



HAL
open science

Étude morphométrique des artérioles rétiniennes chez l'homme par imagerie a haute résolution

Edouard Koch

► **To cite this version:**

Edouard Koch. Étude morphométrique des artérioles rétiniennes chez l'homme par imagerie a haute résolution. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS418 . tel-02924872

HAL Id: tel-02924872

<https://theses.hal.science/tel-02924872>

Submitted on 28 Aug 2020

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

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

Sorbonne Université

Ecole doctorale ED 158 – Cerveau, cognition, comportement (3C)

*Laboratoire UMRS 968 / Equipe de recherche « L'inflammation dans la dégénérescence
neuronale et le remodelage vasculaire »*

**ETUDE MORPHOMETRIQUE DES ARTERIOLES
RETINIENNES CHEZ L'HOMME PAR IMAGERIE A
HAUTE RESOLUTION**

Par Edouard Koch

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Michel Paques

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2018

Devant un jury composé de :

Delyfer Marie-Noelle, Professeur des universités, Rapporteur, Présidente

Redheuil Alban, Professeur des universités, Représentant SU

Meimon Serge, Docteur en Sciences, Rapporteur

Paques Michel, Professeur des universités, Directeur de thèse



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Remerciements

Mesdames, Messieurs,

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance aux membres du jury qui me font l'honneur de cette soutenance.

Au Professeur Michel Paques qui a dirigé et encadré ce travail de thèse. Je tiens à te remercier pour ta confiance et ton soutien, pour ton enseignement et ta patience. Ta curiosité et tes nombreuses idées, ton esprit d'innovation et d'entreprise sont un exemple pour moi et tous les étudiants que tu diriges. Tu m'as appris la rigueur scientifique et la patience, qui sont les clefs d'un travail de recherche. Les longues heures passées à analyser les nouvelles images prises en OA ont été un réel plaisir, et j'espère qu'elles seront encore nombreuses. Trouve dans ce travail le témoignage de mon profond respect et de toute ma reconnaissance.

Au Professeur Marie-Noelle Delyfer. Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Trouvez dans ce travail l'expression de ma considération et de ma reconnaissance.

Au Professeur Alban Redheuil. Vous me faites l'honneur de participer à mon jury de thèse et je vous en remercie. Vos compétences en imagerie cardiovasculaire sont d'un apport très précieux et enrichiront la discussion sur ce travail de recherche. Trouvez dans ce travail l'expression de mon profond respect.

Au Dr Serge Meimon. Je te remercie d'avoir accepté de juger cette thèse. Travailler avec toi et ton équipe est un réel plaisir et un enrichissement constant. Tes innovations en imagerie sont à l'origine de nombreuses publications scientifiques et trouvent des applications précieuses en ophtalmologie et au delà. Trouve par ce travail l'expression de ma profonde estime.

Au Dr Audrey Giocanti-Auregan. Je te remercie d'avoir accepté de juger cette thèse. Tes compétences et ton énergie sont un exemple pour moi. Trouve dans ce travail l'expression de mon profond respect et mon estime.

Je remercie le **Professeur José-Alain Sahel** pour m’avoir accueilli au sein de son équipe de recherche à l’Institut de la vision. Vous êtes un exemple pour tous les ophtalmologues et une fierté pour la France. Par ce travail trouvez toute mon admiration et mon profond respect.

Je remercie mes collègues : le **Professeur Xavier Girerd**, le **Professeur Florence Rossant**, le **Professeur Fernando Pico**, le **Professeur Jean-Jacques Boffa**, le **Professeur Philippe Rousselot**, le **Professeur Philippe Chaumet-Riffaud**, le **Professeur Isabelle Bloch**, le **Professeur Kiyoko Gocho**, le **docteur David Rosenbaum**, le **docteur Dan Buch**, le **docteur Marie-Laure Chadenat**, le **docteur Aurélie Brolly**, le **docteur Jonathan Benesty**, le **docteur Jean-François Girmens**, le **docteur Antonio Gallo** et le **docteur Alessandro Mattina**, **Julien Labreuche** et **Maeva Kyheng**. Ce travail est le fruit de notre collaboration et n’aurait jamais pu être réalisé sans votre participation. J’espère que nos collaborations multiples continueront d’enrichir mon travail et mes connaissances. Trouver dans cette thèse la concrétisation de nos nombreuses heures de travail et l’expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie mes collègues du CIC des Quinze-Vingts pour leur bonne humeur et leur aide pour les différentes études et pour s’être prêtés si souvent aux différentes expériences : Céline, Jeanne, Dorothee, Serge, Alexandre, Céline, Claire, Kitty, Chahira, Stéphanie, Mathias, Kate, Marie-Hélène et tous les thésards. Merci à Iyèd pour son aide et son travail précieux. Merci particulièrement à Céline Devisme pour son aide et sa bonne humeur, c’est un vrai plaisir de travailler avec toi.

Je remercie toute l’équipe d’Imagine Eye pour sa contribution. Je remercie le groupe Paris pour la formidable émulation intellectuelle qu’il crée autour de lui.

Je remercie mes collègues du centre hospitalier de Versailles pour leurs disponibilités, leur bonne humeur et leur bienveillance. Merci à Marie, Véronique, Audrey, Véronique et Maguy pour m’avoir aidé à organiser mes journées afin de me permettre de travailler ma thèse dans les meilleures conditions. Merci à Quynh pour son travail, son sérieux et ses compétences et pour avoir permis ces nombreuses études cliniques. Merci à Marie-Laure pour sa gentillesse et son aide à maintenir le service pendant mes absences.

Je remercie ma famille pour son soutien : ma femme Lou et ma fille Charlotte, mes parents Nelly et Michel, mon frère Pierre, mes beaux-parents Marie et Alain, mes cousins Delphine et Yves. A mes amis pour leur présence : Corentin, Céline, Marie, Olivier, Marie-Dominique, Claire, Laure, Fanny, François, Laurence, David, Laetitia, Hubert, Florent, Dong-Ahn, Julia.

Je dédie ce travail à Lou.

Merci pour ta présence, ton aide et ta bienveillance. C'est une joie de partager ta vie.

Sommaire

Remerciements.....	2
Sommaire	5
1 Introduction générale	6
1.1 Présentation du travail.....	6
1.2 Rappels sur la microcirculation	10
1.2.1 La microcirculation normale.....	10
1.2.2 La microcirculation lors de l'HTA	24
1.3 Les méthodes d'étude de la microcirculation	26
1.3.1 Étude de la microcirculation générale.....	26
1.3.2 Étude de la microcirculation rétinienne	26
2 Etude de la morphométrie vasculaire rétinienne par imagerie en optique adaptative	29
2.1 Plan général des travaux :	29
2.2 1 ^{er} article: Imagerie des artéioles rétiniennes par optique adaptative, faisabilité et reproductibilité. (article issu du master 2)	32
2.3 2 ^{ème} article: Analyse morphométrique des petites artères rétiniennes dans la rétine humaine utilisant l'ophtalmoscopie par optique adaptative: relation avec la pression artérielle et les changements vasculaires focaux.	39
2.4 3 ^{ème} article: Rétrécissement veineux sans contact artérioveineux: rôle du microenvironnement artériolaire dans le signe du croisement artérioveineux.	50
2.5 4 ^{ème} Article: Etude morphométrique des petites artères rétiniennes en ophtalmoscopie par optique adaptative lors de la phase aiguë d'un infarctus cérébral: relation avec la leucopathie et la rétinopathie. (en cours de rédaction)	55
2.6 Etude préliminaire sur la vasomotricité rétinienne normale induite par différents stimuli	68
3 Discussion.....	79
4 Conclusion générale et perspectives	81
5 Annexes.....	83
6 Bibliographie.....	85
7 Résumé.....	91

1 Introduction générale

1.1 Présentation du travail

La microcirculation, communément définie par l'ensemble des vaisseaux ayant un diamètre inférieur à 150 microns, est le siège privilégié des échanges entre le secteur intravasculaire et le secteur interstitiel.(1) Elle assure par exemple l'essentiel de la distribution de l'oxygène, des nutriments et des signaux métaboliques aux cellules et l'évacuation des déchets du métabolisme.

L'étude du réseau microvasculaire est d'un grand intérêt médical. Dans l'hypertension artérielle, maladie touchant 70% des individus après 70 ans, un remodelage des petites artères de l'organisme aboutit notamment à augmenter les résistances périphériques totales, ce qui amplifie le phénomène d'hypertension.(2–5) De plus, 25% à 30% des accidents vasculaires cérébraux seraient liées à une microangiopathie des artères cérébrales perforantes profondes.(6–9) La microcirculation est également impliquée dans le déclin cognitif. Ainsi, dans la maladie d'Alzheimer, des altérations de la microvascularisation cérébrale sont observées.(10–12) Les microvaisseaux sont donc impliqués dans de nombreuses pathologies vasculaires générales, responsables d'une importante morbidité avec en particulier de nombreux handicaps.

Dans la rétine, outre les maladies proprement rétinienne, les petits vaisseaux peuvent être le siège de modifications visibles en photographie classique dans différentes situations pathologiques tel que l'HTA, l'AVC et peuvent être un indicateur du risque accru de maladies cardiovasculaires.(13–21) On comprend donc l'enjeu que constitue la mesure et au-delà la compréhension des mécanismes de remodelage des microvaisseaux rétiens au cours de ces maladies ainsi que la détection des effets thérapeutiques sur celles-ci.

L'étude *in vivo* de la microcirculation rétinienne est possible grâce à la transparence des milieux oculaires. La première observation *in vivo* des vaisseaux rétiens a pu être faite par Helmutz, inventeur de l'ophtalmoscope en 1851.(22) Plus récemment, les petits vaisseaux rétiens sont devenus l'objet d'étude grâce à la mise au point de la rétinophotographie (figure 1) permettant d'étudier les relations entre leurs anomalies vues au fond d'œil et les maladies cardiovasculaires.(13,14,23,24) Cependant, l'absence de visualisation directe des parois

vasculaires rétiniennes explique la limite de ces études. Il a été démontré que le scanner laser doppler (SLDF) permet une mesure indirecte de l'épaisseur pariétale vasculaire rétinienne. Le principe du SLDF est basé sur la mesure du diamètre externe du vaisseau par réflectivité des tissus et la mesure du diamètre interne par effet Doppler ; la différence entre les deux mesures reflète l'épaisseur pariétale. Il a été rapporté au cours de l'HTA une augmentation du rapport paroi-lumière artériel indépendamment des autres risques cardiovasculaires.(25) Cependant, le SLDF présente une limite de résolution spatiale d'environ 5 à 10 microns et une variabilité interobservateur assez élevée, de l'ordre de 10%.(26) Il ne permet pas non plus une analyse focale.



Figure 1. Photographies du fond d'œil standard. La colonne des globules rouges est visible, mais pas la paroi vasculaire.

Au sein du Centre d'Investigation Clinique (CIC) du Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des Quinze-Vingts, a été développée depuis 2006 en partenariat avec l'entreprise Imagine Eyes (Orsay, France), l'ONERA (Office National de Recherches Aérospatiales, Chatillon) et l'Observatoire de Meudon, une collaboration multidisciplinaire autour de l'imagerie par optique adaptative (OA). Cette technique, largement développée dans le domaine de l'astronomie, consiste à mesurer et corriger en temps réel les aberrations liées à la traversée de la cornée et du cristallin par la lumière; ceci permet d'augmenter la résolution des images du fond d'œil.

En ce qui concerne les applications cliniques, un premier banc a été installé dès 2006 par l'Observatoire de Meudon permettant d'observer pour la première fois en Europe les

photorécepteurs. Par la suite, la société ImagineEye a conçu un prototype utilisé dans le cadre d'un travail de master 2 (BIP, UPMC) réalisé par Valérie Sarda en 2009-2010 : ce travail a en particulier permis de suggérer des pistes pour l'amélioration technologique des prototypes suivant. Une caméra rétinienne (figure 2a) a ainsi été perfectionnée permettant actuellement une résolution latérale de l'ordre de $1.6\mu\text{m}$. Un projet de recherche clinique multidisciplinaire (iPhot, financé par l'ANR dans le cadre de l'appel d'offre TecSan 2012) impliquant le fabricant de la caméra, des informaticiens, des biostatisticiens et des cliniciens a été effectué entre 2012 et 2013 grâce à cette nouvelle caméra. L'ensemble de ce travail s'inscrit dans une collaboration multidisciplinaire au sein du groupe PARIS du CIC des XVXX (<http://parisgroup.webstarts.com/index.html>) impliquant informaticiens, physiciens, cardiologues, neurologues, ophtalmologistes, dont le but est de développer non seulement de nouveaux systèmes d'imagerie et de traitements basés sur l'imagerie mais également de développer l'utilisation de ceux-ci en médecine.(27) Il a été notamment réalisé un laser couplé à l'optique adaptative afin de cibler la zone traitée plus précisément qu'avec un laser standard, mais aussi un Doppler permettant d'obtenir des images de flux rétinien et choroïdien.(28–31) En parallèle de ce travail, j'ai collaboré avec le Pr Rossant de l'ISEP et son équipe pour le développement du logiciel d'analyse des vaisseaux rétiens AOV. Cette collaboration a fait l'objet de plusieurs publications dans des revues spécialisées.(32–36)

Lors de cette dernière étude en 2010, l'équipe du CIC a constaté incidemment la possibilité, pour la première fois, de visualiser directement la paroi des petits vaisseaux rétiens (figure 2 b, c, d). Ceci ouvrait donc la possibilité de mesurer directement et de manière non invasive certains paramètres morphologiques des artérioles. A notre connaissance il s'agissait de la première étude in vivo de l'imagerie de la paroi vasculaire chez l'homme. Ceci a motivé le développement d'un programme de recherche visant à analyser les relations entre morphologie pariétale et pression artérielle.

