilisation de leur conformation native. C'est au moment de la maturation protéique qu'un défaut de repliement peut

aboutir à une conformation anormale qui favorise les phénomènes d'agrégation et/ou d'insolubilité. Le mauvais repliement peut faire apparaître en surface des régions hydrophobes ou des charges qui vont favoriser l'apparition de structures secondaires comme les feuilles β plissées, qui favorisent à leur tour la formation de structures fibrillaires. À l'inverse de protéines globulaires qui doivent être en partie dépliées pour s'agréger et former des structures fibrillaires, l'A β , l' α -synucléine ou encore la htt n'ont pas de structure secondaire ou tertiaire définie et sont naturellement non repliées (Chiti et Dobson 2006). Cette forme native déstructurée pourrait expliquer la plus forte propension de ces molécules à générer de façon spontanée des agrégats.

Des mutations ponctuelles peuvent d'autant plus faciliter l'agrégation. Des substitutions d'acides aminés au niveau des chaînes latérales qui augmentent l'hydrophobicité de la protéine, ou des substitutions qui diminuent sa charge globale, peuvent changer les proportions des structures secondaires de la protéine en favorisant une plus grande proportion de feuillets β plissés dans la structure tertiaire (Chiti et Dobson 2006). Le simple nombre d'acides aminés peut modifier la capacité de la molécule à s'autoagréger, comme c'est le cas avec l'A β_{1-42} qui est beaucoup plus pro-agrégante que l'A β_{1-40} ou avec la htt qui s'agrège d'autant plus facilement qu'elle a un grand nombre de résidus dans sa queue polyglutamine (Meisl et al. 2014; Schulte et Littleton 2011). L'hypothèse de la « transconformation » ou du changement conformationnel aboutissant à une conformation pro-agrégante vient de l'étude du prion. Le mode de propagation des pathologies comme Alzheimer et Parkinson a été rapproché de celui du prion car la progression de ces maladies dans le SNC fonctionne de proche en proche, en affectant des régions contiguës ou connectées. De plus, certains travaux ont mis en évidence que l'injection d'extraits de cerveau de patients atteints de MA contenant de l'A β , chez la souris APP était capable d'accélérer le développement de la pathologie amyloïde (Meyer-Luehmann et al. 2006). Néanmoins, si on retrouve certaines similitudes dans les capacités pro-agrégantes des protéines comme A β , htt, l' α -synucléine et celles du prion, il n'a pas été clairement démontré que, à l'instar du prion, ces protéines mal repliées étaient capables de transmettre la pathologie à un individu sain, en induisant activement un mauvais repliement et une transconformation de leurs homologues « saines ».

iii. Mécanismes et cinétiques de l'agrégation

Les mécanismes d'agrégation protéiques sont extrêmement influencés par la concentration, le temps de présence, la biotinylation, la charge et l'hydrophobicité de la protéine, mais également par les caractéristiques physico-chimiques de l'environnement, en particulier le pH, la température, la pression, et le milieu oxydant. Toute agrégation est un phénomène dépendant d'une étape de nucléation. Elle peut être primaire, lors de l'assemblage de monomères pour former des oligomères, ou secondaire dans les cas où la surface de structures fibrillaires préformées sert de catalyseur au processus de nucléation et à la génération de nouveaux oligomères (Fig. 9B). La cinétique de la nucléation primaire est la plus lente de l'ensemble du processus de formation d'agrégats. Cette étape d'initiation est appelée *lag-phase* et sa vitesse détermine la longueur de la première portion de la courbe sigmoïde qui caractérise la cinétique globale de l'agrégation protéique (Fig. 9A). Cette phase est d'autant plus courte que des fibrilles préexistent déjà et permettent une nucléation secondaire. La phase exponentielle de la courbe sigmoïde caractérise le processus d'élongation et la phase de plateau l'état stationnaire, d'équilibre entre les formes monomériques, oligomériques et fibrillaires.

Dans la maladie d'Alzheimer, le *pool* d'A β est constitué de trois types de fractions protéiques : les monomères, les oligomères solubles et les fibrilles insolubles. Dans ce réservoir, les oligomères d'A β peuvent être considérés comme la plaque tournante du processus d'agrégation (Fig. 9B). L'équipe de Knowles qui avait mis en évidence le processus de nucléation secondaire (S. I. A. Cohen et al. 2013) a déterminé, expérimentalement et par modélisation, les constantes des cinétiques de l'agrégation d'A β_{1-42} . L'agrégation d'A β débute par une agrégation de monomères pour former un oligomère. Cet oligomère peut alors subir 1) une conversion vers une forme fibrillaire, avec un enrichissement de la structure globale en feuillets β , et former une protofibrille ou bien 2) se dissocier (Fig. 9B). Ces deux cinétiques sont quasiment à l'équilibre, mais la fréquence de dissociation des oligomères est légèrement plus élevée que la conversion en protofibrilles, ce qui contribue à maintenir un réservoir d'A β monomérique. Les protofibrilles une fois formées subissent l'étape d'élongation et cette étape est extrêmement rapide, environ 10^4 fois plus que la conversion d'oligomères en protofibrilles et 10^6 fois plus rapide que la nucléation primaire (Fig. 9B) (Michaels et al. 2020). Les fibrilles forment une fraction

stable du réservoir d'A β , mais elles peuvent néanmoins générer des fibrilles plus courtes par fragmentation ou de nouveaux oligomères par nucléation secondaire ou fragmentation (Louros, Schymkowitz, et Rousseau 2023). Si le processus de nucléation secondaire est relativement indépendant des facteurs environnementaux, le processus de fragmentation est particulièrement sensible à la longueur des fibrilles, à la température et aux contraintes mécaniques. Les fibrilles sont peu pathogènes en elles-mêmes, mais une fois formées, elles favorisent et accélèrent la production des espèces toxiques d'A β en contribuant grandement au pool d'oligomères. En effet, la cinétique de production d'oligomères par nucléation secondaire est 200 fois plus rapide que la nucléation primaire, et 3 fois plus importante que la dissociation d'oligomères en monomères (Fig. 9B). D'autre part, les agrégats générés par fragmentation des fibrilles sont aussi particulièrement toxiques, car leur réabsorption cellulaire est facilitée (Louros, Schymkowitz, et Rousseau 2023).

Il est intéressant de noter ici que l'A β_{1-40} , qui est la forme la plus abondante d'A β *in vivo*, est plus stable. Sa forme monomérique est présente plus longtemps que celle de l'A β_{1-42} en solution *in vitro*. Meisl et al. ont montré que les différentes étapes d'agrégation concernant ce peptide étaient plus lentes que pour l'A β_{1-42} et qu'elles étaient beaucoup plus dépendantes de la quantité de monomères disponibles. Ces travaux mettent en évidence une différence majeure dans la concentration critique de monomères nécessaire à ces deux peptides pour former des agrégats (concentration critique d'agrégation) qui se situe autour de 90 nM pour l'A β_{1-42} (Novo, Freire, et Al-Soufi 2018) et est de l'ordre du μ M pour l'A β_{1-40} . D'autre part, Meisl et al démontrent que la contribution de la nucléation secondaire au processus d'agrégation est beaucoup plus importante pour l'A β_{1-40} que pour A β_{1-42} . Si la formation d'agrégats reste le plus souvent homomoléculaire, certains travaux suggèrent que la concentration de monomères d'A β_{1-42} influe sur l'agrégation d'A β_{1-40} (Cukalevski et al. 2015). On peut émettre l'hypothèse que des fibrilles d'A β_{1-42} pourraient servir de catalyseur à la nucléation secondaire d'oligomères d'A β_{1-40} . Cette synergie entre l'agrégation d'A β_{1-40} et d'A β_{1-42} accélérerait d'autant plus le processus d'agrégation global et la formation de fibrilles en raccourcissant notamment la lag-phase et en accentuant la pente de la phase exponentielle (Fig. 9A).

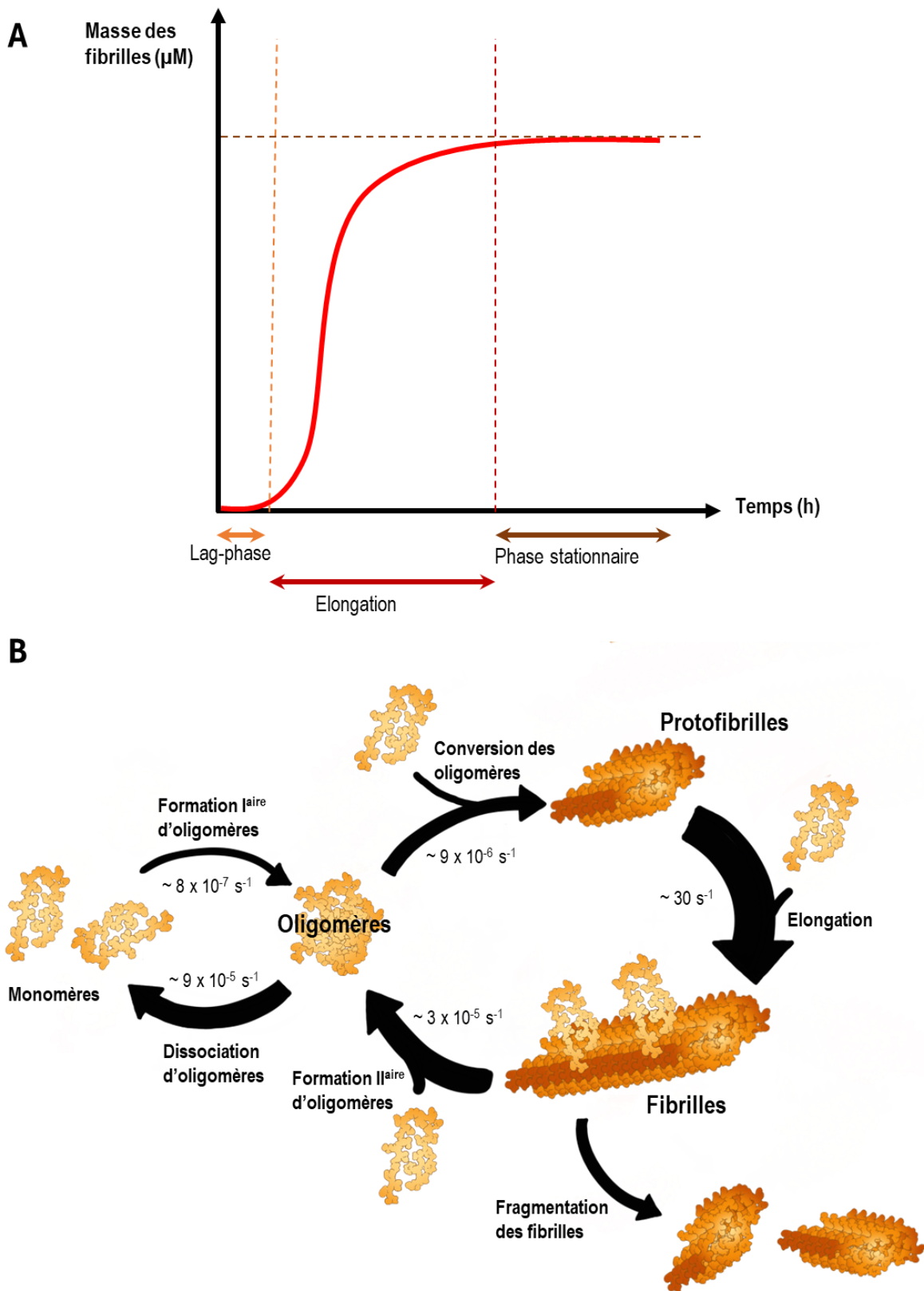


Figure 9. Cinétique et homéostasie du pool d'A β 1-42 : réactions d'agrégation et leur vitesse de réaction associée

A. Cinétique de formation des fibrilles amyloïdes, avec indication des différentes phases de la réaction. B. Réactions de nucléation, d'agrégation et de dissociation au sein du pool A β 1-42. La largeur des flèches est corrélée à la vitesse de la réaction qui est indiquée à l'intérieur des flèches. D'après (Michaels et al. 2020).

L'étape clé de l'oligomérisation se retrouve également dans la maladie de Parkinson avec l' α -synucléine (Cascella et al. 2022) et a également été démontré pour des dimères de SOD1 dans la SLA (Anzai et al. 2017).

iv. La composante toxique des protéinopathies neurodégénératives

Les cliniciens et les chercheurs ont longtemps attribué la perte neuronale aux plaques amyloïdes parce que ces structures étaient majoritairement représentées dans le parenchyme de cerveaux atteints et préférentiellement associées aux lésions neuronales. Depuis les années 2000, la fraction oligomérique du *pool* d'A β a clairement été identifiée comme étant à l'origine de la protéotoxicité (Hardy et Selkoe 2002; Sakono et Zako 2010; Takeda et al. 2013).

La toxicité associée aux protéines mal repliées peut s'expliquer en partie par les groupements chimiques qu'elles exposent en surface alors qu'ils sont enfouis au centre de la protéine et non accessibles à l'environnement dans sa conformation native globulaire. La toxicité peut aussi être due au rapprochement spatial de groupements qui sont habituellement éloignés dans le cas de protéines fibrillaires. Ces groupements peuvent alors interagir de façon non physiologique avec les composants cellulaires (protéines, acides nucléiques, lipides) et engendrer de nombreuses altérations dans la structure et la fonction de ces éléments (Knowles, Vendruscolo, et Dobson 2014). Cette toxicité est donc intimement liée à la surface de contact disponible de ces protéines mal repliées. L'origine de la plus grande toxicité des oligomères par rapport aux structures fibrillaires peut s'expliquer par le fait que les oligomères ont un ratio surface/volume nettement plus favorable aux interactions intermoléculaires que les fibrilles amyloïdes (Chiti et Dobson 2006). D'autre part, ces oligomères sont solubles et ont une plus grande capacité à diffuser que de plus gros agrégats, ce qui contribue à leur propagation et à la dissémination de la pathologie tout en renforçant leur pathogénicité.

Dans la maladie d'Alzheimer, les oligomères d'A β (A β) sont synaptotoxiques, pro-inflammatoires, perturbateurs de l'intégrité membranaire et promoteurs de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. Une étude *in vivo* a montré que des A β de faible poids moléculaire diminuaient la plasticité synaptique en inhibant la LTP (*long-term potentiation*). Ces A β diminuaient également le nombre de récepteurs

β 2-adrénergiques et le nombre de synapses des neurones de l'hippocampe (Yang et al. 2017a). Une autre étude récente a montré que les oligomères altéraient la transmission synaptique (He et al. 2019). Les A β o modifient également les flux calciques et occasionnent des dysfonctions au niveau mitochondrial (Huang et Liu 2020). Des formes tétra- et octomériques d'A β o sont impliquées dans la formation et la stabilisation de pores qui perméabilisent la bicouche lipidique aux flux d'eau (Ciudad et al. 2020). La toxicité des oligomères peut également être indirecte et médiée par leur action pro-inflammatoires sur les astrocytes et la microglie. En effet, les oligomères d'A β induisent une activation microgliale (Yang et al. 2017a) qui, en libérant des cytokines pro-inflammatoires, va induire une réaction astrocytaire anormale appelée astrogliose (Osborn et al. 2016). Une des conséquences de l'astrogliose étant notamment la relocalisation des AQP4 en dehors des pieds astrocytaires et les effets que cela engendre sur la clairance cérébrale.

Une grande partie des mécanismes mis en évidence dans la toxicité des A β o est retrouvé dans d'autres protéinopathies, et d'autres d'agrégats que les oligomères peuvent également être pathogènes. Plus généralement, la protéotoxicité se traduit par la séquestration de molécules ou même de complexes protéiques comme le protéasome par les agrégats d'A β , d' α -synucléine ou de htt. Les agrégats d'A β et d' α -synucléine peuvent également interagir avec les lipides membranaires et occasionner une perméabilisation des membranes en formant des pores à travers (Louros, Schymkowitz, et Rousseau 2023). L'interaction de ces agrégats avec des récepteurs peut aussi modifier les voies de signalisation intracellulaires. On peut également noter que si les agrégats fibrillaires interagissent peu, ils représentent néanmoins un stress mécanique important dans l'ECS et sont des obstacles majeurs au déplacement à et la diffusion des autres solutés. Enfin, une inflammation est toujours associée aux protéinopathies, et du fait de la présence constante des peptides toxiques, elle s'auto-entretient. Cette réaction inflammatoire, qui est initialement un mécanisme neuroprotecteur, devient délétère en se chronicisant et contribue alors également à la cytotoxicité.

c) Liens entre protéotoxicité et clairance cérébrale : importance de la diffusion dans l'ECS

La protéotoxicité est intimement liée à la concentration des protéines toxiques dans le milieu et à leur temps de présence. Les protéines mal repliées localisées en intra-cellulaire peuvent être exocytées dans l'ECS, soit par un mécanisme actif, quand la machinerie de dégradation intracellulaire est débordée, soit par une sécrétion physiologique (comme pour A β), soit par la fuite du contenu cytosolique lors de la mort cellulaire. Les peptides peuvent donc être relargués dans l'ECS sous différentes formes, essentiellement solubles. Dans le cas d'une clairance cérébrale efficace, les peptides relargués diffusent jusqu'aux capillaires, sont pris en charge par le LCR ou la BHE et sont exportés du cerveau. Ce drainage maintient un gradient entre le site de production et les vaisseaux qui assure la diffusion des agrégats solubles. En revanche si une étape de cette clairance est altérée, c'est une réaction en chaîne qui s'installe.

Considérons la première étape impliquée dans la clairance cérébrale : Si la diffusion locale dans l'ECS diminue par une augmentation de sa tortuosité ou par une diminution de α , cela entraîne des répercussions directes sur la concentration locale de peptides. Si les oligomères diffusent moins vite vers les sites d'efflux, ils sont moins efficacement drainés de l'ECS, et leur concentration locale augmente. Cette augmentation de concentration favorise les étapes de nucléation de l'agrégation. Une fois ce processus lancé, les agrégats qui se forment, qu'ils soient solubles ou insolubles, vont contribuer à encombrer l'ECS et à augmenter sa tortuosité. En conséquence, les oligomères d'A β pourront d'autant moins diffuser facilement vers les sites d'élimination, et leur concentration locale continuera d'augmenter. Ce cercle vicieux engendre ainsi une toxicité locale croissante, aboutit aux dysfonctions cellulaires listées précédemment et *in fine* à la mort neuronale.

Même si le processus qui entraîne une détérioration de la clairance dans les maladies neurodégénératives est très probablement multifactoriel, le reste des conséquences que ces agrégats peuvent avoir sur les autres étapes de la clairance cérébrale pourrait découler principalement d'un défaut ou d'un manque d'efficacité de cette première étape de diffusion. Sans même savoir quel mécanisme est à l'origine de l'émergence des protéinopathies, maintenir tout au long de la vie une diffusion efficace dans l'ECS

pourrait permettre de prévenir l'apparition de telles pathologies (si c'est l'origine) ou du moins de retarder ou de limiter leurs effets cytotoxiques en assurant une bonne clairance.

CHAPITRE II : LES MECANISMES NEUROPROTECTEURS DE LA SIGNALISATION IGF-1

I. Axe somatotrope dans le développement et le vieillissement de l'organisme et dans la physiologie cérébrale

L'axe somatotrope est un axe neuroendocrine qui implique deux hormones peptidiques, l'hormone de croissance GH pour *growth hormone* et l'hormone IGF-1 pour *insulin-like growth factor 1*. Ces deux hormones sont nécessaires à la croissance et au développement de l'organisme et du système nerveux. La voie de signalisation de l'insuline/IGF-1 est fortement conservée au cours de l'évolution et on retrouve des homologues du récepteur de type 1 aux IGF (IGF1R), autrement appelé récepteur à l'IGF-1 (IGF-1R), chez de nombreux organismes comme la levure, *Caenorhabditis elegans*, la drosophile ou les mammifères (Kappeler et al. 2006). L'origine du système GH est plus difficile à dater, mais semble beaucoup plus récente dans l'évolution. L'apparition de ce système a longtemps été attribuée aux Vertébrés, mais des études plus récentes semblent indiquer l'émergence du système GH avec les Chordés (Li 2022). L'apparition de ce système endocrine pour contrôler le système IGF préexistant pourrait s'expliquer par l'apparition au cours de l'évolution de contraintes environnementales qui ont nécessité de diversifier les systèmes de réponses anaboliques pour les rendre plus rapides et/ou les réguler plus finement.

a) Actions pléiotropiques des signalisations IGF et GH

i. L'axe somatotrope : ses hormones et ses boucles de rétrocontrôle

L'axe somatotrope fait intervenir l'axe hypothalamo-hypophysaire et le foie. La GHRH, *growth hormone releasing hormone*, est un neuropeptide synthétisé dans les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus notamment. Ces neurones projettent vers l'éminence médiane où ils libèrent la GHRH dans un système porte qui l'achemine jusqu'à l'hypophyse antérieure. Au niveau de l'hypophyse antérieure, la GHRH et la somatostatine vont réguler la sécrétion de GH par les cellules somatotrophes dans la circulation sanguine, la GHRH en stimulant, et la somatostatine en inhibant sa sécrétion. La

sécrétion de GH est pulsatile et provoque plusieurs pics de GH par jour dans la circulation sanguine. La fréquence et l'amplitude de ces pics sont contrôlées par le rythme circadien et le stress à court terme et varient en fonction de l'âge, du sexe et de l'espèce.

Un des organes cibles de la GH impliqué dans l'axe somatotrope est le foie. L'interaction de la GH avec son récepteur au niveau des hépatocytes va induire la production et la sécrétion endocrine d'IGF-1 dans la circulation sanguine. L'IGF-1 et la GH exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe somatotrope par une action endocrine et des actions centrales. D'une part, elles inhibent directement la synthèse de GH au niveau des cellules somatotrophes de l'hypophyse. D'autre part, elles agissent indirectement par leur action sur les neurones hypothalamiques en stimulant la synthèse et la sécrétion de la somatostatine et en inhibant celles de la GHRH. En ce qui concerne IGF-1, son rétrocontrôle sur la sécrétion de GH ne se limite pas aux neurones hypothalamiques, mais intervient également par le biais de son action sur les neurones corticaux. Si les mécanismes sous-jacents n'ont pas encore été élucidés, les travaux de notre laboratoire ont montré que la suppression de la signalisation IGF-1 au niveau cortical induisait une sursécrétion de GH par l'hypophyse (De Magalhaes Filho et al. 2017). Des facteurs extrinsèques et environnementaux interviennent également dans la régulation de l'axe somatotrope. La nutrition est un élément majeur dans le contrôle de cet axe, mais d'autres hormones et messagers sont également impliqués, comme les glucocorticoïdes, qui régulent l'expression des récepteurs à la GH, ou encore la ghreline, qui stimule la prise alimentaire et a un effet sécrétagogue direct sur la GH et donc un effet indirect positif sur la production d'IGF-1.

ii. Les cibles et mécanismes d'action de la GH et IGF-1

Ces deux hormones sont caractérisées par la multiplicité de leurs cibles et touchent presque tous les organes de l'organisme. Parmi les principaux tissus cibles, on peut citer les tissus hépatique, musculaire, adipeux, osseux, mais également les cellules du SN. La réponse cellulaire aux hormones GH et IGF-1 est médiée par des récepteurs transmembranaires spécifiques, GHR et IGF1R respectivement, situés à la surface des cellules cibles. La liaison de la GH à son récepteur GHR entraîne l'activation de la voie JAK2/STAT. De par la proximité structurale tridimensionnelle de l'insuline et de l'IGF-1, l'IGF1R

partage également une grande homologie de séquence et de structure avec le récepteur à l'insuline (IR) et particulièrement au niveau de leurs domaines tyrosine kinase (Adams et al. 2000). Ces deux récepteurs à activité tyrosine kinase existent à l'état d'hétérodimères et sont composés de deux sous-unités α extracellulaires reliées entre elles par des ponts disulfure et reliées chacune à une sous-unité β transmembranaire par des ponts disulfures également. En se fixant à son récepteur, l'IGF-1 induit un changement de conformation de l'IGF1R qui provoque l'autophosphorylation du récepteur au niveau de ses résidus tyrosine intracellulaires. Cette activation déclenche la cascade de signalisation qui débute par la phosphorylation des substrats des récepteurs à l'insuline IRS1 et IRS2 et de Shc (*Src homology and collagen*). Ces substrats vont alors phosphoryler à leur tour soit Grb2 d'une part, qui active à son tour la voie Ras/MAPK, soit la PI3K qui déclenche la cascade de signalisation PIP₃/Akt/mTOR (Fig. 10). Ces voies sont impliquées dans de multiples processus biologiques comme la croissance cellulaire, la différenciation, la survie cellulaire et la synthèse protéique.

iii. Effets pléiotropes d'IGF-1 dépendants et indépendants de la GH

La biodisponibilité plasmatique d'IGF-1 et de la GH est régulée par les IGFbps et les GHbps respectivement, BP pour *binding protein*. Ces protéines de haute affinité assurent à la fois le transport des hormones jusqu'aux cellules cibles, augmentent leur demi-vie dans le sang en les protégeant des protéases et inhibent, dans une certaine mesure, l'action de ces hormones tant que la liaison est maintenue. Il est intéressant de remarquer que malgré la grande homologie entre insuline et IGF, l'insuline ne possède pas de *binding proteins* et qu'elle est dégradée rapidement. Son action systémique est donc d'une durée beaucoup plus courte que celle d'IGF. Bien qu'IR et IGF1R soient globalement co-exprimés de façon ubiquitaire et qu'ils partagent les mêmes cascades de signalisation en aval de leur récepteur, cette différence de demi-vie peut en partie expliquer que l'insuline et l'IGF-1 aient des effets très différents.

L'insuline et l'IGF-1 sont respectivement les médiateurs de la réponse métabolique et de la réponse trophique de l'organisme à la nutrition. L'apparente redondance de ce système permet en réalité de diversifier les réponses cellulaires et de séparer les effets de ces deux hormones grâce à l'intégration

temporelle des signaux (liée à la demi-vie des hormones) et à une intégration spatiale qui dépend du type cellulaire et de la présence et de la proportion de chaque récepteur sur la cellule cible. L'insuline a une courte durée d'action, qui inhibe essentiellement la lipolyse et la glycogénolyse et stimule la mise en réserve, alors que l'intégration du signal IGF se fait sur du plus long terme et enclenche des processus de synthèse intracellulaires.

La GH et l'IGF-1 sont des hormones impliquées majoritairement dans des processus anaboliques dont les effets sont pléiotropes et peuvent différer en fonction du type cellulaire. Dans le foie, le muscle et l'os, elles stimulent la synthèse d'acides nucléiques et de protéines, contribuant à augmenter respectivement la prolifération et la taille cellulaire et favorisent plus généralement les processus de différenciation cellulaire et de croissance tissulaire.

On a longtemps pensé que l'ensemble des effets biologiques de la GH étaient médiés par l'IGF-1. Les chercheurs ont depuis démontré que l'IGF-1 pouvait avoir des effets indépendants de la GH. IGF-1 peut être produit par de nombreuses autres cellules que les hépatocytes. Cette production locale d'IGF-1 dans d'autres tissus a une action para- ou autocrine qui est indépendante de la GH (Milman, Huffman, et Barzilai 2016). En plus de ses effets périphériques, l'IGF-1 a également des effets centraux à la fois par l'IGF-1 systémique qui peut traverser la BHE (Pan et Kastin 2000) et par l'IGF-1 produit localement par les astrocytes et les neurones (Pitt et al. 2017). Les effets médiés par les IGF1R du SNC concernent la résistance au stress oxydant, la longévité (Holzenberger et al. 2003), la régulation de la thermogénèse (Cintron-Colon et al. 2017) et la neuroprotection dans les maladies neurodégénératives. Ces effets centraux seront abordés dans la partie II de ce chapitre.

b) Homéostasie de la signalisation IGF au cours de la vie de l'individu

Les niveaux d'IGF et de GH varient au cours de la vie de l'individu, en augmentant progressivement après la naissance pour se stabiliser au moment de la période péri-pubertaire et commencer à décliner à partir de l'âge adulte. L'homéostasie de ce système est finement régulée et des écarts à cet équilibre peuvent avoir des effets aussi bien néfastes que bénéfiques en fonction du niveau du tonus somatotrope,

de la durée de l'effet, du type de cellule cible et de la période de vie considérée. Un niveau élevé d'IGF sur une courte période de temps peut avoir des effets bénéfiques sur la survie cellulaire, alors qu'à long terme cette surstimulation devient néfaste (Junnila et al. 2013).

i. Rôle des signalisations GH et IGF dans le développement et pathologies associées

Les études ayant utilisé des ablations génétiques constitutives ou conditionnelles des gènes de l'IGF, de la GH ou de leurs récepteurs ont permis de déterminer l'implication de leur signalisation dans les différentes étapes du développement de l'individu. Le phénotype des souris *knockout* (KO) pour IGF-1 est caractérisé par un nanisme et une mortalité importante après la naissance, qui dépend du fond génétique. Le fait qu'une certaine proportion d'individus survivent suggère l'existence de cross-talk et de compensations possibles par l'IGF-2. En revanche, le KO d'IGF1R est systématiquement létal en péri-natal. Ces souris ont un fort retard de croissance, mais la mortalité est attribuée à un retard de maturité du poumon et non à des défauts typiquement développementaux (J. P. Liu et al. 1993). Les souris GHRKO quant à elles sont viables, identiques aux *wild-type* (WT) à la naissance et présentent un retard de croissance uniquement en postnatal (Zhou et al. 1997). De la même manière, une souris *Igf1r*^{+/-}, hétérozygote pour IGF1R, a un développement embryonnaire et postnatal normal jusqu'à la puberté. On note à ce stade une séparation des courbes de croissance entre WT et hétérozygotes chez qui la croissance est ralentie. Aucune différence au niveau de la physiologie de la fertilité n'a été notée (Holzenberger et al. 2003). La signalisation GH n'est donc pas nécessaire au développement embryonnaire, mais cela est à nuancer en ce qui concerne la signalisation IGF puisque, si elle n'est pas nécessaire à l'embryogénèse *stricto-sensu*, notamment à la formation des *patterns*, elle est tout de même fortement impliquée dans la croissance *in utero* (Ziegler, Levison, et Wood 2015). Les signalisations GH et IGF sont en revanche essentielles à la croissance postnatale somatique, particulièrement en période péri-pubertaire. Les retards de croissance associés sont d'autant plus importants que le tonus somatotrope est faible (Zhou et al. 1997; Holzenberger et al. 2003). Les chercheurs ayant travaillé sur ces modèles ont constaté dans le même temps que ces déficits en GH et en IGF-1 à l'âge adulte étaient associés à des phénotypes plus longèves.

Chez l'homme aussi, les conséquences sur l'organisme sont différentes en fonction du stade de développement auquel intervient le déficit ou l'excès d'hormones de croissance. Les individus qui sécrètent durant l'enfance de la GH en excès (le plus généralement résultant d'une tumeur hypophysaire) développent un gigantisme et ceux qui ont un déficit de production à cette période présentent, à l'inverse, un nanisme. À l'âge adulte, si un défaut de GH n'engendre pas de symptômes notables, un excès après la puberté en revanche provoque une acromégalie. Cette pathologie est caractérisée par une croissance osseuse et musculaire anormale qui aboutit à un épaississement des os et des tissus mous, des déformations articulaires, de l'hypertension et une insuffisance cardiaque. L'acromégalie est associée à une morbidité importante et à un raccourcissement de l'espérance de vie. Il n'a pas été clairement démontré que les individus atteints de nanisme mourraient plus précocement ou qu'ils étaient plus longévus à contrario (Junnila et al. 2013). Si aucun lien entre une diminution de signalisation GH et une augmentation de la longévité n'a été établi chez l'homme pour l'instant, une étude de 2008 a mis en évidence une relation entre signalisation IGF et longévité. Cette étude réalisée sur une population de centenaires a retrouvé chez les femmes de cette population particulièrement longève des mutations dans le gène IGF1R qui lui conférait une résistance à son ligand (Suh et al. 2008). Cette étude est l'une des premières à établir chez l'homme une corrélation entre réduction de signalisation IGF et longévité.

ii. Implication du système IGF dans le vieillissement et la longévité

Les signalisations GH et IGF sont intimement liées au vieillissement et à la longévité. Le vieillissement est un processus physiologique caractérisé par une détérioration progressive des fonctions biologiques qui affecte l'ensemble des organes de l'organisme. Physiologiquement, la sécrétion de GH et d'IGF-1 commence à décliner chez l'homme et d'autres mammifères à partir de l'âge adulte. On ne sait pas actuellement si cette « somatopause » endocrine a des répercussions sur les niveaux de productions d'IGF autocrines au niveau du cerveau ou des autres organes.

À partir des années 90, les travaux de Kenyon et collègues ont permis de montrer l'implication de l'axe somatotrope dans le vieillissement du nématode, de la levure et de la drosophile. Ces travaux ont ensuite été transposés chez la souris à partir des années 2000. Un certain nombre de mutations à différents

niveaux de l'axe de signalisation IIS (pour *insulin and IGF-like signaling*) et plus généralement de l'axe somatotrope des vertébrés ont été retrouvées, associées à des phénotypes dont la durée de vie était allongée. Les souris Snell et Ames caractérisées par un nanisme important (environ 60 % de la taille d'une souris WT) et dont les facteurs de transcription hypophysaires sont mutés, ont une durée de vie augmentée de 40 à 60 % tous sexes confondus (Junnila et al. 2013). Des mutations du récepteur à la GHRH augmentent également la durée de vie d'environ 20 %. Une absence constitutive de GHR ($Ghr^{-/-}$), qui s'apparente au syndrome de Laron humain, augmente la longévité de 26 à 40 %, en fonction du fond génétique. Ces souris ont des forts taux de GH et des très faibles taux d'IGF-1 en aval. Elles sont naines (40 % taille du WT), hypofertiles, obèses, mais néanmoins sensibles à l'insuline (Coschigano et al. 2003). De façon intéressante, des altérations spécifiques de la signalisation IGF augmentent également la longévité, mais sans incidence, ou seulement dans une faible mesure, sur la taille et la fertilité des souris. Les souris hétérozygotes $Igf1r^{+/-}$ sont plus longèves de 26 % en moyenne et sont seulement 10 % plus petites que les souris contrôles (Holzenberger et al. 2003). Ce phénotype de longévité semble d'autant plus marqué que les niveaux d'IGF-1 circulants et de la signalisation IGF sont constitutivement élevés dans le fond génétique considéré (Xu et al. 2014). La suppression d'IRS1 augmente également de 17 % la durée de vie (Selman et al. 2008). Il est intéressant de noter que ces deux mutants présentent une résistance à l'insuline. En effet, la sensibilité à l'insuline semble inversement corrélée à la longévité comme le souligne l'étude de Nelson et al. Ils ont constaté que des souris hétérozygotes $Ir^{+/-}$, dont la sensibilité à l'insuline était réduite, vivaient aussi longtemps en moyenne que leurs contrôles alors qu'une augmentation constitutive de la sensibilité à l'insuline, par *knockout* de la phosphatase PTP-1B notamment, réduisait d'environ 15 % la durée de vie de ces souris (Nelson et al. 2012).

En plus de vivre plus longtemps sous un tonus somatotrope plus faible, l'organisme semble vieillir en meilleure santé, dans le sens où les pathologies associées à l'âge sont moins fréquentes ou apparaissent plus tardivement. L'incidence de tumeurs est diminuée par rapport aux populations contrôles chez les souris Snell et $Ghr^{-/-}$, alors que des niveaux de GH et d'IGF-1 élevés, chez des souris transgéniques ou chez l'homme, sont associés au développement de différents types de cancers (Junnila et al. 2013). En

outre, une réduction de la signalisation IGF semble protéger les souris d'un certain nombre de maladies neurodégénératives (voire Chapitre 2 partie III). Concernant le diabète de type 2 et les pathologies cardiaques, les résultats sont plus mitigés et les effets bénéfiques/néfastes d'une réduction du système GH/IGF apparaissent comme très dépendants de la période de la vie à laquelle cette baisse du tonus somatotrope intervient, de sa durée et de son ampleur (Milman, Huffman, et Barzilai 2016).

Chez l'homme, en plus des mutations retrouvées dans le gène IGF1R chez les centenaires Ashkénazes (Suh et al. 2008), des variants des gènes des effecteurs de la signalisation IGF, comme AKT1, FOXO3A, et FOXO1A, ont aussi été identifiés dans différentes cohortes d'individus particulièrement longèves (Milman, Huffman, et Barzilai 2016; Wrigley, Arafa, et Tropea 2017). Une autre intervention, non génétique, mais qui diminue néanmoins la signalisation IGF et permet d'augmenter la longévité est la restriction calorique.

c) Signalisation IGF et cerveau

Après m'être intéressée à l'impact de la signalisation IGF-1 et de l'axe somatotrope sur l'organisme entier, je me focaliserai par la suite sur les effets centraux de ce système. L'IGF-1 a des effets particuliers sur le SNC, et certains des effets systémiques comme la régulation de la longévité découlent même directement d'une régulation centrale de la signalisation IGF-1. L'IGF1R est exprimé par les neurones, la macroglie et les cellules du réseau vasculaire selon un pattern d'expression stable des stades précoces du développement jusqu'à l'âge adulte. L'expression physiologique des IGF1R centraux au cours du vieillissement est peu étudiée et les rares études à ce sujet dans la littérature se contredisent, une étude montrant une augmentation de l'expression du récepteur dans l'hippocampe et une autre une densité plus faible de récepteurs dans le cortex et l'hippocampe chez des rats âgés (Wrigley, Arafa, et Tropea 2017). Les régions très denses en neurones sont particulièrement enrichies en IGF1R. L'IGF1R est activé d'une part par l'IGF-1 produit localement par les astrocytes et les neurones, entre autres, et d'autre part par l'IGF-1 systémique. Les niveaux d'IGF-1 centraux sont effectivement suppléés par l'IGF-1 périphérique qui peut traverser la BHE par transcytose après sa liaison à son récepteur à la surface des cellules endothéliales, une fois qu'il est libéré par les IGFBP du sang.

i. IGF-1 et développement du système nerveux

Au cours du développement la production autocrine d'IGF-1 est importante pendant la période néonatale. L'expression d'IGF au niveau cérébral atteint un pic dans les premières semaines postnatales puis redescend rapidement à un bas niveau au cours de la vie de l'individu. Des études de surexpression d'IGF-1 et d'inhibition ou de réduction génétiques de l'expression d'IGF-1 ou de son récepteur ont montré l'importance de ce facteur dans le développement du SNC et dans son rôle autocrine pro-prolifératif. La signalisation IGF-1 est impliquée dans la neurogenèse embryonnaire et joue un rôle dans la prolifération des progéniteurs neuraux, la migration neuronale et la maturation neuronale dont la formation des synapses et le développement axonal (Dyer et al. 2016). Sans IGF-1, la structure du cerveau est normale, mais sa taille et son poids sont réduits de près de 40 % et correspondent anatomiquement à une réduction d'épaisseur des structures. Une suppression homozygote d'IGF1R spécifiquement dans le cerveau au cours du développement provoque un sévère retard de croissance et une microcéphalie (Kappeler et al. 2008). Liu et al, concluent que l'IGF1R est essentiel au développement et à la complexité de l'hippocampe (W. Liu et al. 2009). Il semblerait plutôt que l'expression d'une seule copie du gène soit nécessaire mais suffisante au rôle neurotrophique de l'IGF-1 dans le développement cérébral (Kappeler et al. 2008).

ii. La signalisation IGF1R dans les différents types cellulaires du SNC

Hors période neurodéveloppementale, l'IGF-1 a d'autres effets pléiotropes sur les différentes populations de cellules du SNC. La signalisation IGF-1 neuronale est notamment impliquée dans la neurogenèse adulte, la plasticité et transmission synaptique et la morphologie neuronale. La neurogenèse est stimulée suite à une injection systémique d'IGF-1 sur quelques jours (Aberg et al. 2000), mais de façon surprenante, l'absence prolongée de signalisation IGF-1 dans les cellules souches neurales augmente, sur le long terme, la production de neuroblastes dans la zone sous-ventriculaire et favorise l'intégration des néo-neurones dans le bulbe olfactif chez la souris adulte (Chaker et al. 2015). Dans un contexte similaire, Chaker et al ont également démontré que la neurogenèse hypothalamique adulte était également régulée à la hausse par la suppression d'IGF1R dans les cellules souches neurales. Cette neurogenèse hypothalamique accrue produit des néoneurones qui s'intègrent dans différents noyaux

hypothalamiques en plus grand nombre et qui contribuent à la plasticité du système neuroendocrine au cours du vieillissement (Chaker et al. 2016). En ce qui concerne l'activité électrophysiologique du neurone, L'IGF1R régule dans les neurones hippocampiques la libération des vésicules présynaptiques en limitant les phénomènes de neurotransmission spontanés et en favorisant le mécanisme de libération vésiculaire déclenché par des potentiels d'action (PA) (Gazit et al. 2016). Une étude plus récente sur les neurones pyramidaux de la couche 5 du cortex préfrontal a montré qu'à l'inverse, la stimulation de la signalisation IGF1R diminuait la transmission synaptique évoquée par des PA (S. Yue, Wang, et Wang 2022). Les auteurs ont également constaté en parallèle une réduction des eEPSCs (*evoked Excitatory PostSynaptic Currents*) qui s'accompagnait d'une diminution de l'expression membranaire de GluR1 et GluR2 et d'une endocytose accrue de récepteurs AMPA au niveau post-synaptique. Leurs résultats suggèrent que la stimulation d'IGF1R par IGF-1 dans les neurones pyramidaux réduit la transmission synaptique. Par ailleurs, la signalisation de ce récepteur, en coopération avec la mitochondrie, est également impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique du neurone pour assurer une réponse électrique adaptée (Katsenelson et al. 2022). *In vivo*, notre laboratoire a montré que la suppression d'IGF1R dans les neurones post-mitotiques glutamatergiques du cerveau antérieur renforçait la neurotransmission du glutamate (De Magalhaes Filho et al. 2017), ce qui est en accord avec ce qui a été depuis montré *in vitro* par Yue et al. Enfin, un autre effet neuronal que nous pouvons citer et qui nous intéressera particulièrement dans les prochaines parties de ce manuscrit, est la régulation de la morphologie et de la taille neuronale par la signalisation IGF (Gontier et al. 2015).

Le récepteur à l'IGF-1 a également un rôle dans la maturation, la myélinisation et le nombre d'oligodendrocytes du SNC. Au niveau des astrocytes, le système IGF régule le nombre d'astrocytes et de leurs *gap junctions* spécifiques (Dyer et al. 2016). Des travaux ont montré que l'absence d'IGF1R spécifiquement au niveau des astrocytes *in vitro* affectait la capacité de ces cellules à servir de supports métaboliques aux neurones en condition de stress (Ratcliffe et al. 2018). D'autres travaux ont mis en évidence l'importance du maintien de la signalisation IGF-1 astrocytaire à court terme dans les processus de phagocytose (Pinto-Benito et al. 2022), la prévention de l'excitotoxicité *in vitro* (Chen et al. 2019) ainsi que son implication *in vivo* à long terme dans le couplage neurovasculaire (Tarantini et al. 2021).

iii. Effets bénéfiques ou délétères de la signalisation IGF1R cérébrale au cours de la vie de l'individu

Des stades embryonnaires à l'individu vieillissant, chaque période de vie d'un individu semble caractérisée par un tonus somatotrope qui lui est propre. Si les niveaux de signalisation GH et IGF requis pour assurer un développement embryonnaire, postnatal et pubertaire physiologique sont bien décrits, les avis divergent quant à l'impact de modulations du système IGF au cours du vieillissement. En ce qui concerne le cerveau, deux points de vue s'opposent au sein de la communauté scientifique. Il y a d'un côté les chercheurs qui prônent l'hypothèse qu'IGF-1, en tant que facteur trophique, est une hormone neuroprotectrice dont la diminution au cours du vieillissement est un signe de détresse cellulaire et une conséquence délétère du vieillissement. A l'opposé, une autre partie de la communauté scientifique argumente plutôt en faveur d'une diminution physiologique de la signalisation IGF1R et soutient que de faibles niveaux de cette signalisation seraient plutôt bénéfiques et conféreraient une résistance cellulaire accrue aux cellules du SNC. La disparité des résultats à l'appui de ces hypothèses en apparence contradictoires est assez surprenante.

Les travaux de l'équipe de Torres-Aleman ont extensivement étudié les effets d'IGF-1 sur la physiologie cérébrale et ont démontré des effets bénéfiques de la supplémentation en IGF-1 sur le cerveau. On peut notamment citer leur papier de 2002 qui montre premièrement qu'après injection de peptides A β dans le cortex de souris préalablement injectées ponctuellement de façon systémique avec de l'IGF-1, on retrouve majoritairement l'A β injecté dans le LCR par la suite. Ils montrent également que dans un modèle de souris Alzheimer, une injection systémique d'IGF-1 pendant 1 mois permet de réduire la charge amyloïde dans le parenchyme de ces souris (Carro et al. 2002). D'autres travaux plus récents montrent notamment que l'IGF-1 produit de façon autocrine par les astrocytes protège les neurones contre une excitotoxicité (Chen et al. 2019) et favorise la survie neuronale, notamment en stimulant au niveau des membranes neuronales des processus d'endocytose puis de relargage d'A β o dans l'ECS (Pitt et al. 2017).

A l'inverse, l'ensemble des travaux cités dans les paragraphes précédents est largement en faveur de l'hypothèse selon laquelle une réduction de la signalisation IGF à l'âge adulte, en particulier au niveau

neuronal, a des effets bénéfiques sur la physiologie cérébrale et le vieillissement. On peut alors se demander si cette apparente incohérence dans les résultats n'est pas due à des fenêtres temporelles d'action différentes. Les effets bénéfiques d'une augmentation de la signalisation IGF-1 ont été essentiellement mis en évidence par des stimulations d'IGF-1 courtes ou ponctuelles et en mesurant leurs effets à court terme. Quelques travaux analysent des modifications de la signalisation IGF sur le moyen terme et relèvent des inconvénients à réduire la signalisation IGF au niveau central. Soto et al. démontrent notamment qu'en supprimant à la fois la signalisation IR et IGF1R dans l'hippocampe, on observe une diminution des GluA1 (action sur plasticité synaptique), des déficits cognitifs et une augmentation du comportement anxieux au bout de 8 semaines (Soto et al. 2019). Il est toutefois très important de noter que dans cette étude, les mutations affectent l'ensemble des cellules nerveuses et que deux mois ne représentent qu'une courte période comparée à la durée de vie de l'animal. Nieto-Estévez et al. remarquent quant à eux, que l'absence de production d'IGF-1 dans l'hippocampe altère la neurogenèse hippocampique adulte et la différenciation des progéniteurs en cellules granulaires matures, sans pour autant diminuer le pool de progéniteurs (Nieto-Estévez et al. 2016).

Ces données suggèrent donc que la signalisation IGF-1 peut toujours être bénéfique au cours du vieillissement si elle reste limitée dans le temps. Les potentiels effets bénéfiques sur le long terme d'une stimulation IGF-1 restent à prouver. En revanche, d'après les travaux de notre laboratoire et d'autres équipes sur le long terme, c'est la réduction de la signalisation IGF1R au niveau cérébral qui semble être le plus bénéfique pour les neurones. Comme nous l'avons vu, ce fait est à moduler pour les autres populations du SNC. Si on considère que dans le modèle IGF1R KO neuronal, l'IGF-1 est augmenté dans le plasma, on pourrait alors envisager que l'IGF-1 ait des effets bénéfiques via son action sur les cellules gliales et/ou endothéliales qui possèdent toujours le récepteur présent au niveau de leur membrane. Creuser cette question permettrait peut-être de réconcilier les deux positions des experts du système IGF.

II. Le système IGF : un régulateur de la taille cellulaire

L'IGF est un régulateur majeur de la croissance à différentes échelles, à la fois à l'échelle de l'organisme, du tissu, mais également à l'échelle cellulaire. Le processus de croissance dépend de la croissance cellulaire d'une part, c'est-à-dire l'augmentation en taille et en masse de la cellule, et de la prolifération cellulaire d'autre part, qui repose sur sa capacité à se diviser. Ces deux mécanismes peuvent être découplés, dans le cadre de la différenciation cellulaire ou dans les premières étapes de la division d'une cellule œuf par exemple, ou co-actifs comme dans la majorité des processus de proliférations cellulaires qui génèrent des cellules filles de tailles identiques à la cellule mère comme c'est le cas pour l'expansion clonale des lymphocytes B et T, par exemple.

a) Détermination et physiologie de la taille cellulaire

La taille cellulaire est déterminée par sa composante massique, qui résulte de l'équilibre entre l'accumulation de macromolécules et leur élimination, et sa composante volumique. Les changements de masse ou de volume cellulaires dans une période de temps donnée sont la conséquence à la fois des processus de biosynthèse et des voies de dégradation intracellulaires, mais également des mécanismes d'import ou d'export de masse d'une part, par l'intermédiaire des processus d'endo- et d'exocytoses de molécules, et de volumes d'eau d'autre part, via les flux hydriques qui maintiennent l'équilibre osmotique (Cadart et al. 2022). Une étude de la fin des années 90 sur des neurones sensoriels a permis de mettre en évidence que la régulation de la masse cellulaire était assurée par un couplage des processus de biosynthèse et de dégradation et qu'ils étaient inversement proportionnels afin de maintenir une certaine taille cellulaire neuronale (Lloyd 2013). En ce qui concerne le volume cellulaire, on considère classiquement l'augmentation en volume de la cellule comme une conséquence de la prise de masse cellulaire. Ces deux processus sont effectivement intimement liés, mais pourraient également fonctionner de façon indépendante. Des études récentes sur des cellules en culture ont montré que des variations de volume cellulaire n'étaient pas strictement juxtaposables aux variations massiques (Cadart et al. 2022) et que la régulation du volume cellulaire pouvait être indépendante de la signalisation mTOR et de la synthèse protéique (Perez-Gonzalez et al. 2019).

b) Les facteurs de croissance et autres protéines impliqués dans la régulation de la taille cellulaire

La croissance cellulaire est contrôlée majoritairement par des signaux extrinsèques. Malgré la présence de nutriments dans le milieu, sans signal mitogène ou facteur de croissance la cellule ne déclenche pas de réponse trophique. Elle nécessite pour cela des signaux extrinsèques qui activent des voies de signalisation dédiées pour croître ou se diviser.

i. Les signaux trophiques

Les signaux extracellulaires impliqués dans la croissance cellulaire sont les mitogènes, les facteurs de croissance, la concentration en nutriments, des signaux mécaniques et le stress. L'IGF-1 est un facteur de croissance à la fois local et systémique qui est un régulateur essentiel de la croissance de l'organisme, comme décrit dans la partie précédente, mais également un régulateur clé de la taille cellulaire pour une grande variété de types cellulaires. Parmi les signaux trophiques plus « cellules spécifiques », on peut citer la myostatine au niveau des cellules musculaires, qui active la voie myostatin/SMAD2/3, l'IL3 (*interleukine 3*) qui active à la fois la prolifération et la croissance cellulaire des lymphocytes B, ou encore le GDF11 (*Growth differentiation factor 11*) qui régule négativement la taille des myocytes cardiaques (Loffredo et al. 2013). Au niveau du SN, les neurotrophines comme NGF sont produites par les cellules cibles des neurones pour diriger la croissance axonale, mais également pour contrôler la taille neuronale dans son ensemble afin que cette dernière s'adapte à la taille de sa cellule cible. Les neurégulines NRG sont à la fois des mitogènes et des facteurs trophiques pour les cellules de Schwann puisqu'elles régulent la myélinisation et donc l'épaisseur et le volume de la cellule (Lloyd 2013). Certains types cellulaires perçoivent également les contraintes mécaniques de leur environnement par l'intermédiaire de mécanosenseurs qui traduisent ces signaux mécaniques en signal trophique et régulent ainsi la taille cellulaire, comme c'est essentiellement le cas pour les cellules ciliées des tubules rénaux ou les cellules musculaires squelettiques.