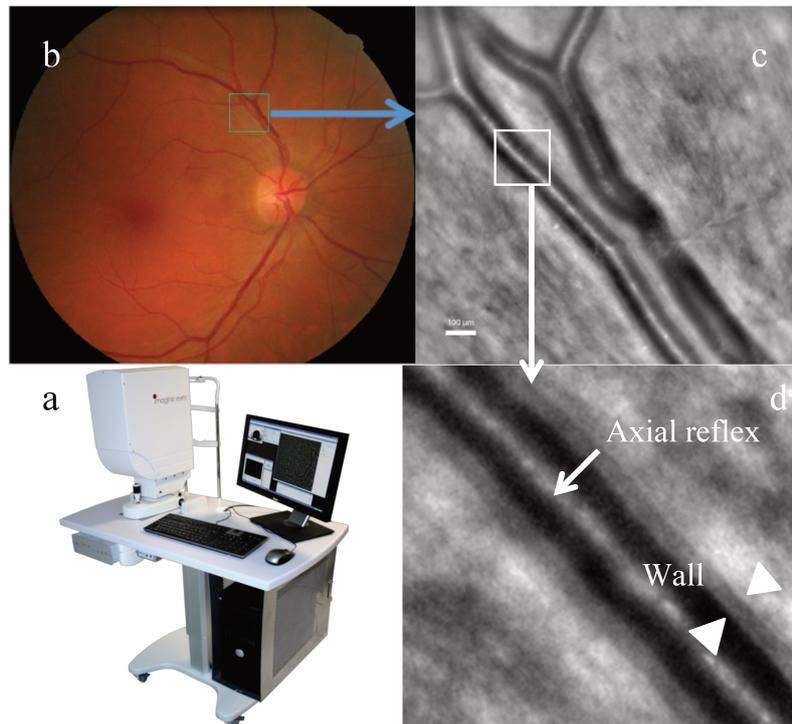


Figure 2. Caméra d'optique adaptative rtx1 (Imagine Eye, Orsay) (a). Comparaison de la résolution et du champ de vision entre la rétinothographie (b) et la caméra OA (c). Parois artériolaires (flèches blanches) et reflet artériolaire central sur l'image magnifiée (d).

Dans cette thèse, nous avons évalué de manière approfondie l'apport de cette technologie au phénotypage microvasculaire rétinien. Nous nous sommes attachés en particulier à déterminer si cette technique peut servir à analyser les variations à long terme et à court terme des diamètres des vaisseaux rétiniens sous l'effet de la pression artérielle, ainsi que des stimuli physiologiques, pharmacologiques ou pathologiques. Nous avons montré la bonne reproductibilité des mesures effectuées (article n°1). Une étude impliquant l'équipe du Pr Xavier Girerd de la Pitié Salpêtrière, a permis d'observer les modifications morphométriques vasculaires au cours de l'hypertension. Nous avons ainsi été les premiers à rapporter l'effet de la pression artérielle sur l'épaisseur pariétale en OA (article n°2). De façon intéressante, nous avons observé que les rétrécissements artériels focaux étaient probablement des points de vasoconstriction chronique et non pas des dégénérescences pariétales. Nous avons étudié également les croisements artérioveineux afin de déterminer s'il existait bien un contact physique entre artère et veine à l'origine des anomalies veineuses

(article n°3). En parallèle de ce travail, mes fonctions m'ont amené à ouvrir le service d'ophtalmologie du Centre Hospitalier de Versailles en 2013. Fort d'une collaboration étroite avec le service de neurologie du Pr Pico, j'ai obtenu le financement de la location d'une caméra d'optique adaptative d'avril 2014 à août 2016 par la DRCI de Versailles afin de mener une étude clinique à Versailles impliquant la neurologie et l'hématologie. Ainsi, Une quatrième étude a consisté en l'analyse de la microcirculation rétinienne chez des patients atteints d'AVC récent (article n°4, en cours de rédaction). Enfin, des travaux préliminaires ont exploré l'effet vasomodulateurs à court terme de stimuli physiologiques ou pharmacologiques permettant de tracer des perspectives sur l'utilisation diagnostique de la réactivité microvasculaire.

1.2 Rappels sur la microcirculation

1.2.1 La microcirculation normale

La microcirculation regroupe donc les artérioles, les veinules et les capillaires faisant moins de 150 μm . Toutefois, cette définition n'est pas universellement acceptée puisqu'elle exclue de fait des vaisseaux supérieurs à 150 μm mais qui auraient des caractéristiques physiologiques identiques. Ainsi, une définition basée sur la physiologie des artères peut être retenue en se fondant sur la réponse à l'augmentation de pression interne. Toutes les artères répondant à une augmentation de pression par une réduction myogénique du diamètre de la lumière devraient être inclus dans la définition de la microcirculation, tout aussi bien les veinules, que les capillaires. Les artères et les artérioles devraient être ainsi considérées comme un continuum et non comme des sites différents de résistance.(37)

Les rôles de la microcirculation sont multiples. Son premier rôle est d'optimiser la distribution des nutriments et de l'oxygène aux tissus. Son second rôle est d'éviter les variations importantes de la pression hydrostatique au niveau des capillaires entraînant des perturbations des échanges. C'est au niveau de la microcirculation, que se produit la chute substantielle de la pression hydrostatique, déterminant ainsi une part importante des résistances totales périphériques.(4,38)

La microcirculation est aussi affectée par de nombreux processus pathologiques en particulier dans l'HTA et le diabète, d'où l'intérêt majeur porté à ce réseau. Nous allons détailler dans une première partie de ce chapitre les bases fondamentales de la physiologie de la microcirculation et plus particulièrement celles de la microcirculation rétinienne. Dans une deuxième partie, nous exposerons les anomalies rencontrées dans l'hypertension artérielle.

1.2.1.1 Bases fondamentales chez l'Homme

1.2.1.1.1 Bases anatomiques :

La microcirculation chez l'Homme se compose de trois parties(39) :

- Le versant artériolaire, responsable du gradient de pression hydrostatique artérioveineux et de la perfusion tissulaire
- Le réseau capillaire qui est le principal contributeur de distribution de l'oxygène aux tissus
- Le versant capillaire et veinulaire perméable assurant les échanges d'eau et de macromolécules entre le secteur intravasculaire et le secteur interstitiel. Le secteur veinulaire est par ailleurs le site privilégié de contact entre les cellules immunologiquement actives et la microcirculation

La circulation systémique possède un réseau artériel et un réseau veineux. Le réseau veineux est un système basse pression qui sert de réservoir de sang grâce à sa grande capacité en rapport avec la déformabilité des veines. Ceci permet au niveau des organes des échanges efficaces pour une dépense énergétique modérée. Le système artériel est, quant à lui, un système haute pression. Cette pression artérielle est déterminée par le travail cardiaque et les résistances vasculaires périphériques totales (TPR).

$$PA = Qc \cdot RAS$$

(PA : pression artérielle, Qc : débit cardiaque, RAS : résistance artérielle systémique)

La pression maximale chez un sujet sain est de 100 mmHg à 140 mmHg. Cette pression permet de surmonter les forces hydrostatiques de gravité devenues importantes chez un organisme à posture dressée, afin d'assurer une ultrafiltration rénale plus efficace et un meilleur contrôle des débits locaux. Cependant, les organes ne reçoivent pas le même débit

sanguin. Ce dernier est régulé afin de diriger sélectivement le flux sanguin en fonction des besoins (effort musculaire, repos). Le tonus vasculaire et son contrôle sont directement liés à la structure des vaisseaux sanguins.

Les vaisseaux sanguins ont tous une architecture commune:

- Une **intima** : partie la plus interne de la paroi composée d'une monocouche losangée de **cellules endothéliales** d'axe longitudinal dans le sens de l'écoulement sanguin, et d'une couche de tissu conjonctif appelé **lame basale**. Les cellules endothéliales filtrent le passage des composants du sang. Elles synthétisent des substances vasodilatatrices (oxyde d'azote : NO, prostacycline, bradykinine), vasoconstrictrices (endothéline, angiotensine, thromboxane A2), antiagrégantes (prostacyclines) et fibrinolytiques (activateur du plaxminogène), ainsi que des facteurs de croissance. L'endothélium est au centre de la régulation du tonus vasomoteur artériel.
- Une **média** : partie intermédiaire de la paroi séparée de l'intima par la **limitante élastique interne** (LEI). Elle contient des **cellules musculaires lisses** (CML) responsables du tonus vasculaire, et une **matrice extracellulaire** constituée de collagène et d'élastine.
- L'**adventice** : partie externe de la paroi, séparée de la média par la **limitante élastique externe** (LEE). L'adventice est constitué de fibroblastes et d'un tissu conjonctif lâche formé de collagène et de fibres élastiques. Elle permet la fixation du vaisseau au tissu de voisinage et est parcourue de capillaires (vasa vasorum) permettant dans les vaisseaux de grand diamètre d'apporter des nutriments aux cellules les plus éloignées de la lumière.

La partie proximale de la microcirculation est constituée par le réseau artériolaire. Il existe des modèles biophysiques de la géométrie de la bifurcation vasculaire. Lorsque celui-ci est proche d'une structure arborescente, les divisions successives définissent les ordres d'artéioles (artéiole de 1^{er} ordre, de 2^e ordre, 3^e ordre et 4^e ordre). Il est d'usage de considérer pour les diamètres que statistiquement, le diamètre des artéioles de 1^{er} ordre est de 70 à 100 μm , de 2^e ordre de 40 à 60 μm , puis 15 à 30 μm pour le 3^e ordre, et 9 à 15 μm pour les artéioles de 4^e ordre. Une artéiole distale perfuse en moyenne une dizaine de capillaires.

Particularités anatomiques de la rétine :

La circulation rétinienne s'étend du nerf optique jusqu'à l'ora serrata. Il s'agit d'un réseau terminal sans possibilité de suppléance artérielle en cas d'occlusion. La vascularisation rétinienne émerge de l'artère centrale (diamètre : 200 μm), branche de l'artère ophtalmique, elle-même branche de l'artère carotide interne. Après le passage de la lame criblée, l'artère centrale de la rétine émerge au centre du nerf optique et se divise en une branche supérieure et une branche inférieure, chacune donnant une branche temporale et nasale. Chaque branche se distribue dans le quadrant correspondant en artères secondaires. Les artères secondaires se divisent par ramifications dichotomiques et par embranchements latéraux. Les capillaires bourgeonnent à partir des artéioles, formant des tubules de 5 à 6 μm de diamètre. Le réseau capillaire est organisé en 3 couches : 1 couche à la surface interne de la rétine dans la couche des cellules ganglionnaires, 1 couche dans la couche nucléaire interne, et 1 couche dans la couche plexiforme externe. Ces trois couches sont en étroites relation comme en témoignent les travaux chez la souris et le porc.(40,41) Les capillaires périfovéolaires anastomotiques connectent les artéioles terminales aux veinules, laissant une zone avasculaire de 400 à 500 μm de diamètre. D'un point de vue structural, l'artère centrale de la rétine perd sa couche élastique en passant la lame criblée.

Les artères rétiniennees sont donc composées de:

- **Une intima** : comprenant endothelium et couche sous-endothéliale.
- **Une média** : dont le nombre de couches de cellules musculaires lisses décroît de la papille à la périphérie, passant de 7 couches à deux.
- **Une adventice** : en contact étroit avec les processus des cellules gliales (astrocytes et cellules de Müller) formant la glie limitante, fonction de support

structural, trophique, et de maintien de l'étanchéité et de l'intégrité de la paroi vasculaire.

Le réseau veineux suit l'arrangement du réseau artériel pour former la veine centrale de la rétine (200 μm de diamètre), se drainant dans la veine ophtalmique puis le sinus caverneux. La structure de la paroi veineuse est similaire à l'artère avec une seule couche de cellule endothéliale, une média plus fine, et une adventice qui, au niveau des croisements artérioveineux, est commune à celle de l'artère. Au niveau des croisements artérioveineux, les vaisseaux les plus profonds parviennent à la couche plexiforme externe ou à la couche nucléaire externe.

L'anatomie des capillaires rétiens a fait l'objet d'études afin de mieux comprendre sa structure et son organisation dans l'espace. Il a été ainsi proposé par l'équipe du Pr Paques un modèle de structure en 2D et 3D des capillaires rétiens basés sur une étude *in vivo* de rétine de porc à l'aide d'un microscope confocal. (40–42)

Des études à partir d'OCT A (angiotomographie à cohérence optique) ont également pu mettre en évidence une structure en 3D de la microcirculation rétinienne humaine proche du modèle de porc.(43,44) Ainsi, la structure de la microcirculation rétinienne ressemblerait à des artères principales donnant des artères de second ordre traversant la couche des fibres nerveuses et se terminant exclusivement dans le plexus vasculaire superficiel (SVP), qui dichotomiserait le flux sanguin entre les capillaires péripapillaires radiaux (CPR) d'un côté et le plexus vasculaire intermédiaire (IVP) et profond (DVP) de l'autre. Chaque RPC serait fourni par un ou plusieurs capillaires du SVP et drainé vers le IVP ou le DVP. Le DVP serait une mosaïque d'anastomoses d'une largeur approximative de 300 à 600 μm , chacune étant drainée par une ou deux veinules reliées aux principales veines. Une direction présumée de l'écoulement pourrait être déterminée pour > 90% des capillaires. Un modèle de la circulation capillaire serait donc celui dans lequel les trois couches de microvaisseaux seraient organisées en série avec les RPC en parallèle entre les SVP et IVP ou DVP.

Le diamètre des capillaires est en moyenne de 2 à 7 μm , mais 50% des capillaires ont un diamètre inférieur à 4,5 μm .(39) Le nombre de capillaires dans le corps humain est d'environ 2×10^9 . Le réseau veinulaire est symétrique au réseau artériolaire et en moyenne de 20% plus gros en diamètre.

1.2.1.1.2 Loi de Hess-Murray :

La loi de Hess-Murray(45) relie le diamètre d'une branche artérielle mère à celui des deux branches filles :

$$d(z)^3 = d_1(z+1)^3 + d_2(z+1)^3$$

Cette loi exprime une condition d'optimalité de répartition du flux en hydrodynamique. Selon Hess, le principe est de maximiser la distribution, et donc minimiser la résistance hydrodynamique, en minimisant les coûts. Ainsi, la taille des vaisseaux doit diminuer d'un facteur constant h à chaque génération, avec $h=2^{-1/3}\approx 0.79$. Murray aboutit également à ce facteur d'homothétie optimal en émettant l'hypothèse selon laquelle les sections et les angles des ramifications sont tels que la circulation qui s'y effectue obéit à un « principe de moindre travail ». Il a supposé que deux termes d'énergie contribuaient au coût du maintien du flux sanguin dans n'importe quelle section de tout vaisseau ;

- l'énergie nécessaire pour surmonter la traînée visqueuse dans un fluide obéissant à la loi de Poiseuille ;
- l'énergie métaboliquement nécessaire pour maintenir le volume du tissu sanguin et vasculaire impliqué dans le flux.