Dans quelques cas la croissance cellulaire peut être stimulée par des signaux intrinsèques. Notamment en cas d'endoréplication et de polyploïdie, la taille cellulaire est augmentée. Un signal intrinsèque peut

également provenir d'une mutation perte ou gain de fonction d'un des éléments des cascades de signalisation qui régulent la taille cellulaire. Par exemple, le gène suppresseur de tumeur Rb est un régulateur de la taille cellulaire qui est fréquemment muté dans un certain nombre de tumeurs (Lloyd 2013).

ii. Les voies de signalisation et les facteurs intracellulaires qui régulent la taille cellulaire

La voie de signalisation classique qui régule la taille cellulaire est la cascade IGF1R/PI3K/AKT/mTORC1 (Fig. 10). Le facteur mTORC1 pour *mammalian target of rapamycin complex 1*, est composé de mTOR et de cofacteurs (raptor, mLST8, deptor, PRAS40) qui activent les voies de biosynthèse et inhibent les voies cataboliques de la cellule. mTORC1 est un médiateur central de la réponse trophique cellulaire car c'est à partir de ce complexe activé qu'ont lieu la stimulation de la biosynthèse protéique, via les phosphorylations activatrice de la S6-K et inhibitrice de la 4E-BP1 (*eIF4E binding protein 1*), l'induction de la synthèse lipidique, via l'activation de facteurs de transcription impliqués dans l'expression de gènes lipogéniques, et l'inhibition de l'autophagie notamment (Laplane et Sabatini 2013). En plus d'être une plaque tournante de cette cascade de signalisation, mTORC1 intègre également des signaux comme le stress, le statut énergétique, et les niveaux d'oxygène et d'acides aminés. Par exemple, la cascade de signalisation des mécanosenseurs implique mTOR, mais est indépendante de la voie PI3K/Akt (Lloyd 2013). En amont de mTOR et en aval de Akt, d'autres facteurs interviennent dans la régulation de la taille cellulaire, comme TSC1/2 qui déphosphorylent et inhibent Rheb, un activateur de mTORC1 (Laplane et Sabatini 2012). mTORC1 agit également dans un rétrocontrôle négatif sur l'IRS afin de *down-réguler* la signalisation d'IGF1R, ce qui permet en partie de maintenir une certaine homéostasie de la taille cellulaire. PTEN est un autre inhibiteur majeur de la signalisation IGF1R/Akt/mTOR. Son activité phosphatase dégrade le produit de la PI3K.

Un autre régulateur majeur de la taille cellulaire est le facteur Myc. Ce facteur régulateur de transcription, traduction et de répllication entre autres, favorise la prolifération et la croissance cellulaires (Baena et al. 2005). Ses mécanismes d'action sur la taille cellulaire se traduisent par une stimulation de la biosynthèse

protéique, une augmentation de la taille nucléaire et une augmentation de la biogénèse des ribosomes (Fig. 10) (van Riggelen, Yetil, et Felsher 2010).

Enfin, la voie de signalisation Hippo est impliquée dans la régulation de la taille des tissus. Initialement décrite comme agissant essentiellement sur la prolifération cellulaire et inhibant l'apoptose, elle était présentée comme le pendant de la signalisation mTOR dans la croissance cellulaire (Tumaneng, Russell, et Guan 2012). L'un de ses principaux effecteurs est le facteur de transcription YAP qui active un certain nombre de gènes pro-prolifératifs et anti-apoptotiques (Fig. 10). Récemment, des chercheurs ont mis en évidence l'implication de la voie Hippo et du facteur YAP, conjointement avec le facteur TAZ, dans la régulation du volume cellulaire au cours du cycle cellulaire et ce de façon mTOR-indépendante (Perez-Gonzalez et al. 2019). Les chercheurs de cette étude mettent également en évidence que YAP est un régulateur de la pression intracellulaire et suggèrent que YAP/TAZ pourrait jouer un rôle de mécanosenseur et de régulateur du cytosquelette. YAP exerce par ailleurs une action positive sur la voie PI3K/Akt en inhibant PTEN. Des travaux sur la Drosophile suggèrent d'important cross-talk entre les voies de signalisation PI3K/Akt, Myc et Hippo (Lloyd 2013).

Un dernier régulateur de la taille cellulaire intéressant que nous pourrions citer est le cotransporteur ionique NKCC1, *Na⁺/K⁺/2Cl⁻ ion transporter 1*. Ce transporteur contrôle à la fois le volume neuronal, car il régule la répartition ionique de part et d'autre de la membrane et régule donc aussi les flux d'eau, mais également la masse de la cellule via son inhibition conjointe d'Akt et de Erk (Demian et al. 2019). L'inhibition de NKCC1 provoque une réduction du volume cellulaire *via* une diminution de la concentration intracellulaire de Na⁺ qui engendre un efflux d'eau vers l'ECS. En parallèle, son inhibition indirecte de mTORC1 favorise la prolifération cellulaire.

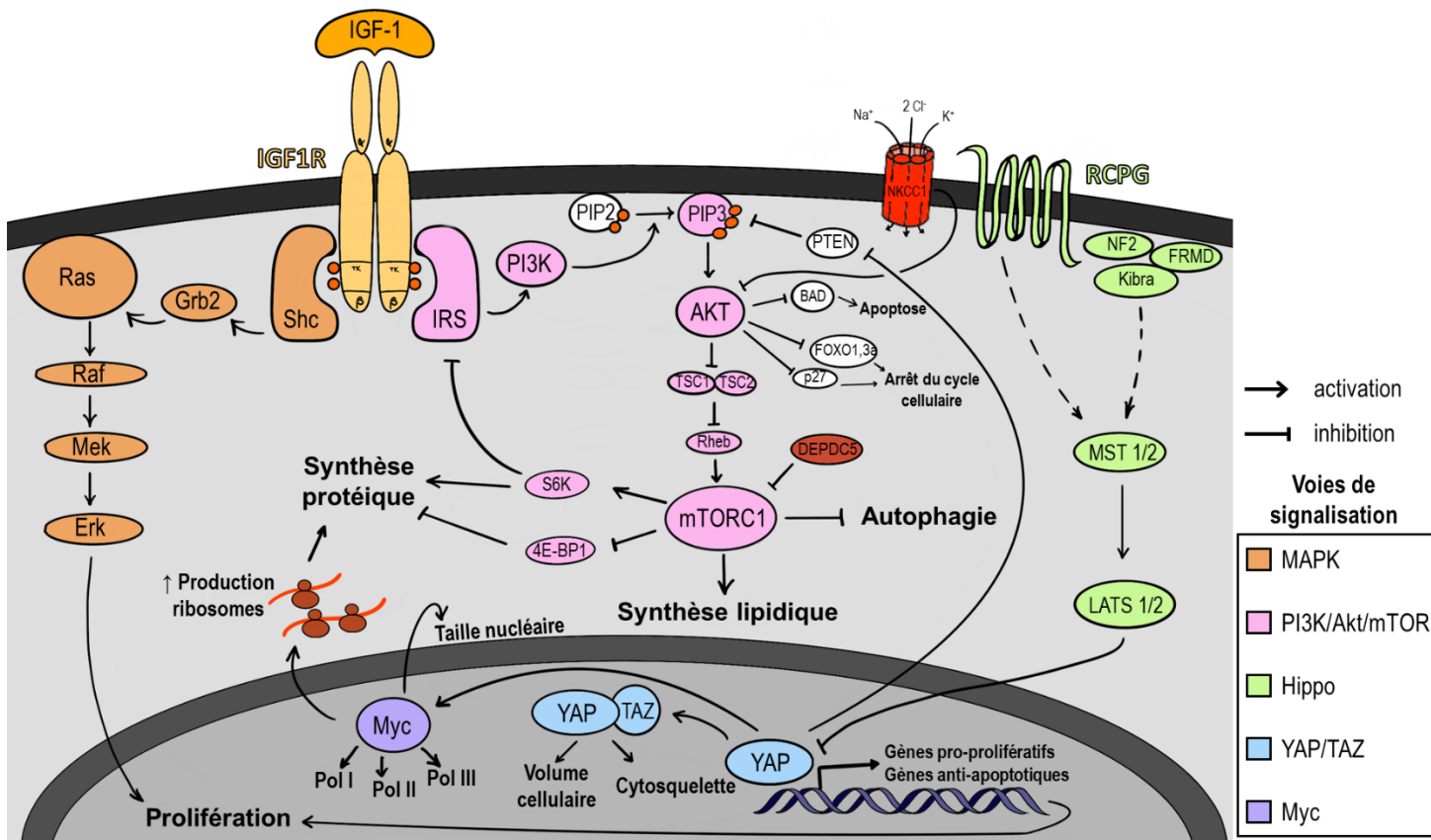


Figure 10. Acteurs de la régulation de la taille cellulaire

Voies de signalisation impliquées dans la régulation de la taille cellulaire, en aval du récepteur à l'IGF-1 (IGF1R) indépendantes. Détails de quelques-unes de leurs actions, des voies métaboliques dans lesquelles elles sont impliquées et des *crossstalks* entre elles. Les ronds orange symbolisent l'activation par la phosphorylation de certains résidus, ils ne sont montrés que pour IGF1R et PIP2. RCPG, Récepteur couplé aux protéine G ; Pol, Polymérase ; TK, domaines tyrosine kinase ; MAPK, *Mitogen activated protein kinase* ; PI3K, *Phosphatidylinositol triphosphate kinase*.

c) Taille cellulaire et cerveau

i. Ambivalence de la taille des cellules nerveuses

La taille cellulaire est intimement liée à l'activité métabolique et à la dépense énergétique cellulaire. Une grande cellule est une cellule à forte activité métabolique ou une cellule de stockage de réserves. Le cerveau étant l'un des organes les plus métaboliquement actifs de l'organisme, les cellules nerveuses, et particulièrement les neurones, occupent un volume non négligeable et possèdent une certaine taille sub-optimale de fonctionnement. Sachant que ces cellules sont contenues dans un espace contraint inextensible comme la boîte crânienne, elles ne peuvent pas non plus excéder une certaine taille.

La régulation de la taille cellulaire dans le SNC est donc un paramètre nécessairement finement régulé et d'une importance cruciale pour la physiologie cérébrale.

En dehors de cas pathologiques et d'inflammation réactionnelle les cellules gliales ont une taille globalement stable, mis à part les astrocytes dont le volume fluctue physiologiquement en fonction de l'activité neuronale (Walch et Fiacco 2022). La fonction d'une cellule gliale dépend de son volume. Plus la cellule est volumineuse et plus elle peut établir de contacts avec les cellules environnantes. Or, plus la cellule est volumineuse et établit de contacts, plus ses besoins énergétiques augmentent. En effet, en augmentant son volume, elle augmente potentiellement sa surface ce qui consomme un surcroît d'énergie pour maintenir le potentiel de membrane. Une taille trop importante de la cellule gliale pourrait donc altérer la capacité de l'astrocyte à jouer son rôle de support métabolique au niveau des synapses, de l'oligodendrocyte à myéliniser efficacement tous ses contacts, et de la microglie à dégrader l'ensemble des débris cellulaires qu'elle phagocyte (Herculano-Houzel et Dos Santos 2018). Cette limite biologique de la taille imposée par la fonction métabolique pourrait également s'appliquer au neurone. Enfin, une étude de 2018 a mis en évidence que l'âge augmentait la taille des cellules microgliales, et leur immunoréactivité, sans affecter celle des astrocytes (Chan et al. 2018).

Les neurones représentent un type cellulaire extrêmement diversifié dans leurs forme, taille et volume dans les différentes régions cérébrales et les différentes espèces de vertébrés. Un neurone peut aussi bien être une petite cellule stellaire ou un interneurone avec un petit corps cellulaire de quelques microns et peu de dendrites, qu'un motoneurone dont l'axone peut mesurer jusqu'à plus d'1 mètre chez l'homme, ou encore qu'une cellule de Purkinje dont le diamètre somatique peut mesurer une centaine de μm . Cette diversité de morphologies et de taille neuronale semble être en partie dépendante de la taille de l'organisme (Savage et al. 2007). La taille de l'axone est régulée par des facteurs de croissance sécrétés par des cellules cibles, mais peut également être contrôlée de façon intrinsèque. De la même manière, il a été montré que des neurones corticaux étaient capables d'adapter leur arborisation dendritique de façon cellule-autonome (S. Liu et al. 2022). La forme d'un neurone, qui dépend de sa taille et de son volume, et la fonction de ce neurone sont interdépendantes. C'est sa morphologie particulière qui lui permet d'établir des contacts synaptiques locaux ou à distance, et la plasticité de cette forme qui lui permet de

moduler le message nerveux. Au-delà de cette simple relation structure-fonction, il est important de s'intéresser à la relation volume-fonction du neurone.

De la même manière que les cellules gliales, le neurone a une très forte activité métabolique. La machinerie métabolique et l'énergie produite par le neurone sont essentiellement dédiées à ses transports intracellulaires et vésiculaires et au maintien de son potentiel membranaire. Le neurone n'ayant que peu de réserves énergétiques, si le volume neuronal devient trop important, les capacités métaboliques du neurone sont dépassées et il n'est plus en mesure d'assurer à la fois une neurotransmission efficace et le maintien du potentiel de repos. A l'inverse, afin d'assurer l'activité métabolique nécessaire à ses fonctions électro-physiologiques, le neurone doit maintenir une masse cellulaire, en termes de quantité de transcrits et de protéines, minimale. En conditions physiologiques, et moyennant une certaine plasticité au niveau de ses prolongements, le neurone fonctionne donc dans une gamme de taille cellulaire assez restreinte afin de préserver l'intégrité des circuits neuronaux.

Comme nous l'avons vu, du fait que le neurone n'a que de faibles réserves énergétiques, il dépend beaucoup des signaux trophiques extrinsèques et de l'apport nutritif de son environnement et il est donc par la même occasion sensible à de faibles variations dans la composition de cet environnement. Des conditions d'hypoxie ou d'acidose peuvent modifier radicalement l'environnement et engendrer des modifications de volumes majeurs qui peuvent avoir de fortes répercussions sur la physiologie cérébrale (Toney 2010). De la même manière, des modifications importantes de la taille cellulaire à plus long terme peuvent être à l'origine d'un certain nombre de pathologies. Enfin, étant donnée leur présence dans un environnement contraint, on pourrait envisager que les cellules du SNC subissent des contraintes mécaniques qui pourraient directement réguler leur taille cellulaire, d'une manière similaire à ce qui est décrit pour la cellule musculaire lors de l'exercice physique (Lloyd 2013).

ii. Les pathologies ou syndromes associés à une augmentation ou une diminution de la taille cellulaire

La dérégulation de la taille cellulaire est une caractéristique commune à de nombreuses pathologies comme le cancer, l'hypertrophie cardiaque et un certain nombre de pathologies neurodéveloppementales. Des cellules cancéreuses modifient par exemple leur forme lors de la transition épithélio-mésenchymateuse et prolifèrent de façon incontrôlée. L'hypertrophie cardiaque est caractérisée par un grossissement des cardiomyocytes qui aboutit à une baisse de la contractilité et une insuffisance cardiaque à terme. La sclérose tubéreuse provoquée par des mutations dans les gènes TSC1 et TSC2 (inhibiteurs de Rheb) aboutit à une surcroissance cellulaire et au développement d'hamartomes au niveau périphérique et central.

Au niveau cérébral, on trouve des pathologies du système nerveux aussi bien associées à des augmentations de la taille neuronale qu'à des réductions de leur volume. Les mutations de TSC1 et 2 ont également des répercussions au niveau cérébral. Elles provoquent une hypertrophie des neurones et sont associées à des crises d'épilepsie et des altérations des fonctions cognitives et comportementales (Parenti et al. 2020). Le syndrome de Lhermitte Duclos est causé par une hypertrophie neuronale des neurones du cervelet qui engendre des crises d'épilepsie, des hydrocéphalies et une hypertension intracrânienne (Kwon et al. 2001). La taille neuronale semble également être affectée dans les troubles autistiques. Néanmoins les résultats sont assez divergents puisque la maladie est parfois associée à des neurones de taille réduite et parfois à des neurones hypertrophiés. Jacot-Descombes et al. ont mis en évidence que les neurones pyramidaux de certaines régions du cortex frontal de patients atteints d'autisme étaient de petite taille (Jacot-Descombes et al. 2012). À l'opposé de cette observation, une étude de 2019 de l'équipe de Ben-Ari démontre que les neurones pyramidaux hippocampiques sont hypertrophiés à la naissance chez des souris modèle de l'autisme, ce qui corrobore des observations faites sur des enfants et adolescents atteints d'autisme qui ont des cerveaux plus volumineux que des patients normotypiques (Cloarec et al. 2019). La schizophrénie est caractérisée par une atrophie corticale, ce qui a poussé des chercheurs à s'intéresser à la densité et la taille des cellules pyramidales de ces patients. Ils ont mis en évidence une réduction du volume somatique des neurones pyramidaux

du cortex préfrontal et du cortex auditif chez ces patients mais n'ont pas relevé de différences de densité neuronale ou gliale entre les groupes sains et malades (Sweet et al. 2003). Au cours d'accidents vasculaires ischémiques, la modification de l'osmolarité induite par la privation en O₂ et l'arrêt des transports actifs ioniques notamment, entraîne dans un court intervalle de temps, une augmentation du volume des cellules et donc du volume neuronal. À l'instar de la schizophrénie, la dépression chez les personnes âgées a également été associée à une réduction de la taille des cellules pyramidales du cortex préfrontal sans que cela affecte leur densité (Khundakar et al. 2009). Enfin, dans un contexte de démence vasculaire post-AVC ou associée à une maladie d'Alzheimer, Foster et al. ont mis en évidence une réduction du volume des cellules pyramidales de 30 à 40 % dans le cortex préfrontal (Foster et al. 2014).

Dans l'ensemble, il semblerait que les pathologies neurodéveloppementales soient plutôt associées à une augmentation de la taille neuronale alors que les pathologies liées à l'âge sont plutôt associées à une réduction du volume neuronale, et ce en l'absence de neurodégénérescence (Fig. 11). On pourrait alors conclure que la réduction de taille cellulaire est un des effets délétères de ces pathologies. Néanmoins, dans la mesure où les études ne retrouvent pas systématiquement de dégénérescence associée, on pourrait également imaginer que ce changement de phénotype révèle plutôt un mécanisme de protection du neurone contre la pathologie. Le neurone adopterait cette forme plus résistante dans les premiers stades de développement de la maladie, et on visualiserait cette forme après un certain temps, quand la pathologie a finalement pris le dessus, et a, dans certains cas comme Alzheimer, déjà cause une mort neuronale.

d) Importance de la taille et de la plasticité neuronale dans la physiologie cérébrale

i. Relations entre taille neuronale et ECS

Le neurone est une cellule différenciée, statique, spécialisée, et dont la plasticité structurale concerne essentiellement les synapses, soit une fraction de ses prolongements cytoplasmiques. La taille neuronale prend en compte à la fois la longueur des prolongements, mais également la taille du soma et les volumes que ces éléments occupent respectivement. La majorité des cellules sorties du cycle cellulaire à l'âge

adulte ne subissent plus de modifications majeures de leur taille. Cela est d'autant plus nécessaire pour les neurones, qui sont intégrés dans un réseau complexe et étendu, qui établissent un très grand nombre de contacts pré et post-synaptiques, qui sont en étroite relation avec les vaisseaux et les cellules gliales et qui ne sont pas remplaçables de surcroît. Malgré l'apparente rigidité de cette organisation, les neurones n'en sont pas moins dans un environnement changeant. Comme l'ont montré Xie et al, l'ECS environnant peut varier en volume de près de 60 % sur quelques heures (Lulu Xie et al. 2013). Ces cellules post-mitotiques doivent donc conserver une certaine adaptabilité de leur taille et de leur morphologie. C'est le cas au niveau de leur axone, qui a une certaine capacité à se régénérer, de leurs dendrites et de leurs synapses, mais qu'en est-il de leur corps cellulaire, qui occupe localement un volume très important dans le parenchyme ? En plus de maintenir une taille neuronale suffisante pour assurer la pérennité de ses contacts synaptiques, maintenir une taille neuronale, compatible avec la physiologie de l'ECS est essentiel à l'ensemble des processus que j'ai détaillé dans le chapitre I, comme la neurotransmission et la clairance cérébrale notamment. Du strict point de vue de la physiologie de l'ECS, une taille neuronale, et surtout une taille somatique trop importante pourrait bloquer ou limiter les flux de solutés interstitiels par exemple. C'est effectivement ce que suggèrent Denis Le Bihan et l'équipe de Xu. Ils constatent respectivement par IRM que l'activité neuronale est associée à une diminution de la diffusion de l'eau et au ralentissement de la clairance interstitielle d'un agent de contraste. Ils émettent alors l'hypothèse que cette limitation des flux de l'ECS est due à un gonflement cellulaire, c'est-à-dire une augmentation du volume neuronal et/ou astrocytaire (Shi et al. 2016; Le Bihan 2014). Le soma neuronal, de par sa taille et son volume par rapport au reste des compartiments neuronaux, représente un des obstacles majeurs à la diffusion dans l'ECS. C'est également le compartiment dont la plasticité morphologique peut être importante sans réellement impacter la morphologie des prolongements et la densité synaptique. Il semble donc essentiel que la taille neuronale somatique puisse s'adapter à des changements de l'ECS afin d'assurer les mouvements moléculaires interstitiels.

ii. Facteurs impliqués dans la régulation de la taille du soma neuronal

Quelques facteurs directement impliqués dans la régulation de la taille du soma de neurones différenciés ont été mis en évidence (Fig. 11). Un défaut de PTEN provoque une hypertrophie neuronale dans des neurones hippocampiques de souris adulte. Cette hypertrophie peut être réprimée et même inversée, avec un retour à une taille somatique physiologique, par une inhibition conjointe de mTOR (Kwon et al. 2003). Les travaux de Gärtner et al. ont montré qu'une activation constitutive de Ras dans des neurones post-mitotiques pyramidaux de l'hippocampe provoquait une augmentation de la taille et du volume de leur péricaryon sans modification de leur morphologie dendritique (Gärtner et al. 2004). Une autre étude de cette équipe a montré que des neurones pyramidaux du cortex dans lesquels Ras est constitutivement activée présentaient pareillement des somas plus grands, mais aussi une arborisation dendritique plus volumineuse (Alpár et al. 2003). La réduction ou la suppression de l'expression de DEPDC5, *Disheveled, Egl-10 and Pleckstrin (DEP) domain-containing protein 5*, un inhibiteur de mTORC1, provoque également une augmentation de la taille somatique et dendritique (Klofas et al. 2020; De Fusco et al. 2020). La neuregulin-4 intervient dans le contrôle de la taille du soma des neurones pyramidaux corticaux, au cours du développement postnatal au moins. Un défaut de NRG4 et de la signalisation Erb4 aboutit à une réduction du volume du soma de neurones pyramidaux des couches 2/3 et 5 (Paramo et al. 2021). Enfin, mon laboratoire a mis en évidence l'implication de IGF1R dans la régulation de la taille somatique du neurone post-mitotique.

Dans un modèle murin de KO IGF1R inductible et spécifique aux neurones, appelé inIGF1RKO, Gontier et al. ont montré que la suppression d'IGF1R à l'âge adulte dans des neurones pyramidaux provoquait une réduction efficace de leur taille (Fig. 11). La section transversale du soma des neurones IGF1R KO est réduite de 20 % en moyenne et se traduit par une réduction du volume occupé par le soma de 25 % par rapport au contrôle. Que le KO ait lieu à 2, 3 ou 16 mois d'âge ou que l'on s'intéresse à des neurones de souris jeunes (6 mois) ou âgées (> 22 mois), la réduction de la taille somatique est toujours présente et dans des proportions similaires (entre 20 et 30 %) (Gontier et al. 2015; George et al. 2017) (Camus et al, in prep.). Les neurones IGF1RKO des couches corticales 2, 3 et 5 ainsi que les neurones de la couche CA3 de l'hippocampe adoptent de la même manière ce phénotype somatique compact. Cette réduction

importante du volume du soma s'accompagne également d'un amincissement et d'un raccourcissement du dendrite primaire sans incidence pour autant sur le nombre de contacts synaptiques que le neurone IGF1R KO établi par rapport à un neurone contrôle (Gontier et al. 2015).

iii. Conséquences physiologiques d'une réduction de la taille somatique du neurone

La plasticité synaptique du neurone IGF1RKO est préservée et notre laboratoire a montré que la transmission synaptique était même plus efficace chez les souris mutantes (De Magalhaes Filho et al. 2017). Un neurone de taille réduite a une plus faible conductance, car moins de surface et donc il a une plus grande excitabilité. Cuntz et al., démontrent que pour une densité synaptique donnée, l'excitabilité neuronale est sensible au diamètre dendritique, mais indépendante de la longueur et de la complexité dendritique (Cuntz et al. 2021). L'excitabilité des neurones IGF1RKO devrait donc être légèrement augmentée et pourrait expliquer la transmission synaptique plus efficace mise en évidence par De Magalhaes Filho et al. D'autre part, le poids du cerveau de souris dont les neurones pyramidaux sont IGF1RKO est plus faible que celui de leurs contrôles, ce qui se traduit par un cerveau plus petit et plus compact. Malgré ces différences morphologiques, l'activité motrice, le comportement et les performances cognitives des souris mutantes ne montrent aucune différence par rapport aux souris contrôles (Gontier et al. 2015; De Magalhaes Filho et al. 2017). Les travaux du laboratoire montrent donc qu'un neurone post-mitotique est capable d'adapter sa taille, en la réduisant de façon importante, à n'importe quel âge, tout en maintenant des fonctions électrophysiologiques adaptées et sans affecter de façon majeure la physiologie globale de l'animal. Ce constat, alors que la morphologie du neurone est plus compacte et le corps cellulaire diminué de 25 % suggère une redondance dans la machinerie métabolique neuronale à l'état basal en présence d'IGF1R.

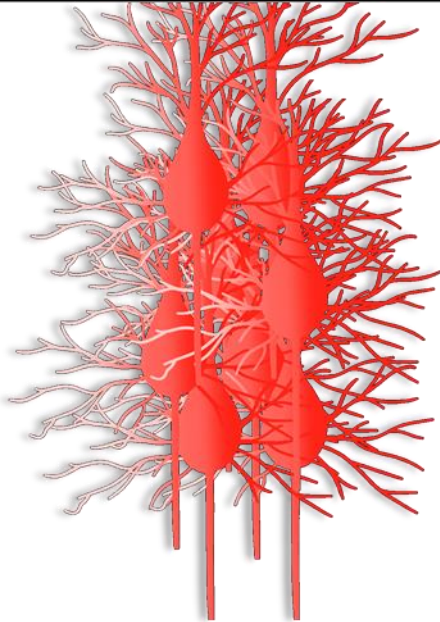
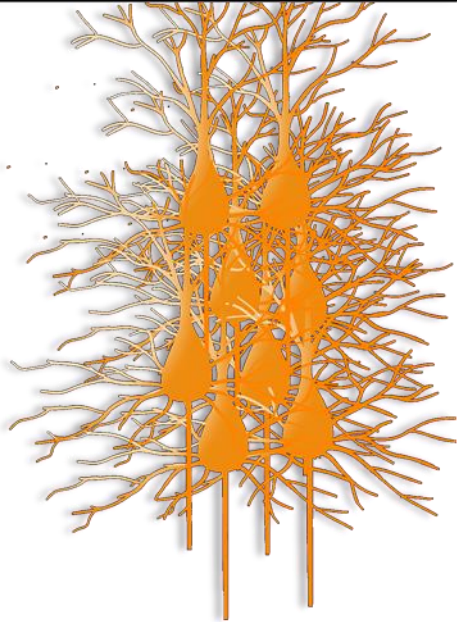
	Hypertrophie neuronale	Hypotrophie neuronale
Maladies	Crises d'épilepsie Maladie de Lhermitte Duclos Troubles du spectre autistique AVC ischémiques	Schizophrénie Dépression Démence post-AVC Maladie d'Alzheimer
Gènes dont la mutation provoque la morphologie hyper- ou hypotrophe	 Tsc1/2 Pten Depdc5 Ras ^{cst}	 Igf-1r Nrg4 mTOR

Figure 11. Pathologies dans lesquelles on retrouve des neurones plus volumineux ou plus petits que la normale et les gènes impliqués dans ces changements morphologiques
 AVC, Accidents vasculaires cérébraux. Ras^{cst} activation constitutive.

Nous allons voir dans la partie suivante que les travaux du laboratoire et d'autres équipes montrent l'importance d'une réduction de la signalisation IGF1R neuronale dans des phénomènes de neuroprotection. On pourra tester théoriquement dans ces différents modèles l'hypothèse selon laquelle c'est la forme plus compacte du neurone pyramidal qui constitue en soi un phénotype « cellule-autonome » plus résistant et qui confère au neurone une protection contre différents types de stress. La détermination de la part de ce phénotype dans l'amélioration de la physiologie de l'ECS via la réduction de son encombrement et la facilitation de ses flux sera abordée dans le chapitre III.

III. La neuroprotection dépendante d'IGF1R : une résistance aux stress

a) Stress liés à l'oxygène : stress oxydant et hypoxie

Le cerveau est l'organe le plus dépendant d'une oxygénation constante de l'organisme. L'oxygène est vital, mais il a une certaine dualité. Une déprivation d'oxygène prolongée est certes létale, mais une hyperoxie est également très délétère pour l'organisme. Le métabolisme de l'O₂ produit des espèces réactives de l'oxygène ou ROS (*reactive oxygen species*) qui ont un certain nombre de fonctions physiologiques, mais qui engendrent un stress oxydant rapidement neurotoxique si leur homéostasie n'est pas maintenue. L'adaptation neuronale à des conditions plus variées en concentration d'oxygène pourrait être un mécanisme neuroprotecteur.

i. Résistance au stress oxydant

La souris hétérozygote $Igf1r^{+/-}$ est plus résistante au stress oxydant provoqué par du paraquat, et survit plus longtemps et en plus grand nombre par rapport à la souris $Igf1r^{+/+}$ (Holzenberger et al. 2003). Quand l'hétérozygotie $IGF1RKO$ n'affecte que les cellules cérébrales, c'est-à-dire neurones et glie (à l'exception de la microglie), la courbe de survie des souris mutantes $bIGF1RKO^{+/-}$ ne diffère pas de celle des souris contrôles suite à deux autres types de stress oxydant (Kappeler et al. 2008). L'origine de cette apparente perte du phénotype résistant au stress oxydant peut être multiple. Elle peut notamment s'expliquer par le fait que les molécules utilisées pour provoquer le stress oxydant sont différentes et que le diquat et l'acétaminophène utilisées dans l'expérience de Kappeler et al. sont potentiellement plus toxiques (sachant que les doses de diquat et de paraquat sont équivalentes). En effet, dans ces conditions, aucune souris ne survit au-delà de 45 h post-injection alors que dans l'expérience d'Holzenberger et al. les taux de survie sont toujours supérieurs à 95 % dans les deux groupes au bout du même temps. D'autre part, il est important de noter que la réponse astrocytaire au stress oxydant dépend de la présence d'IGF-1 (Genis et al. 2014) et que les quantités d'IGF-1 plasmatiques sont augmentées chez les souris $Igf1r^{+/-}$ alors qu'elles sont diminuées chez les souris $bIGF1RKO^{+/-}$ par rapport à leurs contrôles respectifs. Dans ce cas cela suggérerait qu'un maintien basal de la signalisation IGF est nécessaire à la réponse au stress oxydant, soit pour les neurones et les astrocytes, soit uniquement pour les astrocytes.

ii. Résistance à l'hypoxie

Les neurones dépendent essentiellement de la chaîne respiratoire et donc de l'oxygène pour fournir en permanence la quantité d'ATP nécessaire à leurs fonctions électrophysiologiques (Burtscher et al. 2021). Toute ischémie ou hypoxie aigüe modifie la capacité des neurones à maintenir leur activité et provoque, dans des proportions importantes, une neurodégénérescence. L'ischémie/hypoxie représente donc un stress particulier et majeur pour les cellules nerveuses. Dans le modèle nIGF1RKO, où la suppression de la signalisation IGF1R a lieu spécifiquement dans des neurones post-mitotiques, De Magalhaes Filho et al. ont étudié la réponse du tissu cérébral suite à un challenge aigu d'hypoxie/ischémie. Après la ligature de l'artère carotide commune et une réduction de la quantité d'O₂ pendant une quinzaine de minutes, ils constatent que les souris nIGF1RKO et contrôles ont des conditions de survie similaires à 72h. En revanche, la réponse tissulaire cérébrale à l'ischémie diffère radicalement entre les deux groupes puisque le volume total de l'infarctus cérébral est diminué de 75 % chez les souris nIGF1RKO. De plus, les zones infarctées sont en moyenne deux fois moins nombreuses dans le cortex, l'hippocampe et le striatum, et la sévérité des dommages causés est proportionnellement beaucoup moins importante chez les souris nIGF1RKO que chez les contrôles. La neuroprotection du phénotype nIGF1RKO se retrouve également au niveau cellulaire et se traduit par une perte neuronale moins conséquente (8 % versus 27 %), une réduction d'environ 40 % de l'activation microgliale et une diminution du nombre d'astrocytes de 45 % dans les régions normalement irriguées par la carotide ligaturée. La neuroprotection dépendante d'IGF se manifeste donc de façon « cellule-autonome » par des neurones ayant une meilleure survie en condition d'ischémie/hypoxie et de façon indirecte par une limitation de l'activation gliale et une réaction inflammatoire atténuée. Sachant que toute hypoxie ou ischémie engendre un œdème tissulaire provoqué par un gonflement cellulaire, les chercheurs ont également quantifié l'œdème réactionnel. Chez les souris nIGF1RKO l'œdème de l'hémisphère ischémié est 4 fois moins important que chez les souris contrôles (De Magalhaes Filho et al. 2017).

iii. Origines possibles de la neuroprotection oxydative/ischémique

On peut à ce stade émettre deux hypothèses qui pourraient expliquer l'origine de cette neuroprotection. Premièrement, il est intéressant de noter que l'hypoxie induit une production de ROS médiée par les

complexes I et III de la chaîne respiratoire, essentiellement sous forme de peroxyde d'oxygène, qui traversent les membranes par les aquaporines. L'hypoxie est donc un inducteur de stress oxydant. Or, d'après ce que nous avons vu, la réduction de la signalisation IGF1R est associée à une résistance au stress oxydant. On peut donc supposer que les mécanismes à l'origine de la résistance à l'hypoxie et de la résistance au stress oxydant sont communs. D'autre part dans le modèle nIGF1RKO, seuls les neurones ne possèdent plus d'IGF1R, alors que les astrocytes ont une signalisation IGF normale. En outre, les taux plasmatiques d'IGF-1 sont également plus élevés dans ce modèle par rapport au contrôle. On assiste donc peut-être à une potentialisation du phénomène de résistance au stress oxydant par une réduction de signalisation IGF1R neuronale, d'une part et une réponse astrocytaire possible à l'IGF-1, d'autre part.

La deuxième hypothèse concerne le lien qui peut exister entre la morphologie neuronale et l'œdème réactionnel suite à l'hypoxie/ischémie. Tout d'abord le gonflement de la fraction neuronale suite à l'ischémie devrait être proportionnellement plus faible dans un cerveau KO que dans un cerveau contrôle. En effet, dans un cerveau où les neurones IGF1R KO sont plus petits, le volume du parenchyme cortical occupé par les neurones est donc moins important que dans un parenchyme contrôle. Sachant que les neurones représentent environ 50 % des cellules des zones corticales et hippocampiques, la mutation IGF1R neuronale participe donc à réduire au moins une moitié de l'œdème cérébral total. D'autre part, des neurones de taille diminuée ont moins de surface membranaire et devraient donc consommer moins d'énergie et donc moins d'O₂. Ceci pourrait également expliquer pourquoi un même degré d'hypoxie provoque des zones d'infarctus plus grandes et des dommages cellulaires plus sévères chez les souris contrôle.

On peut conclure qu'une partie de la neuroprotection IGF-dépendante repose sur la capacité cérébrale à mieux s'adapter à une gamme plus large de conditions en oxygène, plus pauvres et plus riches, quand la signalisation IGF est réduite.

b) Protection contre la neurodégénérescence : diminution de l'inflammation et meilleure survie neuronale

De nombreuses études ont démontré que la signalisation IGF était impliquée dans les maladies neurodégénératives. Quant à savoir si c'est une stimulation de la voie IGF-1 ou une réduction de la signalisation qui est responsable d'une neuroprotection les avis divergent (Nuñez et al. 2023). Il importe de noter que si on constate des effets contradictoires pour cette signalisation c'est que le facteur temps est souvent ignoré ou trop peu pris en compte. En conséquence IGF-1 peut très bien être effectivement bénéfique, dans des pathologies neurodégénératives ou dans le cadre de lésions aiguës, quand il est administré de façon ponctuelle ou sur une courte période de temps, car c'est un facteur trophique (Selles et al. 2020). En revanche, peu d'études montrent qu'une stimulation prolongée par IGF-1 améliore les conditions de santé des individus. Il semblerait que ce soit plutôt une réduction sur le long terme de cette signalisation qui soit protectrice dans les neurodégénérescences. D'autre part, il me paraît important de constater que la réponse cérébrale à cette signalisation dépend des populations cellulaires concernées par des modifications de signalisation IGF-1.

i. Réduction systémique de la signalisation IGF1R et neuroprotection

Dans l'amyotrophie spinale, Biondi et al. ont montré que l'IGF1R était surexprimé dans la moelle épinière de souris modèles de la pathologie et que les taux d'IGF1R étaient inversement proportionnels aux déficits en protéines SMN, qui sont physiologiquement impliqués dans la survie des motoneurones. Ils ont démontré que l'hétérozygotie *Igf1r^{+/-}* augmentait la durée de vie du modèle murin de la maladie, protégeaient les neurones moteurs de la dégénérescence et améliorait les fonctions motrices. En effet une diminution de la signalisation de moitié permet de ramener la mort neuronale des neurones moteurs de 35 % à seulement 10 %, et de diminuer les processus apoptotiques. La mutation *Igf1r^{+/-}* dans la SMA améliore également la maturation et la structure des jonctions neuromusculaires. Globalement dans cette pathologie, la surstimulation de la signalisation IGF est délétère, et sa réduction neuroprotectrice pour les motoneurones qui deviennent plus résistants et restent fonctionnels (Biondi et al. 2015).

Dans le modèle de la maladie d'Alzheimer APP^{swe}/PS1^{dE9}, Cohen et al. démontrent que l'hétérozygotie *Igfr1r*^{+/-} est également neuroprotectrice. Les souris double mutées ont de meilleures performances cognitives et motrices à 12 mois que leurs contrôles Alzheimer (AD). Dès 4 mois et jusqu'à 17 mois, les chercheurs constatent que les densités neuronales et synaptiques sont conservées quand la signalisation *Igf1r* est réduite chez les souris AD. Ils constatent également que le nombre d'astrocytes et l'inflammation sont réduits dans ces conditions. Ces constats cellulaires sont corrélés à des plaques amyloïdes plus denses mais des taux d'A β solubles plus faibles chez les souris AD *Igf1r*^{+/-} (E. Cohen et al. 2009).

ii. Suppression ciblée de la signalisation IGF1R neuronale et neuroprotection

Parallèlement à ce travail, et avec un autre modèle de la pathologie, une équipe allemande a mis en évidence que la suppression ciblée d'IGF1R ou d'IRS2 spécifiquement dans les neurones hippocampiques réduit la mortalité précoce de souris Alzheimer APP^{SW}-Tg2576. Les KO neuronaux d'IRS2 et d'IGF1R ont des effets similaires sur la survie, ce qui n'est pas le cas du KO neuronal d'IR. En revanche leurs effets sur le processing de l'A β diffèrent dans le temps. Réduire la signalisation IGF diminue le processing de l'APP (quantité diminuée de fragments α et β CTF) et réduit la quantité d'A β total dans l'hippocampe à 28 semaines. Cet effet est plus durable quand l'inhibition de la signalisation a lieu au niveau d'IGF1R plutôt qu'en aval via IRS2, puisqu'à 60 semaines d'âge, le clivage d'APP et la quantité d'A β sont toujours réduits chez les souris dont les neurones sont IGF1RKO par rapport aux contrôles. Si la répercussion de ces KO au niveau cellulaire n'a pas été analysée dans cette étude, ces résultats suggèrent que l'environnement des neurones est moins délétère, car moins chargé en A β quand la signalisation IGF neuronale est réduite (Freude et al. 2009). De plus, les effets plus durables obtenus avec le KO d'IGF1R par rapport au KO IRS2 font penser que d'autres cascades de signalisation en plus de celle d'IRS2 sont impliquées dans la protection IGF dépendante. Cependant, une étude de 2021 montre que cette protection n'implique pas IRS1 par exemple (Ochiai et al. 2021). En 2015, mon laboratoire a démontré que la suppression d'IGF1R à l'âge adulte au niveau neuronal protégeait directement les neurones du cortex et de l'hippocampe contre la pathologie amyloïde dans le modèle APP/PS1 de la maladie d'Alzheimer (souris ADINKO). Ces souris ADINKO ont de meilleures

performances cognitives (apprentissage et mémoire), moins d'anxiété, moins d'inflammation dans le cortex et l'hippocampe et une densité neuronale plus importante que les souris AD à 23 mois. De la même manière que dans les études de Cohen et al. et de Freude et al., la charge A β est également réduite dans le cerveau des souris ADINKO (Gontier et al. 2015).

iii. Effets mitigés de la suppression d'IGF1R dans les cellules gliales dans la neuroprotection

La neurodégénérescence peut également être médiée par de l'inflammation. Dans un modèle de pathologie démyélinisante comme l'encéphalite auto-immune (EAE), l'absence d'IGF1R au niveau des oligodendrocytes réduit la dégénérescence neuronale et réduit l'inflammation (Locatelli et al. 2023). À l'inverse, quand l'ablation de la signalisation IGF est spécifique à la microglie et aux macrophages résidents du CNS, l'inflammation et les dommages neuronaux sont plus sévères dans un modèle murin d'EAE (Ivan et al. 2023). En ce qui concerne les astrocytes, nous avons vu précédemment que la signalisation IGF astrocytaire était importante pour protéger efficacement les neurones du stress oxydant et garantir leur support trophique (Genis et al. 2014; Ratcliffe et al. 2018). En outre, la suppression sélective d'IGF1R astrocytaire semble altérer l'apprentissage et la mémoire spatiale mais ne pas affecter la mémoire de travail ni l'anxiété chez les souris (J. A. Zegarra-Valdivia et al. 2022). L'équipe de Torres Aleman montre également dans cette étude que des souris doubletransgéniques APP/PS1 et IGF1R KO astrocytaire semblent avoir de meilleures capacités d'apprentissage que des souris APP contrôles, mais une densité de plaques amyloïdes équivalente. Néanmoins ces résultats sont à interpréter avec précaution puisque leurs souris double-transgéniques contrôles non induites GFAP-IGF1R/APP-PS1 montrent des différences significatives par rapport aux souris APP contrôles sur l'ensemble des paramètres testés.

Ces différents résultats suggèrent que la neuroprotection dépendante d'IGF dépend également fortement du type cellulaire considéré. Si l'ablation totale dans les neurones et les oligodendrocytes est neuroprotectrice, il semblerait que le maintien d'un certain niveau de signalisation soit nécessaire à la microglie et aux astrocytes pour assurer une neuroprotection la plus efficace possible.

c) Résistance à la protéotoxicité A β : rôle d'IGF1R dans l'autophagie et la clairance cérébrale

Que la réduction de la signalisation IGF1R affecte toutes les cellules de l'organisme ou seulement les neurones, force est de constater qu'elle diminue systématiquement la charge cérébrale en peptides A β dans des modèles de la pathologie d'Alzheimer (Freude et al. 2009; E. Cohen et al. 2009; Gontier et al. 2015; Ochiai et al. 2021).

i. Neuroprotection via une hyperagrégation d'A β

Les travaux de Cohen et al. mettent en évidence une diminution de la fraction soluble d'A β mais des plaques amyloïdes en quantités similaires, structurellement différentes et plus denses chez les souris AD-Igf1r^{+/-}. Ils constatent que quand 50 % de la signalisation IGF1R persiste dans le cerveau, le processing de l'APP n'est pas affecté et que la fraction monomérique d'A β est quantitativement semblable entre AD et AD-Igf1r^{+/-}. Ils attribuent la densification des plaques amyloïdes à une hyperagrégation d'A β . Les plaques étant réputées moins toxiques que la fraction oligomérique, Cohen et al expliquent une part du phénotype neuroprotecteur dépendant d'IGF et la réduction d'A β solubles par un mécanisme de formation de plaques amyloïdes plus riches en fibrilles, plus focales et compactes et plus résistantes à la protéinase K (E. Cohen et al. 2009). Néanmoins, dans ce modèle, ni la cinétique d'initiation de formation des plaques ni la taille de ces dernières ne semble être affectée par la mutation Igf1r^{+/-}.

ii. Neuroprotection via une autophagie préservée et une meilleure clairance cérébrale

Si la réduction de la protéotoxicité IGF-dépendante peut être multifactorielle et impliquer plusieurs types cellulaires, la signalisation IGF1R neuronale semble jouer un rôle prépondérant dans cette neuroprotection. En effet, la réduction des molécules responsables de la protéotoxicité semble directement impliquer les neurones et agir par différents mécanismes. Freude et al. constatent que le processing de l'APP par les neurones IGF1RKO est diminué et concluent que cela explique en partie la quantité réduite d'A β (Freude et al. 2009). Néanmoins, dans le modèle APP/PS1, Gontier et al. ne

retrouvent pas d'effet d'IGF1R sur le processing d'APP et sur la quantité de ses produits de clivage. Gontier et al. montrent en revanche des effets majeurs du récepteur sur les différents produits du métabolisme de l'A β (oligomères et plaques). Dans le mutant ADINKO, les plaques amyloïdes sont en moyenne plus petites, moins denses et moins nombreuses dans le parenchyme du cortex et de l'hippocampe, ce qui concourt à la réduction de la fraction cérébrale insoluble d'A β . De plus, à 16 mois, la fraction cérébrale soluble d'oligomères d'A β (A β O) est 20 à 50 % moins importante chez les ADINKO que chez les souris AD, et à 23 mois la fraction oligomérique la plus toxique est toujours plus faible de 65 %. Contrairement au modèle de neuroprotection proposé par Cohen et al., les chercheurs n'ont pas retrouvé d'hyperagrégation de l'A β dans ce modèle. En revanche, en parallèle de la baisse d'A β O dans le parenchyme, ils détectent une augmentation de la fraction plasmatique d'A β . Ces résultats suggèrent que la clairance systémique d'A β pourrait être un des mécanismes dépendant d'IGF-1 qui assure la réduction de la charge amyloïde cérébrale. D'autre part, l'autophagie qui est altérée dans la maladie d'Alzheimer, semble préservée chez les souris ADINKO. Les ADINKO présentent moins d'accumulation d'autophagosomes par rapport aux souris AD, et leurs vacuoles autophagiques sont plus petites et moins nombreuses que chez les contrôles (Gontier et al. 2015). En supprimant la signalisation IGF1R spécifiquement dans les neurones, Gontier et al. ont montré que la neuroprotection dépendante d'IGF-1 reposait sur la prévention de l'accumulation d'A β via la préservation de l'autophagie et une meilleure clairance cérébrale. La neuroprotection n'est effectivement plus efficace quand le KO IGF1R intervient trop tardivement et que les signes histopathologiques sont majoritairement présents. Georges et al. ont montré qu'une fois la pathologie installée avec des plaques et une certaine quantité d'A β présentes dans le cerveau, supprimer la signalisation IGF1R du neurone n'a plus d'effet. Des souris AD qui perdent la signalisation IGF1R à 16 mois présentent les mêmes concentrations d'A β cérébrale et plasmatique, et les mêmes performances cognitives que des souris AD quand elles sont analysées 5 à 7 mois après l'induction (George et al. 2017).

d) La neuroprotection IGF-dépendante pourrait être un mécanisme endogène de résistance déclenché par un stress protéotoxique ou par le vieillissement

i. Au cours du vieillissement le neurone garde sa capacité à enclencher un programme de neuroprotection

Un stress protéotoxique déclenche un mécanisme de défense cellulaire, mais l'âge pourrait atténuer ou abolir ces phénomènes. Georges et al montrent que même à un âge avancé, les neurones sont capables de déclencher un mécanisme de défense contre la protéotoxicité qui implique IGF1R. Georges et al. ont montré que des souris âgées de 25 mois répondaient mieux à l'injection cérébrale d'oligomères d'A β (A β) quand la signalisation IGF1R neuronale était inactivée. Les souris âgées inIGF1RKO ont de meilleures performances cognitives suites à l'injection d'A β que des souris contrôles. La réponse inflammatoire dans ce contexte est également atténuée, puisque les nombres d'astrocytes et de microglies restent significativement plus bas que chez les souris contrôles, et que la microglie adopte moins une forme amyboïde pro-inflammatoire chez les souris inIGF1RKO (George et al. 2017). Face à un stress protéotoxique, le phénotype IGF1RKO est donc neuroprotecteur, même quand il est induit au cours du vieillissement. D'autre part, ces résultats montrent que des neurones âgés conservent leur capacité à adapter leur taille cellulaire et leur métabolisme puisque le KO d'IGF1R à 16 mois provoque les mêmes modifications morphologiques qu'à un jeune âge (George et al. 2017).

ii. La neuroprotection IGF-dépendante peut être un mécanisme naturellement enclenché par le vieillissement

Georges et al. ont également montré dans cette étude que la signature transcriptomique de neurones de souris AD jeunes était très différente de celle de souris contrôles, mais qu'étonnamment, ces neurones AD jeunes partageaient une grande partie de leur signature transcriptomique avec celle de neurones inIGF1RKO du même âge. Les fonctions cellulaires impliquées dans la neurotransmission, la croissance, la transduction du signal, la réponse au stress et la protéostasie sont affectées dans le même sens et dans des proportions similaires (George et al. 2017). Dans les premiers stades de la maladie d'Alzheimer, un neurone adopte donc une expression protéique et un métabolisme proche de celui d'un neurone caractérisé par une importante résistance au stress. Il semblerait donc que les neurones AD déclenchent

un programme neuroprotecteur en adoptant un phénotype similaire au mutant IGF1RKO. Ces résultats suggèrent que la neuroprotection dépendante d'IGF1R pourrait être un mécanisme endogène de défense face à un stress protéotoxique. Ce mécanisme endogène n'est néanmoins pas suffisant à lui seul pour contrecarrer complètement les effets de la pathologie sur le long terme. D'autres études chez la souris et l'humain sont en faveur de cette hypothèse. On retrouve en effet dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer qui sont décédés, une résistance à l'insuline et à IGF-1 et une réduction des voies de signalisation à PI3K/Akt et IRS1 (Talbot et al. 2012; Moloney et al. 2010). Plutôt qu'un facteur aggravant, ce qu'on appelle le diabète de type 3, c'est-à-dire la résistance cérébrale à l'insuline (Steen et al. 2005), pourrait être en réalité un témoin du programme neuroprotecteur qui a été déclenché en amont et qui a ensuite été dépassé. Comme je l'ai décrit dans la première partie de ce chapitre, au cours du vieillissement, le niveau de signalisation des IGF diminue et est vu comme une conséquence délétère du vieillissement. En suivant le même raisonnement que celui consistant à émettre l'hypothèse que les neurones pourraient enclencher un programme réduisant la signalisation IGF face à un stress protéotoxique, on peut supposer que le tissu nerveux vieillissant pourrait adopter de façon programmée un plus faible niveau de signalisation IGF-1 afin de mieux se protéger.

CHAPITRE III : TRAVAUX DE THESE

I. Hypothèse de travail : mise en relation de la taille neuronale, de l'ECS et de la clairance cérébrale

La clairance cérébrale repose sur un transport efficace des métabolites produits par les cellules nerveuses et gliales depuis leur lieu de production jusqu'au sang veineux et/ou jusqu'aux vaisseaux lymphatiques. Une des étapes clé de ce processus repose, comme expliqué précédemment, sur une diffusion efficace des molécules solubles à travers l'ECS. Or, ce flux passif est physiologiquement entravé par la forme des corps cellulaires, prolongements cytoplasmiques et éléments de la MEC qui s'y trouvent, ce qui confère à l'ECS une tortuosité élevée par rapport à un espace sans contraintes ($\lambda \geq 1,6$). Si on considère la cinétique d'élimination d'une molécule qui est majoritairement évacuée de façon systémique, la durée et la nature de cette première phase de transport qui repose sur la diffusion à travers l'ECS est donc tout aussi déterminante et limitante que l'étape de transport transendothélial par exemple. Cette période de diffusion dans l'ECS serait par conséquent une période critique pour un certain nombre de molécules dont les propriétés neurotoxiques sont liées à leur concentration et à leur accumulation dans le milieu interstitiel. Comme nous l'avons décrit dans le Chapitre I, nous pouvons relever le cas du peptide A β notamment, dont les capacités d'auto-agrégation en oligomères toxiques puis en plaques amyloïdes sont directement liées à sa concentration et à son temps de présence dans un milieu déterminé (Meisl et al. 2014). Dans ce contexte, optimiser cette 1^{re} étape de la clairance cérébrale, en facilitant la diffusion des solutés dans l'ECS, nous semblait être une approche intéressante pour limiter le risque protéotoxique. Cette approche pourrait être considérée comme une approche préventive contre le développement de neurodégénérescences comme Alzheimer ou Parkinson, le but étant de maintenir les cellules nerveuses et gliales dans un environnement le plus sain possible, le plus longtemps possible, débarrassé de ses déchets.

De nombreuses études ont déterminé les propriétés physiologiques de diffusion de l'ECS et ses variations en fonction de l'âge (Eva Syková et Nicholson 2008a), de l'activité neuronale (Shi et al. 2016), du cycle veille-sommeil (Lulu Xie et al. 2013) ou encore au cours de l'anesthésie (Hablitz et al.

2019; Lulu Xie et al. 2013). D'autres travaux de recherche se sont intéressés à la réponse de l'ECS à des stress aigus comme des crises d'épilepsie (Binder et al. 2004; Colbourn, Naik, et Hrabetova 2019; Colbourn et al. 2021), la *cortical spreading depression*, vague de dépolarisation corticale massive qui a lieu lors d'une migraine (Hrabe et Hrabetova 2019) ou un stress osmotique (Binder et al. 2004; Arizono et al. 2021; Murphy et al. 2017) ou ischémique (Hrabětová, Hrabe, et Nicholson 2003; Thevalingam et al. 2021). Le dernier domaine d'étude concerne les changements des propriétés de l'ECS à plus long terme en réponse à des modifications de la MEC (Soria, Paviolo, et al. 2020; Eva Syková, Voríšek, et al. 2005; Bekku et al. 2010; Arranz et al. 2014; Vargová et Syková 2014), suite à une consommation chronique d'alcool (De Santis et al. 2020) ou dans des modèles de pathologies comme Alzheimer (Eva Syková, Voríšek, et al. 2005) ou Parkinson (Soria, Paviolo, et al. 2020). Malgré l'extensivité de ces études, nous n'avons pas trouvé de travaux s'intéressant à l'impact que pourraient avoir des modifications morphologiques pérennes des composants cellulaires du SNC sur l'ECS.

Sachant que les neurones représentent 50 % des cellules du cortex humain et environ 45 % chez la souris (Herculano-Houzel 2009) et que les neurones pyramidaux sont les cellules les plus grandes et ayant le soma le plus volumineux du SNC, nous avons émis l'hypothèse que les corps neuronaux constituaient l'obstacle majeur à la diffusion des molécules dans l'ECS. Lors du vieillissement, la clairance cérébrale diminue (Kress et al. 2014) et la diffusion dans l'ECS est réduite (Eva Syková, Voríšek, et al. 2005). Nous pensons qu'une histo-architecture corticale composée pour moitié de structures cellulaires massives à large corps cellulaires entrave la diffusion moléculaire et favorise la genèse, l'entretien, voire l'amplification des phénomènes protéotoxiques à l'origine de certaines pathologies neurodégénératives telles qu'Alzheimer. À l'inverse, réduire la taille des corps cellulaires neuronaux, sans pour autant altérer l'activité métabolique nécessaire à leur fonction, pourrait rendre le parenchyme plus perméable, faciliter les flux de solutés entre les éléments et favoriser l'acheminement des métabolites à travers l'ECS vers les capillaires et les PVS.

À l'échelle cellulaire, les neurones dépourvus d'IGF1R adoptent un phénotype caractérisé par une taille de soma plus petite, des prolongements dendritiques plus fins et une meilleure résistance aux stress, d'après les observations du chapitre II. Notre modèle de souris *inIGF1RKO* permet de réduire

sélectivement la taille des neurones glutamatergiques corticaux sans affecter leur nombre ni leur connectivité et densité synaptique tout en stimulant modérément leur activité électrophysiologique (De Magalhaes Filho et al. 2017; Gontier et al. 2015). Ces modifications conduisent à une compaction relative du parenchyme cortical. Ce phénotype particulier semble être à l'origine de la neuroprotection observée chez les souris ADINKO, souris modèle de la maladie d'Alzheimer où la signalisation IGF1R neuronale a été supprimée (Gontier et al. 2015). Ce phénotype peut, en réalité, constituer un mécanisme endogène de défense déclenché par un stress protéotoxique (George et al. 2017). Si notre équipe a déjà montré que l'autophagie était préservée dans les neurones IGF1RKO et qu'elle contribuait à réduire la charge amyloïde dans le cortex, nous n'avons pas encore expliqué la plus grande fraction plasmatique de peptide A β que l'on retrouve dans les vaisseaux des souris ADINKO et qui suggère une meilleure clairance cérébrale chez cette souris.

Nous pensons que le mécanisme qui pourrait expliquer cette clairance améliorée repose sur la taille réduite des neurones inIGF1RKO. Nous tâchons donc de comprendre comment un changement de l'histo-architecture du parenchyme modifie la clairance cérébrale. Comme nous l'avons vu dans les précédents chapitres, l'ECS est au cœur des mécanismes d'élimination des métabolites et le premier compartiment impliqué, séquentiellement parlant, dans la clairance extracellulaire systémique. Par ailleurs, l'ECS est par définition l'espace se trouvant directement au contact des neurones. Il constitue donc aussi le compartiment le plus susceptible d'être concerné par un changement morphologique majeur des neurones. Ma thèse est centrée sur l'étude du compartiment de l'ECS et sur les flux de solutés interstitiels. Le but de mon travail est d'essayer de comprendre comment une modification de l'encombrement stérique des neurones se répercute sur l'ensemble du parenchyme cérébral cortical et sur les mouvements de solutés avoisinants au sein de l'ECS. J'ai développé différents protocoles afin de tenter de répondre aux questions suivantes : Existe-t-il un lien entre la taille neuronale et les flux moléculaires interstitiels dans l'ECS ? La réduction de la taille neuronale a-t-elle une incidence sur la tortuosité de l'ECS ? La diffusion de molécules de poids moléculaires variables est-elle différemment impactée par une modification de la taille du neurone ? Des changements neuromorphologiques s'accompagnent-ils d'une restructuration du parenchyme cortical et de sa vascularisation ? Est-ce que

le vieillissement altère la morphologie et la taille neuronale ? Le vieillissement a-t-il un impact sur la diffusion des solutés dans l'ECS ?

II. Optimisation de la méthodologie

a) Quantification de flux de solutés *in vivo*

Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre de cette thèse, l'Integrative Optical Imaging (IOI) et la microscopie biphotonique sont deux techniques d'imagerie permettant de suivre le flux de traceurs *in vivo* dans le parenchyme, mais elles présentent comme inconvénient majeur l'obligation de réaliser une fenêtre crâniale à l'aplomb de la zone à imager d'une part, et d'autre part, elles ne permettent pas non plus, malgré leur forte résolution, d'imager dans la profondeur du cortex à plus de 400 μm . La fenêtre crâniale (environ 3 à 5 mm de diamètre) présente le désavantage supplémentaire de modifier considérablement la physiologie globale du cerveau, en modifiant la pression intracrânienne et donc dans une certaine mesure les flux des compartiments liquidiens comme le LCR, le sang et le liquide interstitiel. Cette modification aurait donc pu fortement impacter l'espace et le phénomène physique que nous voulions observer, à savoir la diffusion dans l'ECS. D'autre part, notre zone d'intérêt se trouvant à plus d'un millimètre sous la surface du cortex, elle se situait trop en profondeur pour être imagée par ces deux méthodes. Une autre technique de choix pour mesurer la diffusion moléculaire dans le cerveau aurait pu être la iontophorèse. Néanmoins, la taille des solutés utilisés et l'étendue de la mesure sont assez restreintes avec cette méthode car elle ne permet de mesurer la diffusion que de certains ions, qui plus est sur une distance d'une centaine de microns seulement. Le but de notre étude étant de déterminer l'impact de corps neuronaux plus minces sur l'ECS et le parenchyme, la iontophorèse comme l'IOI n'auraient apportées qu'une réponse très partielle à notre questionnement, et n'auraient pas permis de généraliser l'observation à l'échelle de l'ensemble du tissu cortical.

Pour étudier la diffusion moléculaire dans l'ECS et s'affranchir des inconvénients des méthodes précédentes, nous avons choisi de combiner deux autres techniques d'imagerie qui nous permettaient d'être moins invasifs et de réduire le nombre de biais expérimentaux listés précédemment. La première

méthode consiste à analyser *ex vivo* par microscopie optique la diffusion de molécules ayant eu lieu *in vivo* en stoppant le processus par perfusion-fixation à un temps donné. La deuxième méthode permet un suivi dynamique du processus *in vivo* grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM). L'étape invasive et commune aux deux interventions consiste à percer un trou d'un millimètre de diamètre dans le crâne de la souris et à introduire une aiguille 33GA dans le parenchyme cortical pour la durée de l'injection de l'agent. Ces deux procédures nécessitent une anesthésie générale des souris, pour laquelle nous avons utilisé l'isoflurane.

i. Analyse et quantification microscopique de la diffusion moléculaire par injection de dextrans

Les dextrans sont utilisés comme traceurs fluorescents de flux intra et extracellulaires. Dans plusieurs études les chercheurs ont injecté ces traceurs fluorescents dans le parenchyme cérébral pour observer leur dispersion *a posteriori*, après le sacrifice de l'animal. Avec cette méthode les chercheurs ont pu déterminer la distribution des dextrans, en fonction du temps, dans les différents compartiments du parenchyme, et montrer qu'au-delà d'une certaine taille moléculaire, les espèces injectées ne diffusaient plus (Carare et al. 2008). D'autres ont pu mettre en évidence l'impact de la pression artérielle sur la diffusion de molécules dans l'hippocampe en démontrant que l'hypertension favorisait une dispersion des traceurs plus importante dans le parenchyme (Bedussi, Naessens, et al. 2017) à l'inverse du flux glymphatique qui était diminué par l'hypertension (Mestre et al. 2018). L'équipe de Verkman a pu ainsi discriminer les processus diffusifs du parenchyme des processus d'advection de solutés à proximité des vaisseaux et des espaces périvasculaires (Smith et al. 2017). Cette méthode a également permis de déterminer que des solutés provenant de l'ECS pouvaient être drainés hors du cerveau le long de la musculature des artéριοles (Morris et al. 2016) ou être drainés le long des PVS veineux par la même voie que des solutés du LCR en provenance de la *cisterna magna* (Iiff et al. 2012), ou encore de mettre en évidence le rôle de l'hypercapnie dans la réduction de la diffusion des traceurs dans le parenchyme cortical (Goodman et Iiff 2019). En nous basant sur cette littérature, nous avons injecté des dextrans fluorescents dans le parenchyme cortical de souris et, après 1 h de diffusion *in vivo*, nous avons sacrifié l'animal et analysé *ex vivo* leur distribution dans le parenchyme.

ii. Analyse de la diffusion et des propriétés de l'ECS par IRM

Le recours à l'IRM dans les études sur la diffusion cérébrale prend une place de plus en plus importante depuis le début des années 2000 (Eva Syková et Nicholson 2008a). Les chercheurs peuvent utiliser des séquences d'IRM pondérées en diffusion qui mesurent le mouvement brownien des molécules d'eau du tissu (Le Bihan 2014). Cette mesure présente l'avantage d'être non-invasive, mais a comme inconvénient majeur de ne pas discriminer l'eau intracellulaire de l'eau extracellulaire. La deuxième approche possible par IRM consiste à injecter un agent de contraste en intraparenchymateux dans la zone d'intérêt et à mesurer la modification du temps de relaxation du moment magnétique des molécules d'eau à proximité. Les travaux de Marty et de Hagberg s'intéressent à la diffusion de différents agents de contraste à base de gadolinium après leur injection dans le striatum ou le cortex chez le rat, en réalisant des scans successifs de séquences pondérées T1 sur plusieurs heures avec une IRM 7T. Une étude récente de l'équipe Valette a également utilisé l'injection de sucrose, marqueur endogène limité à l'ECS, pour déterminer les propriétés de diffusion et de tortuosité de l'ECS, avec une IRM de 11,7 T.

La force du champ magnétique de l'IRM à notre disposition était de 4,7 T. Nous avons choisi d'injecter un agent de contraste d'une façon similaire à celle de Marty et al. en adaptant le protocole à la souris et à un agent de contraste dendromérique, le gadomère-17 (Gd-17). La difficulté de cette optimisation est d'obtenir un signal suffisamment résolutif avec un champ magnétique plus faible et en travaillant sur un cerveau de souris, à peu près 3 à 4 fois plus petit qu'un cerveau de rat. Notre étude IRM a consisté ensuite à mesurer dynamiquement la diffusion dans l'ECS du Gd-17 en réalisant le suivi de l'étalement de la tache de diffusion dans le cortex au cours du temps via 4 scans successifs.

b) Optimisation des coordonnées stéréotaxiques

Dans notre modèle *inIGF1RKO*, l'expression inductible du transgène de la Cre recombinase, CRE-ERT2, est sous le contrôle du promoteur de la *CaMKII α* et le gène *IGF1R* est floxé de façon bi-allélique. Le KO a donc lieu dans les cellules qui expriment la *CaMKII α* . Or, la *CaMKII α* est essentiellement exprimée dans les neurones glutamatergiques du cortex et de l'hippocampe et particulièrement au niveau des couches corticales profondes V et VI. De ce fait, dans notre modèle, les couches corticales V et VI

du cortex somatosensoriel ou moteur sont les régions cérébrales où la proportion de neurones mutés à soma plus mince est très importante, et donc les régions qui se prêtent le mieux à la détermination de l'impact de ces changements neuromorphologiques sur l'ECS. Pour vérifier cela, nous avons procédé à une PCR mesurant le taux d'excision de l'exon 3 d'IGF1R dans le cortex somatosensoriel. Nous avons trouvé que le taux d'excision était de 48,5 % (Chapitre III Résultats, Camus et al. Ext. Data Fig. 9). D'après les travaux de Herculano-Houzel, la proportion de neurones dans les régions corticales somatosensorielles est de 46 % (Herculano-Houzel, Watson, et Paxinos 2013). Nous avons ainsi pu en déduire que l'ensemble de la population neuronale du cortex somatosensoriel des souris inIGF1RKO est KO pour le gène IGF1R et valider le choix de la région à injecter.

Dans les études citées dans la section précédente, les injections intraparenchymateuses de traceurs ont été réalisées préférentiellement dans des structures suffisamment larges telles que le striatum et très peu dans le cortex. De plus, les rares injections corticales pratiquées dans ces études restent très en surface. Nos régions d'intérêts étant plus profondes, il fallait donc dans un premier temps trouver la voie d'abord la plus adaptée. Nous avons initialement ciblé la couche V de la région corticale la plus épaisse, c'est à dire celle des régions motrices M1/M2 à + 1,7 - 1,3 mm par rapport au bregma, pour limiter le reflux. Malgré l'épaisseur corticale de près de 2 mm dans cette région, nous observions un reflux trop important des traceurs vers l'extérieur, car l'injection avait lieu encore trop en surface. Pour limiter au mieux le reflux nous avons changé de région pour pouvoir injecter plus en profondeur dans le parenchyme, dans la région la plus ventrale du cortex somatosensoriel S1, juste au-dessus de l'insula granulaire en nous situant à -3,0 mm dorso-ventral, +1,3 mm antéro-postérieur et +/- 2,85 en latéral par rapport au bregma (Paxinos et Franklin 2019).

Notre modèle de souris inIGF1RKO présente une compaction globale du cerveau qui se traduit par une diminution de la masse du cerveau d'environ 5 à 8 % par rapport au contrôle (Gontier et al. 2015). La diminution de la masse corticale est plus importante (données non publiées) et se traduit par une épaisseur corticale plus fine de 10 % (Fig X). Étant donné cette compaction, j'ai dû réaliser un certain nombre d'injections test dans des cerveaux inIGF1RKO afin d'ajuster les coordonnées stéréotaxiques

pour pouvoir injecter dans la région corticale exactement correspondante chez la souris contrôle et chez la souris mutante.

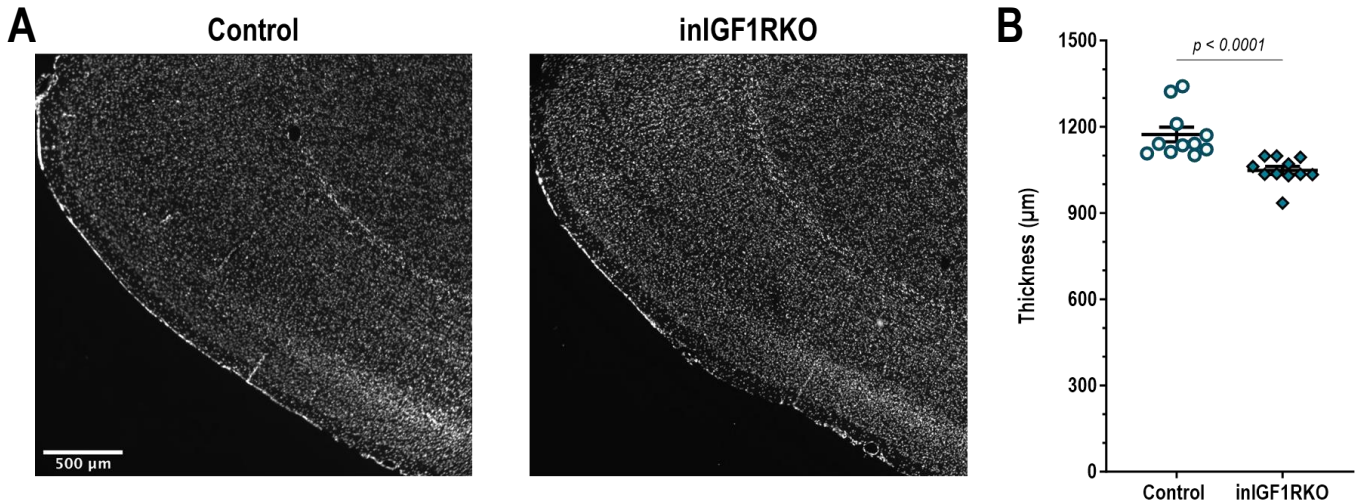


Figure 12. L'épaisseur corticale est moins importante chez la souris inIGF1RKO que chez le contrôle

A. Images de microscopie optique de coupes horizontales de 30 µm de cerveaux fixés, chez des souris femelles âgées de 10 mois. Marquage DAPI. **B.** Quantification de l'épaisseur corticale, sur les coupes précédentes à $z = -3$ mm par rapport au bregma. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures réalisées par coupe par souris. L'épaisseur est mesurée selon une droite, coupant perpendiculairement à la fois le corps calleux et la surface du cortex (Données non publiées).

c) Conditions d'injection

i. Choix des traceurs

Nous avons en tout premier lieu choisi nos molécules d'intérêt pour leur taille. Les molécules étudiées devaient être hydrosolubles, diffusibles, d'une forme assez compacte et devaient pouvoir être détectées par microscopie optique (molécule marquée par fluorescence) ou IRM (molécule paramagnétique). Elles ne devaient pas non plus être éliminées par voie systémique ou réabsorbées/phagocytées par les cellules gliales dans la fenêtre de temps analysée, et notre expérience nécessitait également qu'elles interagissent le moins possible avec les composants des membranes cellulaires et de la MEC. Le but était dans un premier temps d'étudier le comportement de molécules dont la taille était comparable aux différentes fractions solubles et diffusibles d'A β . En sélectionnant des molécules comprises entre 4 kDa et 70 kDa, nous évaluons donc le comportement de molécules proches en taille, encombrement et mobilité d'un

monomère (~4 kDa) et de petits oligomères d'A β , qui sont les fragments solubles les plus neurotoxiques retrouvés dans la pathologie amyloïde (Yang et al. 2017b).

- Dextrans

Les dextrans sont des polymères d'anhydroglucose. Ces structures glucidiques sont flexibles, inertes, possèdent une grande gamme de poids moléculaires, et peuvent facilement être couplées à des marqueurs peptidiques ou fluorescents ce qui en fait d'excellents traceurs biologiques. Nous avons sélectionné trois dextrans de 3, 10 et 40 kDa couplé chacun à un fluorophore dont les spectres d'émission et d'excitation ne se superposaient pas, à savoir le TexasRed (595 nm), un Alexa dans le rouge lointain (647 nm) et la fluoescéine (488 nm) respectivement. À ces tailles, les dextrans sont peu ramifiés et se comportent comme des structures globulaires, relativement repliées et enroulées sur elles-mêmes en solution (Ogston et Woods 1953). Nous souhaitons justement éviter d'utiliser des traceurs qui pourraient s'agréger, comme des protéines, ou qui n'auraient pas présenté de forme compacte et globulaire ce qui aurait entravé d'autant plus leur progression dans l'ECS, particulièrement pour des poids moléculaires > 3 kDa. La progression dans le cortex de nanotubes de poids moléculaires similaires aurait été intraquable avec la microscopie dont nous disposons. En effet, la diffusion de nanotubes, de par leur forme, est particulièrement entravée dans l'ECS. C'est précisément cette caractéristique qui permet leur suivi en vidéomicroscopie à haute résolution (Godin et al. 2017) mais qui exclut leur utilisation avec une autre technique d'imagerie moins résolutive et sans suivi dynamique.

- Gadomer-17

Ce sont également les considérations susmentionnées qui nous ont guidés dans le choix de l'agent de contraste (AC) que nous avons utilisé pour l'IRM. Les AC paramagnétiques sont utilisés en routine en clinique et en recherche. Parmi eux, les plus couramment utilisés sont des molécules formées à partir de chélates de l'ion paramagnétique gadolinium Gd³⁺. On trouve notamment le gadoterate ou Dotarem®, un chélate macrocyclique de gadolinium extensivement utilisé en recherche préclinique et clinique, et le Gd-DTPA ou Magnevist®, un chélate acyclique de gadolinium qui était l'AC de choix en clinique jusqu'en 2018 (Rasschaert et al. 2020). L'ion gadolinium Gd³⁺ étant hautement toxique seul, il est systématiquement chélaté. Dans le cas du Dotarem®, le Gd³⁺ est chélaté par un complexe cyclique

d'acide tétra-acétique (Fig.13.A). Cependant son faible poids moléculaire de 0,8 kDa et sa clairance systémique supérieure à 90 % en moins d'une heure excluaient son utilisation dans notre étude (Bumb, Brechbiel, et Choyke 2010). Nous l'avons vérifié dans une première série de tests, en évaluant sur une succession de 6 scans l'évolution du signal de Dotarem dans le parenchyme cérébral. Nous n'étions pas en mesure de visualiser une diffusion du Dotarem dans le cortex car en moyenne 50 % du signal avait disparu au bout d'une heure. Pour étudier la diffusion dans le striatum de rat, Marty et al. ont notamment utilisé le P846 et le P792, des AC produits par la société Guerbet, dont la taille et la relaxivité auraient également pu convenir à notre étude. Néanmoins, ces deux AC présentaient le désavantage d'être des complexes lâches, avec des chaînes latérales relativement longues par rapport au cœur de Gd^{3+} . Les solutions d'échantillons que nous avons pu tester présentaient des problèmes de conservation et nous ne pouvions pas nous en procurer d'autres car la production de ces molécules a été arrêtée par Guerbet. Pour ces deux raisons, nous avons choisi de nous tourner vers les AC couplés à des dendrimères, appelés gadomères. Ils présentent l'avantage d'avoir une structure globulaire et une relaxivité $r1$ importante du fait du grand nombre de chélates de Gd^{3+} et de leur accessibilité aux molécules d'eau, car ils sont situés à la surface du dendrimère (Fig.13.D). Ces molécules sont connues pour être de bons traceurs du compartiment sanguin avec très peu d'extravasation. Notre choix s'est porté sur le Gadomer-17, un dendrimère de 17 kDa composé d'un squelette carboné s'articulant autour d'un cycle aromatique et lié à ses extrémités de façon covalente par des groupements amines à 24 complexes de chélates cycliques de gadolinium (Fig.13.C) (Misselwitz et al. 2001). Les propriétés de diffusion de cette molécule ont été peu étudiées, et on ne trouve pas de consensus dans la littérature sur sa taille réelle. Par calcul, on retrouve en sommant la masse moléculaire moyenne de chaque unité (squelette carboné et chélates de Gd-DOTA) le poids de 17 kDa. Une étude a cependant fait remarquer qu'en prenant en compte le rayon d'hydratation du Gadomer-17, sa taille correspondait plus à une molécule de poids moléculaire compris entre 30 et 35 kDa (Weinmann et al. 2003). Concernant notre étude, que l'on prenne ou non en compte la couche de molécules d'eau entourant le Gd-17, la taille de l'AC restait comprise dans notre gamme de tailles d'intérêt (entre 3 et 40 kDa) et paraissait compatible avec notre technique.

Le gadomer-17 est un marqueur du compartiment sanguin dont la distribution est quasi exclusivement intravasculaire avec très peu d'extravasation dans le milieu interstitiel quand il est injecté de façon systémique (Misselwitz et al. 2001). D'après les données fournies par la société Viscover, le temps de demi-vie du gadomer-17 dans le sang est de 120 min et son taux d'extravasation est près de 3 fois moins important que celui du Dotarem dans un contexte tumoral (Anne Kirchherr et al. 2013). Nous avons vérifié, qu'à l'inverse, si l'on injectait l'AC dans le parenchyme cortical, le Gd-17 resterait exclusivement dans le compartiment extracellulaire du parenchyme, en dehors des vaisseaux pendant une période de temps suffisamment longue pour réaliser nos mesures (> 1 h) (Extended data Fig. 4).

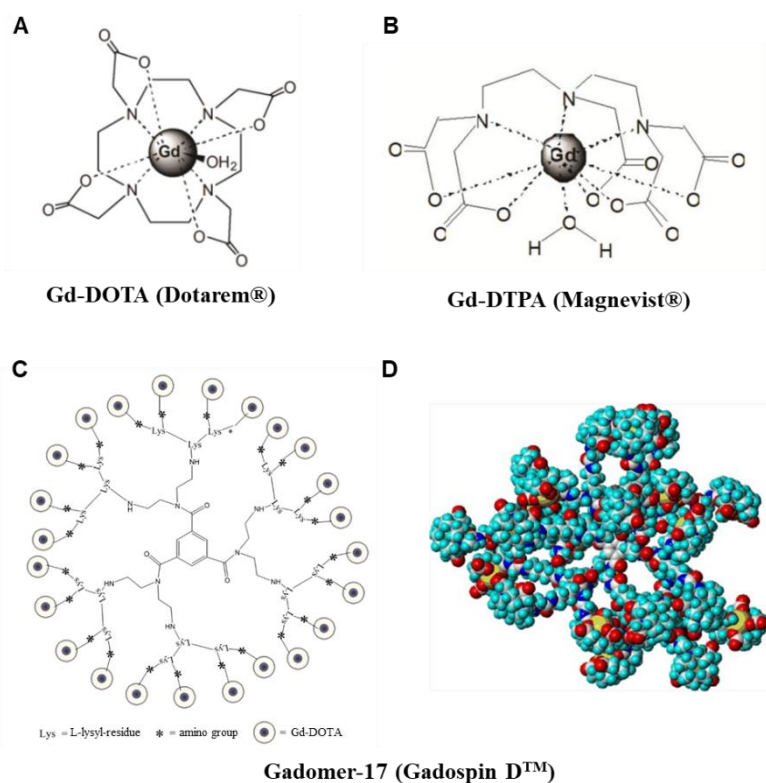


Figure 13. Structure de quelques agents de contraste à base de complexes de gadolinium A.B.C. Structures moléculaires de l'acide gadotérique ou Dotarem® (A), du gadopentétate de diméglumine ou Magnevist® (B) et du gadomère-17 ou GadoSpin™ D (C). **D.** Structure tridimensionnelle du gadomère-17 (Nicolle et al. 2002).

Les ions gadolinium raccourcissent le temps de relaxation T1 des atomes d'hydrogène des molécules d'eau présentes dans un rayon de 0,25 nm autour. Sur des images pondérées en T1, ces molécules d'eau émettent un fort signal. C'est l'étalement de ce signal que l'on mesure par les scans successifs et qui traduit la diffusion du Gadomer-17 à travers l'ECS (Shi et al. 2016).

- Propriétés de diffusion des traceurs utilisés

Nicholson et Tao ont mesuré en 1993 par IOI les coefficients de diffusion à 34°C pour différents types de dextrans dans de l'agar 0,3 % (assimilé à de l'eau et à un milieu sans contraintes) et dans des coupes de cerveaux de rat (Tableau 3. d'après (C. Nicholson et Tao 1993)). Le coefficient de diffusion libre D_{free} (en $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$) permet de calculer le diamètre hydrodynamique d_h (nm) de la molécule considérée grâce à l'équation de Stokes-Einstein-Sutherland et ainsi d'estimer l'encombrement de cette molécule dans un milieu en fonction de sa température T (K), sa viscosité η (Pa.s) et de la constante de Boltzmann $k_B = 1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$:

$$d_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_{free}} * 10^{13} \quad (\text{a})$$

Tableau 3. Valeurs empiriques de coefficients de diffusion libres déterminées par IOI pour quelques dextrans en fonction de leur poids moléculaire et de leur diamètre hydrodynamique

Molécule	M_w (g.mol ⁻¹)	D_{free} 34°C (x10 ⁻⁷ cm ² .s ⁻¹)	d_h (nm)
Dextran – 3 kDa	3 000	23,3	2,63
Dextran – 10 kDa	10 000	13,5	4,54
Dextran – 40 kDa	40 000	4,2	14,6
Dextran – 70 kDa	70 000	3,8	16,13

D_{free} , coefficients de diffusion libre, IOI, *Integrative optical imaging* ; M_w , *molecular weight*, poids moléculaire ; d_h , diamètre hydrodynamique (d'après C. Nicholson et Tao 1993).

De façon attendue, le coefficient de diffusion libre diminue avec l'augmentation du poids et de la taille de la molécule. Une grande molécule possède un encombrement stérique plus important, ce qui ralentit sa progression. À partir des données de Granath et Kvist, Sykova et Nicholson ont établi pour des dextrans d'un poids moléculaire compatible avec une forme globulaire une formule permettant d'estimer leur coefficient de diffusion libre D_{free} (en $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$) à 34°C dans un milieu sans contrainte à partir de leur poids moléculaire, ou *molecular weight*, M_w (g.mol⁻¹) (Eva Syková et Nicholson 2008a) :

$$D_{free} = 1,11 * 10^{-4} * M_w^{-0,48} \quad (1)$$

Ils ont également établi une formule pour déterminer le coefficient de diffusion libre de petites protéines globulaires :

$$D_{free} = 3,26 * 10^{-5} * M_w^{-\frac{1}{3}} \quad (2)^a$$

^a Coefficient de 2,28 dans la littérature pour 20°C (Eva Syková et Nicholson 2008a), corrigé par un facteur 1,43 pour obtenir la valeur de D_{free} à 34 °C.

Ainsi qu'une formule qui s'applique aux macromolécules de type assemblage de monomères en chaînes flexibles :

$$D_{free} = 14,6 * 10^{-5} * M_w^{-0,54} \quad (3)$$

En appliquant ces relations à nos molécules d'intérêt, on peut constater que pour les dextrans de 3 et 10 kDa, les estimations de leurs coefficients de diffusion avec les formules (1) et (2) sont très proches des valeurs mesurées par IOI (Tableau 4). On constate une limite d'applicabilité de la formule (1) quand le poids moléculaire des dextrans dépasse 40 kDa. Les formules (1) et (2) surestiment le D_{free} de 40 à 60 %. En revanche, les coefficients calculés avec la formule (3) pour le 40 et le 70 kDa sont beaucoup plus proches de la valeur expérimentale. Le comportement du dextran de 40 kDa semble donc se rapprocher davantage de celui d'une molécule ramifiée et relâchée que de celui d'une macromolécule globulaire.

Tableau 4. Comparaison des D_{free} obtenus expérimentalement et par calcul à partir des équations (1), (2) et (3) à 34°C pour quelques dextrans

Molécule	M_w (g.mol ⁻¹)	D_{free} mesuré par IOI	D_{free} (1) (x10 ⁻¹¹ m ² .s ⁻¹)	D_{free} (2)	D_{free} (3)
Dextran – 3 kDa	3 000	23,3	23,8	22,6	19,4
Dextran – 10 kDa	10 000	13,5	13,3	15,1	10,1
Dextran – 40 kDa	40 000	4,2	6,9	9,5	4,8
Dextran – 70 kDa	70 000	3,8	5,2	7,9	3,5

Étant donné la forme globulaire du Gadomer-17 (Fig1.D), et son poids moléculaire de 17 kDa compris entre les dextrans de 10 et 40 kDa, on peut estimer que son coefficient de diffusion libre se situe entre 10,3 x 10⁻¹¹ (1) et 12,7 x 10⁻¹¹ m².s⁻¹(2). En utilisant la formule de Stokes-Einstein (a) on peut ainsi déterminer que son diamètre hydrodynamique devrait être compris entre 5,2 et 6,3 nm.

ii. Volumes et mode d'injection

Bien que les dextrans soient des traceurs de choix reconnus et largement utilisés dans la littérature, on ne trouve pas de réel consensus concernant les quantités, volumes et méthodes d'injection mis en œuvre pour un même type d'étude. Qu'il s'agisse du débit, du volume trop important ou du diamètre trop élevé de l'aiguille/capillaire utilisée/é, les paramètres de l'injection sont souvent les arguments avancés pour expliquer des phénomènes à la marge de la physiologie ou des artefacts de mesure. Nous avons donc tâché de minimiser chacun de ces paramètres pour modifier le moins possible l'ECS et les flux interstitiels.

Les volumes injectés en intraparenchymal chez le rongeur varient dans la littérature de 1 μL à 20 nL (Bedussi, Naessens, et al. 2017; Smith et al. 2017; Iliff et al. 2012; Goodman et Iliff 2019; Carare et al. 2008) et sont délivrés soit par infusion soit en une seule fois sous pression. La technique d'injection qui nous a paru la plus adaptée pour notre étude est celle de Smith et al, qui consiste à injecter dans le cortex seulement 20 nL, par impulsion. Cependant, le dépôt en quelques millisecondes, quoique d'un faible volume, nous paraissait encore trop rapide et potentiellement traumatique pour le tissu. En choisissant une infusion lente à raison de 10 nL/min, pendant 5 minutes et en utilisant une seringue Hamilton Neuros dotée d'une aiguille de 0,235 mm de diamètre, nous avons infusé lentement dans le cortex le plus petit volume qu'il nous était possible d'injecter avec précision, soit un volume de 50 nL. L'infusion lente combinée au faible volume nous semblait être le meilleur compromis pour limiter la surpression dans le tissu et éviter de créer une force motrice locale qui aurait provoqué un flux actif non physiologique des molécules injectées vers la périphérie. En réunissant ces conditions, on peut alors assimiler le site d'injection à une source ponctuelle, l'intégrer à l'équation de la diffusion et obtenir une solution analytique valable dans l'espace. Ce prérequis est essentiel notamment pour l'étude IRM. Le défaut tissulaire provoqué par l'aiguille lors de l'injection n'était pas toujours visible sur les coupes de cerveaux analysées. Nous avons néanmoins choisi de censurer cette zone centrale sur l'intégralité des images afin d'exclure tous les artefacts potentiels liés à la déchirure mécanique locale du tissu.

Nous avons ensuite défini la période de temps sur laquelle nous allions réaliser nos mesures. Dans un délai inférieur à 10 min post-injection, des traceurs allant de 10 à 2000 kDa se distribuent de façon

identique autour du site d'injection sur un rayon d'environ 200 à 300 μm (Smith et al. 2017). À ce stade, on ne peut pas encore visualiser de diffusion dans le parenchyme, car la dispersion des traceurs est encore probablement due aux mouvements d'advection induits par l'injection, ce qui explique cette répartition uniforme quelle que soit la taille du traceur. Un autre argument en faveur de cette hypothèse repose sur les résultats de Carare et al. En injectant près de 50 fois plus de volume de traceurs que Smith, Carare détectait au bout de 5 min, pour un dextran de 3 kDa, un signal fluorescent sur 2500 μm d'épaisseur dans le striatum (Carare et al. 2008). Or, d'après les coefficients de diffusion obtenus par Nicholson et Tao (C. Nicholson et Tao 1993), la diffusion libre d'un dextran de 3 kDa n'a lieu en 5 min que dans un rayon maximum d'environ 1200 μm . A fortiori dans un milieu tortueux comme le cerveau et d'après les valeurs de tortuosité trouvées par Nicholson et Tao, on peut calculer que la surface maximale sur laquelle peut s'étaler un dextran de 3 kDa par diffusion correspond à un disque de 700 μm de rayon seulement.

La surface occupée par le signal est donc très nettement influencée par le volume de traceurs injectés, ce qui peut d'autant plus biaiser l'analyse de la diffusion des traceurs que l'intervalle de temps entre la mesure et l'injection est court. À l'inverse, réaliser la mesure dans un intervalle de temps trop long après l'injection nous expose d'une part, à une dilution trop importante du signal pour que celui-ci soit encore détectable dans le parenchyme, et d'autre part, à une élimination des traceurs par clairance systémique et absorption-dégradation cellulaire. Une heure après l'injection, Smith et ses collaborateurs ont mis en évidence que la distribution des traceurs de 10, 70 et 2000 kDa dans le parenchyme était dépendante de leur taille, à savoir que le dextran de 10 kDa se déplaçait plus loin que le dextran de 70 kDa qui lui-même diffusait plus loin que celui de 2000 kDa. En revanche, trois heures après l'injection, et malgré les grandes quantités injectées, Carare ne détectait plus les dextrans de 3 kDa ni de 40 kDa dans le parenchyme.

Au vu du faible volume et de la taille des molécules que nous injectons, nous avons donc choisi pour cette étude de la diffusion des dextrans de réaliser nos mesures à 50 et 60 min, et pour l'étude par IRM de suivre la diffusion de l'agent de contraste pendant 1 h, en réalisant 4 mesures longitudinales avec 4 scans successifs de 15 minutes chacun.

iii. Contrôle des paramètres de la chirurgie et de la stabilité de l'ECS

Les flux de solutés dans le milieu interstitiel ou le LCR au sein du parenchyme cortical peuvent être influencés par de très nombreux facteurs intrinsèques comme , l'hémodynamique cérébrale (van Veluw et al. 2020b; Holstein-Rønsbo et al. 2023b), la pression artérielle (Bedussi, Naessens, et al. 2017; Mestre et al. 2018), la pression intracrânienne (Xiang et al. 2022), le rythme cardiaque, la fréquence respiratoire (Hablitz et al. 2019) et la température (Ferris 2021), ou par des facteurs extrinsèques comme le rythme circadien (Cai et al. 2020) et l'anesthésie (Lulu Xie et al. 2013; Hablitz et al. 2019; Gakuba et al. 2018). Afin d'introduire le moins de perturbations possibles dans nos mesures, nous avons veillé à assurer la plus grande stabilité possible de chacun de ces paramètres.

- Anesthésie

L'anesthésie augmente la fraction volumique de l'ECS (Lulu Xie et al. 2013). Ces variations sont très dépendantes du type d'anesthésique utilisé (Hablitz et al. 2019). L'effet de l'anesthésie sur les flux de solutés et notamment sur les flux de LCR et le flux glymphatique est cependant très controversé. L'équipe de Nedergaard a montré que l'anesthésie, de façon similaire à la phase de sommeil, augmentait le flux glymphatique et la clairance cérébrale, de manière très prononcée avec une anesthésie kétamine/xylazine et dans une moindre mesure sous isoflurane (Lulu Xie et al. 2013; Hablitz et al. 2019; Benveniste et al. 2017). A contrario, les travaux de Gakuba et collègues montrent que le traceur qu'ils injectent dans la *cisterna magna* se distribue bien à l'ensemble du cerveau lors de la phase d'éveil et que l'anesthésie injectable ou par inhalation réduit significativement cette distribution (Gakuba et al. 2018). Dans la même idée, dans leur article de 2019, Proulx et son équipe mettent en évidence un drainage lymphatique plus important lors de la phase d'éveil par rapport à l'état anesthésié (Ma et al. 2019). Ils observent lors de la phase d'éveil un efflux rapide des traceurs du LCR vers la veine saphène et les ganglions lymphatiques, et constatent que les traceurs pénètrent très peu au niveau des espaces périvasculaires (PVS) et pas du tout dans le parenchyme. À l'inverse, sous anesthésie les traceurs du LCR se distribuent dans les PVS et leur efflux vers le compartiment lymphatique est significativement diminué. Ils en déduisent que l'état de veille favorise l'élimination rapide du LCR par la voie

lymphatique au détriment des échanges LCR-liquide interstitiel, qui eux ont majoritairement lieu sous anesthésie ou lors de la phase de sommeil. Ils concluent que puisque l'anesthésie réduit l'efflux de LCR, elle diminue la clairance cérébrale.

On remarque deux effets :

- 1) Quand l'efflux de LCR est diminué lors de l'anesthésie, la clairance des solutés est moins efficace.
- 2) Quand les échanges LCR-ISF sont abolis lors de la phase d'éveil, même si l'efflux de LCR est efficace, les solutés en provenance du parenchyme ne peuvent pas être évacués par le LCR, et donc la clairance est également moins efficace.

Ces résultats en apparence contradictoires par rapport aux conclusions de l'équipe de Nedergaard mettent en évidence l'importance de l'alternance de phases veille/sommeil ou veille/anesthésie pour permettre une clairance efficace de l'ensemble du parenchyme. Goodman et Iliff relient l'effet supprimeur de l'anesthésie sur l'efflux lymphatique à l'hypercapnie qu'elle engendre. Ils le démontrent avec l'anesthésie ketamine/xylazine, mais l'augmentation de la pCO₂ artérielle et la diminution de la réponse cérébrale à l'hypercapnie existent aussi avec d'autres anesthésiques comme l'isoflurane notamment (Massey et Richerson 2017). La mesure qu'ils utilisent pour déterminer l'impact de l'hypercapnie sur les échanges entre le LCR et l'ISF du parenchyme est beaucoup trop peu résolutive. L'augmentation de la surface occupée par le signal qu'ils observent (traceur injecté dans la *cisterna magna*) pendant l'anesthésie en normocapnie versus en hypercapnie pourrait être uniquement due à une meilleure pénétration du LCR dans les PVS. La résolution qu'ils utilisent ne permet pas de présumer des échanges ISF-LCR et l'influx de traceurs qu'ils constatent dans le parenchyme pourrait avoir lieu sans nécessairement s'accompagner d'une diffusion dans le parenchyme cortical. Ce que nous pouvons en conclure par rapport à notre étude c'est que l'hypercapnie induite par l'anesthésie, au mieux n'influe pas sur les échanges LCR-ISF et au pire les limite.

Dans notre étude sur la diffusion moléculaire, le but est de conserver nos traceurs le plus longtemps possible dans l'ECS. Si l'efflux vers les PVS est effectivement réduit sous anesthésie, cela est

même plutôt favorable à notre mesure. Au cas où ce serait l'inverse, étant donné que nos procédures nécessitent dans tous les cas une anesthésie générale des animaux, nous avons décidé d'utiliser l'anesthésique qui provoquait le moins de variations au niveau du flux glymphatique, de l'ECS et des autres paramètres biologiques cités ci-dessus, à savoir l'isoflurane. Enfin, puisque la phase d'éveil altère ou augmente la clairance et modifie les flux liquidiens, il était très important que notre mesure ait lieu sans réveil de l'animal (procédure terminale dans le cas des injections dextrans).

L'isoflurane est un anesthésique par inhalation de la famille des halogénés, couramment utilisé pour une sédation profonde. Il permet un contrôle fin et stable de la profondeur de l'anesthésie et peut être utilisé sur une période de plusieurs heures. La physiologie de la souris sous anesthésie isoflurane en maintien à 1,5 % se rapproche de la physiologie de l'animal éveillé (Constantinides, Mean, et Janssen 2011). L'isoflurane permet de limiter l'effet cardiopresseur important qui existe avec des anesthésiques comme le pentobarbital ou la kétamine/xylazine et d'assurer une constance de la profondeur de l'anesthésie tout au long de la procédure. L'isoflurane est l'anesthésique qui modifie le moins les flux de LCR et les paramètres de l'ECS impliqués dans la diffusion cérébrale. L'EEG de souris sous isoflurane est caractérisé par une proportion plus importante d'ondes β et α qu'avec une anesthésie kétamine/xylazine, ce qui permet de se rapprocher le plus des conditions physiologiques d'éveil en termes d'activité cérébrale (Hablitz et al. 2019; Lulu Xie et al. 2013). L'isoflurane est un dépresseur respiratoire et un vasodilatateur, mais il n'induit pas de variations notables de la pression intracrânienne (Hablitz et al. 2019).

Il est important de relever que l'utilisation de l'anesthésie, même sous isoflurane, place notre expérimentation dans des conditions particulières, notamment au niveau de la capnie et de la température.

- Température

Chez des souris éveillées et en locomotion spontanée, la température corticale est de 35°C, soit près de 2°C inférieure à la température corporelle (Shirey et al. 2015). Malgré une couverture chauffante thermorégulée pour maintenir la température corporelle de la souris à 37,0 +/- 0,1°C, l'anesthésie

isoflurane diminue la température corticale à environ 34,5°C pour un maintien de l'anesthésie autour de 2 % (Shirey et al. 2015). Il importe de souligner que ces mesures sont faites avec des sondes externes positionnées/ introduites dans le parenchyme. Bien que la profondeur puisse compenser une certaine déperdition de chaleur, on peut penser que la trépanation nécessaire à leur introduction dans le cerveau est en partie responsable de cette température cérébrale 2°C plus basse que la température corporelle. En effet, des mesures non invasives de la température du cerveau humain réalisées par spectroscopie RMN montrent plutôt une légère hyperthermie cérébrale (38,5°C) par rapport à la température corporelle (Rzechorzek et al. 2022). Chez la souris, cette température corticale physiologiquement plus basse que la température corporelle, ou du moins plus basse en per-opératoire avec trépanation, et abaissée de près d'1°C sous isoflurane, est très importante à prendre en compte dans les calculs de tortuosité du cortex. La diffusion étant dépendante de la température, il faut donc corriger le coefficient de diffusion libre obtenu à 37°C, à 34-35°C d'après l'équation de Stokes Einstein avant de calculer la tortuosité dans le cortex cérébral.

III. Résultats – Article scientifique

Les résultats de mes travaux sont présentés par la suite sous la forme d'une publication scientifique en cours de soumission intitulée « La taille neuronale influence la diffusion moléculaire dans l'espace extracellulaire cérébral ».

Les objectifs principaux de cet article étaient dans un premier temps de déterminer s'il existait un lien entre la taille neuronale et les flux moléculaires interstitiels dans l'ECS, le but étant de comprendre si on pouvait optimiser ces flux en changeant la morphologie neuronale. Dans un deuxième temps nous souhaitions déterminer l'impact de modifications neuromorphologiques pérennes sur la physiologie de l'ECS, notamment sur sa tortuosité, et sur l'histoarchitecture globale du cortex cérébral. Enfin, notre problématique s'intéressant aux pathologies neurodégénératives nous voulions explorer les effets du vieillissement sur la morphologie neuronale et sur la diffusion moléculaire au sein du cortex cérébral.

Pour cela, nous avons utilisés un modèle de souris knock-out conditionnel inductible de IGF1R neuronal (inIGF1RKO) dont les neurones du cortex cérébral ont une morphologie plus compacte et un soma plus petit que les neurones de souris contrôles. L'injection par stéréotaxie de macromolécules paramagnétiques ou marquées par fluorescence directement dans le cortex de souris inIGF1RKO et contrôles, a permis d'analyser *in vivo*, par IRM, et *ex vivo*, par microscopie optique, les mouvements moléculaires de solutés dans l'ECS. L'étude par microscopie optique a été réalisée sur des cohortes de 6, 10, 15 et 22 mois d'âge, de mâles et de femelles. Enfin, l'immunohistochimie, l'immunofluorescence et la microscopie confocale ont été utilisées pour étudier la morphologie neuronale, les relations anatomiques entre cellules et plus globalement l'histoarchitecture du cortex cérébral.

Nos résultats montrent que la morphologie neuronale affecte bien les flux moléculaires dans l'ECS. En effet, nous montrons qu'un soma plus mince facilite la diffusion des solutés et réduit la tortuosité de l'ECS. Nous démontrons également que cet effet facilitateur observé chez les souris inIGF1RKO est présent dès l'âge adulte, chez les deux sexes, et se maintient tout au long de la vie et du vieillissement de la souris. Enfin, nous mettons en évidence un remaniement de l'histoarchitecture corticale chez

inIGF1RKO qui contribue à renforcer la relation neurovasculaire en rapprochant de façon relative neurones et vaisseaux.

L'ensemble des changements dépendants d'IGF que nous mettons en évidence dans cet article agissent de façon synergique pour améliorer la clairance cérébrale et nous permettent de proposer la morphologie neuronale comme un régulateur des flux moléculaires à travers l'ECS et comme une cible potentielle dans la prévention contre les protéinopathies et maladies neurodégénératives.