Pour exprimer le travail W déployé par le flux dans un vaisseau, Murray a pris en compte la force de freinage due à la viscosité du sang ainsi que l'énergie nécessaire au niveau métabolique pour maintenir le volume de sang dans les vaisseaux. Il a obtenu l'expression suivante :

$$W = \frac{32\eta l J^2}{\pi d^4} + \frac{m\pi d^2 l}{4} \quad (1)$$

où η est la viscosité du sang, m un coefficient métabolique, J le flux sanguin, d le diamètre du vaisseau sanguin, l la longueur de la portion du vaisseau. En minimisant W en fonction de d , par dérivation, on obtient l'expression du flux en fonction du diamètre :

$$J = \frac{\pi}{4} \sqrt{\frac{m}{\eta}} \left(\frac{d}{2}\right)^3 \quad (2)$$

Par conservation du flux dans une bifurcation, on a $J_0 = J_1 + J_2$, où J_0 , J_1 et J_2 sont respectivement les flux dans la branche parent et les deux branches filles. La relation qui en résulte, appelée loi de Murray, indique que le cube du diamètre du vaisseau parent est égal à la somme des cubes des diamètres des vaisseaux fils. Cette relation peut être exprimée comme :

$$d_0^3 = d_1^3 + d_2^3 \quad (3)$$

où d_0 est le diamètre du vaisseau parent et d_1 et d_2 sont les diamètres des vaisseaux fils.

La géométrie du réseau vasculaire est un déterminant essentiel de son efficacité énergétique (Hess, Murray, Sherman).(45–47) Les principes de la loi de Murray ont été redécouverts et vérifiés *in vivo* seulement dans les années 70 (Zamir, 1979).(48) La proportionnalité de l'écoulement vers le cube du diamètre du récipient, qui est à la base de la loi de Murray, a été vérifiée dans les années 80 (Mayrovitz).(49) Des études théoriques plus récentes ont affiné ce modèle, déclarant que l'exposant radial X peut varier en fonction du régime d'écoulement (laminaire ou turbulent) (Uylings) et de la structure pariétale; petits vaisseaux résistifs tels que les artères rétinienne ayant un X optimal plus proche de 3 tandis que les grands vaisseaux élastiques un X optimal plus proche de 2,33 (Nakamura 2014).(50,51)

Le coefficient de jonction (résolution de $X : D0^x = D1^x + D2^x$, pour lequel la valeur attendue est 3) apparaît comme un moyen pratique d'évaluer la conformation d'un réseau microvasculaire aux lois de Murray, car il ne nécessite pas de mesure de débit. La figure 6 illustre les changements de X (coefficient de jonction) et de BC (coefficient de branchement) consécutifs à des changements de diamètres de vaisseaux dans une bifurcation optimale. Le coefficient de branchement correspond à la somme au carré des sections transversales des vaisseaux filles divisée par le carré de la section transversale du vaisseau mère, dont la valeur optimale théorique est de 1,26. La figure 3 montre que la variation du diamètre d'un vaisseau provoque des changements parallèles dans $\text{Log}X$, BC et la résistivité de l'écoulement. Par conséquent, la déviation de X de l'optimalité fournit une indication de la conductance de l'écoulement à une bifurcation particulière. Il est intéressant de noter que, même si les paramètres d'optimalité sont corrélés positivement à la résistivité au flux, ils ne présument pas d'une tonicité microvasculaire en soi. Par exemple, la vasodilatation des vaisseaux parents et fils a des effets opposés sur l'optimalité.

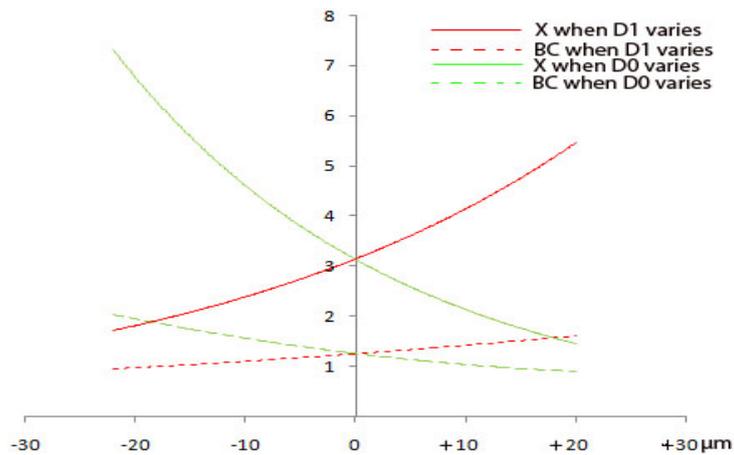


Figure 3: Relation mathématique entre les variations du diamètre des vaisseaux sur les paramètres d'optimalité (LogX et BC) à une bifurcation optimale avec $D_0 = 100$ et $D_1 = D_2 = 79,37\mu\text{m}$. Pour chaque courbe, un seul diamètre de vaisseau a été modifié (D_0 ou D_1).

Cela montre également que lors de la mesure de X, la précision est primordiale. Des études antérieures sur l'optimalité de la rétine ont été obtenues avec des photographies de fond d'oeil classiques, dont la résolution est proportionnelle à la taille des vaisseaux. Le flou peut donc avoir altéré la précision des mesures. L'imagerie rétinienne haute résolution in vivo utilisant l'optique adaptative (AO) permet une résolution transversale d'environ $2\ \mu\text{m}$, d'où une plus grande précision dans la segmentation de la lumière du vaisseau (Koch).(52)

1.2.1.1.3 Bases hémodynamiques :

L'appareil cardiovasculaire assure la circulation du sang pour véhiculer oxygène et nutriments vers les cellules et en évacuer les déchets. Le rôle du cœur est d'assurer un débit sanguin permettant cela. Ce débit est fourni sous une certaine pression. La pression artérielle permet, par le biais des résistances, l'ajustement de la distribution sanguine dans chaque organe en fonction de ses besoins propres sans compromettre l'équilibre général. On définit la pression artérielle PA par le produit du débit cardiaque (Q_c) et de la résistance circulatoire périphérique totale (RPT) :

$$PA = RPT \times Q_c$$

Certaines lois sont utilisées pour décrire le système cardiovasculaire. Ainsi, on utilise pour décrire :

- la fonction cardiaque : la loi de Starling.
 - la fonction cardiovasculaire : le graphique de Guyton.
 - la fonction vasculaire : le modèle de Windkessel.
- *Loi de Starling* : modèle cœur-poumon isolé communément utilisé pour expliquer que la force de contraction du ventricule en systole dépend de sa pression de remplissage en diastole. Par exemple, lors de l'orthostatisme, le changement de position entraîne une baisse de la pression veineuse centrale d'où une diminution de la force d'éjection systolique ventriculaire, et donc une baisse du débit cardiaque qui aboutit à une chute transitoire de la pression artérielle.
 - *Graphique de Guyton* : basé sur la combinaison de la courbe de la fonction vasculaire (la pression veineuse centrale diminue si le débit cardiaque augmente) et la courbe de la fonction cardiaque d'après la loi de Starling (l'augmentation de la pression veineuse centrale augmente le débit cardiaque par élévation de la force d'éjection systolique). L'appareil cardiovasculaire trouve un équilibre correspondant à l'intersection de ces deux courbes.(53,54) En cas d'hypovolémie, la baisse de la pression veineuse entraîne une chute du débit cardiaque. La vasoconstriction réhausse la courbe vasculaire, l'effet inotrope positif réhausse également la courbe cardiaque permettant de ramener la pression artérielle à la normale.
 - *Modèle de Windkessel* : ce modèle décrit par Stephen Hales en 1769 compare le système cardiovasculaire à celui d'une pompe à incendie : le cœur est la pompe à fonctionnement intermittent, le secteur veineux est le réservoir et les artères le réseau de distribution. Le réseau artériel étant élastique, il emmagasine l'augmentation de pression pendant la systole et le restitue durant les alternances de pompage, d'où un écoulement continu. Lors d'une systole, une partie du volume éjecté est stocké grâce à la distensibilité de la paroi artérielle aortique, l'aorte revenant à sa position de base en restituant le volume stocké. Ce mécanisme se propage de proche en proche, constituant l'onde de pouls (ou onde artérielle). La vitesse de propagation de l'onde de pouls est un témoin de l'état de la paroi artérielle et reflète son élasticité : elle s'accélère lorsque la paroi artérielle devient rigide (âge, hypertension artérielle, artériosclérose, etc.).

Particularités hémodynamiques dans la rétine :

Le flux sanguin rétinien Q mesuré dans les vaisseaux principaux de la rétine varie en fonction du diamètre D des vaisseaux selon la formule

$$Q = D^{2,76 \pm 0,16} \text{ pour les artères (D entre 39 } \mu\text{m et 134 } \mu\text{m)}$$

$$Q = D^{2,84 \pm 0,12} \text{ pour les veines (D entre 64 } \mu\text{m et 177 } \mu\text{m)}$$

Chez le sujet sain, le flux sanguin rétinien total varie entre 30 et 80 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Cependant, ce flux semble varier selon la localisation rétinienne : deux à trois fois plus élevé dans la région temporale que nasale, lié à une différence de taille et un taux métabolique plus élevé de la rétine temporale. Ce flux semble identique entre la rétine inférieure et supérieure.(55)

La pression de perfusion moyenne oculaire est quant à elle donnée par la formule suivante :

$$\text{PPm oculaire} = \text{PAOm} - \text{PVO}$$

$$\text{soit PPm oculaire} = 2/3 [\text{PA}_{\text{diast}} + 1/3 (\text{PA}_{\text{syst}} - \text{PA}_{\text{diast}})] - \text{PIO}$$

PPm : pression de perfusion moyenne, PAOm : pression moyenne de l'artère ophtalmique,

PVO : pression veineuse oculaire proche de la valeur de la PIO, PIO : pression intraoculaire,

PA_{syst} et PA_{diast} : pressions artérielles humérales pendant la diastole et la systole.

Différents mécanismes peuvent réguler ce flux sanguin rétinien :

1. L'autorégulation du débit sanguin a pour but de maintenir constant le débit en dépit des variations modérées de la PPm. Il s'agit d'un processus local et la rétine, dépourvue d'innervation sympathique et non influencée par des hormones, est idéale pour l'étude de cette autorégulation. Lors des variations de la PPm, le débit est maintenu par des modifications de la résistance moyenne grâce à des changements d'état de contractilité des artérioles et des péricytes capillaires. La PIO augmentée va entraîner une diminution de la PPm, mais aussi l'élévation de la pression artérielle systémique.
2. Le test au froid permet d'augmenter de 15% la pression artérielle moyenne, entraînant en raison d'un mécanisme d'autorégulation myogénique une élévation de 50% du flux sanguin rétinien suivi d'un retour rapide aux valeurs de base.
3. Le mécanisme myogénique dans l'autorégulation des débits sanguins de la rétine entre en jeu lors de modifications de la pression vasculaire transpariétale. Celui-ci dépend de l'endothélium. Ainsi, une augmentation de la pression vasculaire transpariétale entraîne la libération de substances aboutissant à une vasoconstriction.(56) L'étirement par

l'augmentation de la pression transpariétale des cellules musculaires lisses aboutit à une contraction grâce à l'activation de canaux calciques à voltage L par exemple.(57)

4. La réactivité à l'oxygène est responsable d'une vasoconstriction artérielle et veineuse.(58) Cela entraînerait un ralentissement du flux sanguin rétinien pour maintenir constante la concentration d'oxygène dans la rétine interne.

1.2.1.1.4 Aspects hémorhéologiques :

Le sang possède des propriétés qui le distinguent d'un simple fluide newtonien. Ces propriétés sont notamment liées aux globules rouges, aux globules blancs, et au plasma. Les grandes règles de la mécanique des fluides ont été décrites par différentes lois :

- *Loi de Poiseuille* : loi permettant de calculer le débit d'un fluide simple (eau, alcool) dans un tube en verre :

$$Q = \frac{\Delta P \pi r^4}{8L\eta}$$

Q : débit du liquide, ΔP : différence de pression entre l'entrée et la fin du tube, r : rayon du tube, L : longueur du tube, η : viscosité du fluide.

Parmi les limites de cette loi, on peut citer le fait que le sang est un fluide non newtonien à la fois viscoélastique et thixotrope (dont la viscosité n'est pas constante), mais aussi l'existence d'une activité vasomotrice des vaisseaux sanguins.

- *Théorème de Bernoulli* : L'énergie mécanique développée pour l'écoulement du sang est la somme de la pression hydrostatique P, de l'énergie potentielle de gravité, et de l'énergie cinétique :

$$E_m = P + \rho gh + \rho V^2/2$$

avec P : pression hydrostatique, ρ : la densité, g : l'accélération de la pesanteur, h : la hauteur, V : la vitesse d'écoulement. Ainsi, lorsqu'il existe une sténose d'une artère, la vitesse circulatoire V augmente et l'énergie cinétique s'accroît (effet Venturi). La somme restant constante et l'altitude ne variant pas, c'est donc la pression P qui diminue. En amont et en aval de la sténose, la pression est élevée, dans la sténose, la pression est diminuée, d'où des contraintes mécaniques sur la sténose. Inversement, en

cas d'une dilatation, anévrisme, la pression à l'intérieur est augmentée et tend à faire accroître cette dilatation.

- *Nombre de Reynolds* : l'écoulement sanguin est laminaire : formé de couches liquidiennes concentriques glissant parallèlement les unes aux autres selon un profil parabolique le plus souvent (vitesse nulle au niveau de la paroi, et maximale au centre). Cependant, en dessous d'un seuil, l'écoulement devient turbulent, composé de vecteurs vitesse désordonnés, avec une perte d'énergie significative. Ce seuil est défini par le nombre de Reynolds :

$$Re = VD\rho / \eta$$

avec V : la vitesse d'écoulement, D : diamètre du vaisseau, ρ : la densité, η : la viscosité sanguine. Ainsi, en cas de sténose, l'augmentation de vitesse et l'augmentation du diamètre en aval favorisent la turbulence, de même en cas d'anémie (par diminution de la viscosité). Chez l'Homme, le nombre critique de Reynolds est voisin de 2000.