Neuron size impacts molecular diffusion in the brain extracellular space

Authors:

Claire Camus^{1,2}, Daniel Balvay^{3,4}, Philippe Lacube^{1,2}, Gwennhael Autret^{3,4}, Saba Aid^{1,2,*}, Martin Holzenberger^{1,2,*}

Affiliations:

¹ INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, U938, Paris, France

² Sorbonne University, Faculty of Health, Paris, France

³ INSERM, Paris Cardiovascular Research Center-PARCC, U970, Paris, France

⁴ Université Paris Cité, Paris, France

* These authors jointly supervised this work

En cours de soumission

STUDY HIGHLIGHTS:

- 1.** The findings are new and original, and the relevant effects statistically significant.
- 2.** This study shows that the size of the neuronal soma is important for the physiology of solute clearance in the mouse cerebral cortex. Results were obtained performing several independent *in vivo* experiments and using two different detection systems.
- 3.** The reported data demonstrate enhanced solute fluxes in females as well as in males, broadening the pertinence of the findings.
- 4.** Effects occurring downstream of the here demonstrated improved diffusion, namely reduced proteotoxicity and diminished neuropathologic consequences due to enhanced A β clearance, which can link the present findings to human pathology, have been established previously in several animal models.
- 5.** The present results provide a novel pathophysiological explanation for the positive effects regarding AD progression that we and others obtained in the past by blocking IGF signalling in the mouse brain.
- 6.** This study is relevant to human health because the diffusion of solutes occurs very similarly in the cerebral cortex of mice and humans, and also because the roles of IGF signalling in the brains of both species are strongly overlapping and largely transposable.
- 7.** For the above reasons this work has also a high translational potential.
- 8.** The reported results, interpretations and conclusions may generate new approaches in the quest of conceiving innovative interventions for the prevention and therapy of neurodegeneration involving proteotoxic solutes.

SUMMARY PARAGRAPH

The cerebral cortex of long-lived mammals performs for many years, but eventually accumulates extracellular metabolites that aggregate as neurotoxic deposits. Excessive molecular accretion during aging, namely of amyloid- β oligomers, owes to insufficient removal of solute waste from the interstitium (Tarasoff-Conway et al. 2015; Selkoe et Hardy 2016; Panza et al. 2019). A healthy clearance for its part depends on efficient molecular diffusion from neurons to capillaries through the complex extracellular space (ECS) (Charles Nicholson et Hrabětová 2017; Smith et al. 2017; Tønnesen, Inavalli, et Nägerl 2018; Soria, Paviolo, et al. 2020; Grassi et al. 2023). We hypothesized that controlling the size of neurons might reduce spatial hindrance to diffusion and improve solute transport across the ECS. Here, we genetically downsized the large cell bodies of the forebrain cortical neurons in mice, and found that solute movements through the interstitium were broadly improved throughout adulthood and during ageing. By microinjecting fluorescent dextrans into the ECS of the mouse isocortex as well as by tracking a gadolinium-based contrast agent using dynamic magnetic resonance imaging (MRI), we showed that a compact shape of neurons significantly enhanced diffusion *in vivo* over a large size range of tracer molecules. MRI moreover revealed that the altered cortical histoarchitecture diminished the tortuosity of the ECS, facilitating rapid solute distribution in the living mouse brain. Interestingly, the neuromorphological changes also moved neurons closer to capillaries. We conclude that limiting neuron size improves diffusion of brain metabolites, favoring their swift systemic removal. These findings identify neuron size as a new player to maintain healthy brain clearance.

INTRODUCTION

Neurons in the cerebral cortex typically function throughout life and are not renewed. Therefore, lasting integrity of the local neural circuits critically depends on efficient protection of neurons from premature loss. The cell bodies of these neurons are deeply embedded in neuropil, a compilation of the countless small-scale processes extending from neurons and glial cells (Kasthuri et al. 2015; Motta et al. 2019; Loomba et al. 2022). At the same time, a dense network of blood capillaries connects the cortical parenchyma to the circulation (Tsai et al. 2009; Ji et al. 2021). Importantly, between the myriads of cortical cellular elements remain just as many gaps and openings that form the exceedingly complex and heterogeneous labyrinth of extracellular space (ECS) filled with interstitial fluid (Charles Nicholson et Hrabětová 2017; Tønnesen, Inavalli, et Nägerl 2018; Paviolo et al. 2020; Soria, Paviolo, et al. 2020; Grassi et al. 2023). Efficient solute transport across the ECS relies on swift molecular diffusion through the interstitial fluid (ISF) between the metabolically highly active cortical neurons and the nearest capillaries (Ji et al. 2021; Ventura-Antunes et Herculano-Houzel 2022; Tønnesen, Hrabětová, et Soria 2023a).

Accumulation of proteotoxins in the ECS is a hallmark of major neurodegenerative pathologies (Jucker et Walker 2013). Namely in age-dependent Alzheimer disease (AD), insufficient clearance causes high ISF concentrations of amyloid beta ($A\beta$) peptides released by neurons, accelerating $A\beta$ aggregation into neurotoxic oligomers (Tarasoff-Conway et al., 2015; reviewed in Selkoe and Hardy, 2016; Panza et al., 2019). We showed that blocking insulin-like growth factor (IGF) signalling specifically in neurons of the mouse isocortex protects lifelong from amyloid pathology by clearing toxic $A\beta$ oligomers from the brain (Gontier et al. 2015; George et al. 2017). However, the relevant mechanisms remained unclear. Meanwhile, the pathophysiology of the cortical ECS determining the elimination of neurotoxic metabolites from the ISF has been much debated and raised considerable therapeutic interest. Nedergaard and coll. for instance showed that circadian ECS plasticity allows efficient brain clearance and waste removal during sleep (L. Xie et al. 2013; Nedergaard et Goldman 2020; Hablitz et Nedergaard 2021). Healthy clearance in turn depends on fast molecular diffusion from neurons to capillaries. Since neurons represent the largest cellular obstacles in the cerebral cortex, we thought that their prominent

size alone might hinder molecular diffusion in the ISF. Interestingly, the size of neurons and of their soma in particular is controlled by few pathways, specifically by IGF and the related mTOR- and S6K-dependent signalling cascades (Klofas et al. 2020; Tariq et al. 2022). We have previously shown that blocking IGF signaling selectively in neurons markedly downsizes the cell soma, particularly its apical section and proximal dendrite, without impairing function (Gontier et al. 2015; George et al. 2017). Here, we used this efficient IGF-1R knockout mouse to directly test the impact of compact neuronal shape on cortical diffusion.

RESULTS

Solute diffusion in the mouse cortex

To measure diffusion in the interstitium, we microinjected fluorescently labelled dextrans of 3, 10 and 40 kDa into the cortex of adult neuronal IGF-1R knockout (inIGF1RKO) and control mice (Fig. 1A,B). Since the ECS ranges from narrow gaps of 20-50 nm up to widths of several 100 nm (Tønnesen, Inavalli, et Nägerl 2018; Tønnesen, Hrabětová, et Soria 2023a), these dextrans can access the entire cortical ECS. All three tracers spread through the ECS according to Gaussian function (Extended Data Fig. 1A-C). To quantify their spread, we compared linear distance covered by dextrans after 1 h of diffusion (Fig. 1C). Expectedly, the 3 and 10 kDa tracers spread significantly further than the 40 kDa (Fig. 1D, $p < 0.0001$). The perfectly Gaussian (Extended Data Fig.1) and size-dependent distribution indicated that solute fluxes in the mouse cortical ECS occurred efficiently by molecular diffusion, consistent with previous studies (Eva Syková et Nicholson 2008a; Holter et al. 2017; Smith et al. 2017). Interestingly, in control and inIGF1RKO mice, the 3 kDa dextran seemed delayed compared to 10 kDa (Fig. 1D; Extended Data Fig. 2), indicating that small diameter molecules take slightly different routes through the ECS than larger ones.

Lean neurons facilitate solute transport

We then compared the dextran spreads between inIGF1RKO mutants and controls, and found a highly significant effect of reduced neuronal cell size on tracer diffusion ($p < 0.0001$) (Fig. 1D). For all three

dextran separately, we ascertained a significant increase of interstitial diffusion in inIGF1RKO isocortex, reaching +11% for 10 kDa and for 40 kDa (both $p < 0.001$), and +17% for 3 kDa dextran ($p < 0.001$), as compared to the respective controls (Fig. 1D). This increase was confirmed by analyzing the dextran microinjections into the contralateral hemisphere, performed under identical conditions, except for a 10 min longer diffusion period (Extended Data Fig. 2). Thus, we showed that the diffusion of molecules with mean hydrodynamic diameters between 2.7 and 9 nm was facilitated in the ECS of inIGF1RKO brains. These findings indicate that limiting the size of neurons can improve the diffusion of soluble metabolites across the cortical ECS of adult mice.

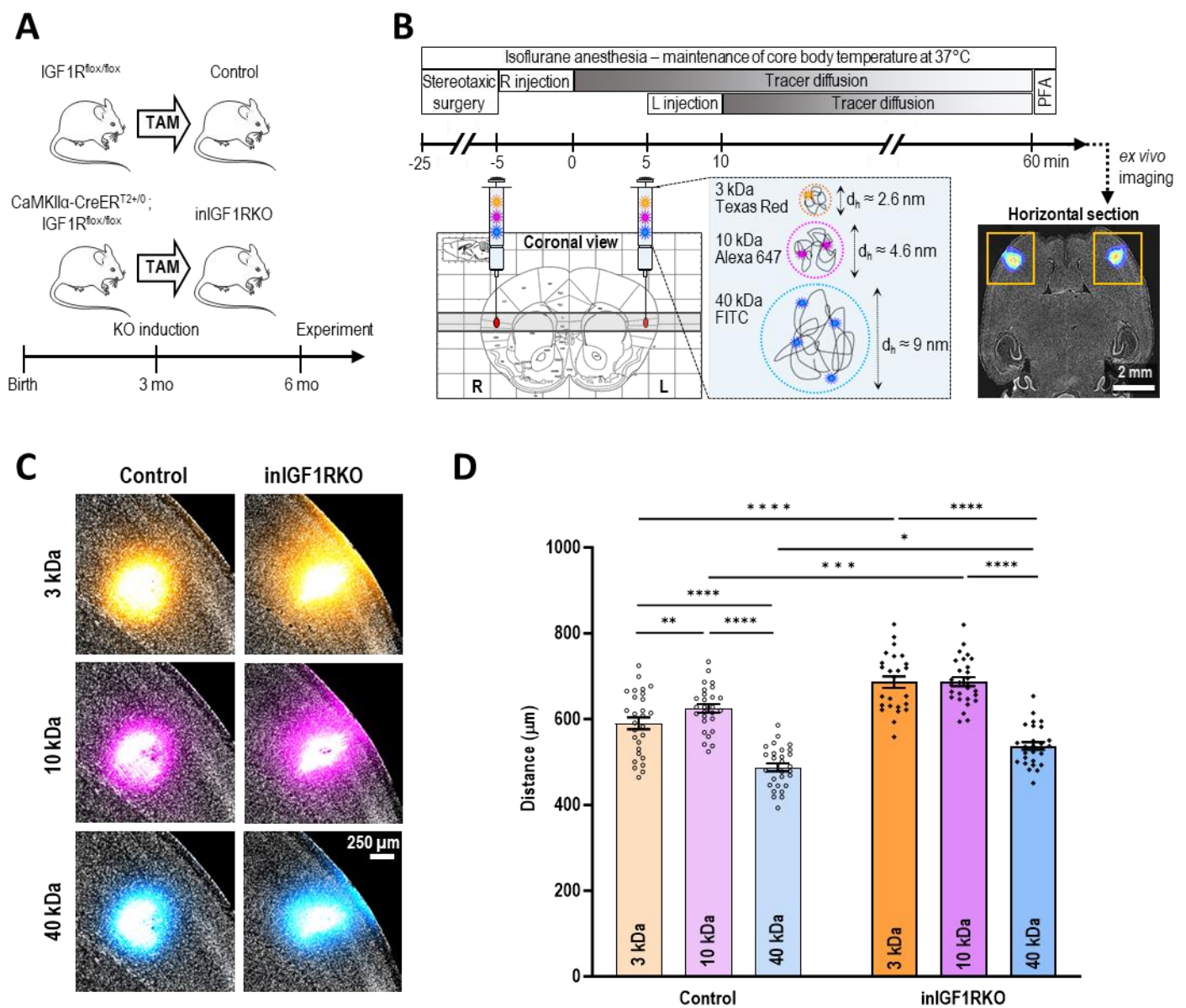


Figure 1. Molecular diffusion is enhanced in inIGF1RKO isocortex

Legend Fig.1. **A**, Neuronspecific IGF-1R knockout (KO) was induced by tamoxifen (TAM) at 3 mo and diffusion measured at ≥ 6 mo. **B**, Timeline for stereotaxic dextran tracer injections under isoflurane anaesthesia. Fluorescence-labelled dextrans of 3, 10 and 40 kDa were co-microinjected into right (R) and left (L) somatosensory cortex, brains perfusion-fixed 60 min post-injection and the ROI (shaded area) cryo-cut in 30- μ m horizontal sections. d_h , calculated hydrodynamic diameter. **C**, Representative dextran spreads. **D**, Linear distance covered by dextrans, determined at 10% of maximum fluorescence ($n = 25-28$, males and females combined). Two-way ANOVA with values matched by molecular weight (MW) reveals significant effect of KO and MW on tracer diffusion (KO effect: $F_{1,55} = 24.85$; $p < 0.0001$; MW effect: $F_{2,102} = 269.2$; $p < 0.0001$). Sidak multiple comparison *post-hoc* test; *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Shown are the individual data points; bars represent mean \pm s.e.m.

ECS tortuosity is related to neuron size

To further explore the effect of diminished neuron size on solute diffusion, we microinjected MRI contrast agent gadomer-17 (Gd-17) bilaterally into the cortex of inIGF1RKO and control mice. We recorded 4 *in vivo* MRI maps at 15 min intervals and quantified the dynamics of spatial Gd-17 distribution (Fig. 2A). With 17.4 kDa molecular mass and a hydrodynamic diameter of 5.8 nm (Fig. 2B), Gd-17 is, like the 10 and 40 kDa dextrans, comparable in size to critical endogenous interstitial metabolites, namely proteotoxic A β oligomers. We first showed that no more than 3% of the Gd-17 signal was lost during the entire MRI measurement, validating Gd-17 for quantitation (Extended Data Fig. 4). As expected, visual comparison revealed constrained diffusion in isocortex, typical for brain parenchyma (Fig. 2C). We then modelled the MRI data using bidimensional Gaussian functions (goodness of fit $R^2 > 0.96$ for all distributions, data not shown) and compared the Gaussian spreads between genotypes after 1 h of diffusion. This revealed that Gd-17 diffused 10% further in the ECS of the inIGF1RKO isocortex compared to controls ($p = 0.0118$; Fig. 2D). Just as for the 10 and 40 kDa dextran diffusion (both +11%), the extra distance covered by Gd-17 in inIGF1RKO brains strongly suggests that a lean neuronal shape facilitated molecular diffusion in the cerebral cortex. Using the data from all 4 maps, we next established diffusion coefficients for inIGF1RKO and control isocortex, and for free medium (Fig. 2E-G). Since the bidimensional components D_X and D_Y were not correlated to cortical anatomy, we combined them to the effective diffusion coefficient D^* . Comparing inIGF1RKO isocortex with controls revealed that the D^* of gadomer-17 was 26% higher in the mutant ECS ($p = 0.0229$) (Fig. 2H). From the individual regressions (Fig. 2E-G) we also derived ECS tortuosity, which reflects the hindrance of diffusion compared to free medium (Fig. 2I; Extended Data Fig. 6). Importantly, inIGF1RKO cortical ECS exhibited 14% lower tortuosity relative to controls ($p = 0.0179$) (Fig. 2I). Collectively, dynamic MRI confirmed that diffusion properties of the ECS were enhanced and tortuosity reduced in the inIGF1RKO isocortex. These results suggest that ECS geometry resulting from suppression of neuronal IGF signalling and following reduction in neuronal cell size improves interstitial transport of solutes through the cortical parenchyma.

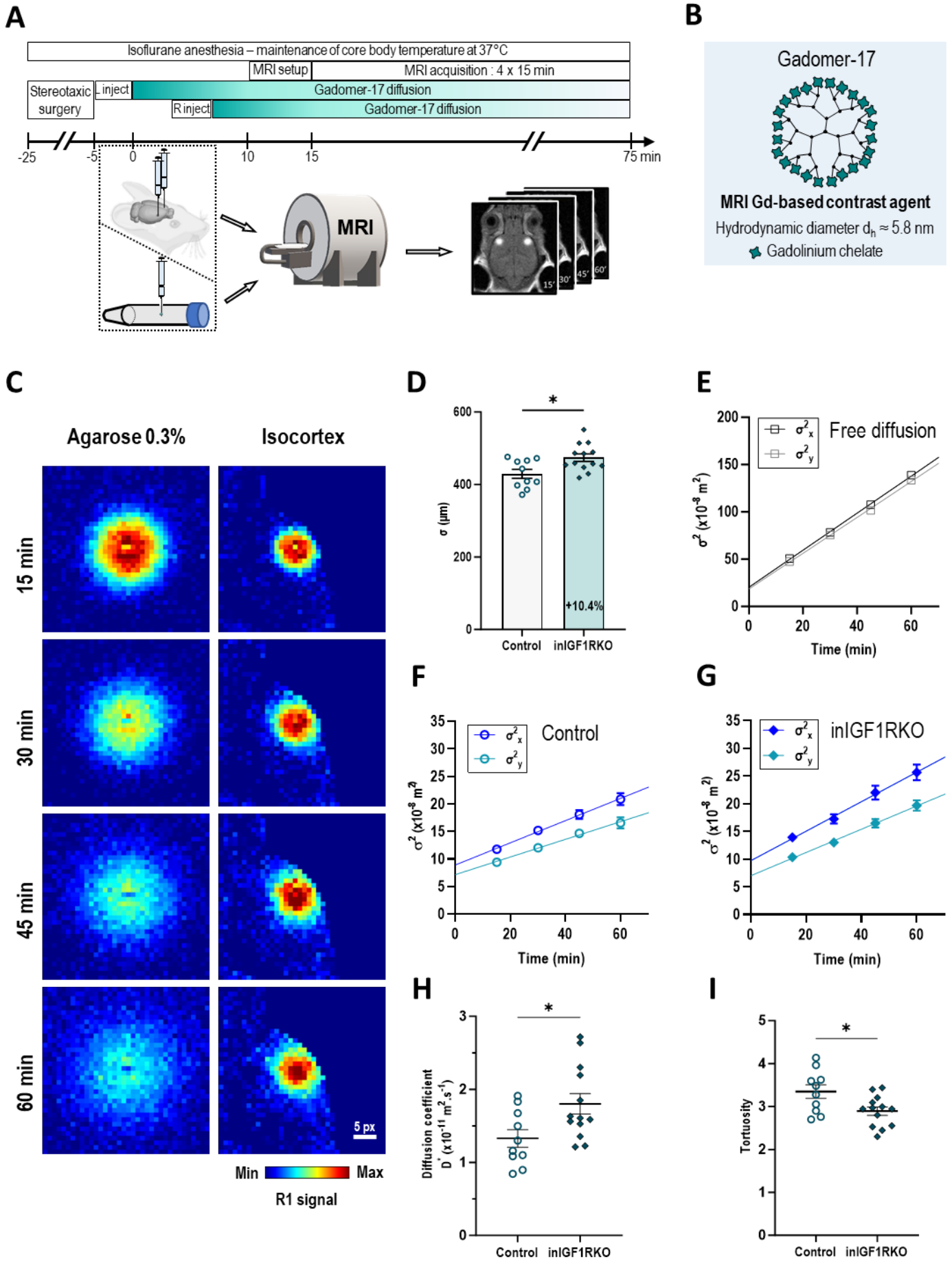


Figure 2. Dynamic MRI of contrast agent gadomer-17 (Gd-17) diffusion in isocortex reveals reduced ECS tortuosity in inIGF1RKO brains

Legend Fig.2. **A**, Timeline of MRI. inIGF1RKO and control mice were used at 6 mo. Tight control of isoflurane anaesthesia is documented in Extended Data Fig. 3. Mice were injected into left (L) and right (R) somatosensory cortex and immediately transferred to a 4.7 T MRI for 4 scans of 15 min. To measure obstacle-free diffusion, Gd-17 was injected into 0.3% agarose gels. **B**, Contrast molecule Gd-17 is a diffusible 17.4 kDa globular dendrimer carrying 24 gadolinium (Gd). **C**, Representative distribution maps at 15 min intervals in isocortex and agarose. The near-spherical fluorescence indicates that mouse cortex is essentially isotropic for Gd-17. **D**, Gaussian spread (σ) of the Gd-17 signal was increased in inIGF1RKO isocortex at 60 min; two-tailed unpaired *t*-test; $*p = 0.0118$. **E-G**, Diffusion maps were fitted with 2D Gaussian functions (Extended Data Fig. 5). Gaussian widths of the main axes σ^2_x and σ^2_y were plotted over time to obtain diffusion coefficients D_x and D_y , according to $\sigma^2_{x,y} = D_{x,y} * 2 * t$. Linear regression of $\sigma^2_{x,y}(t)$ in 0.3% agarose (**E**, $n = 3$), in isocortex of control (**F**, $n = 10$) and of inIGF1RKO mice (**G**, $n = 13$). Data (see Extended Data Table 1 and 2) are the mean \pm s.e.m. **H**, The effective diffusion coefficient D^* (mean of D_x and D_y) showed significant increase in inIGF1RKO isocortex. Two-tailed unpaired *t*-test; $*p = 0.0229$. **I**, Tortuosity λ was significantly diminished in inIGF1RKO isocortex. Two-tailed unpaired *t*-test; $*p = 0.0179$. Female mice were used; shown are individual data points ($n = 10-13$), mean \pm s.e.m.

Enhanced cortical diffusion at all ages

Aging is a major risk factor for neurodegeneration, particularly for AD, and it is suspected to negatively impact brain clearance (Kress et al. 2014; Benveniste, Heerdt, et al. 2019). Thus, we asked whether the enhanced cortical diffusion in inIGF1RKO mice persisted with age. First, we produced evidence that the robust 25% decrease in neuronal cross-section in response to IGF-1R ablation persisted throughout life (Fig. 3A,B). This is consistent with previous results (Gontier et al. 2015; George et al. 2017) and shows that IGF-1R controls the size of postmitotic neurons lifelong. We then compared the diffusion of dextrans in cohorts of 6, 10, 15 and 22 mo of age. For the 3 kDa tracer, cortical diffusion was significantly enhanced at 6 and at 10 mo of age, but not thereafter (Fig. 3C, Extended Data Fig. 7A). For the 10 and 40 kDa tracers, the interstitial diffusion was significantly greater in inIGF1RKO brains at all ages tested, including the oldest cohort at 22 mo of age (Fig. 3D,E). Moreover, and regardless of tracer size or genotype, interstitial diffusion consistently diminished with age by roughly one tenth of the performance in young adults (Fig. 3C-E; Extended Data Fig. 7A-C), indicative of progressively hindered solute movement in the ECS of aging brains (Eva Syková, Vorísek, et al. 2005). Collectively, and despite the significant decrease with aging, interstitial diffusion was consistently higher by about 9 to 17% in inIGF1RKO isocortex for the large dextrans (Fig. 3G-H). Thus, we demonstrated that adult-onset suppression of IGF1R resulting in durable remodelling of neuronal cell size led to lifelong

facilitated interstitial solute diffusion. This suggests that the underlying changes in ECS geometry effectively improve diffusion independently from all age-related modifications.

Lean neurons draw closer to capillaries

We then turned to the cortical capillary network to assess possible vascular changes impacting clearance. We first checked endothelial cell (EC) markers in mutants and control brains and found 10 out of 119 selected EC markers differentially regulated in inIGF1RKO mice (Fig. 4A, Extended Data Table 3). These genes were all upregulated and linked to EC survival (Prex2, Ptrf, Tek), angiogenesis (Sox18) and cell junctions (Cldn5, Pecam1), suggesting that the vascular network structurally responded to the observed neuromorphological changes. We therefore decided to examine neurocapillary histology (Fig. 4B). Using confocal microscopy, we showed that neuronal density and capillary length density tended to be increased in inIGF1RKO isocortex (Fig. 4B-D), while neuroglial ratio and neurons per capillary length remained unchanged, and capillary straightness decreased (Extended Data Fig. 8A-E). Together, this indicated a moderate and essentially proportionate compaction of the inIGF1RKO parenchyma. Significantly, in the brains of inIGF1RKO mice, neurons moved closer to capillaries and the distances between neighbouring neurons diminished, indicating that neurocapillary diffusion paths were on average shorter in the inIGF1RKO isocortices (Fig. 4E,F).

Considering the combined effects of improved diffusion and reduced neurocapillary distance, solutes may take on average up to 45% longer to exit the ECS in control brains compared to inIGF1RKO. This estimated delay predicts higher waste metabolite concentrations in control parenchyma, particularly in the microdomains that are furthest from capillaries. Fig. 4G shows a representative reconstruction of neurocapillary units from the isocortex. Since most neurons are roughly 10 μm distant from the nearest capillary surface, local maxima of metabolites occur essentially in interneural sections of the cortical ECS. This part of the ECS is all the more distant from efficient capillary solute removal as the neuronal silhouettes are large, as resumed in Fig. 4H.

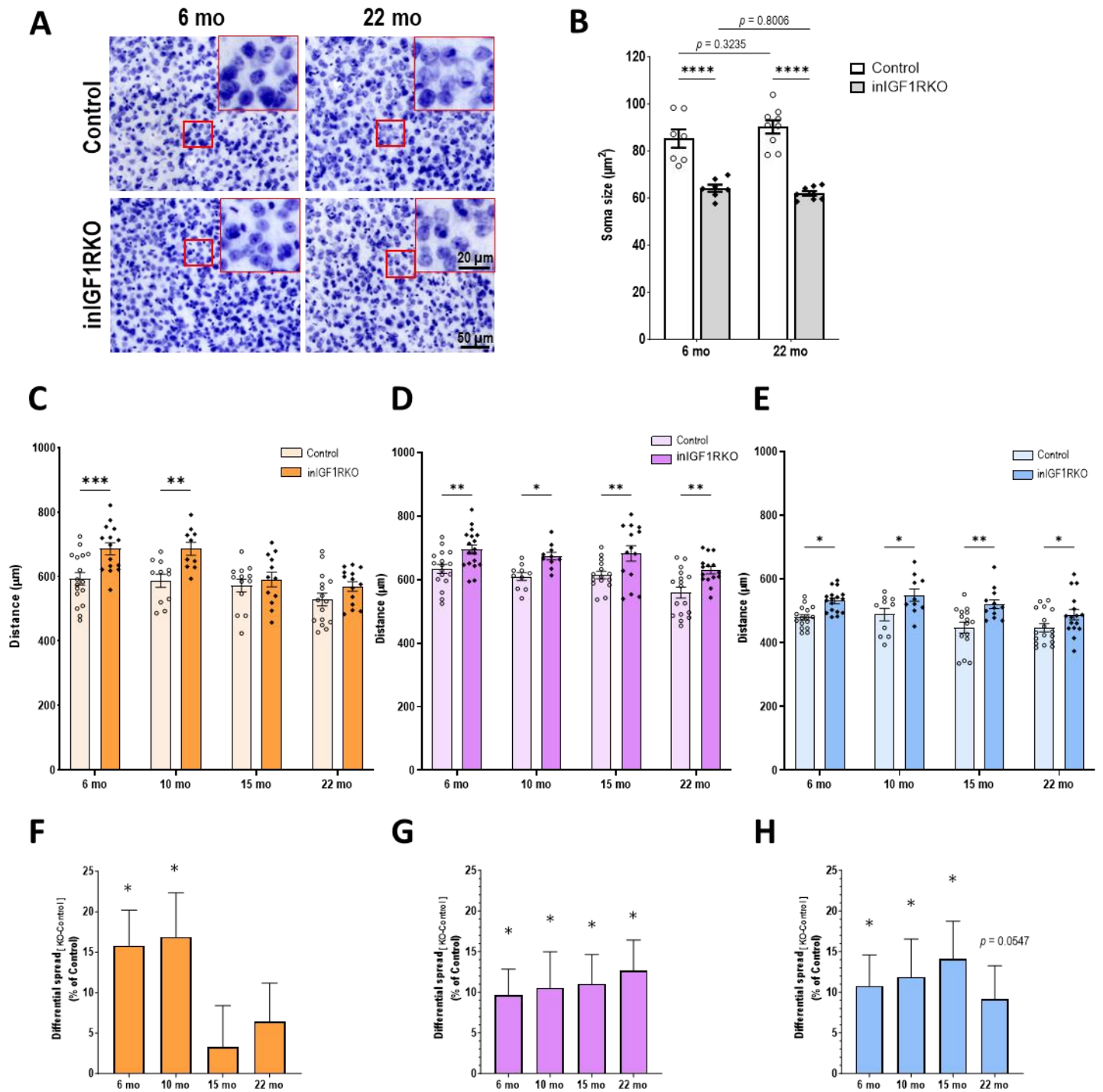


Figure 3. The lean neuronal phenotype in inIGF1RKO brains persists lifelong and durably enhances solute diffusion across the ECS

A, Representative cresyl violet staining of cortical neurons from 6 and 22-mo-old brains. **B**, Morphometry of neuronal soma demonstrated reduction of soma size in inIGF1RKO mice at young adult and advanced age. Two-way ANOVA reveals decrease of neuronal cross-section in KO ($F_{1,27} = 93.50$; $p < 0.0001$) and no change with age ($F_{1,27} = 0.2874$; $p = 0.5963$); Sidak multiple comparison post-hoc test; **** $p < 0.0001$ ($n = 7$ to 9 ; males and females combined). **C-E**, Dextran tracer diffusion through the isocortex using 3 kDa (**C**), 10 kDa (**D**) and 40 kDa (**E**) at 6, 10, 15 and 22 mo ($n = 11-17$; males and females showed no difference and are combined). Spread was measured at 10% of maximum fluorescence. Two-way ANOVA revealed significant effects of KO on diffusion for

Legend Fig.3. (suite) 3 kDa (**C**, $F_{1,100} = 20.18$; $p < 0.0001$), for 10 kDa (**D**, $F_{1,108} = 33.01$; $p < 0.0001$) and 40 kDa (**E**, $F_{1,105} = 30.20$; $p < 0.0001$). The effect of age on diffusion was likewise significant for all 3 dextrans (**C**, $F_{3,100} = 10.62$; $p < 0.0001$; **D**, $F_{3,108} = 8.15$; $p < 0.0001$; **E**, $F_{3,105} = 4.81$; $p = 0.0035$). Shown are q -values from two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli: * $q < 0.05$, ** $q < 0.01$, *** $q < 0.001$. **F-H**, Differential spread in percent of control, from data in (**C-E**) comparing the impact of IGF-1R suppression at different ages. Increased diffusion was tested by unpaired t -test; * $p < 0.05$ for average difference significantly different from zero. Shown are mean \pm s.e.m. and individual data points.

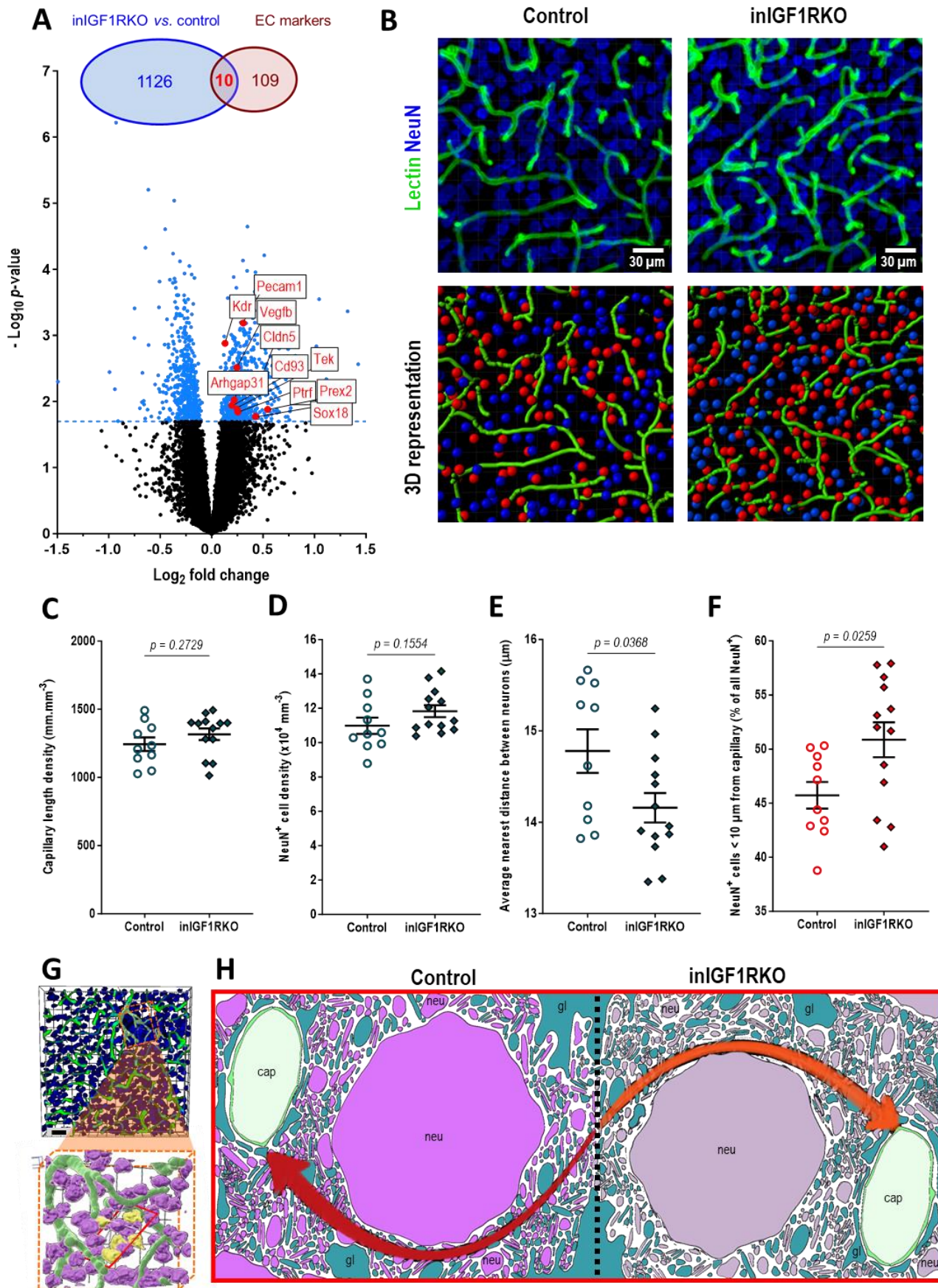


Figure 4. The histomorphological transformations in cerebral cortex subsequent to neuronal IGF1R ablation move neurons closer to capillaries and neighbouring neurons

Legend Fig.4. A, Venn diagram shows overlap between differentially expressed genes (DEG) identified in inIGF1RKO hippocampus (623 up-, 513 downregulated) and 119 genes selectively expressed by brain endothelial cells (EC) (Butler et al. 2016). Intersection identifies 10 genes (red dots), all being significantly upregulated (Extended Data Table 3). DEG with $p < 0.02$ are in blue; microarray data from George *et al.* (George et al. 2017). **B**, Upper row: confocal micrograph from inIGF1RKO (right) and control (left) cortical sections showing neuronal somas (blue) and capillary basal membranes (green). Lower images: corresponding 3D reconstruction of neuronal somas (spheres) and capillaries (strings). Neurocapillary distance: red spheres represent neurons fewer than 10 μm , blue spheres neurons $\geq 10 \mu\text{m}$ away from the nearest capillary. **C-D**, Capillary length (**C**), and neuronal density (**D**) were slightly but not significantly higher in inIGF1RKO cortex. **E**, Average distance between neurons was shorter in inIGF1RKO cortex. **F**, The proportion of neurons being close ($< 10 \mu\text{m}$) to capillaries was significantly increased in inIGF1RKO. Shown are mean \pm s.e.m; two-tailed unpaired *t*-test; $n = 10-13$. **G**. A representative neurocapillary complex from parenchyma reconstructions. **H**. Schematic prototype of the neurocapillary complex. The average intercapillary distance of 40-50 μm is known to be tightly regulated by oxygen supply to neurons. Cortical neurons typically face a capillary on one side, and enclose on the opposite side in conjunction with other neurons, an ECS domain of maximum distance to capillaries. Abbreviations: cap, capillary lumen; gl, glial cells; neu, neuron. In green colour, endothelial cells.

DISCUSSION

We showed that solute diffusion in the cortical ECS is improved in mice with neuronal IGF1R gene knockout. Loss of IGF signaling diminished the size of the neurons, which are the largest obstacles within the brain parenchyma. Fig. 4H shows the typical configuration, with neurons and glial cells embedded in neuropil. Capillaries in the mouse cortex are on average about 40 μm distant from each other. Thus, a neuron is typically facing one capillary, and this neurocapillary configuration is mirrored on the backside of the neuron. The gray matter may thus be considered as a cleverly folded but basically two-layer epithelium with distinct neurocapillary and interneural ECS domains, whereby the latter could be regarded as “backyards” with respect to solute diffusion. This prototypic histoarchitecture could explain why neuronal silhouettes are significant obstacles for solute removal. As can be deduced from the schematic drawing, the presence of large cell bodies elongates the direct diffusion paths to the nearest capillary. Large neuronal somas standing together may form solute traps that retard and prolong the transit time of molecules like A β , increasing the probability of molecular interaction including aggregate formation (Ackleh et al. 2021; Knowles et al. 2009; Linse 2017). This process is intrinsically slow and insidious, especially in the context of Alzheimer pathology, and could be the reason for the long delay between early effects on diffusion and severe late-life consequences in terms of neurodegeneration.

Neuronal morphology and cortical diffusion

We asked whether changing the size of neurons impacts molecular diffusion. Using IGF1R knockout, we selectively reduced neuron size by diminishing average cell soma by about one third. Since neurons with their dendritic arbor and adjacent ECS account for approximately half of the cortical volume, cell autonomous reduction in neuron size will certainly increase the proportion of the ECS, shortly after IGF1R ablation. Although we still lack experimental data on ECS volume fraction in our mutant, we assume that the proportion of the ECS will normalize again afterwards, through an endogenous process of neuropil compaction, and regress towards its normal value around 19-20% of the overall cortical volume (Charles Nicholson et Hrabětová 2017). The idea is that ECS does not durably reflect space that cells do no longer occupy, but that the ECS is, at least on the long run, rather defined by factors like membrane-standing macromolecules, osmolarity, systemic environment, and capillary forces. A direct

consequence of such a dynamic adaptation would be that strongly improved diffusion after IGF1R knockout in adulthood eventually normalizes thereafter, something that we suspect when considering the 3 kDa dextran data. In fact, results for the 3 kDa dextran turned out to be slightly different compared to the two larger dextrans. This may indeed have resulted from specific ECS nanodomains in the aged isocortex, which trap and retain preferentially smaller molecules. However, this seems to be a complex process, and one reading would be that the nanodomain changes generated rapidly after IGF1R knockout remain only for a couple of months, temporarily facilitating small molecule diffusion, and that histoanatomical sedimentation finally returns to a physiological compaction of these ECS structures. This would explain why the molecular sizes that show durably enhanced diffusion in IGF1RKO brains are the larger ones more than the smaller ones.

For waste metabolites like A β , there is essentially no active transport for the initial trajectory between the neuronal cell surface and the pericapillary space. This first step towards clearance occurs mostly, if not entirely, driven by simple diffusion (Abbott et al. 2018; Koundal et al. 2020; Smith et al. 2017). The present data support that view, in particular when one considers the highly reproducible Gaussian distributions of dextrans and Gd-17. Once diffusible solutes approach a capillary, advective bulk fluid movements most likely take over evacuating solutes to the CSF or to the lumen of the blood vessels.

Some methodological considerations may be allowed. In the above experiments and as far as tested, both sexes show the effect of neuronal soma size on diffusion. This needs to be underscored since several IGF-dependent phenotypes have been reported sex-dimorphic, and it means here that the findings are important most likely for both sexes. We insisted on the use of two different methods for detecting enhanced diffusion, in order to reproduce our findings in independent experiments. The use of IRM was particularly helpful as it allows establishing diffusion coefficients and comparing tortuosity (Marty et al. 2013; Soria, Miguelez, et al. 2020b; Eva Syková et Nicholson 2008b). Both methods allow measuring the effects of IGF signalling on diffusion in a significant volume of the cerebral cortex, including all neuroanatomical layers in a large pathophysiologically relevant region. We would like to emphasize also that the conditional gene knockout of IGF1R was used here as a powerful endpoint and as proof of principle showing that diffusion increases as the soma size diminishes. Importantly and although in mice

even an ablation of the neuronal IGF1R in the adult does not seem to impair neuronal function and has no overt negative impact on neuronal health (Gontier et al. 2015; George et al. 2017; Freude et al. 2009; François et al. 2017), we do not suggest to abolish IGF signalling completely as a possible therapeutic means, but to explore strategies of partial inhibition of IGF1R for benefits in view of disease prevention.

Interstitial solute flux connects cell size to proteotoxic disease

Solutes with proteotoxic potential span a wide size range, from monomeric A β of 4 kDa to oligomers of 50 kDa and more (Pryor, Moss, et Hestekin 2012). We found increased diffusion for molecules between 3 and 40 kDa suggesting that the diffusion of the most toxic oligomeric A β was improved. With respect to A β aggregation and although this is normally a statistically rare event, the pathogenic risk arises from the fact that any large oligomer can translate into lasting proteotoxicity (Sakono et Zako 2010). To prevent nucleation as the early form of aggregation, maintaining a high average distance between molecules is important, and to ensure that, the time during which molecules transit through the ECS needs to be kept as short as possible. High concentrations of solute metabolites in the proximity of neurons are critical in this regard. Physiological elimination of metabolites by diffusion can therefore be considered as a competition between speed of diffusion and the tendency to aggregate. Reduced diffusion in cortex with enlarged neurons represents a higher risk of molecular interaction and thus of aggregation into toxic oligomeric forms.

How does the 11-17% difference in linear diffusion and 35% difference in diffusion coefficient that we found accelerate or prevent the progression of AD disease? We believe that as soon as the neuronal cell size is downregulated in our model, numerous molecular aggregates are prevented. Since this reduction lasts throughout adult life and aging, significantly fewer seeds are formed preventing aggregates that would otherwise form and over time grow into larger neurotoxic deposits. Increasing the diffusion of A β across the ECS eventually postpones the process of aggregation and plaque formation. This also implies that in extremely long-lived species like humans, where aggregates normally appear relatively slowly with age, the preventive potential of even slight improvement of diffusion is multiplied by the long-time periods of incubation.

One may speculate that the strong prevalence of neurodegenerative disease like AD in industrialized societies is associated with somatotropic mechanisms. Many men and women nowadays develop to their full growth potential, and the rich and abundant nutrition sustains growth through the constant stimulation of the somatotropic hormone axis. Noteworthy is that IGF-1 is a sensitive marker of abundant nutrition. While this fits well with epidemiological data, it is, of course, only a simple extrapolation. Nevertheless, long lifespan in combination with high somatotropic hormone levels as most humans experience today, could be an unfortunate combination in terms of neurodegenerative risk. If nutrition through IGF signalling regulates even modestly the size of cortical neurons in humans, the possibly impaired A β diffusion has sufficient time to develop into AD pathology. Finally, similar to the circadian changes in ECS volume that help clearing the brain from metabolites (L. Xie et al. 2013), we may speculate that long-term plasticity and in particular repeated changes in neuronal soma size, though not necessarily of the same amplitude as we generated here, may be efficient in keeping the interstitium free from aggregates. The underlying idea being that the mammalian brain, especially in the long-lived species, is not built to be maintained for very long periods of time under full somatotropic tone, without increasing the risk of aggregates developing into plaques and other neurotoxic molecular accretion.

MAIN REFERENCES

1. Tarasoff-Conway, J. M. et al. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nature Rev. Neurol.* **11**, 457-70 (2015). DOI: 10.1038/nrneurol.2015.119. PMID: 26195256
2. Selkoe D. J. & Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **8**, 595-608 (2016). DOI: 10.15252/emmm.201606210. PMID: 27025652
3. Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G. & Imbimbo, B. P. A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **15**, 73-88 (2019). DOI: 10.1038/s41582-018-0116-6. PMID: 30610216

4. Smith, A. J., Yao, X., Dix, J. A., Jin, B. J. & Verkman, A. S. Test of the 'glymphatic' hypothesis demonstrates diffusive and aquaporin-4-independent solute transport in rodent brain parenchyma. *Elife* **6**, e27679 (2017). doi: 10.7554/eLife.27679.
5. Nicholson, C. & Hrabětová, S. Brain extracellular space: The final frontier of neuroscience. *Biophys J* **113**, 2133-2142 (2017). doi: 10.1016/j.bpj.2017.06.052. PMID: 28755756
6. Tønnesen, J., Inavalli, V. V. G. K. & Nägerl, U. V. Super-resolution imaging of the extracellular space in living brain tissue. *Cell* **172**, 1108-1121 (2018).
7. Soria, F. N. et al. Synucleinopathy alters nanoscale organization and diffusion in the brain extracellular space through hyaluronan remodeling. *Nat. Commun.* **11**, 3440 (2020). doi: 10.1038/s41467-020-17328-9. PMID: 32651387
8. Grassi, D. et al. Nanoscale and functional heterogeneity of the hippocampal extracellular space. *Cell Rep.* **42**, 112478 (2023). doi: 10.1016/j.celrep.2023.112478. PMID: 37149864
9. Kasthuri, N. et al. Saturated reconstruction of a volume of neocortex. *Cell* **162**, 648-661 (2015). doi: 10.1016/j.cell.2015.06.054. PMID: 26232230
10. Motta, A. et al. Dense connectomic reconstruction in layer 4 of the somatosensory cortex. *Science* **366**, eaay3134 (2019). doi: 10.1126/science.aay3134. PMID: 31649140
11. Loomba, S. et al. Connectomic comparison of mouse and human cortex. *Science* **377**, eabo0924 (2022). doi: 10.1126/science.abo0924. PMID: 35737810
12. Tsai, P. S. et al. Correlations of neuronal and microvascular densities in murine cortex revealed by direct counting and colocalization of nuclei and vessels. *J. Neurosci.* **29**, 14553-14570 (2009). doi: 10.1523/JNEUROSCI.3287-09.2009. PMID: 19923289
13. Ji, X. et al. Brain microvasculature has a common topology with local differences in geometry that match metabolic load. *Neuron* **109**, 1168-1187.e13 (2021). doi: 10.1016/j.neuron.2021.02.006. PMID: 33657412

14. Paviolo, C. et al. Near-infrared carbon nanotube tracking reveals the nanoscale extracellular space around synapses. *Nano Lett.* **22**, 6849-6856 (2022).
15. Ventura-Antunes, A. & Herculano-Houzel, S. Energy supply per neuron is constrained by capillary density in the mouse brain. *Front. Integr. Neurosci.* **29**, 760887 (2022). doi: 10.3389/fnint.2022.760887. eCollection 2022. PMID: 36105258
16. Tønnesen, J., Hrabětová, S. & Soria, F. N. Local diffusion in the extracellular space of the brain. *Neurobiol. Dis.* **177**, 105981 (2023). DOI: 10.1016/j.nbd.2022.105981. PMID: 36581229
17. Jucker, M. & Walker, L. C. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* **501**, 45-51 (2013). DOI: 10.1038/nature12481. PMID: 24005412.
18. Gontier, G., George, C., Chaker, Z., Holzenberger, M. & Aïd, S. Blocking IGF signaling in adult neurons alleviates Alzheimer's disease pathology through amyloid- β clearance. *J Neurosci* **35**, 11500-11513 (2015). doi: 10.1523/JNEUROSCI.0343-15.2015. PMID: 26290229
19. George, C. et al. The Alzheimer's disease transcriptome mimics the neuroprotective signature of IGF-1 receptor-deficient neurons. *Brain* **140**, 2012-2027 (2017). doi: 10.1093/brain/awx132. PMID: 28595357
20. Xie, L. et al. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* **342**, 373-377 (2013). doi: 10.1126/science.1241224. PMID: 24136970
21. Nedergaard, M. & Goldman, S.A. Glymphatic failure as a final common pathway to dementia. *Science* **370**, 50-56 (2020). doi: 10.1126/science.abb8739. PMID: 33004510
22. Hablitz, L. M. & Nedergaard, M. The glymphatic system. *Curr. Biol.* **31**, R1371-R1375 (2021). doi: 10.1016/j.cub.2021.08.026. PMID: 34699796
23. Klofas, L. K. et al. DEPDC5 haploinsufficiency drives increased mTORC1 signaling and abnormal morphology in human iPSC-derived cortical neurons. *Neurobiol. Dis.* **143**, 104975 (2020). PMID: 32574724. DOI: 10.1016/j.nbd.2020.104975

24. Tariq, K. et al. Disruption of mTORC1 rescues neuronal overgrowth and synapse function dysregulated by PTEN loss. *Cell Rep.* **41**, 111574 (2022). DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111574. PMID: 36323257
25. Syková, E. & Nicholson, C. Diffusion in brain extracellular space. *Physiol. Rev.* **88**, 1277-1340 (2008). doi: 10.1152/physrev.00027.2007. PMID: 18923183
26. Holter, K. E. et al. Interstitial solute transport in 3D reconstructed neuropil occurs by diffusion rather than bulk flow. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **114**, 9894-9899 (2017).
27. Marty, B. et al. Hindered diffusion of MRI contrast agents in rat brain extracellular micro-environment assessed by acquisition of dynamic T1 and T2 maps. *Contrast Media Mol. Imaging* **8**, 12-19 (2013). doi: 10.1002/cmml.1489. PMID: 23109388
28. Mériaux, S., Conti, A. & Larrat, B. Assessing diffusion in the extra-cellular space of brain tissue by dynamic MRI mapping of contrast agent concentrations. *Front. Phys.* **6**, doi: 10.3389 (2018).
29. Kress, B. T. et al. Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Ann. Neurol.* **76**, 845-861 (2014). doi: 10.1002/ana.24271. PMID: 25204284
30. Benveniste, H. et al. The glymphatic system and waste clearance with brain aging: a review. *Gerontology* **65**, 106-119 (2019). doi: 10.1159/000490349. PMID: 29996134.
31. Syková, E. et al. Changes in extracellular space size and geometry in APP23 transgenic mice: a model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **102**, 479-484 (2005). doi: 10.1073/pnas.0408235102. PMID: 15630088
32. Butler, L. M. et al. Analysis of body-wide unfractionated tissue data to identify a core human endothelial transcriptome. *Cell Syst.* **3**, 287-301.e3 (2016). DOI: 10.1016/j.cels.2016.08.001.PMID: 27641958
33. Ackleh, A. S., Elaydi, S., Livadiotis, G. & Veprauskas, A. A continuous-time mathematical model and discrete approximations for the aggregation of β -Amyloid. *J Biol Dyn* **15**, 109–136 (2021). DOI: 10.1080/17513758.2020.1869843

34. Knowles, T. P. J. et al. An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science* 326, 1533–1537 (2009). DOI: 10.1126/science.1178250
35. Linse, S. Monomer-dependent secondary nucleation in amyloid formation. *Biophys Rev* 9, 329–338 (2017). DOI: 10.1007/s12551-017-0289-z
36. Abbott, N. J., Pizzo, M. E., Preston, J. E., Janigro, D. & Thorne, R. G. The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a ‘glymphatic’ system? *Acta Neuropathol* 135, 387–407 (2018).
37. Koundal, S. et al. Optimal Mass Transport with Lagrangian Workflow Reveals Advective and Diffusion Driven Solute Transport in the Glymphatic System. *Sci Rep* 10, 1990 (2020).
38. Soria, F. N., Miguelez, C., Peñagarikano, O. & Tønnesen, J. Current Techniques for Investigating the Brain Extracellular Space. *Front Neurosci* 14, 570750 (2020).
39. Freude, S. et al. Neuronal IGF-1 resistance reduces Abeta accumulation and protects against premature death in a model of Alzheimer’s disease. *FASEB J.* 23, 3315–3324 (2009).
40. François, J.-C. et al. Disrupting IGF Signaling in Adult Mice Conditions Leanness, Resilient Energy Metabolism, and High Growth Hormone Pulses. *Endocrinology* 158, 2269–2283 (2017).
41. Pryor, N. E., Moss, M. A. & Hestekin, C. N. Unraveling the Early Events of Amyloid- β Protein (A β) Aggregation: Techniques for the Determination of A β Aggregate Size. *Int J Mol Sci* 13, 3038–3072 (2012).
42. Sakono, M. & Zako, T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers. *The FEBS Journal* 277, 1348–1358 (2010).