- *Effet Fåhræus-Lindqvist*(54) : cet effet s'applique aux vaisseaux sanguins dont le diamètre est compris entre 8 μm et 300 μm . Pour un diamètre de tube inférieur à 300 μm , la viscosité du sang décroît avec le diamètre du tube. Pour un tube de diamètre inférieur à 5 μm , la viscosité augmente quand le diamètre diminue : c'est le phénomène d'inversion de Fåhræus-Lindqvist.

In vivo, la résistance à l'écoulement dans un microvaisseau dépend donc essentiellement de la viscosité du sang, de la longueur et du rayon du vaisseau, mais aussi du taux de cisaillement aux parois qui est influencé par les propriétés du glycocalyx et des macromolécules associées. Ainsi, le sang est un fluide non newtonien : fluide dont la viscosité diminue avec l'augmentation de la vitesse/contrainte de cisaillement, viscoélastique : avec un seuil d'écoulement en dessous duquel le sang ne peut pas s'écouler, et thixotrope : la viscosité du sang évolue au cours du temps. Ces propriétés biophysiques sont liées notamment à la capacité des globules rouges à s'agréger à faible vitesse de cisaillement et à se déformer à vitesse de cisaillement élevée. Les paramètres définissant l'hémodynamique microvasculaire sont à la fois : les caractéristiques géométriques du réseau (pouvant répondre aux lois de Murray, au cylindre de Krogh, à la géométrie fractale), la relation entre le débit et la perte de charge (notion de viscosité apparente décrite avec l'effet Fåhræus-Lindqvist), et l'effet de

séparation de phase aux bifurcations. A ceci s'ajoute des systèmes de régulation permettant l'adaptation des apports sanguins selon les besoins.

1.2.1.1.5 Systèmes de régulation :

Il existe deux grands niveaux de régulation du système cardiovasculaire : un niveau central, et un niveau vasculaire local.(1,59)

Le contrôle central est principalement lié à la régulation de la pression artérielle. Celle-ci est le produit de la résistance circulatoire périphérique totale par le débit cardiaque. Ainsi, les systèmes de contrôle centraux vont agir sur le débit, produit de la fréquence cardiaque par le volume d'éjection systolique, et sur les résistances périphériques. Parmi ces systèmes on peut retrouver :

- Le système nerveux sympathique : agit par les récepteurs β_1 sur le cœur sur la contractilité et la fréquence, et sur le réseau vasculaire périphériques par les récepteurs α vasoconstricteur.
- Le système parasympathique : ses effets, inotrope et chronotrope négatif, sont essentiellement sur l'atrium cardiaque et le tissu nodal et médié par l'acétylcholine.

La régulation locale des microvaisseaux peut s'effectuer sur deux niveaux :

- A court terme : la régulation passe par une régulation du débit sanguin, des résistances et du diamètre des vaisseaux, mais aussi du nombre de capillaires « fonctionnels »
- A long terme : la régulation de la microcirculation passe par une régulation du nombre de capillaires soit par raréfaction « structurale » microvasculaire, soit par angiogenèse, et aussi par remodelage artériel.

Le contrôle vasculaire local est réalisé sur la vasomotricité essentiellement sous plusieurs aspects :

- *La mécanosensibilité* : propriété des cellules endothéliales et musculaires lisses. Les contraintes mécaniques sont : radiale (distention du vaisseau), pariétale (étirement de

la paroi), et longitudinale (forces de friction des cellules sanguines sur la paroi endothéliale). Cette propriété permet à l'endothélium de maintenir le débit sanguin des tissus et l'intégrité du vaisseau, en élaborant des réponses adaptées.

- *Le tonus myogénique* : c'est une propriété intrinsèque du muscle vasculaire lisse qui se contracte en réponse à un étirement. Il est indépendant de toute influence neurohumorale. Ce tonus est faible au niveau des gros vaisseaux, et augmente au fur et à mesure que le diamètre diminue. Au niveau des artérioles, il est tellement important qu'il entraîne un rétrécissement substantiel de la lumière vasculaire voire même une occlusion complète.
- *Les réponses débit-dépendantes* : elles mettent en jeu les forces de cisaillement s'exerçant sur la surface endothéliale. Ces réponses sont liées à des agents vasorelaxants (NO, EDHF, prostaglandines) agissant sur l'endothélium.
- *Les facteurs métaboliques locaux* : la diminution de l'O₂, l'augmentation du CO₂, l'augmentation des ions K⁺ et H⁺, entraînent une vasorelaxation à l'origine de l'hyperhémie que l'on peut observer en cas d'ischémie ou d'exercice physique.
- *L'auto-régulation* : elle est la résultante des différents mécanismes vus ci-dessus. C'est une propriété intrinsèque du vaisseau dont le rôle est de maintenir le débit sanguin constant.
- *Vasomotion* : il existe une vasomotion spontanée des microvaisseaux. Celle-ci est supprimée en cas d'anesthésie ou de traumatisme. Elle est de grande amplitude (50 à 100% du diamètre) et de haute fréquence (5-25 cpm) pour les vaisseaux de petits diamètres (30 µm), mais est de plus petite amplitude (5 à 20% du diamètre) et moins fréquent (0,3 à 3 cpm) pour les artérioles de diamètre intermédiaire (30-80 µm)(60).
- *La régulation neuronale locale* de la microcirculation est principalement médiée par les récepteurs adrénérgiques.

Ces grands principes de la microcirculation humaine rendent compte de la complexité du système microvasculaire. On comprend aisément que les remaniements observés au cours de différentes situations, physiologiques ou pathologiques sont multiples et leur interprétation difficile. La multiplication des observations réalisées au cours de différentes maladies vasculaires, mais aussi au cours de différentes situations physiologiques, permettra progressivement de faire ressortir des grands principes de fonctionnement de la microcirculation humaine.

Particularités de la rétine :

Les vaisseaux rétiniens sont dépourvus d'innervation par le système nerveux autonome. Cependant, des récepteurs α - et β -adrénergiques et des récepteurs pour l'angiotensine II ont été identifiés dans la tête du nerf optique et au niveau des fibres axonales rétiniennes. Leur signification n'est pas encore définie. Le système sympathique est distribué sur le lit vasculaire de la choroïde et de l'artère centrale de la rétine jusqu'à la lame criblée.

D'autres mécanismes de régulation ont lieu au niveau de l'endothélium vasculaire. Ses fonctions comprennent le contrôle du tonus vasculaire, de la perméabilité endothéliale, l'agrégation plaquettaire mais aussi l'adhésion des plaquettes et des leucocytes, la prolifération des cellules musculaires lisses et la régulation de la fibrinolyse. Le tonus vasculaire est régulé par de nombreux facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs endothéliaux (figure 4). Les facteurs vasoconstricteurs sont principalement composés du thromboxane A_2 , des anions superoxydes, de l'endothéline-1, de la prostaglandine H_2 et de l'angiotensine II. Les trois principaux facteurs vasorelaxants sont le monoxyde d'azote NO, la prostacycline ou PGI_2 , et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ou EDHF.

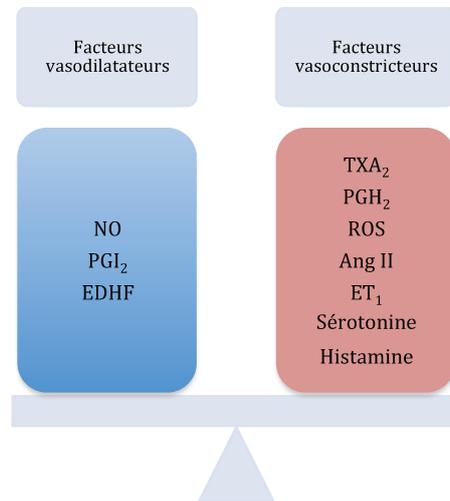


Figure 4 : Facteurs modulant le diamètre vasculaire.

1.2.2 La microcirculation lors de l'HTA

Le réseau artériolaire représente 45 à 50% de la résistance périphérique totale, et 25 à 30% pour le réseau capillaire.(61,62) C'est à ce niveau que de faibles changements fonctionnels ou structuraux entraînent des variations importantes de pression. D'un point de

vue fonctionnel hémodynamique, il est établi que le versant artériel de la microcirculation représente l'essentiel des vaisseaux de résistance : la plus grande partie de la diminution de pression sanguine entre les grosses artères et les veines se produit au niveau des artérioles précapillaires. Le contrôle vasomoteur (relaxation et contraction vasculaires) est responsable de l'adaptation rapide du diamètre de la lumière, tandis que les modifications des propriétés structurelles de la paroi vasculaire constituent un processus à long terme en réponse aux modifications hémodynamiques. Au départ, les changements structurels sont adaptatifs, mais avec le temps, ils deviennent inadéquats, ce qui entraîne des modifications de l'épaisseur du matériau ainsi que du diamètre de la lumière.(63) Ce processus est appelé «remodelage vasculaire» et contribue à l'HTA.(64) Le tonus myogénique a pour but en réduisant le calibre des artérioles de protéger les capillaires d'une hypertension locale qui pourrait entraîner une filtration de plasma à travers la paroi et des hémorragies. Cependant, le rétrécissement voire la fermeture des artérioles précapillaires, en diminuant la contrainte pariétale et donc la production de NO, antiapoptotique, entraîne l'involution de ces vaisseaux et contribue ainsi à l'augmentation des résistances périphériques et de la pression artérielle.(1)

Les changements dans le rapport entre l'épaisseur de la média et le diamètre de la lumière dans l'HTA impliquent une combinaison de deux processus, définis comme le remodelage eutrophique et hypertrophique.(65) Dans le remodelage eutrophique, trouvé dans l'HTA primaire, le diamètre externe du vaisseau et le diamètre de la lumière sont réduits tandis que la surface de la section transversale de la média n'est pas altérée (même quantité totale de tissu de la paroi), comprenant un rapport de média sur lumière augmenté, correspondant à un remodelage centripète, et aussi une raréfaction capillaire.(2) Un remodelage eutrophique a été observé au début d'une HTA légère, suivie séquentiellement d'un dysfonctionnement endothélial et, plus tard, d'une hypertrophie cardiaque.(66) Dans les études sur les petits vaisseaux résistants du tissu sous-cutané de sujets hypertendus, le rapport entre l'épaisseur de la paroi artérielle et le diamètre de la lumière a augmenté entre 26% et 62%.(2,66) Ce remodelage semble toutefois prédominant pour les artères de calibre > 100 μm , moins important entre 10 et 100 μm , et nul en dessous de 10 μm .(67) D'importance potentielle sur le plan clinique, l'augmentation du rapport média sur lumière est associée à une augmentation du taux d'événements cardiovasculaires chez l'homme.(68)

Dans l'hypertension artérielle secondaire, les artères de résistance sont caractérisées par un remodelage hypertrophique : épaissement de la média, diminution de la lumière,

augmentation de la quantité totale de tissu de la paroi liée à une hypertrophie des cellules musculaires lisses.(69)

1.3 Les méthodes d'étude de la microcirculation

1.3.1 Étude de la microcirculation générale

La méthode de référence pour l'étude des petites artères est la biopsie de tissu sous cutané glutéal d'où sont disséquées des artérioles qui sont ensuite montées sur un myographe. Le premier myographe fut développé par Bevan et Osher en 1972. Ce myographe consistait à stimuler une artériole de 200µm montée sur 2 câbles fins clampés à chaque extrémité ce qui garantissait que la réponse observée était isométrique.(70) Depuis, plusieurs types de myographes ont été inventés permettant l'analyse d'artérioles plus petites, l'analyse de réponse force/vitesse ou le contrôle de la pression intra-artériolaire par sa canulation. Mulvany a proposé l'analyse du diamètre du vaisseau avec une réponse isométrique maximale. C'est avec cette méthode qu'ont été faites les observations sur le remodelage des artérioles dans l'hypertension complété par la suite par la microscopie électronique.(71,72) Son caractère invasif et difficilement utilisable à grande échelle explique qu'il n'existe pas de données prospectives montrant que les altérations observées avec le myographe soient corrélées à un sur-risque cardiovasculaire.

1.3.2 Étude de la microcirculation rétinienne

- Rétinophotographie :

En clinique, le processus de remodelage des petits vaisseaux est mal connu du fait des difficultés de son observation. Seul le réseau rétinien est facilement accessible. Les photographies du fond d'œil permettent en effet d'observer la colonne sanguine de vaisseaux rétiniens, qui ont moins de 200 microns de diamètre. Cependant, la paroi de ces vaisseaux n'est pas visible. De ce fait, la quantification des lésions microvasculaires rétiniennes n'est pas satisfaisante à ce niveau.

La classification de l'atteinte oculaire dans l'HTA la plus utilisée est celle élaborée par Keith et Wagener en 1939, se basant sur la présence de rétrécissement du calibre artériel et sur la

présence de signes d'obstruction veineuse.(73) De larges études épidémiologiques ont montré que la diminution du calibre artériel des vaisseaux rétiniens est associée à un risque plus important de développer une HTA, et même à un risque d'accident vasculaire cérébral lacunaire (figure 5).(15, 66, 74–77) Cependant, l'absence de mesure directe de la paroi rétinienne explique probablement pour une large part les faibles corrélations retrouvées dans ces études.



Figure 5 : rétinopathie hypertensive stade 3
(classification de Keith et Wagener)

- Scanner Laser Doppler Flow (SLDF):

Il a été démontré que le scanner laser doppler (SLDF) permet une mesure indirecte de l'épaisseur pariétale vasculaire rétinienne.(76) Le principe du SLDF est basé sur la mesure du diamètre externe du vaisseau par réflectivité des tissus et la mesure du diamètre interne par effet Doppler ; la différence entre les deux mesures reflète l'épaisseur pariétale. Il a été rapporté au cours de l'HTA une augmentation du rapport paroi-lumière artériel indépendamment des autres risques cardiovasculaires.(78) Cependant, le SLDF présente une limite de résolution spatiale d'environ 5 à 10 microns et une variabilité interobservateur assez élevée, de l'ordre de 10%.(77) Il ne permet pas non plus une analyse focale.

- Ophtalmoscopie par optique adaptative :

Une nouvelle technique d'imagerie basée sur l'optique adaptative, technique largement développée en astronomie, qui consiste à mesurer et corriger en temps réel les aberrations liées à la traversée de la cornée et du cristallin par la lumière émise et rétrodiffusée.(79,80)

Lorsque la lumière se propage à travers un support optiquement imparfait, la forme des ondes lumineuses est affectée par les distorsions qui rendent les images floues. L'OA est une technique qui élimine les distorsions des ondes lumineuses. La plupart des systèmes OA

reposent sur trois composants clés qui fonctionnent ensemble dans une configuration de rétroaction en boucle fermée (figure 6):

1. Un capteur de front d'onde qui mesure de manière répétitive les déformations de forme dans les ondes lumineuses;
2. Un miroir déformable qui remodèle constamment sa surface réfléchissante afin de compenser les distorsions de la lumière;
3. Algorithmes informatiques qui traitent les informations du capteur et pilotent le miroir déformable.

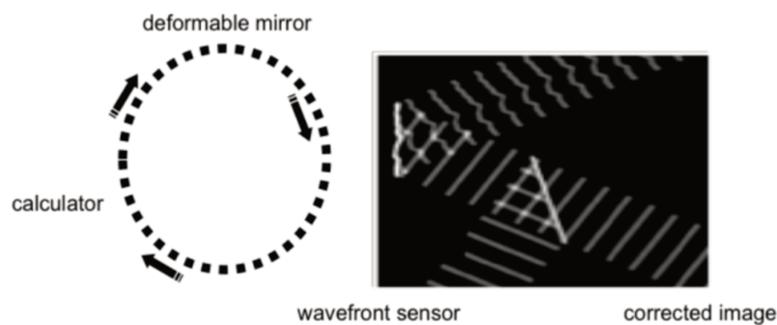


Figure 6. Principe de l'optique adaptative : le front d'onde est corrigé par le système modulateur (miroir déformable) qui en épouse la forme. Il est ensuite renvoyé en partie vers l'analyseur de front d'onde qui en mesure l'écart à la planéité et en déduit la commande à appliquer au miroir déformable.

Cette technologie a permis d'augmenter la résolution latérale des images du fond d'œil aux alentours de $1,6 \mu\text{m}$. Ceci permet la visualisation de la paroi artérielle in vivo (figure 7).

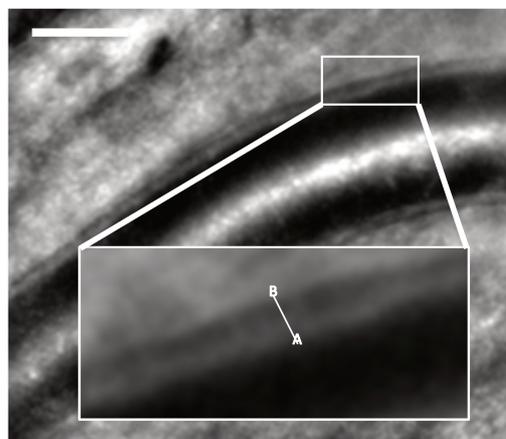


Figure 7 : Artériole rétinienne vue en optique adaptative (barre d'échelle : $130 \mu\text{m}$) avec magnification de la paroi (ligne A à B va de la lumière en noire, inclus la média en gris et s'arrête à l'adventice : trait noir).

2 Etude de la morphométrie vasculaire rétinienne par imagerie en optique adaptative

2.1 Plan général des travaux :

Le rôle majeur de la microcirculation dans l'organisme et l'intérêt de son phénotypage dans les maladies cardiovasculaires rend tout particulièrement intéressant l'étude *in vivo* des vaisseaux rétiens facilement observables. L'utilisation de l'OA en imagerie médicale et plus spécifiquement en ophtalmologie, nous a donc amené à revisiter les différents phénotypes des vaisseaux rétiens afin de mieux comprendre la pathogénie des lésions observées, mais aussi d'extraire des biomarqueurs potentiellement intéressants pour le suivi des patients.

Dans ce but de décrire les différents phénotypes vasculaires rétiens, la première étape est de valider la méthode de mesure qui utilise à la fois une nouvelle technique d'imagerie à haute résolution par OA, mais aussi un nouveau logiciel d'analyse d'image extrayant des données morphométriques vasculaires, conçu par l'Institut Supérieure d'Electronique de Paris. Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2013 dans *Annales de cardiologie et d'angéologie* (article n°1) et a été réalisé avec l'équipe de l'unité de prévention des maladies cardiovasculaires du Pr Girerd.

Une fois la méthode de mesure validée, nous avons phénotypé les vaisseaux rétiens d'un échantillon de sujets sains (n=20) et de sujets hypertendus (n=30). Nous avons ainsi décrit les différents paramètres vasculaires mesurables tel que la lumière artériolaire (ID : inner diameter), le diamètre artériolaire total (OD : outer diameter), l'épaisseur pariétale artériolaire (Wall), le rapport paroi sur lumière artérielle (WLR : wall to lumen ratio), et le diamètre veineux (VD). Nous avons ainsi pu définir des caractéristiques des changements observés au cours de l'HTA et mesurables au niveau des vaisseaux rétiens *in vivo*. Nous avons ainsi décrit l'effet de la pression artérielle sur l'épaisseur pariétale. Il nous a été permis d'observer au cours de cette étude des vasoconstrictions focales artériolaires sans épaissement pariétal, nous permettant d'avancer l'hypothèse d'une vasomodulation locale et focale dans la rétine. Nous avons pu ainsi démontrer que le WLR était un biomarqueur intéressant pour évaluer les effets de l'HTA sur la microcirculation rétinienne. Ce travail a été publié en 2015 dans la

revue scientifique Journal of Hypertension (article n°2) et a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr Girerd pour le recrutement des patients hypertendus.

Nous avons ensuite étudié plus précisément les croisements artérioveineux dans l'HTA afin de mieux comprendre les mécanismes responsables du rétrécissement de calibre veineux lors de ces croisements. Ceci nous a amené à découvrir des croisements artérioveineux avec rétrécissement du calibre veineux sans contact direct ni compression entre l'artère et la veine. Nous avons phénotypé les croisements artérioveineux chez des sujets sains et hypertendus. Ceci nous a permis d'étayer l'hypothèse d'une vasomodulation focale des artérioles rétiniennes et des veinules évoquées lors de l'observation des vaisseaux rétiniens dans l'HTA. Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2015 dans JAMA Ophthalmology.

Après s'être intéressés à l'HTA, nous avons élargi le champ d'étude à d'autres maladies cardiovasculaires et plus spécifiquement aux infarctus cérébraux. Un certain nombre d'entre eux, environ 30% selon les études, seraient liés à une maladie des petites artères et responsables d'AVC lacunaires. Nous avons donc étudié la morphométrie des artérioles rétiniennes dans un échantillon de patients (n=31) ayant eu un infarctus cérébral récent (<7 jours). Ce travail a été réalisé en partie au centre hospitalier de Versailles où les patients de l'unité de neurovasculaire du Pr Pico ont été recrutés durant leur hospitalisation. Nous avons recherché des différences phénotypiques entre les artérioles rétiniennes de patients ayant un infarctus et des patients normaux. Nous avons également phénotypé les artérioles rétiniennes des patients présentant un AVC selon les causes de l'infarctus. Cette étude fait l'objet d'un article en cours de rédaction.

Dans le cadre de notre travail, outre la morphométrie vasculaire rétinienne que nous avons cherché à explorer dans différentes pathologies, nous avons également étudié la faisabilité de tests sur la vasomodulation artérielle rétinienne. Pour cela, nous avons essayé différents tests vasoconstricteurs (test au froid, test d'hyperoxie, inhibiteur de tyrosine kinase) et des tests vasodilatateurs (test de stimulation lumineuse intermittente, inhibiteur calcique). Ceci nous a amené à proposer à la société Imagine Eye d'intégrer à leur caméra un test de Flicker afin d'étudier sur un plus large échantillon de patients les effets de ce test. Des résultats partiels sont exposés dans cette thèse validant la possibilité d'étude de la vasomodulation artériolaire rétinienne. Ceci permettra d'enrichir le phénotypage de la microcirculation rétinienne et de proposer pour chaque pathologie un phénotype de morphométrie et de réactions aux tests dynamiques des artérioles rétiniennes. D'autres travaux sont en cours dont une étude sur le

test Flicker sur une plus grande cohorte de sujet et sur l'ensemble de la longueur du vaisseau. Ceci permettra d'affiner le phénotypage vasculaire pour permettre au final de donner la morphométrie spécifique rencontrée au cours d'une maladie, la réactivité aux tests vasomodulateur, l'organisation de l'arbre vasculaire en fonction du flux sanguin... Tous ces éléments sont autant de biomarqueurs potentiels de la microcirculation dont certains au fil du temps apparaitront plus pertinents que d'autres pour caractériser une maladie vasculaire.

2.2 1^{er} article: Imagerie des artérioles rétinienne par optique adaptative, faisabilité et reproductibilité. (article issu du master 2)

Rosenbaum D, Koch E, Girerd X, Rossant F, Paques M. Retinal arteries imaging by adaptive optics, feasibility and reproducibility. Annales de cardiologie et d'angéiologie, 2013.

Résumé :

L'ophtalmoscopie utilisant l'optique adaptative est une nouvelle technique non invasive permettant d'obtenir une imagerie des vaisseaux rétinien dont la résolution de deux microns autorise la mesure du diamètre et de l'épaisseur des artérioles. Après un travail de master 2 (Koch, 2011) évaluant la reproductibilité de la méthode d'étude morphométrique des vaisseaux rétinien, une deuxième étude a été menée pour confirmer ces résultats. L'objectif de cette étude a été d'évaluer la faisabilité et la reproductibilité de la méthode en clinique chez l'homme.

Chez 23 sujets avec une hypertension artérielle non traitée et chez 14 sujets sains, les artères rétinienne ont été visualisées par optique adaptative et l'analyse des images a été automatisée permettant la mesure du diamètre interne et de l'épaisseur pariétale sur un segment artériolaire de l'artère rétinienne temporale. À partir de ces paramètres, le rapport paroi/lumière (wall to lumen ratio [WLR]) et la surface cross-sectionnelle de la paroi du vaisseau (wall cross sectional area [WCSA]) sont calculés. La reproductibilité intra-observateur a été évaluée en réalisant trois acquisitions consécutives chez 14 sujets. La reproductibilité inter-observateur a été évaluée en réalisant deux lectures indépendantes chez 17 sujets. Le coefficient de variation (CV) a été calculé comme SD/moyenne. Une comparaison des paramètres de l'artériole rétinienne entre les sujets hypertendus et les sujets sains a été réalisée.

Chez les 14 sujets sains, pour un diamètre interne de $56,1 \pm 9,6 \mu\text{m}$ le WLR est à $0,259 \pm 0,035$. La reproductibilité inter-observateur indique un CV à 1,3 % pour le diamètre interne, à 3,7 % pour le WCSA et à 3,2 % pour le WLR. La reproductibilité intra-observateur indique un CV à 3,2 % pour le WLR. Chez les hypertendus le WLR est significativement plus élevé ($0,348 \pm 0,071$; $p < 0,05$) alors que le diamètre interne est comparable.

Conclusion :

L'imagerie microvasculaire par optique adaptative est donc reproductible, robuste, et permet de quantifier le remodelage des petites artères et de suivre les patients sous traitement.

L'imagerie rétinienne par OA est un outil potentiellement intéressant pour le suivi thérapeutique des patients hypertendus.

Article original

Imagerie des artérioles rétinienne par optique adaptative, faisabilité et reproductibilité

Retinal arteries imaging by adaptative optics, feasibility and reproducibility

D. Rosenbaum^{a,*}, E. Koch^b, X. Girerd^a, F. Rossant^c, M. Pâques^b

^a Unité de prévention des maladies cardiovasculaire, hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, 47-83, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

^b Centre d'investigation clinique 503, Centre hospitalier national des Quinze-Vingts, université Pierre-et-Marie-Curie-Paris 6, 75571 Paris, France

^c Institut supérieur d'électronique, 75006 Paris, France

Reçu le 25 avril 2013 ; accepté le 27 avril 2013

Disponible sur Internet le 29 mai 2013

Résumé

Objectifs. – L'optique adaptative est une nouvelle technique non invasive permettant d'obtenir une imagerie des vaisseaux rétinienne dont la résolution de deux microns autorise la mesure du diamètre et de l'épaisseur des artérioles. L'objectif de cette étude a été d'évaluer la faisabilité et la reproductibilité de la méthode en clinique chez l'homme.

Méthodes. – Chez 23 sujets avec une hypertension artérielle non traitée et chez 14 sujets sains, les artères rétinienne ont été visualisées par optique adaptative et l'analyse des images a été automatisée permettant la mesure du diamètre interne et de l'épaisseur pariétale sur un segment artériolaire de l'artère rétinienne temporale. À partir de ces paramètres, le rapport paroi/lumière (*wall to lumen ratio* [WLR]) et la surface cross-sectionnelle de la paroi du vaisseau (*wall cross sectional area* [WCSA]) sont calculés. La reproductibilité intra-observateur a été évaluée en réalisant trois acquisitions consécutives chez 14 sujets. La reproductibilité inter-observateur a été évaluée en réalisant deux lectures indépendantes chez 17 sujets. Le coefficient de variation (CV) a été calculé comme SD/moyenne. Une comparaison des paramètres de l'artériole rétinienne entre les sujets hypertendus et les sujets sains a été réalisée.

Résultats. – Chez les 14 sujets sains, pour un diamètre interne de $56,1 \pm 9,6 \mu\text{m}$ le WLR est à $0,259 \pm 0,035$. La reproductibilité inter-observateur indique un CV à 1,3 % pour le diamètre interne, à 3,7 % pour le WCSA et à 3,2 % pour le WLR. La reproductibilité intra-observateur indique un CV à 3,2 % pour le WLR. Chez les hypertendus le WLR est significativement plus élevé ($0,348 \pm 0,071$; $p < 0,05$) alors que le diamètre interne est comparable.

Conclusion. – L'évaluation de la morphologie des artérioles rétinienne est faisable par l'optique adaptative. La reproductibilité inter- et intra-observateur est satisfaisante et compatible avec la réalisation d'études prospectives dans des pathologies comme l'HTA au cours de laquelle des propriétés structurales des vaisseaux rétinienne sont connus.

© 2013 Publié par Elsevier Masson SAS.

Mots clés : Optique adaptative ; Artérioles ; Rétine ; Hypertension artérielle ; Rapport paroi-lumière

Abstract

Objective. – Adaptative optic is a new non-invasive imaging technique that allows to measure arterioles wall thickness and diameter with a resolution near two microns. Our objectives were to evaluate the feasibility and the reproducibility of this technique in untreated hypertensive patients.