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Molecular diffusion is enhanced in inIGF1RKO isocortex. **A**, Neuronspecific IGF-1R knockout (KO) was induced by tamoxifen (TAM) at 3 mo and diffusion measured at ≥ 6 mo. **B**, Timeline for stereotaxic dextran tracer injections under isoflurane anaesthesia. Fluorescence-labelled dextrans of 3, 10 and 40 kDa were co-microinjected into right (R) and left (L) somatosensory cortex, brains perfusion-fixed 60 min post-injection and the ROI (shaded area) cryo-cut in 30- μ m horizontal sections. d_h , calculated hydrodynamic diameter. **C**, Representative dextran spreads. **D**, Linear distance covered by dextrans, determined at 10% of maximum fluorescence ($n = 25-28$, males and females combined). Two-way ANOVA with values matched by molecular weight (MW) reveals significant effect of KO and MW on tracer diffusion (KO effect: $F_{1,55} = 24.85$; $p < 0.0001$; MW effect: $F_{2,102} = 269.2$; $p < 0.0001$). Sidak multiple comparison *post-hoc* test; $***p < 0.0001$, $**p < 0.001$, $*p < 0.01$, $p < 0.05$. Shown are the individual data points; bars represent mean \pm s.e.m.

Fig. 2. Dynamic MRI of contrast agent gadomer-17 (Gd-17) diffusion in isocortex reveals reduced ECS tortuosity in inIGF1RKO brains. **A**, Timeline of MRI. inIGF1RKO and control mice were used at 6 mo. Tight control of isoflurane anaesthesia is documented in Extended Data Fig. 3. Mice were injected into left (L) and right (R) somatosensory cortex and immediately transferred to a 4.7 T MRI for 4 scans of 15 min. To measure obstacle-free diffusion, Gd-17 was injected into 0.3% agarose gels. **B**, Contrast molecule Gd-17 is a diffusible 17.4 kDa globular dendrimer carrying 24 gadolinium (Gd). **C**, Representative distribution maps at 15 min intervals in isocortex and agarose. The near-spherical fluorescence indicates that mouse cortex is essentially isotropic for Gd-17. **D**, Gaussian spread (σ) of the Gd-17 signal was increased in inIGF1RKO isocortex at 60 min; two-tailed unpaired *t*-test; $*p = 0.0118$. **E-G**, Diffusion maps were fitted with 2D Gaussian functions (Extended Data Fig. 5). Gaussian widths of the main axes σ_x^2 and σ_y^2 were plotted over time to obtain diffusion coefficients D_x and D_y , according to $\sigma_{x,y}^2 = D_{x,y} * 2 * t$. Linear regression of $\sigma_{x,y}^2(t)$ in 0.3% agarose (**E**, $n = 3$), in isocortex of control (**F**, $n = 10$) and of inIGF1RKO mice (**G**, $n = 13$). Data (see Extended Data Table 1 and 2) are the mean \pm s.e.m. **H**, The effective diffusion coefficient D^* (mean of D_x and D_y) showed significant increase in inIGF1RKO isocortex. Two-tailed unpaired *t*-test; $*p = 0.0229$. **I**, Tortuosity λ was

significantly diminished in inIGF1RKO isocortex. Two-tailed unpaired *t*-test; **p* = 0.0179. Female mice were used; shown are individual data points (n = 10-13), mean ± s.e.m.

Fig. 3. The lean neuronal phenotype in inIG1RKO brains persists lifelong and durably enhances solute diffusion across the ECS. **A**, Representative cresyl violet staining of cortical neurons from 6 and 22-mo-old brains. **B**, Morphometry of neuronal soma demonstrated reduction of soma size in inIGF1RKO mice at young adult and advanced age. Two-way ANOVA reveals decrease of neuronal cross-section in KO ($F_{1,27} = 93.50$; $p < 0.0001$) and no change with age ($F_{1,27} = 0.2874$; $p = 0.5963$); Sidak multiple comparison post-hoc test; **** $p < 0.0001$ (n = 7 to 9; males and females combined). **C-E**, Dextran tracer diffusion through the isocortex using 3 kDa (**C**), 10 kDa (**D**) and 40 kDa (**E**) at 6, 10, 15 and 22 mo (n = 11-17; males and females showed no difference and are combined). Spread was measured at 10% of maximum fluorescence. Two-way ANOVA revealed significant effects of KO on diffusion for 3 kDa (**C**, $F_{1,100} = 20.18$; $p < 0.0001$), for 10 kDa (**D**, $F_{1,108} = 33.01$; $p < 0.0001$) and 40 kDa (**E**, $F_{1,105} = 30.20$; $p < 0.0001$). The effect of age on diffusion was likewise significant for all 3 dextrans (**C**, $F_{3,100} = 10.62$; $p < 0.0001$; **D**, $F_{3,108} = 8.15$; $p < 0.0001$; **E**, $F_{3,105} = 4.81$; $p = 0.0035$). Shown are *q*-values from two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli: **q* < 0.05, ***q* < 0.01, ****q* < 0.001. **F-H**, Differential spread in percent of control, from data in (**C-E**) comparing the impact of IGF-1R suppression at different ages. Increased diffusion was tested by unpaired *t*-test; **p* < 0.05 for average difference significantly different from zero. Shown are mean ± s.e.m. and individual data points.

Fig. 4. The histomorphological transformations in cerebral cortex subsequent to neuronal IGF1R ablation move neurons closer to capillaries and neighbouring neurons. **A**, Venn diagram shows overlap between differentially expressed genes (DEG) identified in inIGF1RKO hippocampus (623 up-, 513 downregulated) and 119 genes selectively expressed by brain endothelial cells (EC) (Butler et al. 2016). Intersection identifies 10 genes (red dots), all being significantly upregulated (Extended Data Table 3). DEG with *p* < 0.02 are in blue; microarray data from George *et al.* (George et al. 2017). **B**, Upper row: confocal micrograph from inIGF1RKO (right) and control (left) cortical sections showing neuronal somas (blue) and capillary basal membranes (green). Lower images: corresponding 3D

reconstruction of neuronal somas (spheres) and capillaries (strings). Neurocapillary distance: red spheres represent neurons fewer than 10 μm , blue spheres neurons $\geq 10 \mu\text{m}$ away from the nearest capillary. **C-D**, Capillary length (**C**), and neuronal density (**D**) were slightly but not significantly higher in inIGF1RKO cortex. **E**, Average distance between neurons was shorter in inIGF1RKO cortex. **F**, The proportion of neurons being close ($< 10 \mu\text{m}$) to capillaries was significantly increased in inIGF1RKO. Shown are mean \pm s.e.m; two-tailed unpaired *t*-test; $n = 10-13$. **G**. A representative neurocapillary complex from parenchyma reconstructions. **H**. Schematic prototype of the neurocapillary complex. The average intercapillary distance of 40-50 μm is known to be tightly regulated by oxygen supply to neurons. Cortical neurons typically face a capillary on one side, and enclose on the opposite side in conjunction with other neurons, an ECS domain of maximum distance to capillaries. Abbreviations: cap, capillary lumen; gl, glial cells; neu, neuron. In green colour, endothelial cells.

METHODS

Mouse transgenic strains and breeding

CaMKII α -CreER^{T2+/0};IGF1R^{fllox/fllox} transgenic mice with 129/SvPas genetic background were generated as described in Gontier *et al.* (2015). Briefly, the CaMKII α -CreER^{T2} transgene (Erdmann et al. 2007) was backcrossed to IGF1R^{fllox/fllox} knock-in mice to obtain CaMKII α -CreER^{T2+/0};IGF1R^{fllox/fllox} mice. These mutants were crossed with IGF1R^{fllox/fllox} mice to generate CaMKII α -CreER^{T2+/0};IGF1R^{fllox/fllox}, a model called inIGF1RKO after KO induction. Mice were housed in individually ventilated cages (IVC) enriched with a polycarbonate shelter (Tecniplast) and a cotton pad, to enhance social interaction. The maximum per cage was 6 males or 6 females, kept on 12/12 h light/dark cycle at 22°C room temperature, with free access to water and standard mouse chow (LASQCDiet Rod18, Genobios). The study was conducted in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC). All procedures were approved by the local ethics review committee *Charles Darwin* (#25952 and #33467).

Generation of conditional knockout mice

To induce neuron-specific IGF-1R knockout (inIGF1RKO), CaMKII α -CreER^{T2+/0};IGF1R^{fllox/fllox} mice were injected intraperitoneally at 3 mo of age with tamoxifen (TAM) twice per day for 5 consecutive

days (42 mg kg⁻¹ body weight per injection). The cohorts analyzed at 10 and 15 mo of age were induced at 5 mo. TAM (T5648, Sigma-Aldrich) was dissolved in sunflower seed oil at 10 mg mL⁻¹. As control mice, we used littermate IGF1R^{fllox/fllox} mice injected with TAM and also vehicle-treated CaMKII α -CreER^{T2+/0};IGF1R^{fllox/fllox} mice. Both males and females were used unless otherwise specified.

PCR mouse genotyping

DNA was isolated from skin biopsies and individual genotypes established and confirmed by multiplex genomic PCR as described in Gontier *et al.* (2015). The Cre-loxP recombination efficiency was determined for each mouse after sacrifice from cortical brain sections using competitive PCR (Extended Data Fig. 9).

Fluorescent tracers

Three fluorescence-labelled dextrans were used: Texas Red 3 kDa, Alexa 647 10 kDa and fluorescein 40 kDa (MolecularProbes D3328, D1976, D1845). Dextrans were solubilized in standard artificial cerebrospinal fluid (aCSF; KCl 3 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1.4 mM, MgCl₂ 0.8 mM, HEPES 10 mM) and stored at -20°C. The injected dextran solution was an equimolar mix of 3, 10 and 40 kDa dextrans at 1.0 mg mL⁻¹ each.

Intracortical tracer injection

For the dextran diffusion experiments, we used 4 different age groups (6, 10, 15 and 22 mo) comprising both sexes, except for the cohort studied at 10 mo, consisting of females. Mice were anesthetized by isoflurane gas inhalation (Isocare, Animalcare Ltd). We used 4% isoflurane for induction and 2.0 to 2.5% for maintenance of anaesthesia. Depth was controlled measuring respiratory rate and adjusting isoflurane concentration. Core body temperature was monitored using a rectal probe and tightly maintained at 37.1 \pm 0.3 °C by a microprocessor-controlled heating pad. 15 min before surgery, mice received 1 mg kg⁻¹ meloxicam (0.5 mg mL⁻¹) analgesia subcutaneously into the scalp. Corneas were protected with gel (Admyrin, Novartis). Anesthetized mice were fixed using a stereotaxic frame (Kopf). Bilateral dextran injections were performed sequentially through a 0.8 mm burr hole into the layer V of the motor cortex at coordinates +1.30 mm caudal, +/-2.85 mm lateral and -2.85 mm ventral to bregma

(Paxinos and Franklin 2013) of the right and then the left hemisphere. 50 nL dextran mix was injected at a constant rate of 10 nL min⁻¹ using a 0.5 µL Neuros™ microsyringe (Hamilton) fitted with a 32G bevelled steel needle mounted in an automated stereotaxic microinjector (Stoelting). The needle was left in place for another 5 min at the end of the injection, to prevent backflow. The diffusion period (time between the end of injection and animal sacrifice) was 60 min for the right and 50 min for the left hemisphere.

Fluorescence microscopy

To stop molecular diffusion, the anaesthetized animals were transcardially perfused with 15 mL PBS, immediately followed by 20 mL of 4% paraformaldehyde (PFA; 12 mL min⁻¹) at 4°C. Brains were collected, post-fixed in 4% PFA overnight, incubated for 48 h in 30% sucrose/PBS and snap-frozen in isopentane at -45°C. Brains were protected from light for the entire process and stored at -20°C. Horizontal sections of 30 µm were cut on a cryomicrotome (CM3050S, Leica). DAPI staining and washings were performed free-floating and sections mounted in Mowiol. *In vivo* dextran diffusion through the ECS was determined from the tracer spread in the fixed brain sections by epifluorescence microscopy (IX83, Olympus). Multi-channel images were acquired using a 4X objective. Optimal exposure conditions were determined based on the highest intensity observed and applied unchanged to all acquisitions.

Analysis of fluorescent tracer distribution

Fluorescent images were analyzed using ImageJ (NIH). For each section, the colour channels corresponding to the three dextrans were separated. Mean background intensity was determined from dorsal cortical sections in areas 1.5-2.0 mm from the injection site and individually subtracted. For each brain, 84 cortical images (14 per dextran and hemisphere) were processed. First, a square grid ROI including the diffusion area and the proximal anatomical boundaries of the isocortex was defined for each image and a heatmap of tracer distribution generated using a customized spreadsheet macro. The coordinates of the area of highest dextran abundance were extracted from this map to determine the centre of the diffusion pattern. Using the *radial profile angle* plug-in (ImageJ), normalized integrated

intensities as a function of the distance from the centre were generated. This plug-in was used twice per image to generate 2 intensity profiles in opposite directions along the horizontal orientation of the cortical layer V. Using Prism 9.0, Gaussian curves were fitted to the profiles. The highest fluorescence intensity of each image was determined from the Gaussian fit amplitude. This value was used to normalize each image intensity data to obtain one summary Gaussian curve for each mouse. As parameters to compare diffusion between groups, we used the Gaussian σ or the distance corresponding to 10% of the maximum fluorescence (Smith et al. 2017), as indicated. Exclusion criteria were: (1) insufficient fluorescence (three out of a total of 126 mice), (2) diameter of histological defect $> 300 \mu\text{m}$ (two mice), (3) R^2 of Gaussian fit < 0.90 (this concerned 16 single dextran detections out of 378 analyses), and (4) statistical outliers detected by Grubb test $Q = 0.2$ (this concerned 8 single dextran detections).

MRI contrast agent

We used gadolinium-based MRI contrast agent (CA) gadomer-17 (Gd-17) (GadoSpin D, Viscover) provided at 25 mM. Gd-17, from the class of MRI blood-pool agents, was chosen for its minimal diffusion through vascular endothelium and its estimated hydrodynamic diameter of 5.8 nm (Bumb et al. 2010; Weinmann et al. 2003), well suited for the exploration of the cortical ECS.

Stereotaxic surgery for MRI

We used 6-mo-old females with KO induced at 3 mo. The 1st injection of 50 nL Gd-17 was performed into the left hemisphere under the same stereotaxic conditions as for dextrans. For the 2nd Gd-17 injection (right), 50 nL were injected in 1 min and the needle left in place for another minute. Mice were immediately transferred to the MRI cradle for image acquisition in prone position. During the entire procedure, the cardio-respiratory function was monitored and core body temperature maintained at 37°C using a water-heated jacket in the MRI tunnel (Extended Data Fig. 3).

Magnetic Resonance Imaging

MRI was performed with a 4.7-Tesla MRI scanner (Biospec 47/40 USR, Bruker) and a quadrature transmit/receive volumetric coil with 35 mm bore. MRI took place under general anaesthesia with isoflurane gas in air (4% for induction, 2.0-2.5% for maintenance; flow 0.4 L min⁻¹). Tubes with 0.3% agarose gel for *in vitro* microinjection of CA were maintained at 37°C during injection and MRI procedure using a custom water-heated coil.

After reference plane acquisitions, a saturation recovery fast spin echo with variable repetition time sequence (RAREVTR) was performed to measure T1 maps. The sequence was based on 6 TR: 200, 400, 800, 1500, 4000 and 8000 ms, an echo time TE of 8 ms, and a RARE factor of 2. Eight transversal (horizontal) slices 1 mm thick were acquired with a planar resolution of 0.156 x 0.156 mm (field of view: 20 x 20 mm, matrix: 128 x 128). Each T1 map took 15 min to completion. This sequence was repeated 4 times to measure the evolution of the spatial distribution of the CA across the cerebral isocortex over 1 h.

Image processing and analysis

MRI saturation-recovery series were converted in 4D matrices (3D + recovery time). Evolution of the signal was modelled by a saturation curve: $SI = K \cdot (1 - e^{-R1 \cdot Tr})$, where Tr is the post-saturation recovery time and $R1 = 1/T1$. The R1 maps of the repeated series were then merged to 4D R1 matrices (3D + acquisition time (t_a)). They indicated how R1 evolved over time in the brains and in water (0.3% agarose gel in PP tube), based on the temporal evolution of the spatial distribution of the CA.

For each injection site, we selected the slices that contained the injected CA (1 to 3 slices per site). A 2D region of interest (ROI) was manually drawn around the injection site, following anatomical boundaries of the isocortex (excluding hippocampus and olfactory bulb) and including all cortical layers. One ROI was drawn per tube. The operator then positioned an ellipse around the injection site to initialize the diffusion calculations (Extended Data Fig. 6) and identified the most intense voxel, to define a censoring zone (see below). This avoided that the injection site itself contributed to the result. These steps were taken by consensus between a biologist and a physicist.

The 2D ROI was propagated over all slices creating a 3D ROI containing all the injected CA. R1 in a given voxel is the sum of a constant R1 related to the property of the medium plus the R1 related to the amount of CA in that voxel. Thus, any elimination of CA from the total ROI volume should result in a reduction of average R1 over time. To establish potential loss of CA from the ROI, we approximated the R1 of the medium in the 3D region by the lowest values of R1 found in the ROI but outside of the CA propagation zone. Specifically, we calculated the 5% quantile of R1 in the 3D ROI. The objective was to confirm by MRI that CA clearance was negligibly small, in which case the observed spatiotemporal pattern corresponds to a basic diffusion process.

The dynamic R1 maps were subsequently modelled using a 2D Gaussian spatial distribution model (Marty et al. 2013) resulting, for each time point, in a larger variance σ_x^2 , a smaller variance σ_y^2 , an angle θ , a maximal amplitude $R1_{\max}$ and a baseline amplitude $R1_{\min}$. $R1_{\min}$ is the R1 in the absence of CA. The Gaussian model itself corresponded to the increase in R1 due to the CA. The medium not being necessarily isotropic and the injection not perfectly spheric, the shape of the Gaussian can be ellipsoid, showing a large width characterized by σ_x^2 , and a small width characterized by σ_y^2 (Extended Data Fig. 5). The angle θ corresponds to the inclination of the major axis with respect to the horizontal.

Two strategies (procedures *A* and *B*) were designed to censor artefacts at the injection site while fitting the R1 maps with the 2D Gaussian model (Levenberg-Marquardt algorithm). An automatic procedure *A* detected hyperintense voxels for each R1 map, and a supervised procedure *B* removed a cross of 5 voxels at the injection site. Graphical interfaces, image processing, and non-linear modelling were performed using Matlab 2022a (Mathworks).

Next, we performed linear regression, excluding data points detected by ROUT test $Q = 10\%$ for $\sigma_y^2(t)$ and $\sigma_x^2(t)$, for each hemisphere and for both procedures *A* and *B*. We extracted the diffusion coefficient D_i from the slope of each curve ($D_i = \text{slope}_i/2$). For extra sum-of-squares *F*-test p -value > 0.098 regarding $\sigma_y^2(t)$ slope deviation from zero, the corresponding D_i was excluded from further analysis. Raw data are in Extended Data Tables 1 and 2. To obtain the mean diffusion coefficient for each hemisphere, we combined results from procedures *A* and *B* as follows:

$$D^* = \frac{D_{x,A} + D_{y,A} + D_{x,B} + D_{y,B}}{4}$$

Two-way ANOVA considering D^* from left and right hemispheres in control and inIGF1RKO showed no effect of hemisphere laterality ($F_{1,19} = 1.093$; $p = 0.3089$). We therefore considered left and right injections as independent and averaged left and right D^* for each mouse. To calculate tortuosity, we used the equation:

$$\lambda = \sqrt{\frac{D_{free}}{D^*}}$$

Initial exclusion criteria for MRI analysis were: (1) head tilted during MRI (this concerned 1 mouse out of a total of 24), and (2) no Gd-17 signal in cortical ROI (this concerned a single hemisphere of 1 mouse).

Evaluation of neuronal soma size

Duplicate horizontal brain sections (from bregma -1.40 to -1.24) were stained with 0.3% cresyl violet (C-5042, Sigma-Aldrich), dehydrated through graded ethanol (70, 95, 100%), placed in xylene and coverslipped using DPX mounting medium. Micrographs were taken at 10X magnification using an IX83 microscope (Olympus). All measurements were made within the layer II/III of the somatosensory cortical area. Cell somas were segmented using the QuPath cell detection algorithm (Bankhead et al. 2017). An operator blinded to genotype checked that only neurons with visible nucleolus were selected, to ensure full-size cross section. On average, 125 neurons per animal were analyzed.

Immunofluorescence

Six-month-old females (from the MRI procedure) were anesthetized with sodium pentobarbital (185 mg kg⁻¹ IP), transcardially perfused and brains processed as described above. Free-floating horizontal sections of 40 µm thickness were incubated in blocking buffer (0.5% BSA, 10% goat serum, 0.3% Triton X-100 in PBS) at room temperature for 2 h. Sections were incubated overnight in blocking buffer at 4°C with primary antibodies anti-NeuN (MAB377, 1:200; Millipore) and with FITC-conjugated lectin (L0401, 1:500, Sigma). Sections were washed in 0.1% Triton X-100/PBS followed by a 2 h incubation at room temperature with Alexa Fluor 633 anti-mouse antibody (A21052, 1:200; ThermoFisher) and

Alexa Fluor 594 anti-rabbit antibody (A11012, 1:200; ThermoFisher). Sections were washed with 0.1% Triton X-100/PBS, counterstained with DAPI (Dako, 1:10,000 in PBS) for 15 min, washed in PBS and mounted in Mowiol.

Evaluation of neurovascular network

Four images per mouse (2 per brain section) were acquired at 40X from somatosensory cortex layer V using a IX83 Olympus confocal microscope and analyzed using Imaris software (Version 9.9, Bitplane). Each optical slice was stacked and merged to generate a 3D image of the neuronal somas and the blood vessels using NeuN and lectin signal intensities, respectively. The capillary vessel and neuronal segmentation were performed using *Surface Filament* and *Spot* tools. *Surface* was used to mask the lectin channel and exclude nonspecific signal. Vessel segmentation was obtained using *threshold mode* in *Filament* and subsequent manual correction, yielding the length and straightness of the capillary network. *Surface* was used to mask the NeuN channel, remove nonspecific signal and segment neuronal somas based on morphology and visualization of the cross-section. The count of neuronal somas and DAPI+ nuclei, and the distance between somas were obtained using the *Spot* tool on single channels. To extract the number of neuronal somas within a threshold distance (10 μm) from capillary and the average capillary-to-soma distance, we used a dedicated MatLab Xtensions of Imaris.

Statistics and reproducibility

Data are presented as mean \pm s.e.m. Sample size for each experiment was estimated based on pilot studies. Mice matched by gender, age, genotype and weight were randomly assigned to experimental groups prior to TAM treatment. Investigators were blinded to genotype during experiments, data collection and analyses. No data were excluded from the analysis except for the preset criteria detailed above. Statistical tests were performed using Prism (GraphPad). *F*-test was performed to test normal distribution and homogeneity of variance and Grubb's test to detect statistical outliers. For data distributed normally, groups were compared using two-tailed unpaired Student's *t*-test or ANOVA. Non-parametric Mann-Whitney U-test and Kruskal-Wallis test were used as indicated.

METHODS REFERENCES

1. Erdmann G., Schütz G. & Berger, S. Inducible gene inactivation in neurons of the adult mouse forebrain. *BMC Neurosci.* **8**, 63 (2007). DOI: 10.1186/1471-2202-8-63. PMID: 17683525
2. Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. Mouse brain in stereotaxic coordinates. 4th ed., Amsterdam, Boston, Elsevier/Academic Press, 2013.
3. Bumb, B., Brechbiel, W. W. & Choyke, P. Macromolecular and dendrimer-based magnetic resonance contrast agents. *Acta Radiol* **51**, 751-767 (2010). doi: 10.3109/02841851.2010.491091. PMID: 20590365
4. Weinmann, H.-J., Ebert, W., Misselwitz, B. & Schmitt-Willich, H. Tissue-specific MR contrast agents. *Eur. J. Radiol.* **46**, 33-44 (2003). doi: 10.1016/s0720-048x(02)00332-7. PMID: 12648800
5. Bankhead, P. et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* **7**: 16878(2017). doi: 10.1038/s41598-017-17204-5. PMID: 29203879

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank J.-C. François, B. Tavitian, and O. Clément for insightful comments. We thank J. Ziga, C. Martin, H. Razafimanantsoa, S. Lopez, A. Vlieghe, A. Belly, T. Yeung, R. Morichon, and T. Ledent for their contributions to this work.

COMPETING INTEREST DECLARATION

The authors declare no competing interests.

EXTENDED DATA FIGURE AND TABLE LEGENDS

Extended Data Fig. 1. Procedure for quantification of dextran diffusion spread. **A**, Ten consecutive sections per injected hemisphere were used to establish the individual diffusion profile. **B**, Gaussian functions fitted best to the observed fluorescence patterns and were normalized with maximum fluorescence. **C**, Normalized profiles were then combined to obtain a single Gaussian profile per mouse hemisphere and per dextran.

Extended Data Fig. 2. Diffusion analysis in the right hemisphere confirms the effect of IGF-1R knockout on dextran diffusion in the isocortex. Shown is the quantification of linear distance covered by dextrans, determined at 60 min and at 10% of maximum fluorescence. Two-way ANOVA with values matched by molecular weight (MW) reveals significant effect of KO and MW on tracer diffusion (KO effect: $F_{1,36} = 10.11$; $p = 0.0030$; MW effect: $F_{2,69} = 193.4$; $p < 0.0001$). Shown are q -values from two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli: $*q < 0.05$; $n = 17-19$; analysis was performed in and limited to the females of the cohort explored in Fig. 1. **D**; data are mean \pm s.e.m.

Extended Data Fig. 3. Control of general anaesthesia during MRI. Vital parameters did not differ between inIGF1RKO and controls mice, while changes occurred during the course of the MRI experiment. **A**, Electro-mechanically monitored respiratory rate (RR) in anaesthetized control and inIGF1RKO mice. (Two-way ANOVA; KO effect: $F_{1,22} = 0.9847$; $p = 0.3318$; time effect: $F_{8,130} = 2.677$; $p = 0.0093$). **B**, Core body temperature (T_c) recorded using a rectal probe. Anaesthetized mice in the MRI cradle receive constant thermal support through a water-heated jacket. (Two-way ANOVA with values matched by time; KO effect: $F_{1,22} = 3.641$; $p = 0.0695$; time effect: $F_{8,130} = 2.922$; $p = 0.0050$). **C**, Isoflurane supply adjusted to maintain constant depth of anaesthesia during MRI. (Two-way ANOVA; KO effect: $F_{1,16} = 0.5909$; $p = 0.4533$; time effect: $F_{8,66} = 2.060$; $p = 0.0525$). For (**A**) to (**C**), each point represents the average of all measures taken from all mice over 10 min intervals. The timeline starts at the beginning of the first MRI scan. **D-E**, Means of individual respiratory rate (**D**) and T_c (**E**) throughout the MRI experiment; $n = 11-13$ females; data are mean \pm s.e.m.

Extended Data Fig. 4. Microinjected Gd-17 remains quantitatively in the isocortex. **A**, MRI image planes with microinjected Gd-17 and indication of the analyzed ROI. To capture the whole Gd-17 signal, 4 horizontal planes were processed, the entire signal being generally contained in 1 or 2 planes. **B**, The total volume of the Gd-17 signal within the ROI remained almost constant throughout the 1-hour acquisition of R1 maps, in inIGF1RKO and controls. Two-way ANOVA with values matched by subject reveals no significant effect of genotype on total Gd-17 signal ($F_{1,21} = 3.23$; $p = 0.0867$) and a small, but significant effect of time ($F_{1,21} = 30.01$; $p < 0.0001$). **C**, Clearance from the ROI between first and last MRI acquisition was low (-3.0%) but detectable in both groups (Sidak multiple comparison *post hoc* test). **D**, The MRI baseline signal was established using the 5% lowest values from the ROI and showed negligible increase during the experiment. Two-way ANOVA with values matched by subject revealed a time effect on baseline levels ($F_{1,21} = 9.060$; $p = 0.0067$) but no effect of genotype ($F_{1,21} = 3.4 \times 10^{-5}$; $p = 0.995$). **E**, Baseline change between first and last MRI acquisition was undetectable for controls and slightly increased for inIGF1RKO (Sidak multiple comparison *post hoc* test). $n = 10$ -13 females per group; data are mean \pm s.e.m.

Extended Data Fig. 5. Schematic diagram of the MRI quantitative method for mapping Gd-17 distribution. The distribution pattern of Gd-17 was determined using a 2D Gaussian model. An ellipse with axis x and y was placed over the injection site (green) to contain all the signal corresponding to the contrast agent. Iterative modelling adjustment resulted in optimal fit of a large Gaussian width σ_x and a small Gaussian width σ_y , used to calculate the diffusion coefficient (See Methods section, Fig. 2, and Tables S1 and S2). Shown are cortical layers I to VI. Cx = cortex, CC = corpus callosum and CP = caudoputamen.

Extended Data Fig. 6. Comparing free diffusion of Gd-17 with other contrast agents, tracers and selected physiological solutes. We measured the free diffusion coefficient D_{free} of Gd-17 by MRI (turquoise label) and displayed it together with known solutes and tracers of very different molecular weight (MW). Red squares represent solutes used to establish a regression between D_{free} and MW using the Stokes-Einstein equation data from (data from Torres et al., 2012). Stars indicate dextrans of 3, 10 and 40 kDa (data from Nicholson and Tao, 1993). Yellow triangles represent the gadolinium-based

contrast agents Dotarem (gadoteric acid), P792 and P846 (data from Marty et al., 2013). Gd-17 has a globular dendromeric core carrying 24 Gd chelates outside. The compound is surrounded by 2 to 3 layers of water molecules. With a D_{free} of $14.9 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, Gd-17 diffuses similarly to Dex10, presumably due to a compact form. Gd-based contrast agents P792 and P846, although of conspicuously lower MW, show free diffusion coefficients comparable to Gd-17, likely owed to their branched structures. Abbreviations: Dex3, dextran 3 kDa; Dex10, dextran 10 kDa; Dex40, dextran 40 kDa; BSA, bovine serum albumin; Ovalb, ovalbumin; Lactalb, α -lactalbumin.

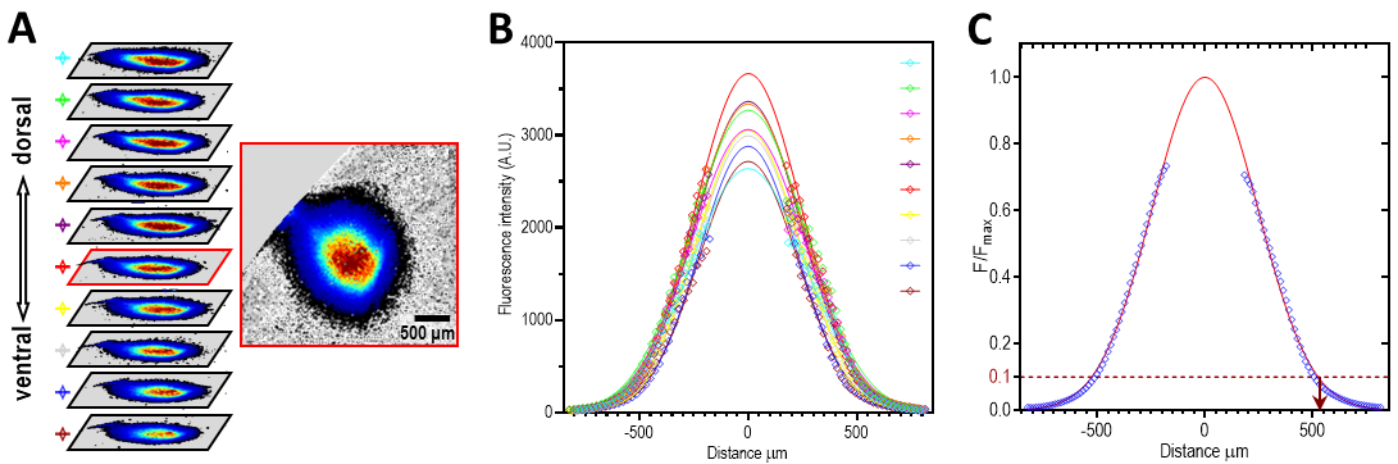
Extended Data Fig. 7. Dextran tracer diffusion decreases with age in the mouse isocortex. Data on dextran diffusion from Fig. 3 were analyzed for age-related decline. For **A**, 3 kDa, **B**, 10 kDa, and **C**, 40 kDa, significant decreases with age occurred, in inIGF1RKO as well as in control mice. $n = 11-17$ mice. Analyses comparing groups at 6 and 22 mo showed (**A**) significant decrease of diffusion by 9% for controls and 16% for KO, using one-way ANOVA with *post-hoc* uncorrected Fisher LSD test ($F_{7,103} = 7.316; p < 0.0001$). In (**B**), significant decrease by 12% for controls and 9% for KO, and in (**C**), significant decrease by 7% for controls and 8% for KO were evidenced between 6 and 22 mo. Brown-Forsythe ANOVA for unequal variances followed by unpaired *t*-test with Welch correction established for (**B**) $F_{7,78.90}^* = 9.229; p < 0.0001$ and for (**C**) $F_{7,78.75}^* = 6.598; p < 0.0001$. **** $p < 0.0001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; data are mean \pm s.e.m.

Extended Data Fig. 8. Confocal microscopy of neurocapillary networks in inIGF1RKO and control isocortex. **A**, Representative fluorescence micrographs for neurocapillary morphometric analyses. **B**, Isocortex cell density established from the prevalence of DAPI-positive nuclei in the ROI. **C**, Neuroglial ratio determined from DAPI and NeuN immunohistochemistry. **D**, Density of neurons per capillary length. **E**, Capillary straightness.

Extended Data Fig. 9. Efficiency of TAM-induced neuron-specific IGF-1R knockout. **A**, Floxed and Cre-loxP-recombined IGF-1R alleles were competitively amplified by PCR using genomic DNA. DNA was extracted from somatomotor and somatosensory cortex dorsal brain sections of inIGF1RKO (KO) and IGF1R^{lox/lox} mice (Ctrl) previously treated with TAM. Shown is a representative PCR gel

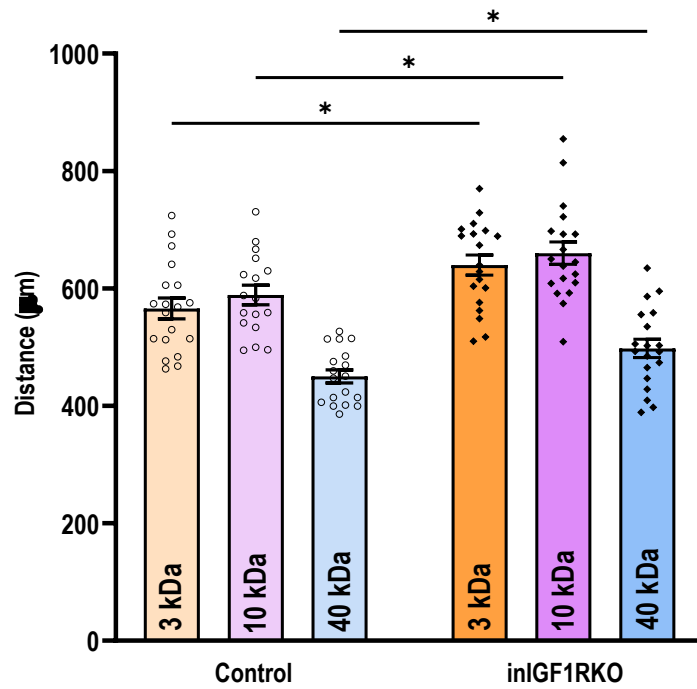
electrophoresis together with a heterozygote IGF1R^{fl^{ox}/KO} genotype serving as standard that marks 50% of floxed IGF-1R alleles. **B**, The proportion of recombined alleles was quantified *post-mortem* in all animals. inIGF1RKO showed on average 48.6% ± 0.7% Cre-loxP excision. Considering that neurons account for 43% of all cells in the mouse isocortex (Herculano-Houzel, Watson, et Paxinos 2013), virtually all neurons in inIGF1RKO mice were knockout for IGF-1R. n = 10 (control), n = 69 (inIGF1RKO). Individual data points are shown with mean ± s.e.m.

EXTENDED DATA FIGURES AND TABLES



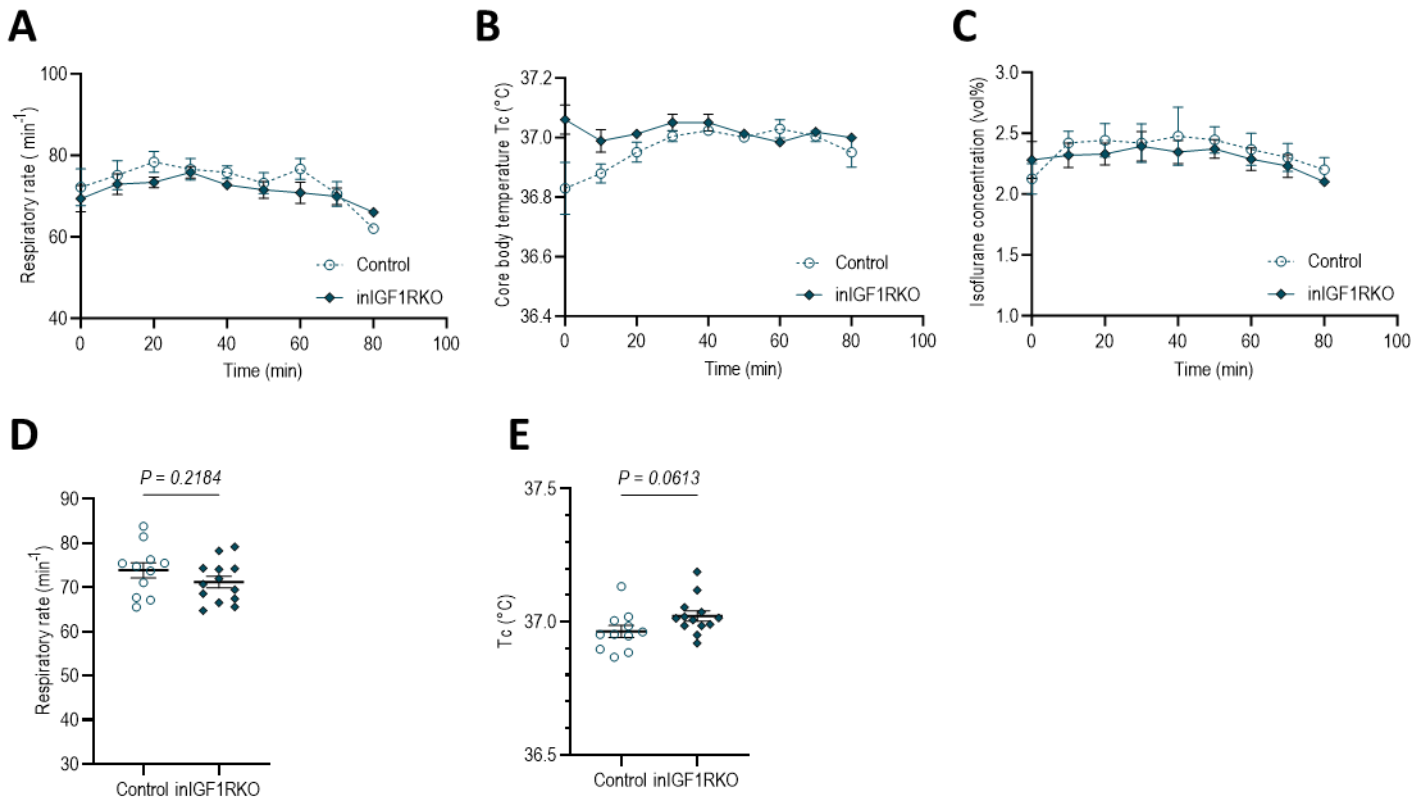
Extended Data Figure 1. Procedure for quantification of dextran diffusion spread

A, Ten consecutive sections per injected hemisphere were used to establish the individual diffusion profile. **B**, Gaussian functions fitted best to the observed fluorescence patterns and were normalized with maximum fluorescence. **C**, Normalized profiles were then combined to obtain a single Gaussian profile per mouse hemisphere and per dextran.



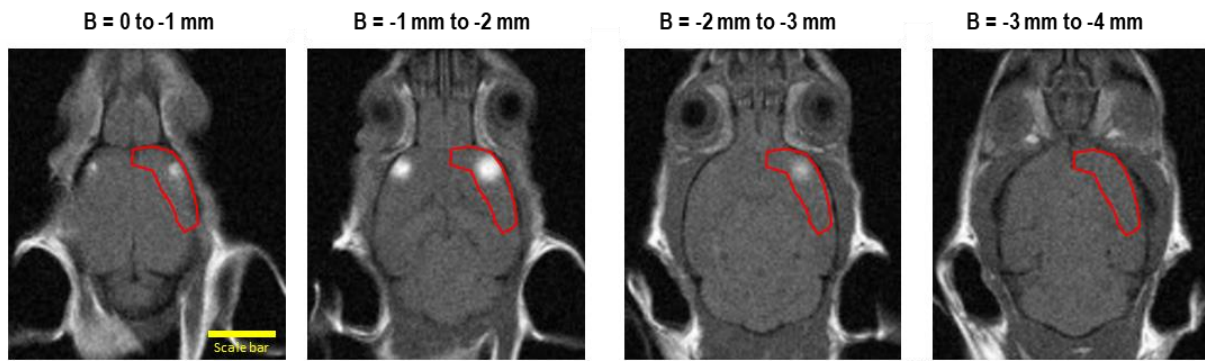
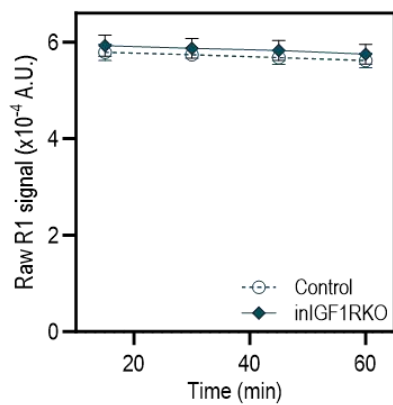
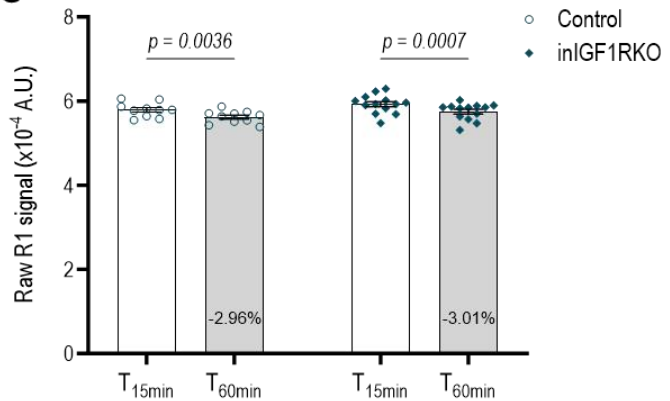
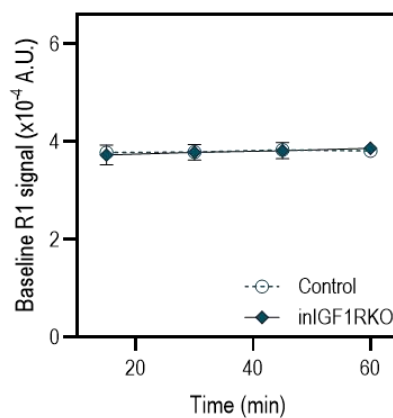
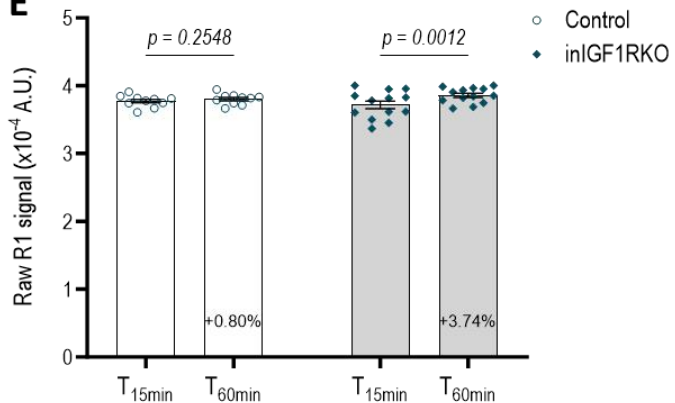
Extended Data Figure 2. Diffusion analysis in the right hemisphere confirms the effect of IGF-1R knockout on dextran diffusion in the isocortex

Shown is the quantification of linear distance covered by dextrans, determined at 60 min and at 10% of maximum fluorescence. Two-way ANOVA with values matched by molecular weight (MW) reveals significant effect of KO and MW on tracer diffusion (KO effect: $F_{1,36} = 10.11$; $p = 0.0030$; MW effect: $F_{2,69} = 193.4$; $p < 0.0001$). Shown are q -values from two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli: $*q < 0.05$; $n = 17-19$; analysis was performed in and limited to the females of the cohort explored in Fig. 1.D; data are mean \pm s.e.m.



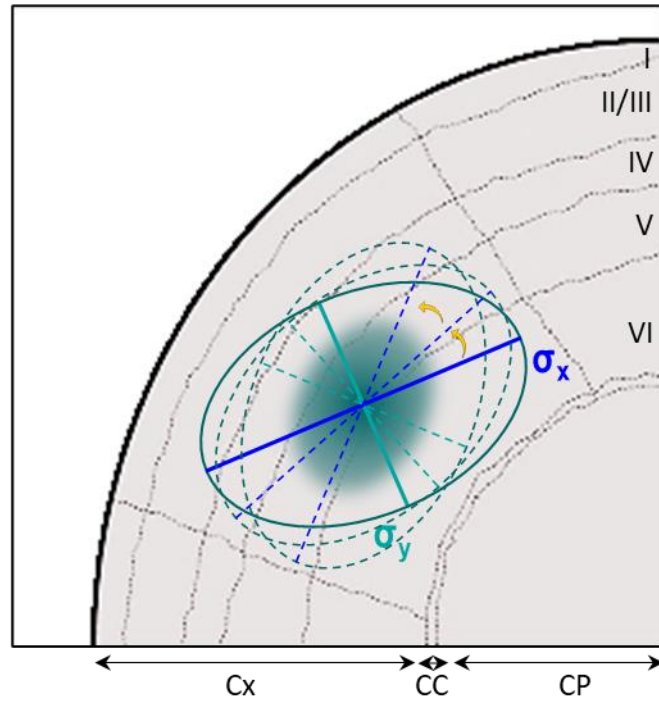
Extended Data Figure 3. Control of general anaesthesia during MRI

Vital parameters did not differ between inlGF1RKO and controls mice, while changes occurred during the course of the MRI experiment. **A**, Electro-mechanically monitored respiratory rate (RR) in anaesthetized control and inlGF1RKO mice. (Two-way ANOVA; KO effect: $F_{1,22} = 0.9847$; $p = 0.3318$; time effect: $F_{8,130} = 2.677$; $p = 0.0093$). **B**, Core body temperature (T_c) recorded using a rectal probe. Anaesthetized mice in the MRI cradle receive constant thermal support through a water-heated jacket. (Two-way ANOVA with values matched by time; KO effect: $F_{1,22} = 3.641$; $p = 0.0695$; time effect: $F_{8,130} = 2.922$; $p = 0.0050$). **C**, Isoflurane supply adjusted to maintain constant depth of anaesthesia during MRI. (Two-way ANOVA; KO effect: $F_{1,16} = 0.5909$; $p = 0.4533$; time effect: $F_{8,66} = 2.060$; $p = 0.0525$). For (**A**) to (**C**), each point represents the average of all measures taken from all mice over 10 min intervals. The timeline starts at the beginning of the first MRI scan. **D-E**, Means of individual respiratory rate (**D**) and T_c (**E**) throughout the MRI experiment; $n = 11-13$ females; data are mean \pm s.e.m.