Design and methods. – In 23 naive hypertensive patients and in 14 normotensives, the internal diameter (ID) and the wall thickness of the superior temporal artery were automatically measured. Those measurements were made on a temporal artery segment and led to determine a whole vessel cross sectional area (WCSA) and a wall to lumen ratio (WLR). Intra-observer reproducibility was evaluated by realizing three consecutive measurements in 14 subjects. Inter-observer reproducibility was assessed by two independent readers in 17 patients. Variation coefficient was calculated as SD/mean values. A comparison of retinal parameters was made between normal and hypertensive subjects.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : david.rosenbaum@psl.aphp.fr (D. Rosenbaum).

Results. – Inter-observer reproducibility indicated a variation coefficient of 1.3% for ID, 3.7% for the WCSA and 3.2% for the WLR. Intra-observer reproducibility indicated a variation coefficient of 3.2% for the WLR. Arterial remodeling was present in hypertensive patients at baseline with a significantly increased WLR as compared to normal subjects (0.32 ± 0.04 vs. 0.26 ± 0.04 ; $P < 0.05$), both population having the same ID.

Conclusion. – Adaptive optics is a feasible and reproducible technique. The possibility of a direct and non-invasive assessment of retinal arterioles must assess the attractions in this technique in hypertensive patients' care.

© 2013 Published by Elsevier Masson SAS.

Keywords: Adaptive optics; Arterial hypertension; Small arteries; Retina; Wall to lumen ratio

1. Introduction

L'hypertension entraîne un remodelage précoce des artérioles. Ce remodelage est secondaire à différents facteurs : pression transmurale, facteurs neurohormonaux, facteurs métaboliques. Il consiste en un épaississement de la paroi artériolaire et en une diminution du diamètre de la lumière. Ce remodelage est associé à une altération de la vasoréactivité artériolaires. Cela a pour conséquences la normalisation de la contrainte pariétale mais aussi l'augmentation réciproque de la pression artérielle en amont. Le meilleur paramètre témoignant du remodelage est l'augmentation du rapport paroi/lumière (*wall to lumen ratio* [WLR]). Chez l'homme, ce phénomène a été uniquement visualisé en utilisant des artérioles issues de biopsies sous-cutanées et étudiées *in vitro* dans des myographes [1–6].

L'optique adaptative est une nouvelle technique d'imagerie non invasive, issue du champ de l'astronomie et récemment appliquée à l'imagerie médicale. Elle permet de visualiser des structures anatomiques avec une résolution de l'ordre de deux microns.

Les objectifs de notre étude étaient d'évaluer la reproductibilité et la faisabilité de cette nouvelle technique pour visualiser les artérioles rétiniennes et étudier les conséquences de l'hypertension artérielle sur le remodelage des artérioles.

2. Méthodes

2.1. Imagerie par optique adaptative

Au sein du centre d'investigation clinique (CIC) du Centre hospitalier national d'ophtalmologie des Quinze-Vingts, a été développée depuis 2008 en partenariat avec Imagine Eyes (Orsay, France), l'Office national de recherches aéronautiques (ONERA) et l'observatoire de Meudon, une collaboration multidisciplinaire autour de l'imagerie par optique adaptative (OA). Cette technique, largement développée en astronomie, consiste à mesurer et corriger en temps réel les aberrations liées à la traversée de la cornée et du cristallin par la lumière émise et rétrodiffusée. L'optique adaptative a pour principe l'utilisation d'un miroir déformable, d'un analyseur de surface d'onde mesurant le front d'onde et d'un calculateur en temps réel chargé de calculer la correction nécessaire pour obtenir un front d'onde plan. La caméra rtx1 illumine le fond d'œil à 850 nm, et utilise une caméra CCD (Imagine Eye, Orsay, France). Cette caméra permet l'acquisition d'une image avec un champ de $4^\circ \times 4^\circ$ ($1,2 \text{ mm} \times 1,2 \text{ mm}$) sur la rétine avec une résolution de l'ordre de $1,6 \mu\text{m}$. Le changement de focalisation se fait par déplacement

longitudinal de la caméra. Une imagerie en temps réel permet une focalisation fine. Pour chaque couche imagée, plusieurs flashes de quelques millisecondes sont envoyés sur la rétine et la lumière rétrodiffusée, après être passée sur le miroir déformable, est captée par la caméra d'imagerie.

Pour l'analyse de la paroi artérielle rétinienne, une image a été prise de l'artère temporale supérieure de l'œil droit à une distance d'un diamètre papillaire de la bordure de l'anneau neurorétinien soit environ 1,5 mm. Cette zone est celle retenue dans la plupart des études cliniques sur la circulation rétinienne. La caméra étant initialement configurée pour l'exploration de la partie centrale de la rétine, l'utilisation de la cible de fixation centrale ne permettait pas d'excentrer le champ d'observation jusqu'à la zone d'intérêt. Cependant, comme l'œil gauche est dégagé lors de l'examen de l'œil droit, la fixation de l'œil gauche a été utilisée pour orienter le regard (et donc l'œil droit) vers la zone d'intérêt. Pour les mêmes raisons techniques, nous n'avons pas pu effectuer les mesures du côté gauche. Chaque image correspond à un champ de vision de $1,2 \times 1,2 \text{ mm}$ avec une résolution transverse de 250 lignes/mm. L'acquisition d'une image prend environ 4 secondes. Selon la qualité de l'image en OA, une dilatation était réalisée à l'œil droit avec une goutte de tropicamide 1 % et une goutte de phényléphrine 2,5 %. Cependant, la plupart des acquisitions ont pu être faites sans dilatation pupillaire car réalisé dans une pièce sombre pour permettre une meilleure dilatation spontanée. Des images successives des vaisseaux rétiens temporaux supérieurs de l'œil droit sont réalisées. Chaque image réalisée était enregistrée sous format PNG puis analysée par un logiciel développé à cet effet (AOV, institut supérieur d'électronique de Paris, France – F. Rossant). Le rapport paroi-lumière (WLR), la surface de section pariétale artérielle (*wall cross sectional area* [WCSA]) et le diamètre de la lumière artérielle (*inner diameter* [ID]) étaient ensuite calculés.

2.2. Population

Cette étude faisait partie d'un protocole de recherche clinique (étude iPhot) ayant reçu l'avis favorable du comité de protection des personnes, Paris, Île-de-France VI. Tous les patients ont signé un formulaire de consentement.

Vingt-trois patients hypertendus naïfs de traitement et sans autre facteur de risque cardiovasculaire ont été recrutés de façon prospective à l'unité de prévention des maladies cardiovasculaires de la Pitié-Salpêtrière entre janvier et décembre 2012. Par ailleurs, des sujets sains et normotendus, non traités par des médicaments cardiovasculaires ont été recrutés par le CIC des 15/20 durant la même période.

Le niveau tensionnel des sujets de l'étude a été évalué par une mesure automatisée de la pression artérielle et pour les patients hypertendus par la réalisation d'un relevé d'automesure selon le protocole de référence.

2.3. Reproductibilité

Afin d'évaluer la reproductibilité de la méthode, des protocoles d'étude de la variabilité intra-observateur et inter-observateur ont été réalisés. La reproductibilité intra-observateur a été calculée sur la réalisation de trois acquisitions indépendantes et consécutives d'images de l'artéριοle rétinienne temporale supérieure de l'œil droit. Deux acquisitions étaient réalisées de façon consécutive, la troisième six heures plus tard. Le protocole de reproductibilité intra-observateur a été réalisé chez 14 sujets sains (sept hommes, sept femmes). L'acquisition et l'analyse d'image a été réalisée par le même observateur pour l'ensemble du protocole de reproductibilité.

La reproductibilité inter-observateur a été calculée sur la réalisation d'acquisitions chez le même sujet effectuées par deux investigateurs indépendants. Chaque acquisition portait sur la même artéριοle rétinienne temporale supérieure de l'œil droit. L'analyse de chaque acquisition était effectuée de façon indépendante par chaque investigateur. Le protocole inter-observateur a été réalisé chez 17 sujets.

Le coefficient de variation (CV) a été calculé pour estimer la reproductibilité. Le calcul de la moyenne et de la déviation standard des mesures pour chaque sujet a été effectué conduisant au calcul du CV ($CV = SD/moyenne$) pour chaque sujet. La moyenne des valeurs individuelles a été retenue comme estimation du CV pour le paramètre. Un CV inférieur à 5 % a été considéré comme satisfaisant.

2.4. Statistiques

Une comparaison des paramètres de l'artéριοle rétinienne entre les sujets hypertendus et les sujets sains a été réalisée. Les moyennes des variables ont été comparées entre deux groupes grâce à un test paramétrique *t* de Student pour échantillons indépendants. Le seuil de significativité a été fixé à $p = 0,05$ pour tous les tests. Les analyses ont été effectuées avec le logiciel JMP.

3. Résultats

3.1. Reproductibilité de l'optique adaptative pour la mesure des artéριοles de la rétine

Le Tableau 1 indique les valeurs de CV observées au cours du protocole de reproductibilité inter-observateur réalisé chez 17 sujets. Les paramètres ID, WLR, WCSA montrent un CV de 1,3 %, 3,2 % et 3,7 % respectivement. Ces valeurs inférieures à 5 % indiquent que la méthode possède une reproductibilité très satisfaisante.

La Fig. 1 montre les valeurs individuelles du WLR pour les trois mesures indépendantes réalisées au cours du protocole de reproductibilité intra-observateur. Le CV du WLR est calculé à 3,2 % ce qui confirme que la méthode possède une

Tableau 1
Reproductibilité inter-observateur de l'optique adaptative pour la mesure des artéριοles de la rétine.

	Coefficient de variation (%)
Internal diameter (ID, diamètre interne artéριοlaire)	1,3
Wall to lumen ratio (WLR, rapport épaisseur sur lumière)	3,2
Wall cross sectional area (WCSA, surface de la paroi artéριοelle)	3,7

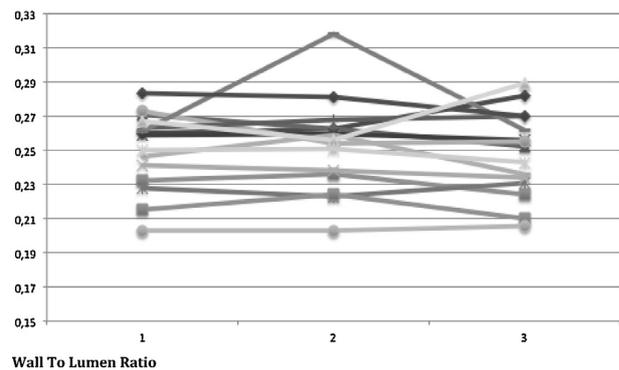


Fig. 1. Reproductibilité intra-observateur : valeurs des trois mesures successives du wall to lumen ratio (WLR, rapport épaisseur sur lumière) chez 14 sujets sains. Le coefficient de variation est calculé à 3,2 %.

reproductibilité très satisfaisante pour une utilisation dans des études prospectives.

3.2. Modifications des artéριοles de la rétine dans l'hypertension

Les données caractérisant le groupe des hypertendus naïfs de traitement et le groupe des sujets sains sont résumées dans le Tableau 2. Les patients hypertendus sont plus âgés et ont un niveau de pression artérielle plus élevé. Le WLR (rapport épaisseur sur lumière) et le WCSA (surface de la paroi artéριοelle) sont significativement augmentés chez les hypertendus

Tableau 2
Caractéristiques cliniques des sujets sains et des hypertendus naïfs de traitement antihypertenseur.

	Sujets sains (n = 14)	Hypertendus (n = 23)	p
Sex-ratio (H/F)	1	1,7	
Âge (ans)	30,2 ± 6	48,1 ± 12,9	<0,0001
PAS (mmHg)	113,1 ± 13,5	141,4 ± 17,8	<0,0001
PAD (mmHg)	70,1 ± 7,5	86,4 ± 13,7	<0,0001
FC (batt/min)	70 ± 10,7	77,4 ± 13,9	0,068
WLR	0,259 ± 0,035	0,348 ± 0,071	0,017
WCSA (μm ²)	1422,7 ± 336,2	2073,9 ± 1323,5	0,014
ID (μm)	56,1 ± 9,6	55,9 ± 18,1	0,121

PAS : pression artérielle systolique ; PAD : pression artérielle diastolique ; WLR : wall to lumen ratio (rapport épaisseur sur lumière) ; WCSA : wall cross sectional area (surface de la paroi artéριοelle) ; ID : internal diameter (diamètre interne artéριοlaire).

mais le diamètre interne artériolaire (ID) est équivalent. Ces modifications qui montrent une augmentation de l'épaisseur de la paroi artériolaire avec persistance de la taille de lumière artériolaire traduisent un remodelage excentrique au niveau des artérioles de la rétine chez l'hypertendu non traité.

4. Discussion

Dans cette étude nous avons pu montrer que l'imagerie des artérioles rétinienne est réalisable par optique adaptative ce qui va permettre de réaliser des études *in vivo* de façon parfaitement non invasive de la morphologie des artérioles et de leurs modifications chez l'homme. Nous montrons de plus que la méthode d'analyse des images des artérioles de la rétine a une reproductibilité très satisfaisante permettant l'usage de cet appareillage pour des études transversales mais aussi prospectives. L'analyse précise de la morphologie des artérioles de la rétine devrait permettre d'évaluer les effets d'interventions physiologiques ou pharmacologiques sur les artérioles, en particulier dans des pathologies connues pour avoir un retentissement sur ces vaisseaux comme l'hypertension artérielle, le diabète, l'insuffisance rénale ou certaines maladies inflammatoires.

Il existe une autre méthode connue pour effectuer des mesures de la morphologie des artérioles de la rétine. Cette technique est basée sur le laser Doppler (SLDF) mais la mesure du WLR se fait de façon indirecte ce qui expose à une moindre reproductibilité de la méthode. Les valeurs du WLR retrouvées chez l'homme sont cependant similaires et montrent une augmentation du WLR dans les populations d'hypertendus [7–9]. Le remodelage des artérioles de la rétine estimé par le WLR en utilisant la technique du SDLF a été montré comme corrélé au WLR des artérioles issues de biopsies sous-cutanées chez l'homme, la méthode invasive considérée comme le *gold standard* pour l'étude des artérioles [10].

De nombreuses études indiquent que prendre en compte les modifications des artérioles rétinienne présentent un intérêt clinique. Ainsi, il a été démontré que la réduction du diamètre artériolaire était corrélée à l'incidence d'une future hypertension [11] mais était aussi associée à une augmentation de la mortalité et du risque d'AVC [12].

Il a aussi été montré que le WLR était corrélé à la microalbuminurie, à l'élévation de l'épaisseur intima média de la carotide commune et que le WLR était plus élevé chez des patients avec des ATCD de maladie cérébrovasculaire.

Comme la technique de l'optique adaptative offre une excellente reproductibilité avec des CV inférieurs à 5 %, il sera possible d'envisager le suivi de patients chez lesquels des interventions physiologiques ou pharmacologiques seront entreprises. En effet, les études prospectives réalisées en prenant comme critère le WLR des artérioles sous-cutanées, ont montré une réduction d'environ 10 % du WLR sous l'influence de traitements antihypertenseurs [13]. Ainsi, notre technique va offrir la possibilité de visualiser des changements de façon non invasive chez l'homme au cours de la prise en charge de maladies chroniques comme l'hypertension, le diabète ou l'insuffisance rénale.

Les limites de l'étude sont de plusieurs ordres. La première est liée au site de mesure lui-même puisqu'il est difficile du fait du champ d'examen relativement restreint ($4^\circ \times 4^\circ$) de pouvoir être certain d'effectuer l'acquisition exactement à un diamètre papillaire de la papille, bien que l'on puisse en revanche être certain d'observer exactement la même zone à chaque examen comme le montre clairement la superposition des différentes images prises à différents temps. Une limite de la caméra est liée au trouble des milieux et notamment la présence d'une cataracte qui peut empêcher la réalisation d'une image en optique adaptative, en particulier chez le sujet âgé. La dilatation pupillaire et la possibilité d'orienter la caméra selon différentes incidences pourraient permettre de surmonter ces obstacles dans un certain nombre de cas. Une possible source d'artéfact pourrait être la pulsativité vasculaire transversale qui peut interagir sur la netteté et sur aussi la variation des paramètres mesurés.

En conclusion, l'usage de l'optique adaptative permet d'obtenir par une nouvelle technique d'imagerie à haute résolution une exploration performante des vaisseaux rétinien. La bonne reproductibilité de la méthode chez l'homme permet d'envisager un usage dans de larges populations de façon transversale mais aussi pour le suivi de sujets ayant des pathologies avec un retentissement sur les petits vaisseaux comme l'hypertension artérielle.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Mulvany MJ. Are vascular abnormalities a primary cause or secondary consequence of hypertension? *Hypertension* 1991;18(Suppl. 3):I52–7.
- [2] Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment. *Hypertension* 2012;59(2):367–74.
- [3] Park JB, Schiffrin EL. Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J Hypertens* 2001;19:921–30.
- [4] Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension: dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* 1993;21:391–7.
- [5] Schiffrin EL, Deng LY, Larochelle P. Morphology of resistance arteries and comparison of effects of vasoconstrictors in mild essential hypertensive patients. *Clin Invest Med* 1993;16:177–86.
- [6] Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, et al. Vascular remodeling. *Hypertension* 1996;28:505–6.
- [7] Ritt M, Harazny JM, Ott C, et al. Analysis of retinal arteriolar structure in never-treated patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2008;26:1427–34.
- [8] Baleanu D, Ritt M, Harazny J, Heckmann J, Schmieder RE, Michelson G. Wall to lumen ratio of retinal arterioles and arteriole-to-venule ratio of retinal vessels in patients with cerebrovascular damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(9):4351–9.
- [9] Rizzoni D, Porteri E, Duse S, De Ciuceis C, Rosei CA, La Boria E, et al. Relationship between media-to-lumen ratio of subcutaneous small arteries and wall to lumen ratio of retinal arterioles evaluated non-invasively by scanning laser Doppler flowmetry. *J Hypertens* 2012;30(6):1169–75.
- [10] Lehmann MV, Schmieder RE. Remodeling of retinal small arteries in hypertension. *Am J Hypertens* 2011;24(12):1267.

- [11] Tanabe Y, Kawasaki R, Wang JJ, Wong TY, Mitchell P, Daimon M, et al. Retinal arteriolar narrowing predicts 5-year risk of hypertension in Japanese people: the Funagata study. *Microcirculation* 2010;17(2): 94–102.
- [12] Sairenchi T, Iso H, Yamagishi K, Irie F, Okubo Y, Gunji J, et al. Mild retinopathy is a risk factor for cardiovascular mortality in Japanese with and without hypertension: the Ibaraki Prefectural Health Study. *Circulation* 2011;124(23):2502–11.
- [13] Buus NH, Mathiassen ON, Fenger-Grøn M, Præstholm MN, Sihm I, Thybo NK, et al. Small artery structure during antihypertensive therapy is an independent predictor of cardiovascular events in essential hypertension. *J Hypertens* 2013;31(4):791–7.

2.3 2^{ème} article: Analyse morphométrique des petites artères rétiniennes dans la rétine humaine utilisant l'ophtalmoscopie par optique adaptative: relation avec la pression artérielle et les changements vasculaires focaux.

Koch E, Rosenbaum D, Brolly A, Sahel JA, Chaumet-Riffaud P, Girerd X, Rossant F, Paques M. Morphometric analysis of small arteries in the retina using adaptive optics imaging: relationship with blood pressure and focal vascular change. Journal of hypertension, 2014.

Résumé :

Le rapport paroi-lumière (WLR) des artères rétiniennes est un marqueur reconnu des dommages dus au vieillissement et / ou à l'hypertension artérielle aux organes cibles. Cependant, la morphométrie pariétale reste difficile à évaluer in vivo. Récemment, il a été démontré que l'imagerie rétinienne par optique adaptative peut être de la résolution des structures pariétales d'artéριοles rétiniennes chez l'homme in vivo. Ici, en utilisant l'imagerie rétinienne par optique adaptative, nous avons étudié les variations de l'épaisseur pariétale de petites artères rétiniennes avec la pression artérielle et présentant des lésions vasculaires focales.

L'imagerie en optique adaptative de l'artère rétinienne supérotemporale a été réalisée chez 49 individus naïfs de traitement [âge moyen (\pm SD) 44,9 ans (\pm 14); la pression systolique moyenne de 132 mmHg (\pm 22)]. La segmentation semi-automatisée a permis d'extraire l'épaisseur pariétale et le diamètre de la lumière. Dans une cohorte distincte, les images en optique adaptative de signe du croisement artérioveineux (AVN; n=12) et de rétrécissement artériolaire focal (FAN; n=10) ont également été analysées qualitativement et quantitativement.

Dans la cohorte de patients naïfs de traitement, par régression multiple tenant compte de l'âge, de l'indice de masse corporelle, de la pression artérielle moyenne, systolique, diastolique et de la pression pulsée, le WLR a été trouvé positivement corrélé à la pression artérielle moyenne et à l'âge pour 43% de la variabilité du WLR. Dans la cohorte de patients présentant des lésions vasculaires focales, ni les FAN ni les AVN n'ont présenté de signes d'épaississement pariétal; au lieu de cela, aux sites des FAN, une diminution du diamètre extérieur suggérant une vasoconstriction a été systématiquement constatée, tandis que sur les sites des AVN, un rétrécissement veineux a pu être observé en l'absence de contact artérioveineux.

Conclusion:

L'imagerie à haute résolution des vaisseaux rétiens par l'optique adaptative permet un phénotypage microvasculaire quantitatif, ce qui peut contribuer à une meilleure compréhension et à une meilleure gestion de la rétinopathie hypertensive.

Morphometric analysis of small arteries in the human retina using adaptive optics imaging: relationship with blood pressure and focal vascular changes

Edouard Koch^a, David Rosenbaum^b, Aurélie Brolly^a, José-Alain Sahel^a, Philippe Chaumet-Riffaud^{a,c}, Xavier Girerd^b, Florence Rossant^d, and Michel Paques^a

Objectives: The wall-to-lumen ratio (WLR) of retinal arteries is a recognized surrogate of end-organ damage due to aging and/or arterial hypertension. However, parietal morphometry remains difficult to assess *in vivo*. Recently, it was shown that adaptive optics retinal imaging can resolve parietal structures of retinal arterioles in humans *in vivo*. Here, using adaptive optics retinal imaging, we investigated the variations of parietal thickness of small retinal arteries with blood pressure and focal vascular damage.

Methods: Adaptive optics imaging of the superotemporal retinal artery was done in 49 treatment-naive individuals [mean age (\pm SD) 44.9 years (\pm 14); mean systolic pressure 132 mmHg (\pm 22)]. Semi-automated segmentation allowed extracting parietal thickness and lumen diameter. In a distinct cohort, adaptive optics images of arteriovenous nicking (AVN; $n = 12$) and focal arteriolar narrowing (FAN; $n = 10$) were also analyzed qualitatively and quantitatively.

Results: In the cohort of treatment-naive individuals, by multiple regression taking into account age, body mass index, mean, systolic, diastolic and pulse blood pressure, the WLR was found positively correlated to mean blood pressure and age which in combination accounted for 43% of the variability of WLR. In the cohort of patients with focal vascular damage, neither FANs or AVNs showed evidence of parietal growth; instead, at sites of FANs, decreased outer diameter suggestive of vasoconstriction was consistently found, while at sites of AVNs venous narrowing could be seen in the absence of arteriovenous contact.

Conclusion: High resolution imaging of retinal vessels by adaptive optics allows quantitative microvascular phenotyping, which may contribute to a better understanding and management of hypertensive retinopathy.

Keywords: adaptive optics, arterial hypertension, retina, small vessels, wall-to-lumen ratio

Abbreviations: AO, adaptive optics; AVN, arteriovenous nicking; FAN, focal arteriolar narrowing; SDF, scanning laser Doppler flowmetry; WCSA, wall cross-sectional area; WLR, wall-to-lumen ratio

INTRODUCTION

Arterial hypertension and aging affects the structure of small arteries. An increase of the wall-to-lumen ratio (WLR) is a hallmark of hypertensive microangiopathy and is predictive of end-organ damage [1–4]. The prevalent physiopathological concept of such parietal thickening postulates that a rise in blood pressure stimulates myogenic vasoconstriction, which tends to normalize parietal tension [5,6], without significant modification of the parietal components (a process called eutrophic remodeling). However, there is currently a lack of clinically pertinent methods for measuring parietal thickness. Myographic and histological investigations are indeed not applicable in clinical routine. Conversely, the retina being an easily accessible part of the microcirculation, *in-vivo* evaluation of the microvascular consequences of arterial hypertension can be done on fundus photographs. The most prevalent lesions of hypertensive retinopathy are diffuse narrowing of arterioles and focal lesions such as focal arteriolar narrowing (FAN) and arteriovenous nicking (AVN). Several large-scale epidemiological studies reported that the severity and/or incidence of these signs correlate with past and incident arterial pressure [7–10] and with end-organ damage [11–14]. The clinical evaluation of hypertensive retinopathy is however limited by the fact that fundus photographs or fluorescein angiography do not enable visualizing the arteriolar wall. An indirect measure of the arteriolar wall thickness based on the differential analysis of

Journal of Hypertension 2014, 32:890–898

^aClinical Investigation Center 503, Centre Hospitalier National des Quinze-Vingts, INSERM and Université Pierre et Marie Curie-Paris6, ^bPreventive Cardiovascular Unit, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, ^cUniversité Paris-Sud, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, and ^dInstitut Supérieur d'Electronique de Paris, Paris, France

Correspondence to Michel Paques, MD, PhD, Clinical Investigation Center 503, Centre Hospitalier National des Quinze-Vingts, 28 rue de Charenton 75012 Paris, France. Tel: +33 1 40 02 14 15; fax: +33 1 40 02 14 99; e-mail: michel.paques@gmail.com

Received 29 July 2013 Revised 28 November 2013 Accepted 28 November 2013
J Hypertens 32:890–898 © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 3.0 License, where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially.

DOI:10.1097/HJH.0000000000000095

laser Doppler and reflectance imaging (scanning laser Doppler flowmetry, SDLF) of the retina has been proposed [15–17]. However, this technique has a relatively limited spatial resolution, which impairs in particular the analysis of focal lesions.

Adaptive optics is an opto-electronic technology that improves the resolution of fundus images. Current adaptive optics-based fundus cameras enable visualization of microstructures such as photoreceptors [18], capillaries [19] or vascular wall [20] noninvasively in humans. Here, following our pilot study [21], we evaluated a novel approach of microvascular morphometry using adaptive optics imaging, which may ultimately help to better understand and manage hypertensive microangiopathy.

METHODS

This clinical study was carried out according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Approval of the Ethics Committee of the Saint-Antoine hospital (Paris, France) was obtained. Patients older than 18 years with clear ocular media and no ocular or systemic diseases apart from arterial hypertension were considered eligible. Patients were recruited at the Preventive Cardiovascular Unit of the Pitié-Salpêtrière Hospital. Other patients with AVNs and/or FANs were also recruited at the Quinze-Vingts Hospital. Each patient received full oral and written information and gave written consent prior to inclusion.

Adaptive optics retinal imaging

Retinal imaging was performed at the Clinical Investigation Center of the Quinze-Vingts Hospital. En face adaptive optics fundus images were obtained using a commercially available flood-illumination adaptive optics retinal camera (rtx1; Imagine Eyes, Orsay, France). Briefly, the rtx1 camera measures and corrects wavefront aberrations with a 750 nm super luminescent diode source and an adaptive optics system operating in a closed loop. A 4×4 fundus area (i.e. approximately 1.2×1.2 mm in emmetropic eyes) is illuminated at 840 nm by a temporally low coherent light-emitting diode flashed flood source, and a stack of 40 fundus images is acquired in 4 s by a charge-coupled device camera.

Most examinations were done without pupil dilation; if needed, pupil dilation was obtained with topical tropicamide (Novartis, France). After a 10-min rest during which the examination was explained, the patient was installed on the chin rest. The measured refraction was integrated into the camera. The live video image of the pupil allowed alignment with the incident light; the live display of adaptive optics-corrected fundus image allowed brightness, contrast and focus to be adjusted. Gaze was oriented by an internal or external target in order to capture the region of interest. The reference site was a segment of the superotemporal artery of the right eye, at least $250 \mu\text{m}$ long with an inner diameter of at least $50 \mu\text{m}$, devoid of bifurcations, one disc diameter from the disc (see example in Fig. 1a). Blood pressure (BP) was measured in the sitting position simultaneously to adaptive optics image acquisition using an automated oscillometric device using an arm cuff (VS800, Mindray Corporation; Shenzhen, China). Two

measures of BP were taken before starting the acquisition process; then one BP measurement was then performed during each image acquisition.