A**B****C****D****E**

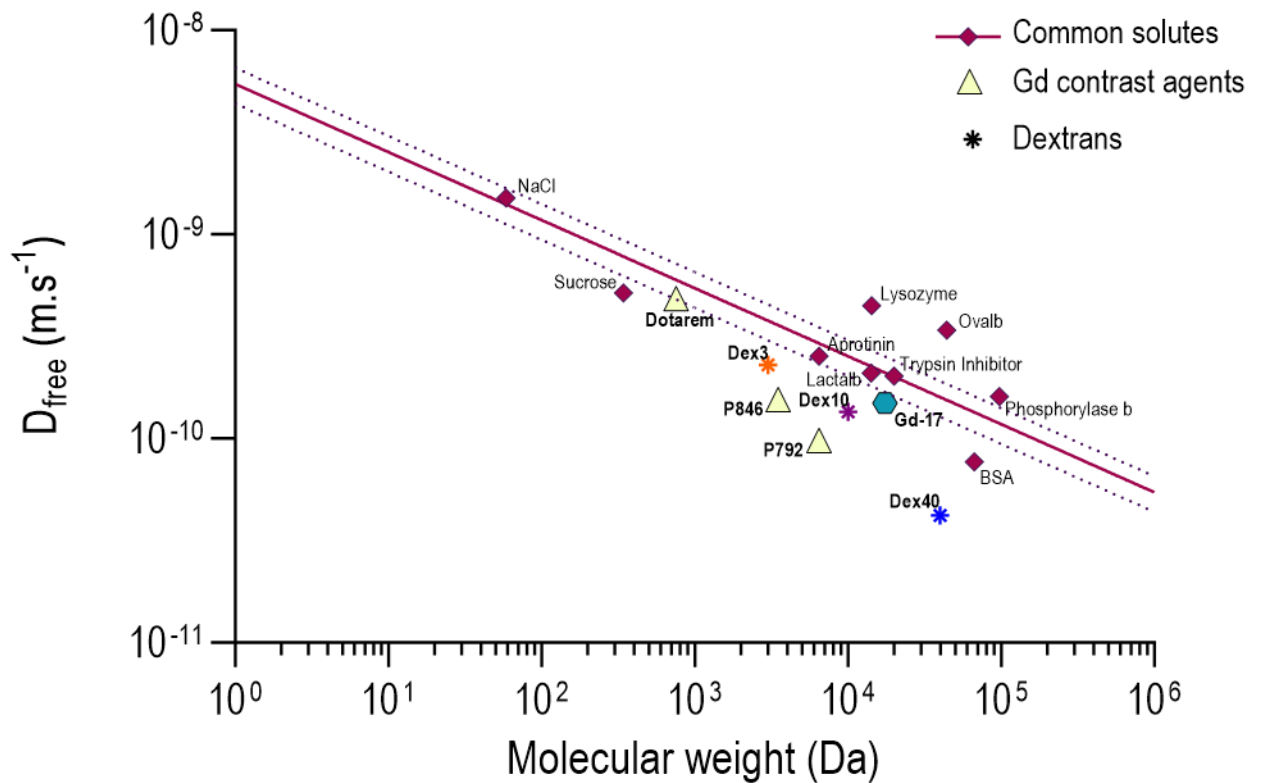
Extended Data Figure 4. Microinjected Gd-17 remains quantitatively in the isocortex

A, MRI image planes with microinjected Gd-17 and indication of the analyzed ROI. To capture the whole Gd-17 signal, 4 horizontal planes were processed, the entire signal being generally contained in 1 or 2 planes. **B**, The total volume of the Gd-17 signal within the ROI remained almost constant throughout the 1-hour acquisition of R1 maps, in inIGF1RKO and controls. Two-way ANOVA with values matched by subject reveals no significant effect of genotype on total Gd-17 signal ($F_{1,21} = 3.23$; $p = 0.0867$) and a small, but significant effect of time ($F_{1,21} = 30.01$; $p < 0.0001$). **C**, Clearance from the ROI between first and last MRI acquisition was low (-3.0%) but detectable in both groups (Sidak multiple comparison *post hoc* test). **D**, The MRI baseline signal was established using the 5% lowest values from the ROI and showed negligible increase during the experiment. Two-way ANOVA with values matched by subject revealed a time effect on baseline levels ($F_{1,21} = 9.060$; $p = 0.0067$) but no effect of genotype ($F_{1,21} = 3.4 \times 10^{-5}$; $p = 0.995$). **E**, Baseline change between first and last MRI acquisition was undetectable for controls and slightly increased for inIGF1RKO (Sidak multiple comparison *post hoc* test). $n = 10$ -13 females per group; data are mean \pm s.e.m.



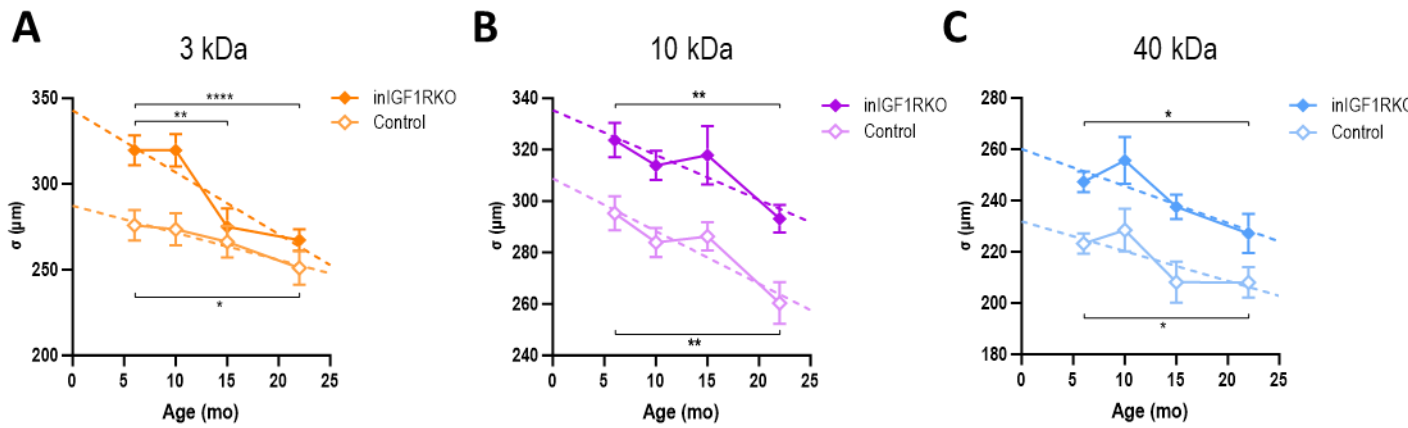
Extended Data Figure 5. Schematic diagram of the MRI quantitative method for mapping Gd-17 distribution

The distribution pattern of Gd-17 was determined using a 2D Gaussian model. An ellipse with axis x and y was placed over the injection site (green) to contain all the signal corresponding to the contrast agent. Iterative modelling adjustment resulted in optimal fit of a large Gaussian width σ_x and a small Gaussian width σ_y , used to calculate the diffusion coefficient (See Methods section, Fig. 2, and Tables S1 and S2). Shown are cortical layers I to VI. Cx = cortex, CC = corpus callosum and CP = caudoputamen.



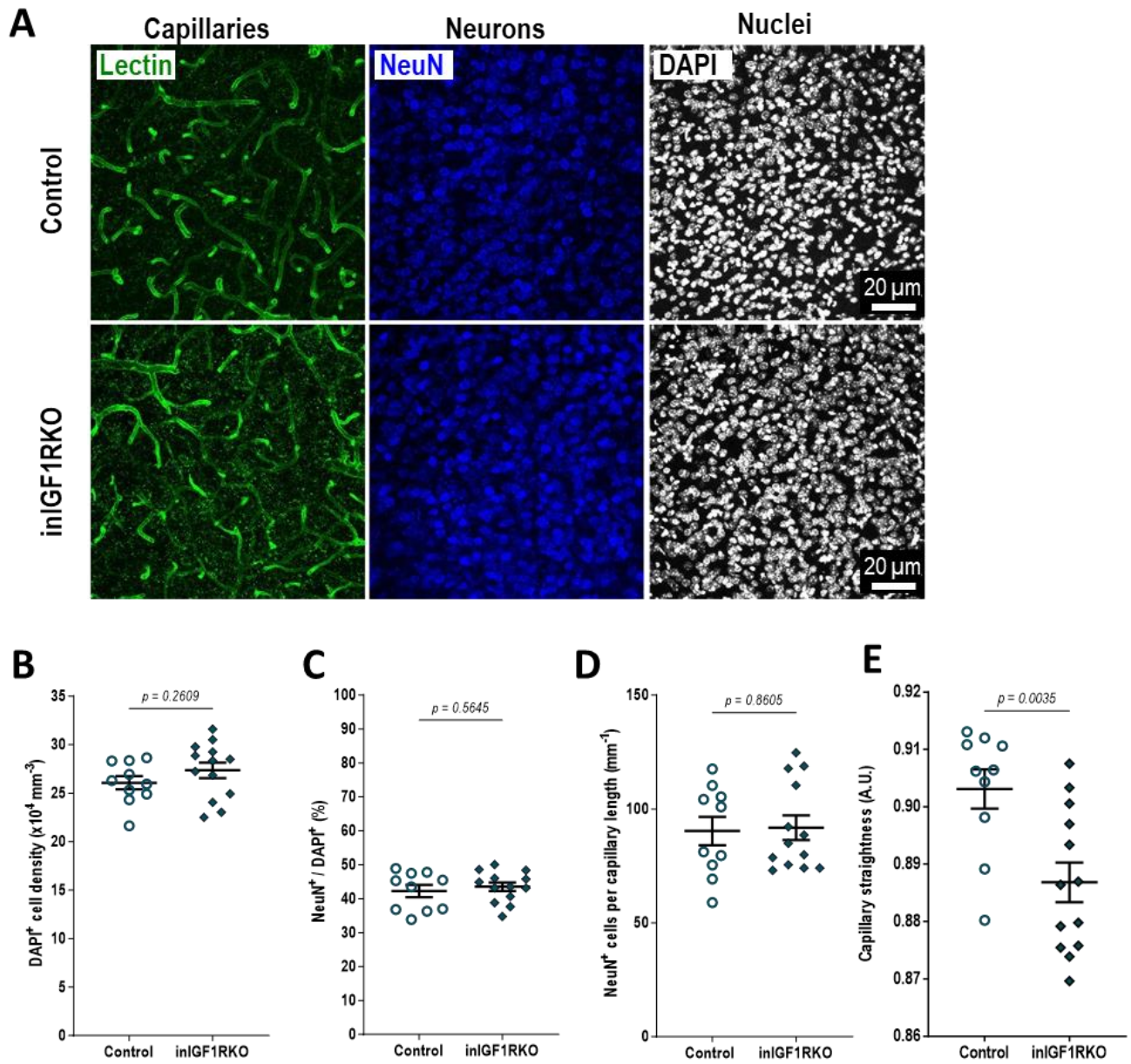
Extended Data Figure 6. Comparing free diffusion of Gd-17 with other contrast agents, tracers and selected physiological solutes

We measured the free diffusion coefficient D_{free} of Gd-17 by MRI (turquoise label) and displayed it together with known solutes and tracers of very different molecular weight (MW). Red squares represent solutes used to establish a regression between D_{free} and MW using the Stokes-Einstein equation data from (data from Torres et al., 2012). Stars indicate dextrans of 3, 10 and 40 kDa (data from Nicholson and Tao, 1993). Yellow triangles represent the gadolinium-based contrast agents Dotarem (gadoteric acid), P792 and P846 (data from Marty et al., 2013). Gd-17 has a globular dendromeric core carrying 24 Gd chelates outside. The compound is surrounded by 2 to 3 layers of water molecules. With a D_{free} of $14.9 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, Gd-17 diffuses similarly to Dex10, presumably due to a compact form. Gd-based contrast agents P792 and P846, although of conspicuously lower MW, show free diffusion coefficients comparable to Gd-17, likely owed to their branched structures. Abbreviations: Dex3, dextran 3 kDa; Dex10, dextran 10 kDa; Dex40, dextran 40 kDa; BSA, bovine serum albumin; Ovalb, ovalbumin; Lactalb, α -lactalbumin.



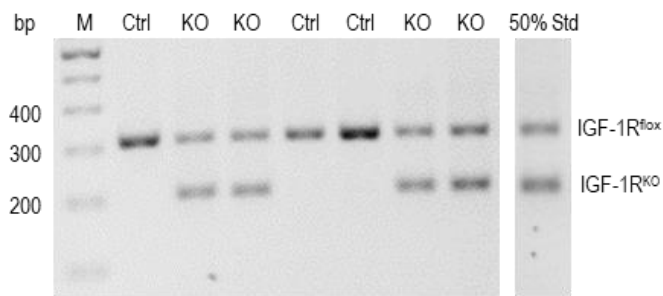
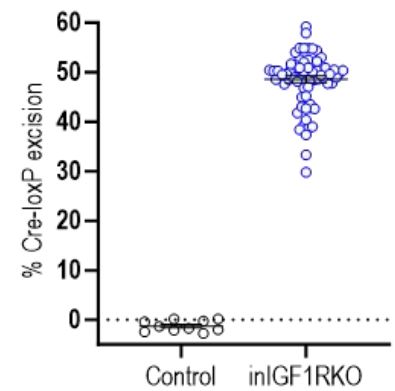
Extended Data Figure 7. Dextran tracer diffusion decreases with age in the mouse isocortex

Data on dextran diffusion from Fig. 3 were analyzed for age-related decline. For **A**, 3 kDa, **B**, 10 kDa, and **C**, 40 kDa, significant decreases with age occurred, in inIGF1RKO as well as in control mice. $n = 11-17$ mice. Analyses comparing groups at 6 and 22 mo showed (**A**) significant decrease of diffusion by 9% for controls and 16% for KO, using one-way ANOVA with *post-hoc* uncorrected Fisher LSD test ($F_{7,103} = 7.316$; $p < 0.0001$). In (**B**), significant decrease by 12% for controls and 9% for KO, and in (**C**), significant decrease by 7% for controls and 8% for KO were evidenced between 6 and 22 mo. Brown-Forsythe ANOVA for unequal variances followed by unpaired *t*-test with Welch correction established for (**B**) $F_{7,78.90}^* = 9.229$; $p < 0.0001$ and for (**C**) $F_{7,78.75}^* = 6.598$; $p < 0.0001$. **** $p < 0.0001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; data are mean \pm s.e.m.



Extended Data Figure 8. Confocal microscopy of neurocapillary networks in inIGF1RKO and control isocortex

A, Representative fluorescence micrographs for neurocapillary morphometric analyses. **B**, Isocortex cell density established from the prevalence of DAPI-positive nuclei in the ROI. **C**, Neuroglial ratio determined from DAPI and NeuN immunohistochemistry. **D**, Density of neurons per capillary length. **E**, Capillary straightness.

A**B**

Extended Data Figure 9. Efficiency of TAM-induced neuron-specific IGF-1R knockout

A, Floxed and Cre-loxP-recombined IGF-1R alleles were competitively amplified by PCR using genomic DNA. DNA was extracted from somatomotor and somatosensory cortex dorsal brain sections of inIGF1RKO (KO) and IGF1R^{fl/fl} mice (Ctrl) previously treated with TAM. Shown is a representative PCR gel electrophoresis together with a heterozygote IGF1R^{fl/KO} genotype serving as standard that marks 50% of floxed IGF-1R alleles. **B**, The proportion of recombined alleles was quantified *post-mortem* in all animals. inIGF1RKO showed on average 48.6% ± 0.7% Cre-loxP excision. Considering that neurons account for 43% of all cells in the mouse isocortex (Herculano-Houzel, Watson, et Paxinos 2013), virtually all neurons in inIGF1RKO mice were knockout for IGF-1R. n = 10 (control), n = 69 (inIGF1RKO). Individual data points are shown with mean ± s.e.m.

Mouse ID	Slope ($\times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	R^2	Slope deviation from zero F -test (p -value)
1	3.265	0.8478	<0.0001
2	5.338	0.9656	<0.0001
3	1.345	0.6427	0.001
4	3.062	0.8436	<0.0001
5	3.300	0.9218	<0.0001
6	3.347	0.8473	<0.0001
7	3.108	0.9304	<0.0001
8	2.067	0.7398	<0.0001
9	2.162	0.4937	0.0108
10	2.288	0.9608	<0.0001
11	2.485	0.7927	<0.0001
12	1.269	0.5742	0.0485
13	2.939	0.9147	<0.0001
14	3.699	0.9456	<0.0001
15	2.452	0.8267	<0.0001
16*	1.179	0.1606	0.3251
17	2.482	0.5303	0.0014
18	3.299	0.9200	<0.0001
19	1.366	0.9036	0.0003
20	3.384	0.8688	<0.0001
21	3.325	0.3205	0.0222
22	2.866	0.9167	<0.0001
23	2.087	0.5524	0.0056

* : data excluded from D^* calculation based on F -test p value > 0.09

Extended Data Table 1. Regression analysis of $\sigma_y^2(t)$ from MRI diffusion experiments

Mouse ID	Slope ($\times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	R^2	Slope deviation from zero F -test (p -value)
1	3.885	0.7851	<0.0001
2	5.249	0.9896	<0.0001
3	2.302	0.8687	<0.0001
4	2.957	0.5307	0.0014
5	5.317	0.9305	<0.0001
6	3.477	0.7244	<0.0001
7	4.308	0.8593	<0.0001
8	2.812	0.8667	<0.0001
9	1.953	0.4912	0.0111
10	2.882	0.9718	<0.0001
11	3.074	0.9170	<0.0001
12	1.894	0.8285	0.0017
13	3.250	0.7231	0.0005
14	2.731	0.9594	<0.0001
15	3.483	0.9430	<0.0001
16	1.899	0.9121	0.0008
17	2.678	0.6630	0.0013
18	4.102	0.9041	<0.0001
19	2.453	0.9221	<0.0001
20	5.097	0.4432	0.0181
21	5.464	0.2236	0.0644
22	3.063	0.8643	<0.0001
23	3.664	0.6618	0.0013

Extended Data Table 2. Regression analysis of $\sigma_x^2(t)$ from MRI diffusion experiments

Gene ID	Gene symbol	Fold change	<i>p</i> -value	Gene name
109294	Prex2	1.4582	0.0132	Phosphatidylinositol-3.4.5-trisphosphate-dependent rac exchange
12741	Cldn5	1.3768	0.0060	Claudin 5
20672	Sox18	1.3445	0.0169	SRY (sex determining region Y)-box 18
18613	Pecam1	1.2374	0.0007	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
19285	Ptrf/Cavin1	1.1928	0.0144	Caveolae associated 1
21687	Tek	1.1863	0.0130	TEK receptor tyrosine kinase (Tie2)
22340	Vegfb	1.1857	0.0031	Vascular endothelial growth factor B
12549	Arhgap31	1.1643	0.0095	Rho GTPase activating protein 31
17064	Cd93	1.1448	0.0115	Cd93 antigen (C1qr1,Ly68)
16542	Kdr	1.0945	0.0013	Kinase insert domain protein receptor (Vegfr2)

Extended Data Table 3. Endothelial cell-specific genes differentially expressed in inIGF1RKO vs control mice

EXTENDED DATA REFERENCES

1. Torres, J. F., Komiya, A., Okajima, J. & Maruyama, S. Measurement of the Molecular Mass Dependence of the Mass Diffusion Coefficient in Protein Aqueous Solutions. *Defect. Diff. Forum Vols* **326-328**, 452-458 (2012). doi:10.4028/www.scientific.net/DDF.326-328.452
2. Nicholson C. & Tao, L. Hindered diffusion of high molecular weight compounds in brain extracellular microenvironment measured with integrative optical Imaging. *Biophys. J.* **65**, 2277-2290 (1993). doi: 10.1016/S0006-3495(93)81324-9. PMID: 7508761
3. Herculano-Houzel, S., Watson, C. & Paxinos, G. Distribution of neurons in functional areas of the mouse cerebral cortex reveals quantitatively different cortical zones. *Front. Neuroanat.* **7**, 35 (2013). doi: 10.3389/fnana.2013.00035.

CHAPITRE IV : DISCUSSION

La suppression de la signalisation neuronale IGF1R entraîne des changements morphologiques du neurone qui réduisent la taille de son soma et l'épaisseur de ses dendrites (Gontier et al. 2015; George et al. 2017). Mes travaux de thèse permettent de montrer tout d'abord que ce phénotype neuronal IGF1RKO plus mince et pérenne se maintient tout au long de la vie de l'individu et persiste jusqu'à un âge avancé. Je mets également en évidence, avec ces travaux, que cette morphologie neuronale plus compacte s'accompagne de modifications des flux moléculaires au sein de l'ECS. Je démontre que des neurones amincis facilitent la diffusion de traceurs de différents poids moléculaires dans le cortex cérébral de jeunes souris mâles et femelles, et que cet effet se maintient jusqu'à 22 mois d'âge. En parallèle, j'ai constaté que l'efficacité du transport moléculaire dans l'ECS diminue avec l'âge, et que cette diminution a lieu dans les mêmes proportions chez les souris contrôles et les souris mutantes. En outre, je prouve avec cette étude que le phénotype neuronal mince entraîne une réduction de la tortuosité de l'ECS du cortex. Sachant que le parenchyme cérébral inIGF1RKO est macroscopiquement compacté, j'ai analysé la densité vasculaire et neuronale. Mes résultats montrent qu'elles ne sont pas modifiées dans ce contexte, mais que les rapports de distance entre les deux populations sont affectés. J'ai en effet constaté que les neurones minces sont en moyenne plus proches des vaisseaux et qu'à l'inverse, les régions les plus éloignées des vaisseaux appelées *local maxima*, possèdent un moins grand nombre de neurones KO que de neurones contrôle. Ce résultat suggère que ces régions de *local maxima* sont des zones critiques au regard de la diffusion et des flux de clairance dans les conditions physiologiques, car elles associent les désavantages d'être à la fois stériquement encombrées par les neurones et d'être les plus éloignées des sites d'élimination.

Les flux interstitiels dans l'ECS du cortex cérébral reposent essentiellement sur la diffusion moléculaire

Dans un premier temps, j'ai validé expérimentalement que le transport des dextrans au sein de l'ECS cortical avait bien lieu par diffusion et que j'étais en mesure de le quantifier *ex vivo* par microscopie optique. J'ai montré que la distribution des traceurs injectés dans le parenchyme cortical dépend de leur taille moléculaire et qu'elle est modélisable par une courbe gaussienne. Ces résultats attestent du

transport des dextrans par diffusion dans l'ECS et confirment ce qui avait été préalablement établi par les travaux de l'équipe de Verkman entre autres (Smith et al. 2017). L'ECS a récemment été décrit par microscopie à superrésolution par l'équipe de Nägerl comme une succession de tunnels, de canaux et de cavités pouvant aller de quelques nanomètres à une centaine de nanomètres de large (Arizono et al. 2023). En conséquence, bien que les trois dextrans de mon étude diffusent simultanément dans le parenchyme, leurs poids moléculaires, et leur rayon hydrodynamiques correspondants, ne leur permettent pas d'explorer les mêmes microdomaines de l'ECS. Certains microdomaines pourraient même être assimilés à des impasses pour les mouvements moléculaires. Cette notion pourrait expliquer pourquoi nous avons constaté que le dextran de 3 kDa (dex3) se comportait légèrement différemment de ce qui était attendu d'après la théorie. J'ai en effet constaté que, au lieu de se déplacer plus loin que le dextran de 10 kDa (dex10), leurs distributions à 60 min se superposaient. Grâce à sa petite taille de 2,6 nm de diamètre environ, le dex3 peut explorer la majorité des micro-domaines de l'ECS. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse – que nous appellerons hypothèse (1) - que sa progression nette peut être retardée par rapport aux autres dextrans de plus grand poids moléculaire, qui sont exclus stériquement de ces microdomaines, si une certaine quantité de molécules dex3 pénètrent dans des cavités sans issue de l'ECS. La diffusion unitaire se poursuit, mais à l'échelle du parenchyme elle est en partie stoppée pour les dex3 retenus dans les microdomaines, ce qui pourrait expliquer la distance apparente parcourue par le dex3, équivalente à celle du dex10. La distribution du signal correspondrait alors à la somme de deux gaussiennes, la première qui décrirait la diffusion des dex3 retenus et retardés dans les cavités et la deuxième, celle des dex3 qui diffusent dans le reste de l'ECS. Comme la modélisation du signal du 3 kDa par la somme de deux gaussiennes me donne un coefficient de détermination R^2 équivalent et un fit aussi proche de la distribution brute des molécules qu'avec un simple modèle gaussien, notre méthode ne nous permet pas d'invalider ni de confirmer cette hypothèse. En outre, selon cette hypothèse, la tortuosité de l'ECS serait plus élevée pour le dex3 que pour le dex10. Cette idée est légèrement contre-intuitive si on considère un milieu homogène avec des canaux de taille relativement constante, mais reste plausible dans le cas d'un milieu aussi complexe que l'ECS.

On peut également envisager une autre explication, que j'appellerai hypothèse (2). Hrabětova et collègues ont montré que dans des conditions ischémiques ou hypo-osmolaires, la tortuosité de l'ECS augmente pour de petites molécules quand de grosses molécules préexistent dans l'espace et « masquent » certains canaux et microdomaines, qu'ils supposent à l'époque n'exister que dans ces conditions particulières de stress de l'ECS (Hrabětová, Hrabe, et Nicholson 2003). Ils constatent qu'en conditions normoxiques iso-osmotiques, l'infusion préalable (> 4 h avant) d'un dextran de 70 kDa dans l'ECS ne modifie plus la diffusion du TMA ou d'un dex3 injectés par la suite dans le milieu. Est-ce qu'il ne serait pas alors possible d'envisager que, dans le cas de la co-injection de dextrans de 3, 10 et 40 kDa, la plus petite molécule étant la plus rapide à explorer l'ECS avoisinant, le dex3 se faufile dans un certain nombre de microdomaines stériquement accessibles au dex3 et au dex10 et comble ces espaces ? Quand le dex10 arrive par la suite à ce niveau, les microdomaines qui lui étaient initialement accessibles sont masqués par le 3kDa. On se retrouverait ainsi dans la situation inverse de celle décrite précédemment. Le dex3 ne serait alors pas ralenti dans l'absolu, mais c'est plutôt le dex10 qui serait accéléré par une occupation préalable de l'ECS par le dex3. Le dex40 pourrait donc en réalité également se distribuer plus loin que ce qui serait attendu s'il était le seul dextran à diffuser dans l'ECS. Afin de valider cette hypothèse, il faudrait procéder à l'injection séparée des dextrans 3, 10 et 40 kDa dans le cortex cérébral et vérifier si les distributions obtenues quand ils sont injectés individuellement sont plus restreintes pour dex10 et dex40 que quand ils sont co-injectés.

Enfin, l'architecture de l'ECS pourrait ne pas expliquer à elle seule les écarts du comportement des dextrans par rapport à la théorie. Une autre hypothèse qui pourrait expliquer le signal moins étendu du dex3 a trait à son élimination active hors de l'ISF. Les dextrans sont utilisés comme traceurs pour leur caractère inerte mais on peut envisager, sur des temps longs proches de l'heure, que les molécules soient finalement recaptées par des cellules gliales ou éliminées dans la circulation, via les transporteurs ABC au niveau de la BHE ou via les voies de drainage de l'ISF (IPAD, flux glymphatique). Le retard de migration apparente du dextran de 3 kDa à 60 min pourrait alors correspondre à l'établissement d'un équilibre au bout d'une heure, entre la fraction de dex3 qui est éliminée et celle qui reste et diffuse dans

l'ECS. En effet, puisque ce dextran est celui qui devrait se déplacer le plus loin, c'est également celui au contact du plus grand nombre de sites d'élimination, donc celui qui disparaît en premier.

Le premier inconvénient de ma méthode réside dans l'acquisition à faible grossissement optique, qui évalue la diffusion macroscopique dans le parenchyme et non le phénomène unitaire microscopique. Nous observons donc une diffusion apparente des molécules et n'avons pas accès à la distribution précise des dextrans au sein de l'ECS. Cette approche ne permet pas non plus de suivre l'évolution du signal en fonction du temps. Dans l'hypothèse où l'expérience contrôle de diffusion individuelle des dextrans ne montrerait aucune différence de migration par rapport à l'expérience de co-injection, je ne pourrais toujours pas déterminer avec ma méthode si les écarts de migration relatifs entre dextrans par rapport à ce qui est théoriquement attendu sont dus à une perte de signal par clairance ou à une rétention du signal proche de la zone d'injection.

Une morphologie neuronale mince facilite la diffusion moléculaire et réduit la tortuosité de l'ECS

L'un des objectifs princeps de ma thèse a consisté à montrer que l'efficacité des flux moléculaires de l'ECS dépendait de la morphologie neuronale. J'ai mis en évidence que la réduction de la taille neuronale augmente significativement de plus de 10 % la distance macroscopique parcourue par des molécules de 3 à 40 kDa dans le parenchyme cérébral d'une souris adulte. Ce constat implique que les flux de dextrans dans l'ECS sont plus importants quand les neurones ont un phénotype compact. Cette augmentation du flux moléculaire ne peut pas s'expliquer par un gradient de concentration plus fort puisque les dextrans ont été injectés dans les mêmes quantités chez inIGF1RKO et son contrôle. La morphologie neuronale a donc une influence directe sur la perméabilité du parenchyme. Cette perméabilité accrue peut être la conséquence de trajectoires moléculaires plus rectilignes dans l'ECS inIGF1RKO par rapport à l'ECS contrôle qui serait plus sinueux, ou bien d'une augmentation du diamètre des pores et canaux de l'ECS, ou bien encore d'une combinaison des deux. Grâce à l'étude IRM et au suivi dynamique de gadomer-17 dans le cortex, j'ai apporté la preuve de principe que la réduction de la taille des neurones favorise les flux moléculaires en réduisant notamment la tortuosité de l'ECS. Réduire la tortuosité de l'ECS revient à simplifier le trajet des molécules dans l'ECS en diminuant le nombre et/ou la taille des obstacles

à leur diffusion. J'ai montré que dans le parenchyme inIGF1RKO, les mouvements moléculaires sont moins entravés et plus rapides. On pourrait vérifier par tracking unitaire de molécules, comme les nanotubes de carbone, qu'au lieu d'emprunter des chemins étroits et tortueux, les molécules diffusent plus rapidement selon des trajectoires mésoscopiquement plus rectilignes quand les neurones sont plus minces. Il est hautement probable que les répercussions d'un ECS plus favorable aux flux moléculaires sur la clairance cérébrale soient majeures. Dans un parenchyme cérébral où la tortuosité est réduite, les trajectoires entre les cellules et les capillaires sont plus directes, les métabolites atteignent plus rapidement les PVS et les vaisseaux où les flux de LCR et l'élimination sanguine systémique prennent le relais. En outre, quand les flux moléculaires sont plus efficaces, cela contribue à réduire le temps de présence des métabolites dans les canaux et cavités de l'ECS, donc à réduire leur concentration locale et, en conséquence, à limiter les phénomènes d'agrégation. Nous émettons l'hypothèse que la taille neuronale est un acteur majeur de la neuroprotection des souris ADINKO, dont la morphologie neuronale est réduite dans les mêmes proportions que chez inIGF1RKO. La réduction de tortuosité et la facilitation de la diffusion moléculaire quand la morphologie neuronale est plus compacte sont un premier argument en faveur de cette hypothèse, que je vais étayer au fil de cette discussion.

J'ai également constaté que la distribution relative des dextrans entre eux n'était pas exactement la même en fonction du contexte KO ou non de l'ECS. En effet, les écarts de distances parcourues, en valeurs absolues, entre le dex40 et les deux autres dextrans sont plus importants chez inIGF1RKO que chez le contrôle. On remarque aussi qu'alors que le dex10 diffuse plus loin que le dex3 dans l'ECS contrôle, les deux dextrans sont distribués macroscopiquement de façon similaire dans le parenchyme inIGF1RKO. Que les microdomaines de l'ECS retiennent le dex3 ou que ce soit le dex10 qui progresse plus rapidement que prévu, ces observations suggèrent que la réduction de la taille neuronale IGF-dépendante affecte différemment les sous-espaces et les micro-domaines de l'ECS en fonction de leur taille. Dans le cas où la situation que nous observons correspondrait à celle décrite dans l'hypothèse 2, l'écart de distribution entre dex10 et dex3 serait d'autant plus important que les espaces habituellement accessibles à dex10 seraient saturés par dex3. Cet écart étant plus important dans l'ECS contrôle que chez inIGF1RKO, cela suggère que l'ECS contrôle possède des petits microdomaines accessibles à des

molécules de diamètre hydrodynamique inférieur à 5 nm, acceptant donc dex3 et dex10, en plus grand nombre que l'ECS inIGF1RKO. Cela ne présume pas d'un changement du volume total de l'ECS accessible mais à minima, cela laisse penser que l'ECS inIGF1RKO possède une autre fréquence de distribution de la taille des microdomaines par rapport à celle du contrôle.

Quel est l'effet des changements neuromorphologiques IGF-dépendants sur le volume de l'ECS ?

Mes résultats démontrent que la compaction de la morphologie neuronale réduit la tortuosité de l'ECS du cortex cérébral. Néanmoins nous ne connaissons pas l'effet de la mutation IGF1R neuronale sur le volume de l'ECS. Des chercheurs ont montré que la répartition et la fréquence de certains microdomaines pouvaient être différentes entre une condition contrôle et une condition expérimentale, comme dans le cas d'un modèle de synucléinopathie, sans que cela affecte la fraction α moyenne de l'ECS (Tønnesen, Hrabětová, et Soria 2023b). Les variations de λ et de α ne vont pas de pair (Tableau 5). Au cours du sommeil ou de l'anesthésie, la fraction volumique augmente par rapport à la condition éveillée, sans que la tortuosité soit affectée (Lulu Xie et al. 2013). Dans des conditions ischémiques, hypo-osmolaires, ou lors de la dépolarisation progressive migraineuse, α diminue tandis que λ augmente (Hrabe et Hrabetova 2019; Hrabětová, Hrabe, et Nicholson 2003; Hrabetová et Nicholson 2000; Le Bihan 2014). Suite à une lésion corticale dans S1, des chercheurs ont mis en évidence que la tortuosité était augmentée dans les régions corticales somatosensorielles et auditives alors que le volume de l'ECS restait inchangé (Vorísek et al. 2002). Le vieillissement s'accompagne dans l'ECS du cortex d'une diminution de α sans changements de λ (E. Syková et al. 2002; Eva Syková, Vorísek, et al. 2005). En revanche, des défauts de constituants de la MEC diminuent à la fois la tortuosité et la fraction volumique de l'ECS, car l'ISF devient moins visqueux, et la structure rigide entre les cellules est affaiblie (Eva Syková, Voříšek, et al. 2005). La synucléinopathie augmente la fraction volumique et réduit la tortuosité par son effet sur les composants de la MEC (Soria, Paviolo, et al. 2020). Dans des modèles d'Alzheimer, on retrouve à la fois une augmentation de α et une augmentation de λ , qui peuvent s'expliquer respectivement par la perte neuronale et la présence d'agrégats dans l'ECS (Eva Syková, Vorísek, et al. 2005).

Tableau 5. Variations de la tortuosité et de la fraction volumique de l'ECS en fonction de différentes conditions expérimentales et par rapport à leur condition contrôle respectivement

Condition	Tortuosité λ	Fraction volumique α
Maladie d'Alzheimer	↑	↑
Ischémie, migraine, choc hyposmolaire	↑	↓
Lésion	↑	~
Sommeil, anesthésie	~	↑
Vieillessement	~	↓
Défauts de la MEC	↓	↓
Synucléinopathie	↓	↑
inIGF1RKO	↓	?

« ~ » signifie qu'aucune variation n'a été constatée. « ? » signifie que la mesure n'a pas été déterminée.

Presque toutes les combinaisons entre α et λ sont possibles, mais on ne connaît pas encore de conditions où la tortuosité est diminuée tandis que la fraction volumique reste inchangée (Tableau 5). Dans notre modèle, l'effet du KO IGF1R sur la taille neuronale est le plus marqué au niveau du soma avec 35 % de réduction de sa taille. On peut donc penser que les régions de l'ECS les plus affectées par le changement de morphologie neuronale se trouvent à la périphérie du soma. Cette compaction somatique pourrait engendrer localement, en périneuronal, un agrandissement des cavités et des *pools* à proximité (Soria, Paviolo, et al. 2020). À l'échelle du parenchyme, la fréquence de grands *pools* pourrait donc être augmentée par rapport aux petits dans un cortex inIGFRKO comparé à un cortex contrôle. La fraction α serait de cette manière inchangée dans un cortex où les neurones sont plus minces du fait de la compaction globale du tissu. On peut également imaginer que la fréquence de grands compartiments pourrait aussi être augmentée dans l'absolu. En outre, puisque la mutation IGF1RKO réduit l'épaisseur des dendrites primaires, cela pourrait augmenter la largeur ou le diamètre des espaces canaliculaires de l'ECS. Dans ce cas de figure, l' α moyenne de l'ECS d'un cerveau inIGF1RKO serait augmentée par rapport à un cerveau contrôle.

On peut alors réfléchir à différents cas de figure et à l'impact que peut avoir la réduction de la taille neuronale sur le volume de l'ECS et les autres cellules du SNC. Pour cela, je réaliserai un certain nombre

de simplifications. Considérons que le volume occupé par les vaisseaux est négligeable (1,8 % (Schmid et al. 2019)) et que le volume cortical se répartit alors en 20 % d'ECS et le reste en volume neuronal (40 %) et glial (40 %) à raison d'une contribution à 50/50. Sachant que la mutation IGF1RKO entraîne une réduction de 25 % de la surface en coupe transversale d'un soma, en assimilant le soma à une sphère, la mutation induit donc une réduction de 35 % du volume somatique. D'après des données compilées à partir de la base NeuroMorpho.Org (<https://neuromorpho.org/>), on peut estimer que le volume d'un neurone se partage de façon égale entre son soma et ses prolongements cytoplasmiques (dendrites et axones). Sachant que la mutation affecte également l'épaisseur des dendrites, on peut considérer qu'un neurone KO correspond à 65 % en volume d'un neurone contrôle. D'autre part, la mesure de l'épaisseur corticale chez le mutant montre une compaction de 10 % par rapport au cortex contrôle. Si on suppose que la réduction est isométrique dans les 3 dimensions, cela diminue le volume cortical de 27 %. Il est important de noter que cette valeur est très probablement nettement surestimée puisque nos données non publiées sur la réduction en masse du cerveau inIGF1RKO donnent des valeurs plus faibles (20 % perte de masse humide d'un cortex inIGF1RKO par rapport à un cortex contrôle). On peut alors conclure à partir des relations entre ces différents paramètres, que toute modification du volume neuronal entraîne nécessairement des modifications du volume de l'ECS et/ou du volume glial. Dans le cas où l' α de l'ECS ne serait pas modifié, cela impliquerait une réduction du volume glial de 35 %. Dans le cas où la fraction volumique de l'ECS serait augmentée, le volume glial devrait d'autant plus diminuer (40 % de réduction du volume glial si l'ECS augmente ne serait-ce que de 10 %). A l'inverse, si l'ECS diminue par exemple de 20 %, α passant de 0,2 à 0,16, la glie ne serait compactée que de 25 %. On peut effectivement s'attendre à ce que le volume glial soit réduit dans notre modèle, notamment la fraction astrocytaire. En effet, puisque l'apport métabolique que ces cellules doivent fournir au neurone est probablement plus faible chez inIGF1RKO que dans un contrôle (étant donné qu'un neurone plus petit consomme moins) et que la surface neuronale à contacter au niveau somatique et dendritique est plus petite, les astrocytes pourraient, par une diminution de leur taille, adapter leur morphologie au phénotype neuronal plus mince. Néanmoins, une diminution de 35 % ou plus paraît trop importante et non physiologique, d'autant que les cellules gliales possèdent toujours une signalisation IGF-1, potentiellement légèrement plus stimulée que chez le contrôle du fait des taux d'IGF-1 plasmatique plus

élevés. Ce modèle très simplifié du parenchyme cortical serait donc plutôt en faveur d'une légère baisse du volume de l'ECS qui s'accompagnerait d'une réduction du volume glial.

Perspective : Afin de statuer sur les effets de la mutation inIGF1RKO sur la fraction volumique de l'ECS on pourrait tenter d'approximer α expérimentalement. Une approche préliminaire consisterait à mesurer les quantités de Na⁺ présentes dans le cerveau de souris inIGF1RKO et contrôles. Le Na⁺ étant majoritairement concentré dans l'ECS par rapport à l'intracellulaire, en obtenant la quantité d'ions Na⁺ totale et en connaissant les rapports de concentration entre ces deux compartiments, je serai ensuite capable d'en déduire les rapports entre le volume occupé par le compartiment extracellulaire et le volume occupé par le compartiment intracellulaire. L'immunohistochimie nous fournit la preuve que la densité et le volume occupé par les vaisseaux est le même dans un cerveau contrôle et mutant. Si je constate une différence du rapport des volumes intra- et extracellulaires entre mutants et contrôles je pourrais alors en déduire que c'est bien le volume de l'ECS qui est différent.

Mise à part la synucléinopathie qui affecte directement les composants de la MEC et contribue ainsi à réduire la viscosité de l'ISF, on constate que les états pathologiques sont plus généralement associés à une augmentation de la tortuosité (Tableau 5). Réduire la tortuosité de l'ECS apparait donc comme un moyen intéressant pour contrecarrer des pathologies comme Alzheimer ou diminuer l'effet d'accidents vasculaires ischémiques, par exemple.

Répercussion du KO IGF1R sur les autres composants du parenchyme : les astrocytes, la microglie et la MEC

Si les neurones sont la population principalement touchée et de façon prédominante par la mutation IGF1RKO neuronale, cela n'exclue pas un certain nombre de répercussions sur l'histo-architecture environnante, la densité et l'organisation des autres cellules et la composition biochimique de la MEC par exemple.

En ce qui concerne les astrocytes, ceux-ci ont des contacts et des interactions privilégiés avec les neurones. Étant donné leurs capacités à détecter et suppléer les besoins énergétiques du neurone et à réguler l'activité de ses synapses, on peut raisonnablement imaginer que les astrocytes puissent adapter

leur nombre et/ou leur morphologie au phénotype neuronal KO. Ils pourraient ainsi éventuellement participer directement ou indirectement à la neuroprotection. D'après les travaux préalablement publiés par le laboratoire, la densité des astrocytes n'est pas modifiée dans un parenchyme où les neurones sont constitutivement IGF1RKO (De Magalhaes Filho et al. 2017) et augmente légèrement plus dans le cortex de souris âgées inIGF1RKO que dans un cortex contrôle (George et al. 2017) mais nous ne l'avons pas encore vérifié dans notre modèle inIGF1RKO à jeune âge. Si leur nombre ne semble que peu affecté par les changements neuromorphologiques, il est néanmoins important de déterminer les répercussions du KO neuronal IGF1R sur les astrocytes car, en plus de leur régulation de l'activité neuronale, les astrocytes sont également des acteurs privilégiés des mouvements d'eau et d'osmose dans le parenchyme, et influent donc sur la régulation du volume de l'ECS (Sætra, Ellingsrud, et Rognes 2023). Une équipe a notamment montré que la capacité des astrocytes à réguler leur volume et leur réponse à un stress hypo-osmotique était altérée dans un modèle triple transgénique de la maladie d'Alzheimer (Tureckova et al. 2022), ce qui pourrait donc directement impliquer les astrocytes dans la progression ou l'entretien de la pathologie. D'autre part, les astrocytes semblent réagir plus positivement à une stimulation IGF-1 (Logan et al. 2018; Pinto-Benito et al. 2022; Tarantini et al. 2021; Ratcliffe et al. 2018) qu'à une inhibition de cette signalisation (J. Zegarra-Valdivia et al. 2022). Dans notre modèle, les niveaux d'IGF-1 circulants sont plus élevés que chez le contrôle. Dans le cortex inIGF1RKO, la signalisation IGF1R des cellules gliales pourrait donc être légèrement stimulée quand celle des neurones est absente. Cela pourrait contribuer à maintenir une réactivité contrôlée et des fonctions efficaces voire stimulées des cellules gliales, de phagocytose par exemple (Logan et al. 2018), ce qui contribuerait à maintenir un ECS sain et pourrait même renforcer le phénomène neuroprotecteur IGF-dépendant de façon « cellule non-autonome ».

Les travaux publiés étayent l'hypothèse selon laquelle le maintien d'un certain niveau de signalisation dans les populations astrocytaires, mais également microgliales (Ivan et al. 2023), serait nécessaire pour assurer une neuroprotection la plus efficace possible. Pour déterminer l'importance respective de chacune de ces populations dans la neuroprotection dépendante d'IGF-1, il faudrait concevoir un modèle double knockout ciblant les neurones et les astrocytes, par exemple, ou bien un modèle où le KO IGF1R

neuronal ne s'accompagne pas d'une augmentation systémique d'IGF-1. On pourrait également envisager dans notre modèle inIGF1RKO de délivrer de façon locale un inhibiteur pharmacologique d'IGF1R, comme le PPP, mais nous serions confrontés au problème de la voie d'administration, au temps d'action de la molécule, non compatible avec des études à long terme, et surtout au fait que le PPP inhiberait les différentes populations cellulaires de façon non sélective et pourrait aussi agir de façon non spécifique sur d'autres récepteurs à tyrosine kinases. Alors que de tels modèles pourraient éventuellement permettre aux spécialistes de la signalisation IGF de s'accorder sur les effets cérébraux bénéfiques et néfastes de l'IGF-1, ils n'existent, à ma connaissance, pas encore à ce jour.

Perspective : Nous sommes actuellement en train de déterminer l'impact du KO neuronal IGF1R sur les astrocytes du cortex par immunohistochimie. Nous prévoyons de les quantifier et d'évaluer leur morphologie et leur volume par microscopie confocale et analyse du signal GFAP avec le logiciel IMARIS. Nous pourrions également envisager de faire de même pour la microglie. Nous prévoyons également au cours de cette analyse d'évaluer les relations entre la glie et les vaisseaux (marquage lectine) d'une part, et entre la glie et les neurones (marquage NeuN) d'autre part, dans le contexte inIGF1RKO.

On pourrait également envisager que la réduction de la taille neuronale affecte la composition de la MEC. Puisque les enchevêtrements d'acide hyaluronique et de protéoglycanes assurent une certaine rigidité de la structure de l'ECS et sont en partie liés aux membranes cellulaires, notamment via les ténascines, une réduction du volume neuronal devrait entraîner une mise sous tension de la MEC et potentiellement induire son remodelage. De surcroît, une structure particulière de la MEC appelée *perineuronal net* (PNN) existe autour des régions somatiques et dendritiques de certains neurones (Krishnaswamy et al. 2019). On pense que les PNN sont impliqués dans la stabilisation des synapses et on constate que leur distribution et composition sont altérées dans un certain nombre de pathologies comme l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie ou encore dans les troubles autistiques. Si les neurones glutamatergiques sont entourés de ces PNN, ce qui n'est pas encore clairement établi, cette structure serait alors située au contact des régions les plus affectées par le KO d'IGF1R. C'est donc la structure susceptible de subir le plus de remodelage. Des changements dans la composition biochimique

de la MEC, comme une diminution de l'expression des ténaescines, par exemple (Eva Syková, Voříšek, et al. 2005), pourraient contribuer à réduire la viscosité de l'ECS et renforcer la réduction de tortuosité déjà engendrée par l'amincissement des neurones.

Répercussion du KO IGF1R neuronal sur l'unité neurovasculaire : les avantages pour les pathologies liées à la clairance d'avoir une relation neuro-vasculaire renforcée

En étudiant l'impact des changements neuromorphologiques IGF-dépendants sur le réseau vasculaire, j'ai montré que la densité du réseau capillaire n'était pas impactée par la mutation, ce qui corrobore les données obtenues dans un autre modèle IGF1R KO neuronal (De Magalhaes Filho et al. 2017). En revanche en m'intéressant aux rapports anatomiques entre les vaisseaux et les neurones, j'ai constaté une réorganisation de l'agencement neuronal autour des capillaires. J'ai d'abord montré que la réduction de la taille cellulaire des neurones n'affectait pas leur densité. J'ai ensuite mis en évidence que des neurones minces étaient significativement plus proches des vaisseaux de manière relative, que les neurones contrôles. Alors que dans un parenchyme contrôle, une plus grande proportion de neurones se situe à plus de 10 μm de la surface capillaire (55 %), des neurones plus minces se répartissent presque équitablement de part et d'autre de cette frontière choisie arbitrairement, avec légèrement plus de neurones dans les premiers 10 microns. Cette réorganisation architecturale qui limite l'épaisseur d'ECS à traverser entre un neurone et un vaisseau, contribue à renforcer le flux moléculaire des métabolites relargués dans l'ISF. La réduction de la taille neuronale entraîne deux phénomènes dont les effets se cumulent, la réduction de la tortuosité de l'ECS et un rapprochement relatif entre neurones et vaisseaux, et devraient très probablement concourir à augmenter la clairance cérébrale.

En l'absence de signalisation IGF1R, le phénotype neuronal mince se maintient et facilite les flux moléculaires de l'ECS tout au long de la vie de l'individu

J'ai pu constater que le phénotype neuronal mince était pérenne et se maintenait au cours de la vie et du vieillissement de la souris. Ce résultat est un argument supplémentaire en faveur de l'effet bénéfique d'une réduction de la signalisation IGF1R sur le long terme. En effet, si une compaction de la morphologie neuronale n'était pas compatible avec les fonctions électrophysiologiques du neurone, cela se répercuterait premièrement sur la connectivité et l'activité neuronale et ensuite sur les fonctions

cognitives et comportementales de la souris. D'autre part, étant donné les nombreux cross-talk impliqués dans la régulation de la taille cellulaire, d'autres signaux qu'IGF-1 pourraient éventuellement intervenir pour compenser l'absence d'IGF1R et restaurer la taille neuronale physiologique si celle-ci était une condition nécessaire au fonctionnement neuronal (Lloyd 2013). Or, de l'âge adulte jusqu'à un âge avancé, on n'observe pas chez le neurone IGF1RKO de mise en place d'un système de compensation lui permettant de court-circuiter le signal IGF1R pour récupérer sa taille physiologique. Ce résultat suggère l'existence d'une certaine redondance métabolique neuronale dans les conditions physiologiques, dont le neurone peut se dispenser tout en assurant son fonctionnement basal. Cet « excès » métabolique pourrait s'assimiler à une sorte de mise en réserve neuronale. On peut imaginer que dans des conditions environnementales de surstimulation de l'axe somatotrope (régime occidental, excès en protéines...), toutes les cellules, y compris les neurones, se sont adaptées en produisant en condition basale un peu plus que nécessaire. Dans ce cas, cette surstimulation ne pourrait-elle pas entraîner un certain épuisement neuronal, une moins bonne résistance au stress, et ainsi accélérer le développement de maladies neurodégénératives, par exemple, car la cellule « en fait trop » ?

Dans mes travaux j'ai pu constater, en accord avec ce qui avait déjà été précédemment montré dans la littérature, que la diffusion diminue avec l'âge (Eva Syková, Vorisek, et al. 2005; E. Syková et al. 2002; Tureckova et al. 2022) ce qui sous-entend que le vieillissement s'accompagne d'une augmentation physiologique de la tortuosité de l'ECS. J'observe cette diminution de l'efficacité de la diffusion à la fois chez le contrôle et chez la souris inIGF1RKO, mais selon une cinétique qui apparaît différente entre les deux groupes et propre à chaque taille moléculaire. En considérant de façon globale ce résultat, on peut conclure que la réduction de taille neuronale n'empêche pas la diminution de la diffusion moléculaire avec l'âge mais qu'elle retarde les stades où la diffusion est la plus altérée. En effet, on remarque que les molécules dex10 et dex40 diffusent aussi facilement dans l'ECS d'une souris inIGF1RKO de 22 mois que dans l'ECS d'une souris contrôle de 6 mois. Cela reviendrait à dire que la mutation inIGF1RKO « décale » de quelques mois le vieillissement du cerveau. À l'échelle de la vie d'une souris, cet avantage est considérable si on considère que la diminution de la diffusion est à la fois un élément déclencheur et un facteur d'entretien des pathologies neurodégénératives. Le phénotype

neuronal mince pérenne contribue ainsi à maintenir un environnement ECS sain et propice à la diffusion et aux flux moléculaires tout au long de la vie. En effet, la diffusion facilitée chez *inIGF1RKO* persiste jusqu'à 22 mois pour des molécules entre 5 et 18 nm de diamètre hydrodynamique. En extrapolant cet effet à la clairance cérébrale, la clairance de molécules de taille intermédiaire est donc favorisée et stimulée tôt dans la vie de l'individu. Plus le cerveau est capable d'éliminer des métabolites potentiellement toxiques de façon efficace, précoce et constante au cours de la vie et plus cela diminue et retarde l'apparition des phénomènes d'accumulation. Dans cette logique, une facilitation de la diffusion sur le long cours et débutant tôt dans la vie adulte devrait donc avoir des effets bénéfiques cumulatifs. C'est ce mécanisme que nous identifions comme étant à l'origine de la protection contre la pathologie amyloïde chez les souris *ADINKO*.

La taille neuronale comme acteur de la neuroprotection contre la protéotoxicité dans Alzheimer via ses répercussions fonctionnelles sur l'ECS à long terme

La diffusion facilitée, la réduction de la tortuosité, et la persistance de ces phénomènes chez un mutant *inIGF1RKO* sont autant d'arguments en faveur d'un mécanisme neuroprotecteur de résistance au stress, et particulièrement au stress protéotoxique, impliquant la morphologie neuronale, les flux moléculaires de l'ECS et la clairance cérébrale. Dans un autre modèle *IGF1RKO* neuronal, Gontier et al. ont montré que les souris *ADINKO* étaient protégées de la maladie d'Alzheimer. Ils ont constaté une réduction de la charge amyloïde qui se traduisait par une diminution du nombre de plaques amyloïdes, une diminution de la fraction soluble d'A β oligomériques dans le cortex et une augmentation de la fraction plasmatique d'A β (Gontier et al. 2015). Les neurones de ces souris *ADINKO* étant knockout pour *IGF1R* et possédant le même phénotype que les neurones de *inIGF1RKO* (Gontier et al. 2015; George et al. 2017), nous pouvons suggérer plusieurs mécanismes en lien avec la réduction de la taille neuronale pouvant expliquer la protection contre la pathologie A β chez *ADINKO*.

La diminution de la taille neuronale, et donc vraisemblablement aussi de la surface membranaire, ne semble pas affecter la production d'A β puisque les niveaux d'expression relatifs des sécrétases par rapport à la *GAPDH* sont équivalents dans les souris mutantes et dans les contrôles (Gontier et al. 2015). Néanmoins, étant donné que le neurone *IGF1RKO* est plus petit, la quantité absolue de protéines et donc

d'A β qu'il peut produire pourrait être réduite par rapport à un neurone contrôle. Un argument en faveur de cette hypothèse concerne la quantité de transcrits extraits suite à la microdissection de la région CA1 de l'hippocampe de souris inIGF1RKO, qui semble moins abondante que celle de souris contrôles, mais qui pourrait également être liée à des différences de microdissection (données non publiées). On peut alors envisager qu'une part de la diminution de la charge amyloïde dans le cortex est due à une plus faible production en raison de la taille réduite du neurone. Néanmoins, cette réduction de production, si elle existe, peut certes contribuer à réduire la charge toxique d'A β dans le cortex, mais elle ne peut pas expliquer la fraction d'A β plasmatique augmentée constatée chez ADINKO.

J'ai montré, dans un cortex inIGF1RKO, que la diffusion est facilitée pour des espèces moléculaires de tailles comparables à celles des monomères et des oligomères d'A β (formes dimériques à décāmériques). Les changements neuromorphologiques dépendants d'IGF1R impactent donc les flux de toute la gamme de taille moléculaire des espèces les plus toxiques d'A β . La morphologie neuronale IGF1RKO compacte permet de dégager de l'espace dans l'ECS, en réduisant la place occupée par des renflements membranaires proéminents, ce qui facilite le flux et l'accès aux vaisseaux et PVS des espèces d'A β solubles et diffusibles. Cette diffusion facilitée des peptides et oligomères d'A β de leurs sites de production jusqu'aux vaisseaux, via un ECS moins tortueux, pourrait être un des mécanismes expliquant le plus grand ratio d'A β plasmatique/A β cortical chez ADINKO par rapport à une souris AD. En outre, favoriser ainsi le drainage des peptides A β permet de limiter leur accumulation dans l'ECS. Par ricochet, cela réduit la concentration des molécules d'A β dans l'ECS et limite donc leur agrégation. Réduire la signalisation IGF1R neuronale limite donc aussi indirectement les phénomènes d'agrégation. Si la réduction de la tortuosité neurodépendante intervient suffisamment tôt dans le développement de la pathologie, elle pourrait alors ralentir suffisamment la cinétique d'agrégation pour retarder l'apparition des premiers signes la pathologie, ce qui se traduit à un instant t dans le cerveau par des plaques moins nombreuses, moins d'oligomères d'A β , moins de mort neuronale et d'inflammation et des performances cognitives conservées. À l'inverse, quand la pathologie est déjà installée et active, l'ECS est déjà trop encombré et les éléments toxiques nombreux et déjà insolubles pour qu'une facilitation de la diffusion ait un quelconque effet sur la progression et les symptômes de la maladie

(George et al. 2017). Nous proposons comme mécanisme neuroprotecteur que la réduction de la taille neuronale IGF1R dépendante facilite l'élimination d'A β vers la périphérie tout au long de la vie et qu'elle agisse également de façon préventive sur les phénomènes d'agrégation quand elle se met en place de façon précoce en parallèle de la pathologie.

Perspective : Nous pourrions envisager de faire une étude longitudinale par IRM qui permettrait d'évaluer la tortuosité et la clairance chez un individu jeune inIGF1RKO et/ou ADINKO et de réévaluer 10 mois plus tard l'évolution de ces deux paramètres. On pourrait pour cela injecter les souris avec du Gd-17, dont on pourrait suivre la diffusion de la même manière que dans l'expérience de notre article, mais dont on pourrait également évaluer la clairance en réalisant des acquisitions supplémentaires à quelques heures d'intervalle chacune. On réaliserait ensuite la même procédure sur cette cohorte à un âge plus avancé.

La diffusion facilitée d'A β pourrait également avoir des inconvénients. Le potentiel toxique des peptides extracellulaires comme A β ou tout autre peptide pro-agrégant soluble se manifeste dans les premiers microns autour de son site de sécrétion ou de relargage. Il faut également considérer que, dans une tentative de diminution de la charge toxique intracellulaire, le mécanisme neuroprotecteur qui consiste à exocytter dans l'ECS les oligomères et agrégats, pourrait mettre en péril les autres cellules à proximité en favorisant la dissémination de protéines mal conformées. En effet, par un mécanisme prion-*like*, ces peptides mal conformés pourraient promouvoir des défauts de repliement protéiques ailleurs dans le parenchyme (Boland et al. 2018, Hérard et al. 2020). Une diffusion facilitée serait alors à double tranchant, elle favoriserait l'acheminement des protéotoxines vers les voies extracellulaires d'élimination, mais augmenterait dans le même temps le risque de propagation d'un mauvais repliement. Ce point de vue souligne l'importance du maintien d'un fort gradient entre les vaisseaux et les régions du parenchyme qui en sont les plus éloignées pour accélérer la diffusion et limiter les possibilités de réabsorptions neuronales sur le chemin.

Perspective : Il conviendrait également de vérifier que les molécules diffusent mieux dans un cerveau ADINKO que dans un cerveau AD, avec des dextrans et éventuellement des A β O marqués ou bien par microdialyse. On pourrait également vérifier que la diffusion facilitée ne favorise pas la progression dans le sens expansion à d'autres régions de signes histopathologiques. Il faudrait un suivi global de l'ensemble du cortex et de l'hippocampe par exemple une étude IRM permettant de détecter in vivo l'A β et les plaques.

Une morphologie plus compacte comme acteur générique de neuroprotection

Nous pourrions envisager que la neuroprotection IGF-dépendante que l'on retrouve dans d'autres conditions stressantes passe également par la réduction de la taille neuronale et les répercussions qu'elle entraîne sur l'ECS. L'ischémie engendre un œdème cellulaire et tissulaire important, et particulièrement dans le cerveau où les neurones répondent et gonflent très fortement du fait de leur forte demande en O₂ qui n'est pas atteinte. Comme les souris dont les neurones sont constitutivement IGF1R KO sont protégées d'un tel stress, on peut envisager que la taille neuronale IGF1R KO pourrait être, non seulement un phénotype résistant au stress, mais une taille également optimisée pour s'adapter à des mouvements d'eau massifs. Suite au stress ischémique, la pompe Na/K s'arrête et entraîne une entrée massive, via les récepteurs ionotropiques AMPAR et NMDAR et des canaux voltages dépendant, de Na⁺ et de Cl⁻ qui engendre un influx d'eau vers le compartiment intracellulaire et fait gonfler la cellule. On peut alors imaginer deux scénarios possibles de réponse d'un neurone IGF1RKO. (1) Le neurone IGF1R KO gonfle, mais il gonfle dans une moindre mesure que les neurones contrôles. Puisque ces neurones minces devraient consommer moins d'O₂ qu'un neurone contrôle et qu'ils se dépolarisent moins spontanément (Gazit et al. 2016), le gonflement engendré serait alors mieux contrôlé et permettrait de réduire l'impact du stress ischémique sur l' α et la λ de l'ECS, et de maintenir une structure de l'ECS compatible avec des flux moléculaires interstitiels. (2) Le neurone IGF1RKO gonfle de la même manière, mais comme la λ , et peut-être l' α aussi, de l'ECS sont optimisées dans un tel contexte, le gonflement neuronal place alors l'ECS dans des conditions sub-optimales de flux moléculaires mais pas excessivement délétères. Dans les deux cas, la morphologie cellulaire plus compacte n'éliminerait

pas complètement l'œdème réactionnel, mais permettrait d'assurer un certain flux de molécules dans le parenchyme compatible avec la survie neuronale.

On peut faire l'hypothèse dans notre modèle que, comme le réseau vasculaire ne change pas, cela crée une condition d'hypoxie temporaire, et que cela expliquerait pourquoi les neurones se rapprochent relativement des capillaires chez inIGF1RKO. Burtcher et al se sont intéressés à l'effet de l'hypoxie dans les maladies neurodégénératives. Ils montrent qu'en fonction de la chronicité de l'exposition à des conditions hypoxiques, les effets sur les fonctions cérébrales peuvent être bénéfiques ou néfastes. Une hypoxie légère et très progressive comme celle liée à la vie en altitude (habitants dans les montagnes) ou une hypoxie chronique intermittente est corrélée à une neuroprotection vis à vis de la MA et des maladies ND (X. Yue et al. 2021; Thielke, Slatore, et Banks 2015; Stacey et al. 2023). On peut alors penser que chez les souris inIGF1RKO, c'est peut-être une hypoxie qui s'installe à très court terme suite au KO et que, comme le réseau vasculaire ne change pas, les neurones se rapprochent des vaisseaux et réduisent ainsi la distance totale à parcourir pour les métabolites toxiques jusqu'aux sites d'élimination. L'hypoxie peut également avoir un effet moins important pour des neurones IGF1RKO et être contrebalancée par le fait que les neurones sont plus petits et donc consomment moins. Par rapport aux ROS, nous ne savons actuellement pas si les neurones KO produisent moins de ROS et si cela pourrait contribuer à leur résistance au stress oxydant et à l'hypoxie (Holzenberger et al. 2003; De Magalhaes Filho et al. 2017). Cette résistance aux ROS pourrait également être la conséquence d'une production d'anti-oxydants plus importante.

En l'absence de neurodégénérescence, n'associe-t-on pas de façon erronée l'amincissement cortical à des neurones moins performants alors qu'à l'inverse, il s'agirait pour les neurones d'adopter un phénotype plus résistant ?

Des études multicentriques chez l'homme ont permis d'établir que l'épaisseur corticale était négativement corrélée à l'âge (Frangou et al. 2022). Dans la période de temps qui concerne les stades tardifs de la vie de l'individu, certaines études mettent en avant que l'épaisseur corticale est globalement préservée au cours du vieillissement physiologique. À l'inverse, ces chercheurs constatent une forte dégradation d'amincissement cortical chez des patients Alzheimer, et ce dès l'apparition des premiers stades

cliniques, associés à des symptômes cognitifs légers (*mild clinical stages*) (Dickerson et al. 2009). Une autre étude met en évidence une diminution notable du volume et de l'épaisseur corticale également chez des personnes âgées sans déficits cognitifs (Fleischman et al. 2014). Le terme atrophie, qui caractérise une réduction en volume d'un tissu ou d'un organe est un terme péjoratif associé à une dysfonction et/ou une mort cellulaire, et l'amincissement cortical et l'atrophie corticale sont souvent amalgamés et associés à des défauts cognitifs ou comportementaux. Effectivement, dans les maladies neurodégénératives affectant le SNC comme la MA, la MP et la MH, chez les patients présentant déjà des symptômes, une atrophie corticale est systématiquement associée à une neurodégénérescence. Faisons maintenant l'hypothèse qu'une certaine atrophie corticale préexiste par rapport à l'apparition des symptômes et ne soit pas associée à une neurodégénérescence. Cela est possible puisqu'il existe un certain nombre de pathologies du SNC, comme la dépression, la schizophrénie et la démence post-accident vasculaire, caractérisées par une atrophie corticale sans modification de la densité neuronale dans le parenchyme (Sweet et al. 2003; Khundakar et al. 2009; Foster et al. 2014). Mon laboratoire suggère que la réduction de la signalisation IGF1R est un mécanisme endogène mis en place en réponse à un stress. Le programme neuroprotecteur ainsi mis en place provoque un changement phénotypique neuronal et une compaction de sa morphologie (George et al. 2017). Pour faire écho à cette idée, on peut émettre l'hypothèse que l'amincissement cortical, en dehors de toute dégénérescence, pourrait être le résultat de l'activation de ce programme neuroprotecteur. Cette apparente atrophie tissulaire pourrait n'être qu'un amincissement cortical résultant d'une compaction neuronale suite au stress provoqué par le début du développement de la pathologie cérébrale. On peut alors supposer que les patients atteints de maladies neurodégénératives présentent également dans les premiers stades de la maladie un amincissement cortical, non encore associé à une neurodégénérescence, mais exclusivement lié à une réduction de la taille cellulaire des neurones. Marlene Tahedl propose que la caractérisation par IRM de l'épaisseur corticale au cas par cas puisse devenir une mesure de routine (Tahedl 2020), permettant éventuellement de détecter, via ce potentiel amincissement pré-symptomatique, les stades précoces de certaines pathologies. Cela pourrait permettre d'agir avant que la pathologie n'ait trop progressé, que les agrégats se soient déposés ou qu'il y ait déjà une mort neuronale. L'IRM pourrait alors s'inscrire dans le cadre du dépistage des maladies neurodégénératives comme un examen systématique, au même

titre que les coloscopies, mammographies ou les dosages hormonaux font partie des campagnes de dépistage et de prévention des cancers du côlon, du sein ou de la prostate respectivement.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, N. Joan, Michelle E. Pizzo, Jane E. Preston, Damir Janigro, et Robert G. Thorne. 2018. « The Role of Brain Barriers in Fluid Movement in the CNS: Is There a ‘Glymphatic’ System? » *Acta Neuropathologica* 135 (3): 387-407. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1812-4>.
- Abeliovich, Asa, et Aaron D. Gitler. 2016. « Defects in Trafficking Bridge Parkinson’s Disease Pathology and Genetics ». *Nature* 539 (7628): 207-16. <https://doi.org/10.1038/nature20414>.
- Aberg, M. A., N. D. Aberg, H. Hedbäcker, J. Oscarsson, et P. S. Eriksson. 2000. « Peripheral Infusion of IGF-I Selectively Induces Neurogenesis in the Adult Rat Hippocampus ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (8): 2896-2903. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-08-02896.2000>.
- Ackleh, Azmy S., Saber Elaydi, George Livadiotis, et Amy Veprauskas. 2021. « A Continuous-Time Mathematical Model and Discrete Approximations for the Aggregation of β -Amyloid ». *Journal of Biological Dynamics* 15 (1): 109-36. <https://doi.org/10.1080/17513758.2020.1869843>.
- Adams, T. E., V. C. Epa, T. P. Garrett, et C. W. Ward. 2000. « Structure and Function of the Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 57 (7): 1050-93. <https://doi.org/10.1007/PL00000744>.
- Ahn, Ji Hoon, Hyunsoo Cho, Jun-Hee Kim, Shin Heun Kim, Je-Seok Ham, Intae Park, Sang Heon Suh, et al. 2019. « Meningeal Lymphatic Vessels at the Skull Base Drain Cerebrospinal Fluid ». *Nature* 572 (7767): 62-66. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1419-5>.
- Albargothy, Nazira J., David A. Johnston, Matthew MacGregor-Sharp, Roy O. Weller, Ajay Verma, Cheryl A. Hawkes, et Roxana O. Carare. 2018. « Convective Influx/Glymphatic System: Tracers Injected into the CSF Enter and Leave the Brain along Separate Periarterial Basement Membrane Pathways ». *Acta Neuropathologica* 136 (1): 139-52. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1862-7>.
- Albayram, Mehmet Sait, Garrett Smith, Fatih Tufan, Ibrahim Sacit Tuna, Mehmet Bostancıkloğlu, Michael Zile, et Onder Albayram. 2022. « Non-Invasive MR Imaging of Human Brain Lymphatic Networks with Connections to Cervical Lymph Nodes ». *Nature Communications* 13 (1): 203. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27887-0>.
- Aldea, Roxana, Roy O. Weller, Donna M. Wilcock, Roxana O. Carare, et Giles Richardson. 2019. « Cerebrovascular Smooth Muscle Cells as the Drivers of Intramural Periarterial Drainage of the Brain ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 11: 1. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00001>.

Alpár, Alán, Kirstin Palm, Andreas Schierwagen, Thomas Arendt, et Ulrich Gärtner. 2003. « Expression of Constitutively Active p21H-Rasval12 in Postmitotic Pyramidal Neurons Results in Increased Dendritic Size and Complexity ». *The Journal of Comparative Neurology* 467 (1): 119-33. <https://doi.org/10.1002/cne.10915>.

Anne Kirchherr, Thomas Kaulisch, Matthew D. Kennedy, Detlef Stiller, et Andreas Briel. 2013. « Novel MRI Blood Pool Agents with different Chemical Structures: An in vivo Comparison ».

Anzai, Itsuki, Eiichi Tokuda, Atsushi Mukaiyama, Shuji Akiyama, Fumito Endo, Koji Yamanaka, Hidemi Misawa, et Yoshiaki Furukawa. 2017. « A Misfolded Dimer of Cu/Zn-Superoxide Dismutase Leading to Pathological Oligomerization in Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Protein Science* 26 (3): 484-96. <https://doi.org/10.1002/pro.3094>.

Arizono, Misa, Agata Idziak, Federica Quici, et U. Valentin Nägerl. 2023. « Getting Sharper: The Brain under the Spotlight of Super-Resolution Microscopy ». *Trends in Cell Biology* 33 (2): 148-61. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.06.011>.

Arizono, Misa, V.V.G. Krishna Inavalli, Stéphane Bancelin, Mónica Fernández-Monreal, et U. Valentin Nägerl. 2021. « Super-Resolution Shadow Imaging Reveals Local Remodeling of Astrocytic Microstructures and Brain Extracellular Space after Osmotic Challenge ». *Glia* 69 (6): 1605-13. <https://doi.org/10.1002/glia.23995>.

Arranz, Amaia M., Katherine L. Perkins, Fumitoshi Irie, David P. Lewis, Jan Hrabe, Fanrong Xiao, Naoki Itano, Koji Kimata, Sabina Hrabetova, et Yu Yamaguchi. 2014. « Hyaluronan Deficiency Due to Has3 Knock-out Causes Altered Neuronal Activity and Seizures via Reduction in Brain Extracellular Space ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (18): 6164-76. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3458-13.2014>.

Aspelund, Aleksanteri, Salli Antila, Steven T. Proulx, Tine Veronica Karlsen, Sinem Karaman, Michael Detmar, Helge Wiig, et Kari Alitalo. 2015. « A Dural Lymphatic Vascular System That Drains Brain Interstitial Fluid and Macromolecules ». *The Journal of Experimental Medicine* 212 (7): 991-99. <https://doi.org/10.1084/jem.20142290>.

B. M. Koeppen et B.A. Stanton. 6th Edition. *Berne & Levy Physiology 6th Edition*. Elsevier Health. <https://www.uk.elsevierhealth.com/berne-levy-physiology-9780323847902.html>.

Baena, Esther, Alberto Gandarillas, Mireia Vallespinós, Jennifer Zanet, Oriol Bachs, Clara Redondo, Isabel Fabregat, Carlos Martínez-A., et Ignacio Moreno de Alborán. 2005. « c-Myc regulates cell size and ploidy but is not essential for postnatal proliferation in liver ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (20): 7286-91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409260102>.

- Bedussi, Beatrice, Mitra Almasian, Judith de Vos, Ed VanBavel, et Erik NTP Bakker. 2017. « Paravascular Spaces at the Brain Surface: Low Resistance Pathways for Cerebrospinal Fluid Flow »: *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, octobre. <https://doi.org/10.1177/0271678X17737984>.
- Bedussi, Beatrice, Daphne M. P. Naessens, Judith de Vos, Rik Olde Engberink, Micha M. M. Wilhelmus, Edo Richard, Malysa Ten Hove, Ed vanBavel, et Erik N. T. P. Bakker. 2017. « Enhanced Interstitial Fluid Drainage in the Hippocampus of Spontaneously Hypertensive Rats ». *Scientific Reports* 7 (1): 744. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00861-x>.
- Bekku, Yoko, Lýdia Vargová, Yoshinobu Goto, Ivan Vorísek, Lesia Dmytrenko, Masahiro Narasaki, Aiji Ohtsuka, et al. 2010. « Bral1: Its Role in Diffusion Barrier Formation and Conduction Velocity in the CNS ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (8): 3113-23. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5598-09.2010>.
- Benveniste, Helene, Paul M. Heerdt, Manuel Fontes, Douglas L. Rothman, et Nora D. Volkow. 2019. « Glymphatic System Function in Relation to Anesthesia and Sleep States ». *Anesthesia & Analgesia* 128 (4): 747-58. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000004069>.
- Benveniste, Helene, Hedok Lee, Fengfei Ding, Qian Sun, Ehab Al-Bizri, Rany Makaryus, Stephen Probst, Maiken Nedergaard, Elliot A. Stein, et Hanbing Lu. 2017. « Anesthesia with Dexmedetomidine and Low-Dose Isoflurane Increases Solute Transport via the Glymphatic Pathway in Rat Brain When Compared with High-Dose Isoflurane ». *Anesthesiology* 127 (6): 976-88. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001888>.
- Benveniste, Helene, Xiaodan Liu, Sunil Koundal, Simon Sanggaard, Hedok Lee, et Joanna Wardlaw. 2019. « The Glymphatic System and Waste Clearance with Brain Aging: A Review ». *Gerontology* 65 (2): 106-19. <https://doi.org/10.1159/000490349>.
- Binder, Devin K., Marios C. Papadopoulos, Peter M. Haggie, et A. S. Verkman. 2004. « In Vivo Measurement of Brain Extracellular Space Diffusion by Cortical Surface Photobleaching ». *Journal of Neuroscience* 24 (37): 8049-56. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2294-04.2004>.
- Biondi, Olivier, Julien Branchu, Amina Ben Salah, Léo Houdebine, Lise Bertin, Farah Chali, Céline Desseille, et al. 2015. « IGF-1R Reduction Triggers Neuroprotective Signaling Pathways in Spinal Muscular Atrophy Mice ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (34): 12063-79. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0608-15.2015>.
- Bumb, Ambika, Martin W. Brechbiel, et Peter Choyke. 2010. « Macromolecular and Dendrimer-Based Magnetic Resonance Contrast Agents ». *Acta Radiologica (Stockholm, Sweden: 1987)* 51 (7): 751-67. <https://doi.org/10.3109/02841851.2010.491091>.

Burtscher, Johannes, Robert T. Mallet, Martin Burtscher, et Grégoire P. Millet. 2021. « Hypoxia and Brain Aging: Neurodegeneration or Neuroprotection? » *Ageing Research Reviews* 68 (juillet): 101343. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101343>.

Butler, Lynn Marie, Björn Mikael Hallström, Linn Fagerberg, Fredrik Pontén, Mathias Uhlén, Thomas Renné, et Jacob Odeberg. 2016. « Analysis of Body-Wide Unfractionated Tissue Data to Identify a Core Human Endothelial Transcriptome ». *Cell Systems* 3 (3): 287-301.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.08.001>.

Cadart, Clotilde, Larisa Venkova, Matthieu Piel, et Marco Cosentino Lagomarsino. 2022. « Volume Growth in Animal Cells Is Cell Cycle Dependent and Shows Additive Fluctuations ». *eLife* 11 (janvier): e70816. <https://doi.org/10.7554/eLife.70816>.

Cai, Xuezhu, Ju Qiao, Praveen Kulkarni, Ian C. Harding, Eno Ebong, et Craig F. Ferris. 2020. « Imaging the Effect of the Circadian Light-Dark Cycle on the Glymphatic System in Awake Rats ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (1): 668-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914017117>.

Carare, R. O., M. Bernardes-Silva, T. A. Newman, A. M. Page, J. a. R. Nicoll, V. H. Perry, et R. O. Weller. 2008. « Solutes, but Not Cells, Drain from the Brain Parenchyma along Basement Membranes of Capillaries and Arteries: Significance for Cerebral Amyloid Angiopathy and Neuroimmunology ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 34 (2): 131-44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00926.x>.

Caron, Nicholas S., Raul Banos, Christopher Yanick, Amirah E. Aly, Lauren M. Byrne, Ethan D. Smith, Yuanyun Xie, et al. 2021. « Mutant Huntingtin Is Cleared from the Brain via Active Mechanisms in Huntington Disease ». *Journal of Neuroscience* 41 (4): 780-96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1865-20.2020>.

Carro, E., J. L. Trejo, T. Gomez-Isla, D. LeRoith, et I. Torres-Aleman. 2002. « Serum Insulin-like Growth Factor I Regulates Brain Amyloid-Beta Levels ». *Nature Medicine* 8 (12): 1390-97. <https://doi.org/10.1038/nm1202-793>.

Casarotto, Elena, Daisy Sproviero, Eleonora Corridori, Maria Cristina Gagliani, Marta Cozzi, Marta Chierichetti, Riccardo Cristofani, et al. 2022. « Neurodegenerative Disease-Associated TDP-43 Fragments Are Extracellularly Secreted with CASA Complex Proteins ». *Cells* 11 (3): 516. <https://doi.org/10.3390/cells11030516>.

- Cascella, Roberta, Alessandra Bigi, Nunilo Cremades, et Cristina Cecchi. 2022. « Effects of Oligomer Toxicity, Fibril Toxicity and Fibril Spreading in Synucleinopathies ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 79 (3): 174. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04166-9>.
- Chaker, Zayna, Saba Aid, Hugues Berry, et Martin Holzenberger. 2015. « Suppression of IGF-I Signals in Neural Stem Cells Enhances Neurogenesis and Olfactory Function during Aging ». *Aging Cell* 14 (5): 847-56. <https://doi.org/10.1111/accel.12365>.
- Chaker, Zayna, Caroline George, Marija Petrovska, Jean-Baptiste Caron, Philippe Lacube, Isabelle Caillé, et Martin Holzenberger. 2016. « Hypothalamic Neurogenesis Persists in the Aging Brain and Is Controlled by Energy-Sensing IGF-I Pathway ». *Neurobiology of Aging* 41 (mai): 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.008>.
- Chan, Thomas E., Yael S. Grossman, Erik B. Bloss, William G. Janssen, Wendy Lou, Bruce S. McEwen, Dani Dumitriu, et John H. Morrison. 2018. « Cell-Type Specific Changes in Glial Morphology and Glucocorticoid Expression During Stress and Aging in the Medial Prefrontal Cortex ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 10 (mai): 146. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00146>.
- Chen, Wei, Bin He, Wusong Tong, Jinsong Zeng, et Ping Zheng. 2019. « Astrocytic Insulin-Like Growth Factor-1 Protects Neurons Against Excitotoxicity ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00298>.
- Chiti, Fabrizio, et Christopher M. Dobson. 2006. « Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease ». *Annual Review of Biochemistry* 75: 333-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>.
- Cintron-Colon, Rigo, Manuel Sanchez-Alavez, William Nguyen, Simone Mori, Ruben Gonzalez-Rivera, Tiffany Lien, Tamas Bartfai, et al. 2017. « Insulin-like Growth Factor 1 Receptor Regulates Hypothermia during Calorie Restriction ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (36): 9731-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617876114>.
- Ciudad, Sonia, Eduard Puig, Thomas Botzanowski, Moeen Meigooni, Andres S. Arango, Jimmy Do, Maxim Mayzel, et al. 2020. « A β (1-42) Tetramer and Octamer Structures Reveal Edge Conductivity Pores as a Mechanism for Membrane Damage ». *Nature Communications* 11 (1): 3014. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16566-1>.
- Cloarec, R., B. Riffault, A. Dufour, H. Rabiei, L.-A. Gouty-Colomer, C. Dumon, D. Guimond, et al. 2019. « Pyramidal neuron growth and increased hippocampal volume during labor and birth in autism ». *Science Advances* 5 (1): eaav0394. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav0394>.

Cohen, Ehud, Johan F. Paulsson, Pablo Blinder, Tal Burstyn-Cohen, Deguo Du, Gabriela Estepa, Anthony Adame, et al. 2009. « Reduced IGF-1 Signaling Delays Age-Associated Proteotoxicity in Mice ». *Cell* 139 (6): 1157-69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.014>.

Cohen, Samuel I. A., Sara Linse, Leila M. Luheshi, Erik Hellstrand, Duncan A. White, Luke Rajah, Daniel E. Otzen, Michele Vendruscolo, Christopher M. Dobson, et Tuomas P. J. Knowles. 2013. « Proliferation of Amyloid-B42 Aggregates Occurs through a Secondary Nucleation Mechanism ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (24): 9758-63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218402110>.

Colbourn, Robert, Jan Hrabec, Charles Nicholson, Matthew Perkins, Jeffrey H. Goodman, et Sabina Hrabetova. 2021. « Rapid Volume Pulsation of the Extracellular Space Coincides with Epileptiform Activity in Mice and Depends on the NBCe1 Transporter ». *The Journal of Physiology* 599 (12): 3195-3220. <https://doi.org/10.1113/JP281544>.

Colbourn, Robert, Aditi Naik, et Sabina Hrabetova. 2019. « ECS Dynamism and Its Influence on Neuronal Excitability and Seizures ». *Neurochemical Research* 44 (5): 1020-36. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02773-w>.

Constantinides, Christakis, Richard Mean, et Ben J. Janssen. 2011. « Effects of Isoflurane Anesthesia on the Cardiovascular Function of the C57BL/6 Mouse ». *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 52: e21-31.

Coschigano, Karen T., Amy N. Holland, Markus E. Riders, Edward O. List, Allan Flyvbjerg, et John J. Kopchick. 2003. « Deletion, but Not Antagonism, of the Mouse Growth Hormone Receptor Results in Severely Decreased Body Weights, Insulin, and Insulin-like Growth Factor I Levels and Increased Life Span ». *Endocrinology* 144 (9): 3799-3810. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0374>.

Cragg, B. 1980. « Preservation of Extracellular Space during Fixation of the Brain for Electron Microscopy ». *Tissue & Cell* 12 (1): 63-72. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(80\)90052-x](https://doi.org/10.1016/0040-8166(80)90052-x).

Cserr, Helen F., D. N. Cooper, et T. H. Milhorat. 1977. « Flow of cerebral interstitial fluid as indicated by the removal of extracellular markers from rat caudate nucleus ». *Experimental Eye Research, The Ocular and Cerebrospinal Fluids*, 25 (janvier): 461-73. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(77\)80041-9](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(77)80041-9).

Cukalevski, Risto, Xiaoting Yang, Georg Meisl, Ulrich Weininger, Katja Bernfur, Birgitta Frohm, Tuomas P. J. Knowles, et Sara Linse. 2015. « The A β 40 and A β 42 Peptides Self-Assemble into Separate Homomolecular Fibrils in Binary Mixtures but Cross-React during Primary Nucleation ». *Chemical Science* 6 (7): 4215-33. <https://doi.org/10.1039/c4sc02517b>.

Cuntz, Hermann, Alex D. Bird, Martin Mittag, Marcel Beining, Marius Schneider, Laura Mediavilla, Felix Z. Hoffmann, Thomas Deller, et Peter Jedlicka. 2021. « A general principle of dendritic constancy: A neuron's size- and shape-invariant excitability ». *Neuron* 109 (22): 3647-3662.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.08.028>.

De Fusco, Antonio, Maria Sabina Cerullo, Antonella Marte, Caterina Michetti, Alessandra Romei, Enrico Castroflorio, Stephanie Baulac, et Fabio Benfenati. 2020. « Acute knockdown of Depdc5 leads to synaptic defects in mTOR-related epileptogenesis ». *Neurobiology of Disease* 139 (juin): 104822. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104822>.

De Magalhaes Filho, C. Daniel, Laurent Kappeler, Joëlle Dupont, Julien Solinc, Sonia Villapol, Cécile Denis, Marika Nosten-Bertrand, et al. 2017. « Deleting IGF-1 Receptor from Forebrain Neurons Confers Neuroprotection during Stroke and Upregulates Endocrine Somatotropin ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 37 (2): 396-412. <https://doi.org/10.1177/0271678X15626718>.

De Santis, Silvia, Alejandro Cosa-Linan, Raquel Garcia-Hernandez, Lesia Dmytrenko, Lydia Vargova, Ivan Vorisek, Serena Stopponi, et al. 2020. « Chronic Alcohol Consumption Alters Extracellular Space Geometry and Transmitter Diffusion in the Brain ». *Science Advances* 6 (26): eaba0154. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba0154>.

Demian, Wael L., Avinash Persaud, Chong Jiang, Étienne Coyaud, Shixuan Liu, Andras Kapus, Ran Kafri, Brian Raught, et Daniela Rotin. 2019. « The Ion Transporter NKCC1 Links Cell Volume to Cell Mass Regulation by Suppressing mTORC1 ». *Cell Reports* 27 (6): 1886-1896.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.034>.

Dickerson, Bradford C., Eric Feczko, Jean C. Augustinack, Jenni Pacheco, John C. Morris, Bruce Fischl, et Randy L. Buckner. 2009. « Differential Effects of Aging and Alzheimer's Disease on Medial Temporal Lobe Cortical Thickness and Surface Area ». *Neurobiology of Aging* 30 (3): 432-40. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.07.022>.

Diem, Alexandra K., Matthew MacGregor Sharp, Maureen Gatherer, Neil W. Bressloff, Roxana O. Carare, et Giles Richardson. 2017. « Arterial Pulsations Cannot Drive Intramural Periarterial Drainage: Significance for A β Drainage ». *Frontiers in Neuroscience* 11: 475. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00475>.

Drieu, Antoine, Siling Du, Steffen E. Storck, Justin Rustenhoven, Zachary Papadopoulos, Taitea Dykstra, Fenghe Zhong, et al. 2022. « Parenchymal Border Macrophages Regulate the Flow Dynamics of the Cerebrospinal Fluid ». *Nature* 611 (7936): 585-93. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05397-3>.

Dyer, Adam H., Cyrus Vahdatpour, Albert Sanfeliu, et Daniela Tropea. 2016. « The Role of Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) in Brain Development, Maturation and Neuroplasticity ». *Neuroscience* 325 (juin): 89-99. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.056>.

Engelhardt, Britta, Roxana O. Carare, Ingo Bechmann, Alexander Flügel, Jon D. Laman, et Roy O. Weller. 2016. « Vascular, Glial, and Lymphatic Immune Gateways of the Central Nervous System ». *Acta Neuropathologica* 132 (3): 317-38. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1606-5>.

Ferris, Craig F. 2021. « Rethinking the Conditions and Mechanism for Glymphatic Clearance ». *Frontiers in Neuroscience* 15 (avril): 624690. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.624690>.

Fischl, Bruce, et Anders M. Dale. 2000. « Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (20): 11050-55. <https://doi.org/10.1073/pnas.200033797>.

Fleischman, Debra A., Sue Leurgans, Konstantinos Arfanakis, Zoe Arvanitakis, Lisa L. Barnes, Patricia A. Boyle, S. Duke Han, et David A. Bennett. 2014. « Gray-Matter Macrostructure in Cognitively Healthy Older Persons: Associations with Age and Cognition ». *Brain Structure & Function* 219 (6): 2029-49. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0622-7>.

Foster, Vincent, Arthur E. Oakley, Janet Y. Slade, Roslyn Hall, Tuomo M. Polvikoski, Matthew Burke, Alan J. Thomas, Ahmad Khundakar, Louise M. Allan, et Raj N. Kalaria. 2014. « Pyramidal neurons of the prefrontal cortex in post-stroke, vascular and other ageing-related dementias ». *Brain* 137 (9): 2509-21. <https://doi.org/10.1093/brain/awu172>.

François, Jean-Christophe, Saba Aïd, Zayna Chaker, Philippe Lacube, Jie Xu, Racha Fayad, Francine Côté, Patrick Even, et Martin Holzenberger. 2017. « Disrupting IGF Signaling in Adult Mice Conditions Leanness, Resilient Energy Metabolism, and High Growth Hormone Pulses ». *Endocrinology* 158 (7): 2269-83. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00261>.

Frangou, Sophia, Amirhossein Modabbernia, Steven C. R. Williams, Efstathios Papachristou, Gaelle E. Doucet, Ingrid Agartz, Moji Aghajani, et al. 2022. « Cortical Thickness across the Lifespan: Data from 17,075 Healthy Individuals Aged 3–90 Years ». *Human Brain Mapping* 43 (1): 431-51. <https://doi.org/10.1002/hbm.25364>.

Freude, Susanna, Moritz M. Hettich, Christina Schumann, Oliver Stöhr, Linda Koch, Christoph Köhler, Michael Udelhoven, et al. 2009. « Neuronal IGF-1 Resistance Reduces Abeta Accumulation and Protects against Premature Death in a Model of Alzheimer's Disease ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (10): 3315-24. <https://doi.org/10.1096/fj.09-132043>.

Gakuba, Clement, Thomas Gaberel, Suzanne Goursaud, Jennifer Bourges, Camille Di Palma, Aurélien Quenault, Sara Martinez de Lizarrondo, Denis Vivien, et Maxime Gauberti. 2018. « General Anesthesia Inhibits the Activity of the “Glymphatic System” ». *Theranostics* 8 (3): 710-22. <https://doi.org/10.7150/thno.19154>.

Gärtner, Ulrich, Alán Alpár, Frank Reimann, Gudrun Seeger, Rolf Heumann, et Thomas Arendt. 2004. « Constitutive Ras Activity Induces Hippocampal Hypertrophy and Remodeling of Pyramidal Neurons in synRas Mice ». *Journal of Neuroscience Research* 77 (5): 630-41. <https://doi.org/10.1002/jnr.20194>.

Gazit, Neta, Irena Vertkin, Ilana Shapira, Martin Helm, Edden Slomowitz, Maayan Sheiba, Yael Mor, Silvio Rizzoli, et Inna Slutsky. 2016. « IGF-1 Receptor Differentially Regulates Spontaneous and Evoked Transmission via Mitochondria at Hippocampal Synapses ». *Neuron* 89 (3): 583-97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.034>.

Genis, Laura, David Dávila, Silvia Fernandez, Andrea Pozo-Rodrigálvarez, Ricardo Martínez-Murillo, et Ignacio Torres-Aleman. 2014. « Astrocytes Require Insulin-like Growth Factor I to Protect Neurons against Oxidative Injury ». *F1000Research* 3: 28. <https://doi.org/10.12688/f1000research.3-28.v2>.

George, Caroline, Géraldine Gontier, Philippe Lacube, Jean-Christophe François, Martin Holzenberger, et Saba Aïd. 2017. « The Alzheimer’s Disease Transcriptome Mimics the Neuroprotective Signature of IGF-1 Receptor-Deficient Neurons ». *Brain: A Journal of Neurology* 140 (7): 2012-27. <https://doi.org/10.1093/brain/awx132>.

Gherzi-Egea, Jean-François, Nathalie Strazielle, Martin Catala, Violeta Silva-Vargas, Fiona Doetsch, et Britta Engelhardt. 2018. « Molecular Anatomy and Functions of the Choroidal Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier in Health and Disease ». *Acta Neuropathologica* 135 (3): 337-61. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1807-1>.

Godin, Antoine G., Juan A. Varela, Zhenghong Gao, Noémie Danné, Julien P. Dupuis, Brahim Lounis, Laurent Groc, et Laurent Cognet. 2017. « Single-Nanotube Tracking Reveals the Nanoscale Organization of the Extracellular Space in the Live Brain ». *Nature Nanotechnology* 12 (3): 238-43. <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.248>.

Gontier, Géraldine, Caroline George, Zayna Chaker, Martin Holzenberger, et Saba Aïd. 2015. « Blocking IGF Signaling in Adult Neurons Alleviates Alzheimer’s Disease Pathology through Amyloid- β Clearance ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (33): 11500-513. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0343-15.2015>.

Goodman, James R., et Jeffrey J. Iliff. 2019. « Vasomotor Influences on Glymphatic-Lymphatic Coupling and Solute Trafficking in the Central Nervous System »: *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, septembre. <https://doi.org/10.1177/0271678X19874134>.

Grassi, Diego, Agata Idziak, Antony Lee, Ivo Calaresu, Jean-Baptiste Sibarita, Laurent Cognet, U. Valentin Nägerl, et Laurent Groc. 2023. « Nanoscale and Functional Heterogeneity of the Hippocampal Extracellular Space ». *Cell Reports* 42 (5): 112478. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112478>.

Hablitz, Lauren M., et Maiken Nedergaard. 2021. « The Glymphatic System ». *Current Biology: CB* 31 (20): R1371-75. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.08.026>.

Hablitz, Lauren M., Hanna S. Vinitsky, Qian Sun, Frederik Filip Stæger, Björn Sigurdsson, Kristian N. Mortensen, Tuomas O. Lilius, et Maiken Nedergaard. 2019. « Increased glymphatic influx is correlated with high EEG delta power and low heart rate in mice under anesthesia ». *Science Advances* 5 (2). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav5447>.

Hannocks, Melanie-Jane, Michelle E Pizzo, Jula Huppert, Tushar Deshpande, N Joan Abbott, Robert G Thorne, et Lydia Sorokin. 2018. « Molecular Characterization of Perivascular Drainage Pathways in the Murine Brain ». *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 38 (4): 669-86. <https://doi.org/10.1177/0271678X17749689>.

Hardy, John, et Dennis J. Selkoe. 2002. « The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics ». *Science (New York, N.Y.)* 297 (5580): 353-56. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>.

Harris, J. Robin. 2015. « Transmission Electron Microscopy in Molecular Structural Biology: A Historical Survey ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 581 (septembre): 3-18. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.11.011>.

He, Yang, Mengdi Wei, Yan Wu, Huaping Qin, Weinan Li, Xiaolin Ma, Jingjing Cheng, et al. 2019. « Amyloid β Oligomers Suppress Excitatory Transmitter Release via Presynaptic Depletion of Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate ». *Nature Communications* 10 (1): 1193. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09114-z>.

Henderson, Mark A., Stuart Gillon, et Mo Al-Haddad. 2021. « Organization and composition of body fluids ». *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 22 (8): 511-17. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2021.06.002>.

Herculano-Houzel, Suzana. 2009. « The Human Brain in Numbers: A Linearly Scaled-up Primate Brain ». *Frontiers in Human Neuroscience* 3 (novembre): 31. <https://doi.org/10.3389/neuro.09.031.2009>.

Herculano-Houzel, Suzana, et Sandra E. Dos Santos. 2018. « You Do Not Mess with the Glia ». *Neuroglia* 1 (1): 193-219. <https://doi.org/10.3390/neuroglia1010014>.

Herculano-Houzel, Suzana, Bruno Mota, et Roberto Lent. 2006. « Cellular Scaling Rules for Rodent Brains ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (32): 12138-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604911103>.

Herculano-Houzel, Suzana, Charles Watson, et George Paxinos. 2013. « Distribution of Neurons in Functional Areas of the Mouse Cerebral Cortex Reveals Quantitatively Different Cortical Zones ». *Frontiers in Neuroanatomy* 7: 35. <https://doi.org/10.3389/fnana.2013.00035>.

Hjerpe, Roland, John S. Bett, Matthew J. Keuss, Alexandra Solovyova, Thomas G. McWilliams, Clare Johnson, Indrajit Sahu, et al. 2016. « UBQLN2 Mediates Autophagy-Independent Protein Aggregate Clearance by the Proteasome ». *Cell* 166 (4): 935-49. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.001>.

Hladky, Stephen B, et Margery A Barrand. 2014. « Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence ». *Fluids and Barriers of the CNS* 11 (décembre): 26. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-11-26>.

Hladky, Stephen B., et Margery A. Barrand. 2018. « Elimination of Substances from the Brain Parenchyma: Efflux via Perivascular Pathways and via the Blood-Brain Barrier ». *Fluids and Barriers of the CNS* 15 (1): 30. <https://doi.org/10.1186/s12987-018-0113-6>.

Holstein-Rønso, Stephanie, Yiming Gan, Michael J. Giannetto, Martin Kaag Rasmussen, Björn Sigurdsson, Felix Ralf Michael Beinlich, Laura Rose, et al. 2023a. « Glymphatic Influx and Clearance Are Accelerated by Neurovascular Coupling ». *Nature Neuroscience* 26 (6): 1042-53. <https://doi.org/10.1038/s41593-023-01327-2>.

———. 2023b. « Glymphatic Influx and Clearance Are Accelerated by Neurovascular Coupling ». *Nature Neuroscience* 26 (6): 1042-53. <https://doi.org/10.1038/s41593-023-01327-2>.

Holter, Karl Erik, Benjamin Kehlet, Anna Devor, Terrence J. Sejnowski, Anders M. Dale, Stig W. Omholt, Ole Petter Ottersen, Erlend Arnulf Nagelhus, Kent-André Mardal, et Klas H. Pettersen. 2017. « Interstitial Solute Transport in 3D Reconstructed Neuropil Occurs by Diffusion Rather than Bulk Flow ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (37): 9894-99. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706942114>.

Holzenberger, Martin, Joëlle Dupont, Bertrand Ducos, Patricia Leneuve, Alain Géoën, Patrick C. Even, Pascale Cervera, et Yves Le Bouc. 2003. « IGF-1 Receptor Regulates Lifespan and Resistance to Oxidative Stress in Mice ». *Nature* 421 (6919): 182-87. <https://doi.org/10.1038/nature01298>.

Horde, Gaither W., et Vikas Gupta. 2023. « Drug Clearance ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557758/>.

Hrabe, Jan, et Sabina Hrabetova. 2019. « Time-Resolved Integrative Optical Imaging of Diffusion during Spreading Depression ». *Biophysical Journal* 117 (10): 1783-94. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.08.031>.

Hrabe, Jan, Sabina Hrabetová, et Karel Segeth. 2004. « A Model of Effective Diffusion and Tortuosity in the Extracellular Space of the Brain ». *Biophysical Journal* 87 (3): 1606-17. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.039495>.

Hrabetová, S., et C. Nicholson. 2000. « Dextran Decreases Extracellular Tortuosity in Thick-Slice Ischemia Model ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20 (9): 1306-10. <https://doi.org/10.1097/00004647-200009000-00005>.

Hrabětová, Sabina, Jan Hrabe, et Charles Nicholson. 2003. « Dead-Space Microdomains Hinder Extracellular Diffusion in Rat Neocortex during Ischemia ». *Journal of Neuroscience* 23 (23): 8351-59. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-23-08351.2003>.

Huang, Ya-Ru, et Rui-Tian Liu. 2020. « The Toxicity and Polymorphism of β -Amyloid Oligomers ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (12): 4477. <https://doi.org/10.3390/ijms21124477>.

Iilff, Jeffrey J., Hedok Lee, Mei Yu, Tian Feng, Jean Logan, Maiken Nedergaard, et Helene Benveniste. 2013. « Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (3): 1299-1309. <https://doi.org/10.1172/JCI67677>.

Iilff, Jeffrey J., Minghuan Wang, Yonghong Liao, Benjamin A. Plogg, Weiguo Peng, Georg A. Gundersen, Helene Benveniste, et al. 2012. « A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β ». *Science Translational Medicine* 4 (147): 147ra111. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>.

Ivan, Daniela C., Kristina Carolin Berve, Sabrina Walthert, Gianni Monaco, Katharina Borst, Elisa Bouillet, Filipa Ferreira, et al. 2023. « Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Controls the Function of CNS-Resident Macrophages and Their Contribution to Neuroinflammation ». *Acta Neuropathologica Communications* 11 (1): 35. <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01535-8>.

Jacob, Laurent, Jose de Brito Neto, Stephanie Lenck, Celine Corcy, Farhat Benbelkacem, Luiz Henrique Geraldo, Yunling Xu, et al. 2022. « Conserved Meningeal Lymphatic Drainage Circuits in Mice and Humans ». *The Journal of Experimental Medicine* 219 (8): e20220035. <https://doi.org/10.1084/jem.20220035>.

Jacot-Descombes, Sarah, Neha Uppal, Bridget Wicinski, Micaela Santos, James Schmeidler, Panteleimon Giannakopoulos, Helmut Heinsen, Christoph Schmitz, et Patrick R. Hof. 2012. « Decreased Pyramidal Neuron Size in Brodmann Areas 44 and 45 in Patients with Autism ». *Acta Neuropathologica* 124 (1): 67-79. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-0976-6>.

Ji, Xiang, Tiago Ferreira, Beth Friedman, Rui Liu, Hannah Liechty, Erhan Bas, Jayaram Chandrashekar, et David Kleinfeld. 2021. « Brain Microvasculature Has a Common Topology with Local Differences in Geometry That Match Metabolic Load ». *Neuron* 109 (7): 1168-1187.e13. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.02.006>.

Jin, Byung-Ju, Alex J. Smith, et Alan S. Verkman. 2016. « Spatial Model of Convective Solute Transport in Brain Extracellular Space Does Not Support a “Glymphatic” Mechanism ». *The Journal of General Physiology* 148 (6): 489-501. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611684>.

Jin, Songwan, Zsolt Zador, et A. S. Verkman. 2008. « Random-Walk Model of Diffusion in Three Dimensions in Brain Extracellular Space: Comparison with Microfiberoptic Photobleaching Measurements ». *Biophysical Journal* 95 (4): 1785-94. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.131466>.

Jucker, Mathias, et Lary C. Walker. 2013. « Self-Propagation of Pathogenic Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases ». *Nature* 501 (7465): 45-51. <https://doi.org/10.1038/nature12481>.

Junnila, Riia K., Edward O. List, Darlene E. Berryman, John W. Murrey, et John J. Kopchick. 2013. « The GH/IGF-1 Axis in Ageing and Longevity ». *Nature Reviews. Endocrinology* 9 (6): 366-76. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.67>.

Kalisman, Nir, Gilad Silberberg, et Henry Markram. 2005. « The Neocortical Microcircuit as a Tabula Rasa ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (3): 880-85. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407088102>.

Kappeler, Laurent, Carlos De Magalhaes Filho, Joëlle Dupont, Patricia Leneuve, Pascale Cervera, Laurence Périn, Catherine Loudes, et al. 2008. « Brain IGF-1 Receptors Control Mammalian Growth and Lifespan through a Neuroendocrine Mechanism ». *PLoS Biology* 6 (10): e254. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060254>.

Kappeler, Laurent, Carlos De Magalhaes Filho, Yves Le Bouc, et Martin Holzenberger. 2006. « [Ageing, genetics and the somatotropic axis] ». *Medecine Sciences: M/S* 22 (3): 259-65. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006223259>.

Kasthuri, Narayanan, Kenneth Jeffrey Hayworth, Daniel Raimund Berger, Richard Lee Schalek, José Angel Conchello, Seymour Knowles-Barley, Dongil Lee, et al. 2015. « Saturated Reconstruction of a Volume of Neocortex ». *Cell* 162 (3): 648-61. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.054>.

Katsenelson, Maxim, Ilana Shapira, Eman Abbas, Kristina Jevdokimenko, Boaz Styr, Antonella Ruggiero, Saba Aïd, et al. 2022. « IGF-1 Receptor Regulates Upward Firing Rate Homeostasis via the Mitochondrial Calcium Uniporter ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119 (33): e2121040119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2121040119>.

Keep, Richard F., Hazel C. Jones, Mark G. Hamilton, et Lester R. Drewes. 2023. « A Year in Review: Brain Barriers and Brain Fluids Research in 2022 ». *Fluids and Barriers of the CNS* 20 (1): 30. <https://doi.org/10.1186/s12987-023-00429-0>.

Khundakar, Ahmad, Christopher Morris, Arthur Oakley, William McMeekin, et Alan J. Thomas. 2009. « Morphometric Analysis of Neuronal and Glial Cell Pathology in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Late-Life Depression ». *The British Journal of Psychiatry* 195 (2): 163-69. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.108.052688>.

Kinney, Justin P., Josef Spacek, Thomas M. Bartol, Chandrajit L. Bajaj, Kristen M. Harris, et Terrence J. Sejnowski. 2013. « Extracellular Sheets and Tunnels Modulate Glutamate Diffusion in Hippocampal Neuropil ». *Journal of Comparative Neurology* 521 (2): 448-64. <https://doi.org/10.1002/cne.23181>.

Klofas, Lindsay K., Brittany P. Short, John P. Snow, Justine Sinnaeve, Gabrielle V. Rushing, Grant Westlake, Will Weinstein, Rebecca A. Ihrie, Kevin C. Ess, et Robert P. Carson. 2020. « DEPDC5 Haploinsufficiency Drives Increased mTORC1 Signaling and Abnormal Morphology in Human iPSC-Derived Cortical Neurons ». *Neurobiology of Disease* 143 (septembre): 104975. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104975>.

Knowles, Tuomas P. J., Michele Vendruscolo, et Christopher M. Dobson. 2014. « The Amyloid State and Its Association with Protein Misfolding Diseases ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (6): 384-96. <https://doi.org/10.1038/nrm3810>.

Knowles, Tuomas P. J., Christopher A. Waudby, Glyn L. Devlin, Samuel I. A. Cohen, Adriano Aguzzi, Michele Vendruscolo, Eugene M. Terentjev, Mark E. Welland, et Christopher M. Dobson. 2009. « An Analytical Solution to the Kinetics of Breakable Filament Assembly ». *Science (New York, N.Y.)* 326 (5959): 1533-37. <https://doi.org/10.1126/science.1178250>.

- Koch, Timo, Vegard Vinje, et Kent-André Mardal. 2023. « Estimates of the Permeability of Extra-Cellular Pathways through the Astrocyte Endfoot Sheath ». *Fluids and Barriers of the CNS* 20 (1): 20. <https://doi.org/10.1186/s12987-023-00421-8>.
- Korogod, Natalya, Carl C. H. Petersen, et Graham W. Knott. 2015. « Ultrastructural Analysis of Adult Mouse Neocortex Comparing Aldehyde Perfusion with Cryo Fixation ». *eLife* 4 (août): e05793. <https://doi.org/10.7554/eLife.05793>.
- Koundal, Sunil, Rena Elkin, Saad Nadeem, Yuechuan Xue, Stefan Constantinou, Simon Sanggaard, Xiaodan Liu, et al. 2020. « Optimal Mass Transport with Lagrangian Workflow Reveals Advective and Diffusion Driven Solute Transport in the Glymphatic System ». *Scientific Reports* 10 (1): 1990. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59045-9>.
- Kress, Benjamin T., Jeffrey J. Iliff, Maosheng Xia, Minghuan Wang, Helen S. Wei, Douglas Zeppenfeld, Lulu Xie, et al. 2014. « Impairment of Paravascular Clearance Pathways in the Aging Brain ». *Annals of Neurology* 76 (6): 845-61. <https://doi.org/10.1002/ana.24271>.
- Krishnaswamy, Venkat Raghavan, Amit Benbenishty, Pablo Blinder, et Irit Sagi. 2019. « Demystifying the Extracellular Matrix and Its Proteolytic Remodeling in the Brain: Structural and Functional Insights ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 76 (16): 3229-48. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03182-6>.
- Kuffler, S. W., et D. D. Potter. 1964. « GLIA IN THE LEECH CENTRAL NERVOUS SYSTEM: PHYSIOLOGICAL PROPERTIES AND NEURON-GLIA RELATIONSHIP ». *Journal of Neurophysiology* 27 (mars): 290-320. <https://doi.org/10.1152/jn.1964.27.2.290>.
- Kwon, Chang-Hyuk, Xiaoyan Zhu, Junyuan Zhang, et Suzanne J. Baker. 2003. « mTor is required for hypertrophy of Pten-deficient neuronal soma in vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (22): 12923-28. <https://doi.org/10.1073/pnas.2132711100>.
- Kwon, Chang-Hyuk, Xiaoyan Zhu, Junyuan Zhang, Lori L. Knoop, Ruby Tharp, Richard J. Smeyne, Charles G. Eberhart, Peter C. Burger, et Suzanne J. Baker. 2001. « Pten Regulates Neuronal Soma Size: A Mouse Model of Lhermitte-Duclos Disease ». *Nature Genetics* 29 (4): 404-11. <https://doi.org/10.1038/ng781>.
- Labbadia, Johnathan, et Richard I. Morimoto. 2015. « The Biology of Proteostasis in Aging and Disease ». *Annual Review of Biochemistry* 84: 435-64. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033955>.

- Laplante, Mathieu, et David M. Sabatini. 2012. « mTOR Signaling in Growth Control and Disease ». *Cell* 149 (2): 274-93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>.
- . 2013. « Regulation of mTORC1 and Its Impact on Gene Expression at a Glance ». *Journal of Cell Science* 126 (Pt 8): 1713-19. <https://doi.org/10.1242/jcs.125773>.
- Le Bihan, Denis. 2014. « Diffusion MRI: What Water Tells Us about the Brain ». *EMBO Molecular Medicine* 6 (5): 569-73. <https://doi.org/10.1002/emmm.201404055>.
- Lee, Hedok, Lulu Xie, Mei Yu, Hongyi Kang, Tian Feng, Rashid Deane, Jean Logan, Maiken Nedergaard, et Helene Benveniste. 2015. « The Effect of Body Posture on Brain Glymphatic Transport ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (31): 11034-44. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1625-15.2015>.
- Lei, Yiming, Hongbin Han, Fan Yuan, Aqeel Javeed, et Yong Zhao. 2017. « The brain interstitial system: Anatomy, modeling, in vivo measurement, and applications ». *Progress in Neurobiology, New Perspectives on Healthy Aging*, 157 (octobre): 230-46. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.007>.
- Lendahl, Urban, Per Nilsson, et Christer Betsholtz. 2019. « Emerging Links between Cerebrovascular and Neurodegenerative Diseases-a Special Role for Pericytes ». *EMBO Reports* 20 (11): e48070. <https://doi.org/10.15252/embr.201948070>.
- Li, Mengyang. 2022. « The Origination of Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor System: A Story From Ancient Basal Chordate Amphioxus ». *Frontiers in Endocrinology* 13: 825722. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.825722>.
- Linse, Sara. 2017. « Monomer-Dependent Secondary Nucleation in Amyloid Formation ». *Biophysical Reviews* 9 (4): 329-38. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0289-z>.
- Liu, Guojun, Humberto Mestre, Amanda M. Sweeney, Qian Sun, Pia Weikop, Ting Du, et Maiken Nedergaard. 2020. « Direct Measurement of Cerebrospinal Fluid Production in Mice ». *Cell reports* 33 (12): 108524. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108524>.
- Liu, J. P., J. Baker, A. S. Perkins, E. J. Robertson, et A. Efstratiadis. 1993. « Mice Carrying Null Mutations of the Genes Encoding Insulin-like Growth Factor I (Igf-1) and Type 1 IGF Receptor (Igf1r) ». *Cell* 75 (1): 59-72.

Liu, Shixuan, Ceryl Tan, Mike Tyers, Anders Zetterberg, et Ran Kafri. 2022. « What Programs the Size of Animal Cells? » *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10: 949382. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.949382>.

Liu, Wen, Ping Ye, John R. O’Kusky, et A. Joseph D’Ercole. 2009. « Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor Signaling Is Essential for the Development of the Hippocampal Formation and Dentate Gyrus ». *Journal of Neuroscience Research* 87 (13): 2821-32. <https://doi.org/10.1002/jnr.22129>.

Lloyd, Alison C. 2013. « The Regulation of Cell Size ». *Cell* 154 (6): 1194-1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.053>.

Locatelli, Giuseppe, Filipa Marques-Ferreira, Antonis Katsoulas, Vasileia Kalaitzaki, Martin Krueger, Barbara Ingold-Heppner, Sabrina Walthert, et al. 2023. « IGF1R Expression by Adult Oligodendrocytes Is Not Required in the Steady-State but Supports Neuroinflammation ». *Glia* 71 (3): 616-32. <https://doi.org/10.1002/glia.24299>.

Loffredo, Francesco S., Matthew L. Steinhäuser, Steven M. Jay, Joseph Gannon, James R. Pancoast, Pratyusha Yalamanchi, Manisha Sinha, et al. 2013. « Growth Differentiation Factor 11 Is a Circulating Factor That Reverses Age-Related Cardiac Hypertrophy ». *Cell* 153 (4): 828-39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.015>.

Logan, Sreemathi, Gavin A. Pharaoh, M. Caleb Marlin, Dustin R. Masser, Satoshi Matsuzaki, Benjamin Wronowski, Alexander Yeganeh, et al. 2018. « Insulin-like Growth Factor Receptor Signaling Regulates Working Memory, Mitochondrial Metabolism, and Amyloid- β Uptake in Astrocytes ». *Molecular Metabolism* 9 (mars): 141-55. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.01.013>.

Looma, Sahil, Jakob Straehle, Vijayan Gangadharan, Natalie Heike, Abdelrahman Khalifa, Alessandro Motta, Niansheng Ju, et al. 2022. « Connectomic comparison of mouse and human cortex ». *Science* 377 (6602): eabo0924. <https://doi.org/10.1126/science.abo0924>.

Louros, Nikolaos, Joost Schymkowitz, et Frederic Rousseau. 2023. « Mechanisms and Pathology of Protein Misfolding and Aggregation ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, septembre. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00647-2>.

Louveau, Antoine, Igor Smirnov, Timothy J. Keyes, Jacob D. Eccles, Sherin J. Rouhani, J. David Peske, Noel C. Derecki, et al. 2015. « Structural and Functional Features of Central Nervous System Lymphatic Vessels ». *Nature* 523 (7560): 337-41. <https://doi.org/10.1038/nature14432>.

Lu, Xiaotang, Xiaomeng Han, Yaron Meirovitch, Evelina Sjöstedt, Richard L. Schalek, et Jeff W. Lichtman. 2023. « Preserving Extracellular Space for High-Quality Optical and Ultrastructural Studies

of Whole Mammalian Brains ». *Cell Reports Methods* 3 (7): 100520. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2023.100520>.

Ma, Qiaoli, Miriam Ries, Yann Decker, Andreas Müller, Chantal Riner, Arno Bücker, Klaus Fassbender, Michael Detmar, et Steven T. Proulx. 2019. « Rapid Lymphatic Efflux Limits Cerebrospinal Fluid Flow to the Brain ». *Acta Neuropathologica* 137 (1): 151-65. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1916-x>.

Madelin, Guillaume, Richard Kline, Ronn Walvick, et Ravinder R. Regatte. 2014. « A Method for Estimating Intracellular Sodium Concentration and Extracellular Volume Fraction in Brain in Vivo Using Sodium Magnetic Resonance Imaging ». *Scientific Reports* 4 (avril): 4763. <https://doi.org/10.1038/srep04763>.

Marín-Padilla, Miguel. 2012. « The human brain intracerebral microvascular system: development and structure ». *Frontiers in Neuroanatomy* 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2012.00038>.

Martín-Durán, José M., et Andreas Hejnol. 2021. « A Developmental Perspective on the Evolution of the Nervous System ». *Developmental Biology* 475 (juillet): 181-92. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.10.003>.

Marty, B., B. Djemaï, C. Robic, M. Port, P. Robert, J. Valette, F. Boumezbeur, D. Le Bihan, F. Lethimonnier, et S. Mériaux. 2013. « Hindered Diffusion of MRI Contrast Agents in Rat Brain Extracellular Micro-Environment Assessed by Acquisition of Dynamic T1 and T2 Maps ». *Contrast Media & Molecular Imaging* 8 (1): 12-19. <https://doi.org/10.1002/cmml.1489>.

Massey, Cory A., et George B. Richerson. 2017. « Isoflurane, Ketamine-Xylazine, and Urethane Markedly Alter Breathing Even at Subtherapeutic Doses ». *Journal of Neurophysiology* 118 (4): 2389-2401. <https://doi.org/10.1152/jn.00350.2017>.

Meisl, Georg, Xiaoting Yang, Erik Hellstrand, Birgitta Frohm, Julius B. Kirkegaard, Samuel I. A. Cohen, Christopher M. Dobson, Sara Linse, et Tuomas P. J. Knowles. 2014. « Differences in Nucleation Behavior Underlie the Contrasting Aggregation Kinetics of the A β 40 and A β 42 Peptides ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (26): 9384-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401564111>.

Mestre, Humberto, Jeffrey Tithof, Ting Du, Wei Song, Weiguo Peng, Amanda M. Sweeney, Genaro Olveda, John H. Thomas, Maiken Nedergaard, et Douglas H. Kelley. 2018. « Flow of Cerebrospinal Fluid Is Driven by Arterial Pulsations and Is Reduced in Hypertension ». *Nature Communications* 9 (1): 4878. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07318-3>.

Meyer-Luehmann, Melanie, Janaky Coomaraswamy, Tristan Bolmont, Stephan Kaeser, Claudia Schaefer, Ellen Kilger, Anton Neuenschwander, et al. 2006. « Exogenous Induction of Cerebral Beta-Amyloidogenesis Is Governed by Agent and Host ». *Science (New York, N.Y.)* 313 (5794): 1781-84. <https://doi.org/10.1126/science.1131864>.

Michaels, Thomas C. T., Andela Šarić, Samo Curk, Katja Bernfur, Paolo Arosio, Georg Meisl, Alexander J. Dear, et al. 2020. « Dynamics of Oligomer Populations Formed during the Aggregation of Alzheimer's A β 42 Peptide ». *Nature Chemistry* 12 (5): 445-51. <https://doi.org/10.1038/s41557-020-0452-1>.

Milman, Sofiya, Derek M. Huffman, et Nir Barzilai. 2016. « The Somatotrophic Axis in Human Aging: Framework for the Current State of Knowledge and Future Research ». *Cell Metabolism* 23 (6): 980-89. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.014>.

Ming, Guo-li, et Hongjun Song. 2011. « Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions ». *Neuron* 70 (4): 687-702. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>.

Misselwitz, Bernd, Heribert Schmitt-Willich, Wolfgang Ebert, Thomas Frenzel, et Hanns-Joachim Weinmann. 2001. « Pharmacokinetics of Gadomer-17, a New Dendritic Magnetic Resonance Contrast Agent ». *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 12 (2): 128-34.

Moloney, Aileen M., Rebecca J. Griffin, Suzanne Timmons, Rosemary O'Connor, Rivka Ravid, et Cora O'Neill. 2010. « Defects in IGF-1 Receptor, Insulin Receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's Disease Indicate Possible Resistance to IGF-1 and Insulin Signalling ». *Neurobiology of Aging* 31 (2): 224-43. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.04.002>.

Mondola, Paolo, Simona Damiano, Anna Sasso, et Mariarosaria Santillo. 2016. « The Cu, Zn Superoxide Dismutase: Not Only a Dismutase Enzyme ». *Frontiers in Physiology* 7: 594. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00594>.

Morris, Alan W. J., Matthew MacGregor Sharp, Nazira J. Albargothy, Rute Fernandes, Cheryl A. Hawkes, Ajay Verma, Roy O. Weller, et Roxana O. Carare. 2016. « Vascular Basement Membranes as Pathways for the Passage of Fluid into and out of the Brain ». *Acta Neuropathologica* 131 (5): 725-36. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1555-z>.

Motta, Alessandro, Manuel Berning, Kevin M. Boergens, Benedikt Staffler, Marcel Beining, Sahil Loomba, Philipp Hennig, Heiko Wissler, et Moritz Helmstaedter. 2019. « Dense Connectomic Reconstruction in Layer 4 of the Somatosensory Cortex ». *Science (New York, N.Y.)* 366 (6469): eaay3134. <https://doi.org/10.1126/science.aay3134>.

Murphy, Thomas R., David Davila, Nicholas Cuvelier, Leslie R. Young, Kelli Lauderdale, Devin K. Binder, et Todd A. Fiocco. 2017. « Hippocampal and Cortical Pyramidal Neurons Swell in Parallel with Astrocytes during Acute Hypoosmolar Stress ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2017.00275>.

Nedergaard, Maiken, et Steven A. Goldman. 2020. « Glymphatic Failure as a Final Common Pathway to Dementia ». *Science* 370 (6512): 50-56. <https://doi.org/10.1126/science.abb8739>.

Nelson, James F., Randy Strong, Alex Bokov, Vivian Diaz, et Walter Ward. 2012. « Probing the Relationship between Insulin Sensitivity and Longevity Using Genetically Modified Mice ». *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 67 (12): 1332-38. <https://doi.org/10.1093/gerona/gls199>.

Nicholson, C., et L. Tao. 1993. « Hindered Diffusion of High Molecular Weight Compounds in Brain Extracellular Microenvironment Measured with Integrative Optical Imaging ». *Biophysical Journal* 65 (6): 2277-90. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81324-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81324-9).

Nicholson, Charles, et Sabina Hrabětová. 2017. « Brain Extracellular Space: The Final Frontier of Neuroscience ». *Biophysical Journal* 113 (10): 2133-42. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.06.052>.

Nicholson, Charles, et Padideh Kamali-Zare. 2020. « Reduction of Dimensionality in Monte Carlo Simulation of Diffusion in Extracellular Space Surrounding Cubic Cells ». *Neurochemical Research* 45 (1): 42-52. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02793-6>.

Nicholson, Charles, Padideh Kamali-Zare, et Lian Tao. 2011a. « Brain Extracellular Space as a Diffusion Barrier ». *Computing and Visualization in Science* 14 (7): 309-25. <https://doi.org/10.1007/s00791-012-0185-9>.

———. 2011b. « Brain Extracellular Space as a Diffusion Barrier ». *Computing And Visualization In Science* 14 (7): 309-25. <https://doi.org/10.1007/s00791-012-0185-9>.

Nicolle, Gaëlle M., Éva Tóth, Heribert Schmitt-Willich, Bernd Radüchel, et André E. Merbach. 2002. « The Impact of Rigidity and Water Exchange on the Relaxivity of a Dendritic MRI Contrast Agent ». *Chemistry – A European Journal* 8 (5): 1040-48. [https://doi.org/10.1002/1521-3765\(20020301\)8:5<1040::AID-CHEM1040>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1521-3765(20020301)8:5<1040::AID-CHEM1040>3.0.CO;2-D).

Nieto-Estévez, Vanesa, Carlos O. Oueslati-Morales, Lingling Li, James Pickel, Aixa V. Morales, et Carlos Vicario-Abejón. 2016. « Brain Insulin-Like Growth Factor-I Directs the Transition from Stem Cells to Mature Neurons During Postnatal/Adult Hippocampal Neurogenesis ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 34 (8): 2194-2209. <https://doi.org/10.1002/stem.2397>.

Novo, Mercedes, Sonia Freire, et Wajih Al-Soufi. 2018. « Critical Aggregation Concentration for the Formation of Early Amyloid- β (1–42) Oligomers ». *Scientific Reports* 8 (1): 1783. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19961-3>.

Nuñez, A., J. Zegarra-Valdivia, D. Fernandez de Sevilla, J. Pignatelli, et I. Torres Aleman. 2023. « The Neurobiology of Insulin-like Growth Factor I: From Neuroprotection to Modulation of Brain States ». *Molecular Psychiatry*, juin. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02136-6>.

Oberlaender, Marcel, Christiaan P. J. de Kock, Randy M. Bruno, Alejandro Ramirez, Hanno S. Meyer, Vincent J. Dercksen, Moritz Helmstaedter, et Bert Sakmann. 2012. « Cell Type-Specific Three-Dimensional Structure of Thalamocortical Circuits in a Column of Rat Vibrissal Cortex ». *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 22 (10): 2375-91. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr317>.

Ochiai, Toshitaka, Toshiharu Sano, Takeru Nagayama, Naoto Kubota, Takashi Kadowaki, Tomoko Wakabayashi, et Takeshi Iwatsubo. 2021. « Differential Involvement of Insulin Receptor Substrate (IRS)-1 and IRS-2 in Brain Insulin Signaling Is Associated with the Effects on Amyloid Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Disease* 159 (novembre): 105510. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105510>.

Ogston, A. G., et E. F. Woods. 1953. « Molecular Configuration of Dextran in Aqueous Solution ». *Nature* 171 (4344): 221-22. <https://doi.org/10.1038/171221a0>.

Osborn, Lana M., Willem Kamphuis, Wytse J. Wadman, et Elly M. Hol. 2016. « Astrogliosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease ». *Progress in Neurobiology, Targeting Astrocytes in Brain Injuries: A Translational Research Approach*, 144 (septembre): 121-41. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.001>.

Padamsey, Zahid, et Nathalie L. Rochefort. 2023. « Paying the brain's energy bill ». *Current Opinion in Neurobiology* 78 (février): 102668. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102668>.

Pan, W., et A. J. Kastin. 2000. « Interactions of IGF-1 with the Blood-Brain Barrier in Vivo and in Situ ». *Neuroendocrinology* 72 (3): 171-78. <https://doi.org/10.1159/000054584>.

Panza, Francesco, Madia Lozupone, Giancarlo Logroscino, et Bruno P. Imbimbo. 2019. « A Critical Appraisal of Amyloid- β -Targeting Therapies for Alzheimer Disease ». *Nature Reviews. Neurology* 15 (2): 73-88. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0116-6>.

Paramo, Blanca, Sven O. Bachmann, Stéphane J. Baudouin, Isabel Martinez-Garay, et Alun M. Davies. 2021. « Neuregulin-4 Is Required for Maintaining Soma Size of Pyramidal Neurons in the Motor Cortex ». *eNeuro* 8 (1): ENEURO.0288-20.2021. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0288-20.2021>.

- Parenti, Ilaria, Luis G. Rabaneda, Hanna Schoen, et Gaia Novarino. 2020. « Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways ». *Trends in Neurosciences* 43 (8): 608-21. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.05.004>.
- Paviolo, Chiara, Federico N. Soria, Joana S. Ferreira, Antony Lee, Laurent Groc, Erwan Bezard, et Laurent Cognet. 2020. « Nanoscale Exploration of the Extracellular Space in the Live Brain by Combining Single Carbon Nanotube Tracking and Super-Resolution Imaging Analysis ». *Methods (San Diego, Calif.)* 174 (mars): 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.03.005>.
- Perez-Gonzalez, Nicolas A., Nash D. Rochman, Kai Yao, Jiayang Tao, Minh-Tam Tran Le, Shannon Flanary, Lucia Sablich, et al. 2019. « YAP and TAZ Regulate Cell Volume ». *The Journal of Cell Biology* 218 (10): 3472-88. <https://doi.org/10.1083/jcb.201902067>.
- Pinto-Benito, Daniel, Carmen Paradela-Leal, Danny Ganchala, Paula de Castro-Molina, et Maria-Angeles Arevalo. 2022. « IGF-1 Regulates Astrocytic Phagocytosis and Inflammation through the P110 α Isoform of PI3K in a Sex-Specific Manner ». *Glia* 70 (6): 1153-69. <https://doi.org/10.1002/glia.24163>.
- Pitt, Jason, Kyle C. Wilcox, Vanessa Tortelli, Luan Pereira Diniz, Maira S. Oliveira, Cassandra Dobbins, Xiao-Wen Yu, et al. 2017. « Neuroprotective Astrocyte-Derived Insulin/Insulin-like Growth Factor 1 Stimulates Endocytic Processing and Extracellular Release of Neuron-Bound A β Oligomers ». *Molecular Biology of the Cell* 28 (20): 2623-36. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-06-0416>.
- Pryor, N. Elizabeth, Melissa A. Moss, et Christa N. Hestekin. 2012. « Unraveling the Early Events of Amyloid- β Protein (A β) Aggregation: Techniques for the Determination of A β Aggregate Size ». *International Journal of Molecular Sciences* 13 (3): 3038-72. <https://doi.org/10.3390/ijms13033038>.
- Pulido, Robert S., Roeben N. Munji, Tamara C. Chan, Clare R. Quirk, Geoffrey A. Weiner, Benjamin D. Weger, Meghan J. Rossi, et al. 2020. « Neuronal Activity Regulates Blood-Brain Barrier Efflux Transport through Endothelial Circadian Genes ». *Neuron* 108 (5): 937-952.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.09.002>.
- Ramaswamy, Srikanth, et Henry Markram. 2015. « Anatomy and physiology of the thick-tufted layer 5 pyramidal neuron ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2015.00233>.
- Rasmussen, Martin Kaag, Humberto Mestre, et Maiken Nedergaard. 2022. « Fluid Transport in the Brain ». *Physiological Reviews* 102 (2): 1025-1151. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2020>.

Rasschaert, Marlène, Roy O. Weller, Josef A. Schroeder, Christoph Brochhausen, et Jean-Marc Idée. 2020. « Retention of Gadolinium in Brain Parenchyma: Pathways for Speciation, Access, and Distribution. A Critical Review ». *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI* 52 (5): 1293-1305. <https://doi.org/10.1002/jmri.27124>.

Ratcliffe, Laura E., Irina Vázquez Villaseñor, Luke Jennings, Paul R. Heath, Heather Mortiboys, Aurelie Schwartzenruber, Evangelia Karyka, et al. 2018. « Loss of IGF1R in Human Astrocytes Alters Complex I Activity and Support for Neurons ». *Neuroscience* 390: 46-59. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.07.029>.

Riggelen, Jan van, Alper Yetil, et Dean W. Felsher. 2010. « MYC as a Regulator of Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis ». *Nature Reviews Cancer* 10 (4): 301-9. <https://doi.org/10.1038/nrc2819>.

Rungta, Ravi L., Hyun B. Choi, John R. Tyson, Aqsa Malik, Lasse Dissing-Olesen, Paulo J. C. Lin, Stuart M. Cain, Pieter R. Cullis, Terrance P. Snutch, et Brian A. MacVicar. 2015. « The Cellular Mechanisms of Neuronal Swelling Underlying Cytotoxic Edema ». *Cell* 161 (3): 610-21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.029>.

Rzechorzek, Nina M., Michael J. Thrippleton, Francesca M. Chappell, Grant Mair, Ari Ercole, Manuel Cabeleira, CENTER-TBI High Resolution ICU (HR ICU) Sub-Study Participants and Investigators, Jonathan Rhodes, Ian Marshall, et John S. O'Neill. 2022. « A Daily Temperature Rhythm in the Human Brain Predicts Survival after Brain Injury ». *Brain: A Journal of Neurology* 145 (6): 2031-48. <https://doi.org/10.1093/brain/awab466>.

Sætra, Marte J., Ada J. Ellingsrud, et Marie E. Rognes. 2023. « Neural Activity Induces Strongly Coupled Electro-Chemo-Mechanical Interactions and Fluid Flow in Astrocyte Networks and Extracellular Space-A Computational Study ». *PLoS Computational Biology* 19 (7): e1010996. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010996>.

Sakono, Masafumi, et Tamotsu Zako. 2010. « Amyloid Oligomers: Formation and Toxicity of A β Oligomers ». *The FEBS Journal* 277 (6): 1348-58. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07568.x>.

Salman, Mootaz M., Philip Kitchen, Andrea Halsey, Marie Xun Wang, Susanna Törnroth-Horsefield, Alex C. Conner, Jerome Badaut, Jeffrey J. Iliff, et Roslyn M. Bill. 2022. « Emerging Roles for Dynamic Aquaporin-4 Subcellular Relocalization in CNS Water Homeostasis ». *Brain: A Journal of Neurology* 145 (1): 64-75. <https://doi.org/10.1093/brain/awab311>.

Savage, Van M., Andrew P. Allen, James H. Brown, James F. Gillooly, Alexander B. Herman, William H. Woodruff, et Geoffrey B. West. 2007. « Scaling of number, size, and metabolic rate of cells with

body size in mammals ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (11): 4718-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611235104>.

Schmid, Franca, Matthew J. P. Barrett, Patrick Jenny, et Bruno Weber. 2019. « Vascular Density and Distribution in Neocortex ». *NeuroImage* 197 (août): 792-805. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.06.046>.

Schnack, Hugo G., Neeltje E.M. van Haren, Rachel M. Brouwer, Alan Evans, Sarah Durston, Dorret I. Boomsma, René S. Kahn, et Hilleke E. Hulshoff Pol. 2015. « Changes in Thickness and Surface Area of the Human Cortex and Their Relationship with Intelligence ». *Cerebral Cortex* 25 (6): 1608-17. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht357>.

Schulte, Joost, et J. Troy Littleton. 2011. « The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology ». *Current trends in neurology* 5 (janvier): 65-78.

Selkoe, Dennis J., et John Hardy. 2016. « The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease at 25 Years ». *EMBO Molecular Medicine* 8 (6): 595-608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>.

Selles, Maria Clara, Juliana T. S. Fortuna, Maria F. Zappa-Villar, Yasmin P. R. de Faria, Amanda S. Souza, Claudia K. Suemoto, Renata E. P. Leite, et al. 2020. « Adenovirus-Mediated Transduction of Insulin-Like Growth Factor 1 Protects Hippocampal Neurons from the Toxicity of A β Oligomers and Prevents Memory Loss in an Alzheimer Mouse Model ». *Molecular Neurobiology* 57 (3): 1473-83. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01827-y>.

Selman, Colin, Steven Lingard, Agharul I. Choudhury, Rachel L. Batterham, Marc Claret, Melanie Clements, Faruk Ramadani, et al. 2008. « Evidence for Lifespan Extension and Delayed Age-Related Biomarkers in Insulin Receptor Substrate 1 Null Mice ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (3): 807-18. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9261com>.

Sereno, Martin I., Jörn Diedrichsen, Mohamed Tachrount, Guilherme Testa-Silva, Helen d'Arceuil, et Chris De Zeeuw. 2020. « The human cerebellum has almost 80% of the surface area of the neocortex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (32): 19538-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002896117>.

Sherpa, Ang Doma, Fanrong Xiao, Neethu Joseph, Chiye Aoki, et Sabina Hrabetova. 2016. « Activation of β -adrenergic receptors in rat visual cortex expands astrocytic processes and reduces extracellular space volume ». *Synapse (New York, N.Y.)* 70 (8): 307-16. <https://doi.org/10.1002/syn.21908>.

Shi, Chunyan, Yiming Lei, Hongbin Han, Long Zuo, Junhao Yan, Qingyuan He, Lan Yuan, Huipo Liu, Ge Xu, et Weiguo Xu. 2016. « Transportation in the Interstitial Space of the Brain Can Be Regulated by Neuronal Excitation ». *Scientific Reports* 5 (1): 17673. <https://doi.org/10.1038/srep17673>.

Smith, Alex J, Xiaoming Yao, James A Dix, Byung-Ju Jin, et Alan S Verkman. 2017. « Test of the “glymphatic” hypothesis demonstrates diffusive and aquaporin-4-independent solute transport in rodent brain parenchyma ». Édité par John Huguenard. *eLife* 6 (août): e27679. <https://doi.org/10.7554/eLife.27679>.

Soria, Federico N., Cristina Miguelez, Olga Peñagarikano, et Jan Tønnesen. 2020a. « Current Techniques for Investigating the Brain Extracellular Space ». *Frontiers in Neuroscience* 14: 570750. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.570750>.

———. 2020b. « Current Techniques for Investigating the Brain Extracellular Space ». *Frontiers in Neuroscience* 14: 570750. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.570750>.

Soria, Federico N., Chiara Paviolo, Evelyne Doudnikoff, Marie-Laure Arotcarena, Antony Lee, Noémie Danné, Amit Kumar Mandal, et al. 2020. « Synucleinopathy Alters Nanoscale Organization and Diffusion in the Brain Extracellular Space through Hyaluronan Remodeling ». *Nature Communications* 11 (1): 3440. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17328-9>.

Soto, Marion, Weikang Cai, Masahiro Konishi, et C. Ronald Kahn. 2019. « Insulin Signaling in the Hippocampus and Amygdala Regulates Metabolism and Neurobehavior ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (13): 6379-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817391116>.

Spruston, Nelson. 2008. « Pyramidal Neurons: Dendritic Structure and Synaptic Integration ». *Nature Reviews Neuroscience* 9 (3): 206-21. <https://doi.org/10.1038/nrn2286>.

Stacey, Benjamin S., Ryan L. Hoiland, Hannah G. Caldwell, Connor A. Howe, Tyler Vermeulen, Michael M. Tymko, Gustavo A. Vizcardo-Galindo, et al. 2023. « Lifelong Exposure to High-Altitude Hypoxia in Humans Is Associated with Improved Redox Homeostasis and Structural-Functional Adaptations of the Neurovascular Unit ». *The Journal of Physiology* 601 (6): 1095-1120. <https://doi.org/10.1113/JP283362>.

Steen, Eric, Benjamin M. Terry, Enrique J. Rivera, Jennifer L. Cannon, Thomas R. Neely, Rose Tavares, X. Julia Xu, Jack R. Wands, et Suzanne M. de la Monte. 2005. « Impaired Insulin and Insulin-like Growth Factor Expression and Signaling Mechanisms in Alzheimer’s Disease--Is This Type 3 Diabetes? » *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 7 (1): 63-80. <https://doi.org/10.3233/jad-2005-7107>.

Suh, Yousin, Gil Atzmon, Mi-Ook Cho, David Hwang, Bingrong Liu, Daniel J. Leahy, Nir Barzilai, et Pinchas Cohen. 2008. « Functionally Significant Insulin-like Growth Factor I Receptor Mutations in Centenarians ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (9): 3438-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705467105>.

Sweeney, Melanie D., Zhen Zhao, Axel Montagne, Amy R. Nelson, et Berislav V. Zlokovic. 2019. « Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back ». *Physiological Reviews* 99 (1): 21-78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017>.

Sweet, Robert A., Joseph N. Pierri, Sungyoung Auh, Allan R. Sampson, et David A. Lewis. 2003. « Reduced Pyramidal Cell Somal Volume in Auditory Association Cortex of Subjects with Schizophrenia ». *Neuropsychopharmacology* 28 (3): 599-609. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300120>.

Syková, E., T. Mazel, R.u. Hasenöhr, A.r. Harvey, Z. Šimonová, W.h.a.m. Mulders, et J.p. Huston. 2002. « Learning Deficits in Aged Rats Related to Decrease in Extracellular Volume and Loss of Diffusion Anisotropy in Hippocampus ». *Hippocampus* 12 (2): 269-79. <https://doi.org/10.1002/hipo.1101>.

Syková, Eva, et Charles Nicholson. 2008a. « Diffusion in Brain Extracellular Space ». *Physiological reviews* 88 (4): 1277-1340. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2007>.

———. 2008b. « Diffusion in Brain Extracellular Space ». *Physiological Reviews* 88 (4): 1277-1340. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2007>.

Syková, Eva, Ivan Vorísek, Tatiana Antonova, Tomáš Mazel, Melanie Meyer-Luehmann, Mathias Jucker, Milan Hájek, Michael Ort, Michael Or, et Jan Bures. 2005. « Changes in Extracellular Space Size and Geometry in APP23 Transgenic Mice: A Model of Alzheimer's Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2): 479-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408235102>.

Syková, Eva, Ivan Voříšek, Tomáš Mazel, Tatiana Antonova, et Melitta Schachner. 2005. « Reduced Extracellular Space in the Brain of Tenascin-R- and HNK-1-Sulphotransferase Deficient Mice ». *European Journal of Neuroscience* 22 (8): 1873-80. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04375.x>.

Tagluk, M. Emin, et Ramazan Tekin. 2014. « The influence of ion concentrations on the dynamic behavior of the Hodgkin–Huxley model-based cortical network ». *Cognitive Neurodynamics* 8 (4): 287-98. <https://doi.org/10.1007/s11571-014-9281-5>.

Tahedl, Marlene. 2020. « Towards individualized cortical thickness assessment for clinical routine ». *Journal of Translational Medicine* 18 (1): 151. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02317-9>.

Takeda, Shuko, Tadafumi Hashimoto, Allyson D. Roe, Yukiko Hori, Tara L. Spires-Jones, et Bradley T. Hyman. 2013. « Brain Interstitial Oligomeric Amyloid β Increases with Age and Is Resistant to Clearance from Brain in a Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *The FASEB Journal* 27 (8): 3239-48. <https://doi.org/10.1096/fj.13-229666>.

Talbot, Konrad, Hoau-Yan Wang, Hala Kazi, Li-Ying Han, Kalindi P. Bakshi, Andres Stucky, Robert L. Fuino, et al. 2012. « Demonstrated Brain Insulin Resistance in Alzheimer's Disease Patients Is Associated with IGF-1 Resistance, IRS-1 Dysregulation, and Cognitive Decline ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (4): 1316-38. <https://doi.org/10.1172/JCI59903>.

Tarantini, Stefano, Priya Balasubramanian, Andriy Yabluchanskiy, Nicole M. Ashpole, Sreemathi Logan, Tamas Kiss, Anna Ungvari, et al. 2021. « IGF1R Signaling Regulates Astrocyte-Mediated Neurovascular Coupling in Mice: Implications for Brain Aging ». *GeroScience* 43 (2): 901-11. <https://doi.org/10.1007/s11357-021-00350-0>.

Tarasoff-Conway, Jenna M., Roxana O. Carare, Ricardo S. Osorio, Lidia Glodzik, Tracy Butler, Els Fieremans, Leon Axel, et al. 2015. « Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease ». *Nature reviews. Neurology* 11 (8): 457-70. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2015.119>.

Tariq, Kamran, Erin Cullen, Stephanie A. Getz, Andie K. S. Conching, Andrew R. Goyette, Mackenzi L. Prina, Wei Wang, Meijie Li, Matthew C. Weston, et Bryan W. Luikart. 2022. « Disruption of mTORC1 Rescues Neuronal Overgrowth and Synapse Function Dysregulated by Pten Loss ». *Cell Reports* 41 (5): 111574. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111574>.

Tasker, J. G., S. H. R. Oliet, J. S. Bains, C. H. Brown, et J. E. Stern. 2012. « Glial Regulation of Neuronal Function: From Synapse to Systems Physiology ». *Journal of Neuroendocrinology* 24 (4): 566-76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02259.x>.

Thevalingam, Donald, Aditi A. Naik, Jan Hrabe, Dan P. McCloskey, et Sabina Hrabětová. 2021. « Brain Extracellular Space of the Naked Mole-Rat Expands and Maintains Normal Diffusion under Ischemic Conditions ». *Brain Research* 1771 (novembre): 147646. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147646>.

Thielke, Stephen, Christopher G. Slatore, et William A. Banks. 2015. « Association Between Alzheimer Dementia Mortality Rate and Altitude in California Counties ». *JAMA Psychiatry* 72 (12): 1253-54. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2015.1852>.

Thomas, Jean-Léon, Laurent Jacob, et Ligia Boisserand. 2019. « Système lymphatique et cerveau ». *médecine/sciences* 35 (1): 55-61. <https://doi.org/10.1051/medsci/2018309>.

Thorne, Robert G., et Charles Nicholson. 2006. « In Vivo Diffusion Analysis with Quantum Dots and Dextran Predicts the Width of Brain Extracellular Space ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (14): 5567-72. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509425103>.

Toney, Glenn M. 2010. « Regulation of neuronal cell volume: from activation to inhibition to degeneration ». *The Journal of Physiology* 588 (Pt 18): 3347-48. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.197251>.

Tønnesen, Jan, Sabina Hrabětová, et Federico N. Soria. 2023a. « Local Diffusion in the Extracellular Space of the Brain ». *Neurobiology of Disease* 177 (février): 105981. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105981>.

———. 2023b. « Local Diffusion in the Extracellular Space of the Brain ». *Neurobiology of Disease* 177 (février): 105981. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105981>.

Tønnesen, Jan, V. V. G. Krishna Inavalli, et U. Valentin Nägerl. 2018. « Super-Resolution Imaging of the Extracellular Space in Living Brain Tissue ». *Cell* 172 (5): 1108-1121.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.007>.

Torres, Juan F., Atsuki Komiya, Junnosuke Okajima, et Shigenao Maruyama. 2012. « Measurement of the Molecular Mass Dependence of the Mass Diffusion Coefficient in Protein Aqueous Solutions ». *Defect and Diffusion Forum* 326-328 (avril): 452-58. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/DDF.326-328.452>.

Tsai, Philbert S., John P. Kaufhold, Pablo Blinder, Beth Friedman, Patrick J. Drew, Harvey J. Karten, Patrick D. Lyden, et David Kleinfeld. 2009. « Correlations of Neuronal and Microvascular Densities in Murine Cortex Revealed by Direct Counting and Colocalization of Nuclei and Vessels ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (46): 14553-70. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3287-09.2009>.

Tsuboguchi, Shintaro, Yuka Nakamura, Tomohiko Ishihara, Taisuke Kato, Tokiharu Sato, Akihide Koyama, Hideki Mori, Yuka Koike, Osamu Onodera, et Masaki Ueno. 2023. « TDP-43 Differentially Propagates to Induce Antero- and Retrograde Degeneration in the Corticospinal Circuits in Mouse Focal ALS Models ». *Acta Neuropathologica* 146 (4): 611-29. <https://doi.org/10.1007/s00401-023-02615-8>.

Tumaneng, Karen, Ryan C. Russell, et Kun-Liang Guan. 2012. « Organ Size Control by Hippo and TOR Pathways ». *Current Biology* 22 (9): R368-79. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.003>.

Tureckova, Jana, Monika Kamenicka, Denisa Kolenicova, Tereza Filipi, Zuzana Hermanova, Jan Kriska, Lenka Meszarosova, et al. 2022. « Compromised Astrocyte Swelling/Volume Regulation in the

Hippocampus of the Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2021.783120>.

Vanharreveld, A., J. Crowell, et S. K. Malhotra. 1965. « A STUDY OF EXTRACELLULAR SPACE IN CENTRAL NERVOUS TISSUE BY FREEZE-SUBSTITUTION ». *The Journal of Cell Biology* 25 (1): 117-37. <https://doi.org/10.1083/jcb.25.1.117>.

Vargová, Lýdia, et Eva Syková. 2014. « Astrocytes and extracellular matrix in extrasynaptic volume transmission ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369 (1654): 20130608. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0608>.

Vasudevan, Anju, Jason E. Long, James E. Crandall, John L. R. Rubenstein, et Pradeep G. Bhide. 2008. « Compartment-Specific Transcription Factors Orchestrate Angiogenesis Gradients in the Embryonic Brain ». *Nature Neuroscience* 11 (4): 429-39. <https://doi.org/10.1038/nn2074>.

Veluw, Susanne J. van, Steven S. Hou, Maria Calvo-Rodriguez, Michal Arbel-Ornath, Austin C. Snyder, Matthew P. Frosch, Steven M. Greenberg, et Brian J. Bacskai. 2020a. « Vasomotion as a Driving Force for Paravascular Clearance in the Awake Mouse Brain ». *Neuron* 105 (3): 549-561.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.10.033>.

———. 2020b. « Vasomotion as a Driving Force for Paravascular Clearance in the Awake Mouse Brain ». *Neuron* 105 (3): 549-561.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.10.033>.

Ventura-Antunes, aLissa, et Suzana Herculano-Houzel. 2022. « Energy Supply per Neuron Is Constrained by Capillary Density in the Mouse Brain ». *Frontiers in Integrative Neuroscience* 16: 760887. <https://doi.org/10.3389/fnint.2022.760887>.

Villegas, Gloria M., et Josefina Fernández. 1966. « Permeability to thorium dioxide of the intercellular spaces of the frog cerebral hemisphere ». *Experimental Neurology* 15 (1): 18-36. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(66\)90031-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(66)90031-8).

Vorísek, I., M. Hájek, J. Tintera, K. Nicolay, et E. Syková. 2002. « Water ADC, Extracellular Space Volume, and Tortuosity in the Rat Cortex after Traumatic Injury ». *Magnetic Resonance in Medicine* 48 (6): 994-1003. <https://doi.org/10.1002/mrm.10305>.

Walch, Erin, et Todd A. Fiacco. 2022. « Honey, I Shrunk the Extracellular Space: Measurements and Mechanisms of Astrocyte Swelling ». *Glia* 70 (11): 2013-31. <https://doi.org/10.1002/glia.24224>.

Walter F. Boron et Emile L. Boulpaep. 2012. *Medical physiology : a cellular and molecular approach*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/nlmcatalog/101463080>.

- Weinmann, Hanns-Joachim, Wolfgang Ebert, Bernd Misselwitz, et Heribert Schmitt-Willich. 2003. « Tissue-Specific MR Contrast Agents ». *European Journal of Radiology* 46 (1): 33-44. [https://doi.org/10.1016/s0720-048x\(02\)00332-7](https://doi.org/10.1016/s0720-048x(02)00332-7).
- Wilson, Mark R., Sandeep Satapathy, et Michele Vendruscolo. 2023. « Extracellular Protein Homeostasis in Neurodegenerative Diseases ». *Nature Reviews Neurology* 19 (4): 235-45. <https://doi.org/10.1038/s41582-023-00786-2>.
- Winnubst, Johan, Erhan Bas, Tiago A. Ferreira, Zhuhao Wu, Michael N. Economo, Patrick Edson, Ben J. Arthur, et al. 2019. « Reconstruction of 1,000 Projection Neurons Reveals New Cell Types and Organization of Long-Range Connectivity in the Mouse Brain ». *Cell* 179 (1): 268-281.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.042>.
- Wrigley, Sarah, Donia Arafa, et Daniela Tropea. 2017. « Insulin-Like Growth Factor 1: At the Crossroads of Brain Development and Aging ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11 (février): 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00014>.
- Wyckoff, R. W. G., et J. Z. Young. 1956. « The Motorneuron Surface ». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 144 (917): 440-50.
- Xiang, Tangtang, Dongyi Feng, Xinjie Zhang, Yupeng Chen, Hanhua Wang, Xuanhui Liu, Zhitao Gong, et al. 2022. « Effects of Increased Intracranial Pressure on Cerebrospinal Fluid Influx, Cerebral Vascular Hemodynamic Indexes, and Cerebrospinal Fluid Lymphatic Efflux ». *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 42 (12): 2287-2302. <https://doi.org/10.1177/0271678X221119855>.
- Xie, L., H. Kang, Q. Xu, M. J. Chen, Y. Liao, M. Thiyagarajan, J. O'Donnell, et al. 2013. « Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain ». *Science* 342 (6156): 373-77. <https://doi.org/10.1126/science.1241224>.
- Xie, Lulu, Hongyi Kang, Qiwu Xu, Michael J. Chen, Yonghong Liao, Meenakshisundaram Thiyagarajan, John O'Donnell, et al. 2013. « Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain ». *Science (New York, N.Y.)* 342 (6156): 373-77. <https://doi.org/10.1126/science.1241224>.
- Xu, Jie, Géraldine Gontier, Zayna Chaker, Philippe Lacube, Joëlle Dupont, et Martin Holzenberger. 2014. « Longevity Effect of IGF-1R(+/-) Mutation Depends on Genetic Background-Specific Receptor Activation ». *Aging Cell* 13 (1): 19-28. <https://doi.org/10.1111/accel.12145>.
- Yang, Ting, Shaomin Li, Huixin Xu, Dominic M. Walsh, et Dennis J. Selkoe. 2017a. « Large Soluble Oligomers of Amyloid β -Protein from Alzheimer Brain Are Far Less Neuroactive Than the Smaller

Oligomers to Which They Dissociate ». *The Journal of Neuroscience* 37 (1): 152-63. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1698-16.2016>.

———. 2017b. « Large Soluble Oligomers of Amyloid β -Protein from Alzheimer Brain Are Far Less Neuroactive Than the Smaller Oligomers to Which They Dissociate ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 37 (1): 152-63. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1698-16.2016>.

Yue, Shuwen, Yunwanbin Wang, et Zi-Jun Wang. 2022. « Insulin-like growth factor 1 regulates excitatory synaptic transmission in pyramidal neurons from adult prefrontal cortex ». *Neuropharmacology* 217 (octobre): 109204. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109204>.

Yue, Xiangpei, Yanzhao Zhou, Meng Qiao, Xingnan Zhao, Xin Huang, Tong Zhao, Xiang Cheng, et al. 2021. « Intermittent Hypoxia Treatment Alleviates Memory Impairment in the 6-Month-Old APPswe/PS1dE9 Mice and Reduces Amyloid Beta Accumulation and Inflammation in the Brain ». *Alzheimer's Research & Therapy* 13 (1): 194. <https://doi.org/10.1186/s13195-021-00935-z>.

Zaric, Olgica, Vladimir Juras, Pavol Szomolanyi, Markus Schreiner, Marcus Raudner, Chiara Giraud, et Siegfried Trattnig. 2021. « Frontiers of Sodium MRI Revisited: From Cartilage to Brain Imaging ». *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 54 (1): 58-75. <https://doi.org/10.1002/jmri.27326>.

Zegarra-Valdivia, Jonathan A., Jansen Fernandes, Maria Estrella Fernandez de Sevilla, Angel Trueba-Saiz, Jaime Pignatelli, Kentaro Suda, Laura Martinez-Rachadell, et al. 2022. « Insulin-like Growth Factor I Sensitization Rejuvenates Sleep Patterns in Old Mice ». *GeroScience* 44 (4): 2243-57. <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00589-1>.

Zegarra-Valdivia, Jonathan, Ana M. Fernandez, Laura Martinez-Rachadell, Raquel Herrero-Labrador, Jansen Fernandes, et Ignacio Torres Aleman. 2022. « Insulin and Insulin-like Growth Factor-I Receptors in Astrocytes Exert Different Effects on Behavior and Alzheimer's-like Pathology ». *F1000Research* 11: 663. <https://doi.org/10.12688/f1000research.121901.3>.

Zheng, Kaiyu, Thomas P. Jensen, Leonid P. Savtchenko, James A. Levitt, Klaus Suhling, et Dmitri A. Rusakov. 2017. « Nanoscale Diffusion in the Synaptic Cleft and beyond Measured with Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Imaging ». *Scientific Reports* 7 (février): 42022. <https://doi.org/10.1038/srep42022>.

Zhou, Y., B. C. Xu, H. G. Maheshwari, L. He, M. Reed, M. Lozykowski, S. Okada, et al. 1997. « A Mammalian Model for Laron Syndrome Produced by Targeted Disruption of the Mouse Growth Hormone Receptor/Binding Protein Gene (the Laron Mouse) ». *Proceedings of the National Academy*

of Sciences of the United States of America 94 (24): 13215-20.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13215>.

Ziegler, Amber N., Steven W. Levison, et Teresa L. Wood. 2015. « Insulin and IGF Receptor Signalling in Neural-Stem-Cell Homeostasis ». *Nature Reviews. Endocrinology* 11 (3): 161-70.
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.208>.

Zou, Wenyan, Tinglin Pu, Weixi Feng, Ming Lu, Ying Zheng, Renhong Du, Ming Xiao, et Gang Hu. 2019. « Blocking Meningeal Lymphatic Drainage Aggravates Parkinson's Disease-like Pathology in Mice Overexpressing Mutated α -Synuclein ». *Translational Neurodegeneration* 8: 7.
<https://doi.org/10.1186/s40035-019-0147-y>.