To identify the systolic pulse and delete the corresponding images, real-time videos were generated from each stack using a customized plugin developed under ImageJ software (see examples in supplementary video 1 and 2, <http://links.lww.com/HJH/A317>, <http://links.lww.com/HJH/A318> [adaptive optics videofunduscopy of the superotemporal artery and vein in the right eye of a 26 years old man (same patient as in figure 1). Note the visibility of the arterial wall but not of the venous wall, and the systolic curving of the arteriole (Quicktime video; image width 1.2mm; 40 frames, 10 fps); adaptive optics videofunduscopy of the superotemporal artery in the right eye of a 40 years old healthy woman (Quicktime video; image width 1.2mm; 40 frames, 10 fps).]). Then, the diastolic images were averaged to increase the signal-to-noise ratio (Fig. 1b; see ref.[22] for supplementary details, <http://links.lww.com/HJH/A316>).

Image analysis

Averaged adaptive optics images were semi-automatically segmented using a custom software running under Matlab (Mathworks, Natick, Massachusetts, USA). Briefly, the processed adaptive optics images, after being encoded on 8 bits, were first enhanced by applying a median filter followed by a nonlinear diffusion filter [23]. Such filters allow smoothing the blood vessels while preserving the contrast along their edges. The first step of the segmentation is based on the enhancement of the axial reflection and the detection of the darkest regions, by applying respectively morphological operations and k-means classification. Both are then fused in order to select the axial reflection of the vessel and compute a binary mask of the vessel. The second step of the segmentation process aims at extracting the borders of the vessel. Each side is approximated by a curve parallel to the regularized skeleton of its axial reflection [24,25]. The mean distance between a side contour and the central reflection line is deduced from the binary mask and the gradient image; it is adjusted so that the obtained curve is placed as near as possible to the internal side of the parietal structure. This segmentation is then refined by applying a parametric active contour with a parallelism constraint [26]. In this model, a curve evolves towards the higher gradients of the image (the edges) while maintaining locally an approximate parallelism with the reference line (the axial reflection), which improves robustness regarding image noise. The algorithm is applied twice in order to segment the internal limits of the vessel lumen. Then, the initialization is automatically modified in order to segment the outer limits. Thus, a complete segmentation of the arterial wall is obtained (Fig. 1b), with a point-by-point correspondence between opposite sides of the vessel. The whole segmentation process is under human supervision. Graphic representations of morphometric parameters along a given vessel segment (termed here morphograms; Fig. 1c) were generated. The ratio of total parietal thickness (P) over the lumen diameter (D) averaged over $250 \mu\text{m}$ defined the WLR. The cross-sectional surface of the vessel wall, averaged over $250 \mu\text{m}$, defined the wall cross-sectional area (WCSA). All measures were done in a masked fashion.

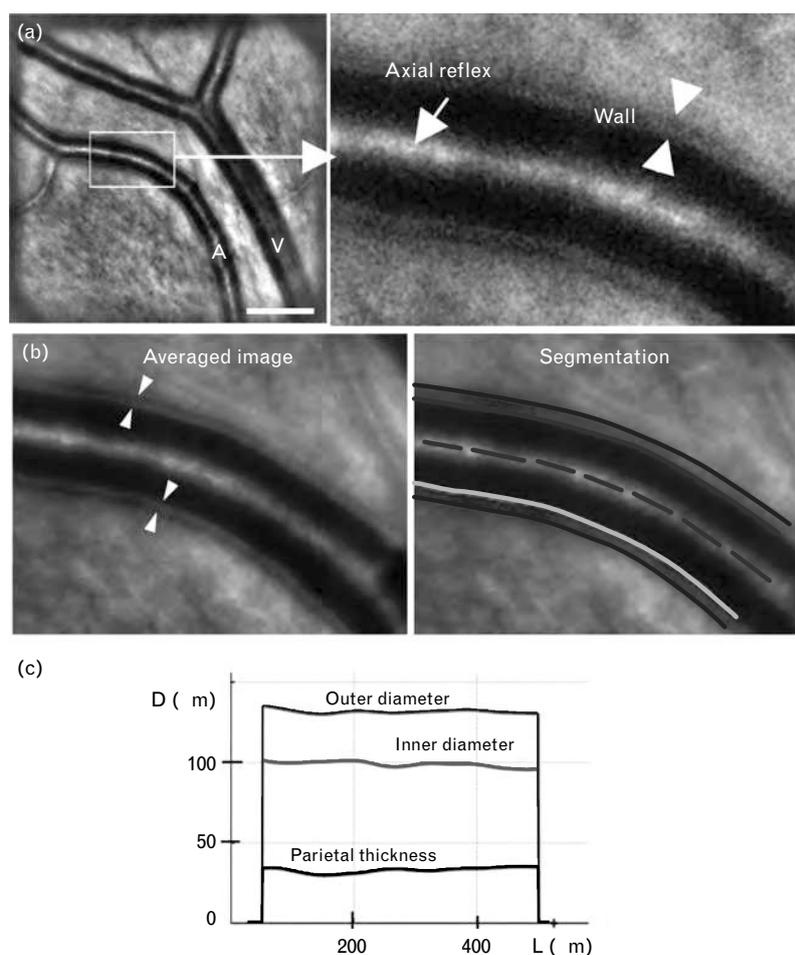


FIGURE 1 Adaptive optics (AO) imaging and segmentation of a retinal arteriole (same patient as in supplementary video 1, <http://links.lww.com/HJH/A317>). (a) Single videoframe (right panel: magnification). Note that parietal structures (between arrowheads in magnification) can be seen (A: arteriole, V: venule; bar, 250 μm). (b) Image averaging and segmentation. (c) Morphogram of the segmented vessel (D: diameter; L: length).

Statistics

Descriptive statistics of quantitative and ordinal variables and analysis of normality of distribution were performed. The means of quantitative variables between two groups were compared using the parametric *t* test for independent samples. The homogeneity of variance was checked using Levene's test. The relationship between two variables (interval data) was investigated by calculating Pearson's correlation coefficient. In some cases, Kendall's correlation values were also calculated. To test intra-observer and inter-observer reproducibility, three consecutive measures of WLR and lumen diameter were performed within 10 min in 20 patients, followed by a fourth measure at the same location 6 h later. Intraclass coefficients were over 0.8 and Cronbach's alpha were over 0.9 for lumen diameter and WLR (see supplementary Table 1 Table 1, <http://links.lww.com/HJH/A316>). The threshold of significance was set to $P=0.05$ for all tests. Pearson's correlation coefficient was calculated to estimate the linear relationship between two variables. Multiple regression (backward stepwise method) was carried out to identify predictors of WLR. All analyses

were performed with SPSS software (version 19; IBM Corporation, Arbank, New York, USA).

RESULTS

By adaptive optics imaging, the red cell column of arteries and veins appeared as dark stripes with an axial reflection. Along both sides of the blood column of arteries, a linear structure was visible (Fig. 1a). This structure was observed on individual video frames (supplementary videos 1 and 2, <http://links.lww.com/HJH/A317>, <http://links.lww.com/HJH/A318>[adaptive optics video funduscopy of the superotemporal artery and vein in the right eye of a 26-year-old man (same patient as in figure 1). Note the visibility of the arterial wall but not of the venous wall, and the systolic curving of the arteriole (Quicktime video; image width 1.2 mm; 40 frames, 10 fps); adaptive optics video funduscopy of the superotemporal artery in the right eye of a 40-year-old healthy woman (Quicktime video; image width 1.2 mm; 40 frames, 10 fps)], hence ruling out a blurring artifact due to systolic expansion. Parietal

TABLE 1. Clinical and morphometric characteristics of the study population (mean \pm SD)

	Total	Normotensive	Hypertensive	P*
n	49 (23F, 26M)	30 (15F, 15M)	19 (8F, 11M)	
Age (years)	44.9 \pm 14.4	42.3 \pm 15	48 \pm 11	NS
BMI	24.9 \pm 4.7	23.8 \pm 4.5	26.4 \pm 4	NS
SBP (mmHg)	132.5 \pm 22.2	118 \pm 13	154 \pm 14	<0.01
DBP (mmHg)	82.6 \pm 14	74 \pm 9.5	95.5 \pm 10	<0.01
Mean BP (mmHg)	99 \pm 16	88.8 \pm 10	113.8 \pm 11	<0.01
Pulse BP (mmHg)	49.9 \pm 12	43.7 \pm 9	58.9 \pm 11	<0.01
D (μ m)	79.8 \pm 12	83.5 \pm 11.2	74 \pm 12.6	<0.05
P (μ m)	24.3 \pm 3.7	23.5 \pm 3.7	25.5 \pm 3.3	NS
WLR	0.31 \pm 0.07	0.285 \pm 0.05	0.36 \pm 0.08	<0.01
WCSA (μ m ²)	3411 \pm 874	3459 \pm 915	3338 \pm 826	NS

BP, blood pressure; D, diameter; NS, not statistically significant; P, parietal thickness; WCSA, wall cross-sectional surface; WLR, wall-to-lumen ratio.
*Between normo and hypertensive.

structures were visible in arterioles as small as 25 μ m. Their visibility did not depend on its orientation relative to the nerve fiber layer, ruling out an optical effect of ganglion cell axons.

Correlation of arteriolar morphometry and blood pressure

Forty-nine normotensive or treatment-naive hypertensive individuals were included (Table 1). Nineteen had systolic pressure over 139 mmHg, while 30 were below. In hypertensive patients, the lumen diameter of the superotemporal artery was significantly lower, and the WLR was significantly higher. There was no significant difference of WCSA between groups. By univariate analysis, a number of significant correlations were found (Fig. 2 and Table 2). Multiple regression was carried out taking into account age, BMI, systolic, mean, and pulse pressure. The linear combination of these factors that gave the most accurate prediction of WLR was:

$$\text{WLR} = 0.0051 + 0.0025 \\ \times \text{mean pressure} + 0.0014 \times \text{age}$$

which accounted for 43% of the variability of WLR. This suggests that mean pressure had a stronger effect on WLR than age.

Adaptive optics imaging of focal vascular changes

In a distinct cohort, adaptive optics images of arteriovenous crossings and FANs were analyzed. Classical concepts of the pathophysiology of AVNs postulate that venous nicking is due to mechanical compression from overlying arterioles. Alternatively, the implication of retinal cells was suggested by histology. In order to progress in the understanding of AVNs, adaptive optics images of 10 normal arteriovenous crossings from nine patients (age range, 26–62 years) were compared with adaptive optics images of 12 AVNs from 12 patients (age range, 47–77 years). In normal arteriovenous crossings (Fig. 3a), venules were seen crossing under the arteriole without notably changing their caliber or their pathway. The borders of the vein lumen remained clearly visible up to the area of arteriovenous overlap. In AVNs (Fig. 3b and c, and supplementary Figure 1, <http://links.lww.com/HJH/A316>), the vein appeared frequently blurred upstream and downstream. One or more sites of focal venous narrowing could be often seen upstream and/or downstream of the crossing site (asterisks in figures). The overlying arteriole did not show evidence of parietal thickening; The WLR was indeed not significantly different between AVNs and control areas (Fig. 3b). In order to better understand the arteriovenous relationship at sites of AVNs, we documented by adaptive optics four cases of venous nicking occurring at a site where an arteriole and a venule ran in parallel, yet without overlapping (Fig. 4c and supplementary Figure 2, bottom, <http://links.lww.com/HJH/A316>). This peculiar anatomical feature, which is clinically and histologically similar to AVNs with overlapping vessels [19] allowed a direct observation of the arteriovenous interface. In all cases, there was a gap 10–30 μ m wide between the artery and the vein, suggesting that physical contact between the arteriole and the venule is not a prerequisite for venous nicking.

In 10 FANs from 10 patients (age range, 47–64 years), we observed that, in most cases, the inner and outer vascular limits remained parallel throughout the FAN (Fig. 4 and supplementary Figure 2, <http://links.lww.com/HJH/A316>), focal parietal thickening being detected in only two cases. Therefore, the WLR in FANs was locally increased, in relationship with the decrease of lumen diameter. Conversely, the WCSA was not increased, indicating that there was no significant parietal growth at sites of FANs. Taken together, this favors the hypothesis that focal vasoconstriction is involved in FANs.

In 10 FANs from 10 patients (age range, 47–64 years), we observed that, in most cases, the inner and outer vascular limits remained parallel throughout the FAN (Fig. 4 and supplementary Figure 2, <http://links.lww.com/HJH/A316>), focal parietal thickening being detected in only two cases. Therefore, the WLR in FANs was locally increased, in relationship with the decrease of lumen diameter. Conversely, the WCSA was not increased, indicating that there was no significant parietal growth at sites of FANs. Taken together, this favors the hypothesis that focal vasoconstriction is involved in FANs.

DISCUSSION

Here, we show that adaptive optics imaging allows qualitative and quantitative microvascular morphometry of small vessels at a near-histological scale, which allowed us to explore the structural basis of the various manifestations of hypertensive retinopathy. In a cohort of treatment-naive individuals, our data suggests that a higher BP is accompanied by parietal thickening and lumen narrowing, and hence increased WLR of retinal vessels. This supports the notion that a diffuse vasoconstriction accompanies BP increase. As the WLR is dimensionless, any bias due to refraction is neutralized, reinforcing the robustness of our findings. This transversal study cannot, however, determine

TABLE 2. Univariate correlations between clinical and morphometric parameters

	D	P	WLR	WCSA
Age	-0.173	0.331*	0.348*	0.183
BMI	-0.254	0.241*	0.342*	0
SBP	-0.384**	0.438*	0.582**	0.13
DBP	-0.362*	0.437*	0.559**	0.06
Mean BP	-0.385**	0.453*	0.589**	0.05
Pulse pressure	-0.275	0.283	0.406**	0.01

D, diameter; P, parietal thickness; WCSA, wall cross-sectional area; WLR, wall-to-lumen ratio.
 * $P < 0.05$.
 ** $P < 0.01$.

compares the demographic, clinical and morphometric characteristics of our report and of reference [16]. As SDLF measures are well correlated with myographic data [17], this

suggests that the WLR measured by adaptive optics imaging is a valid surrogate of the actual WLR. A potential bias may have been the use of topical tropicamide in some eyes. To

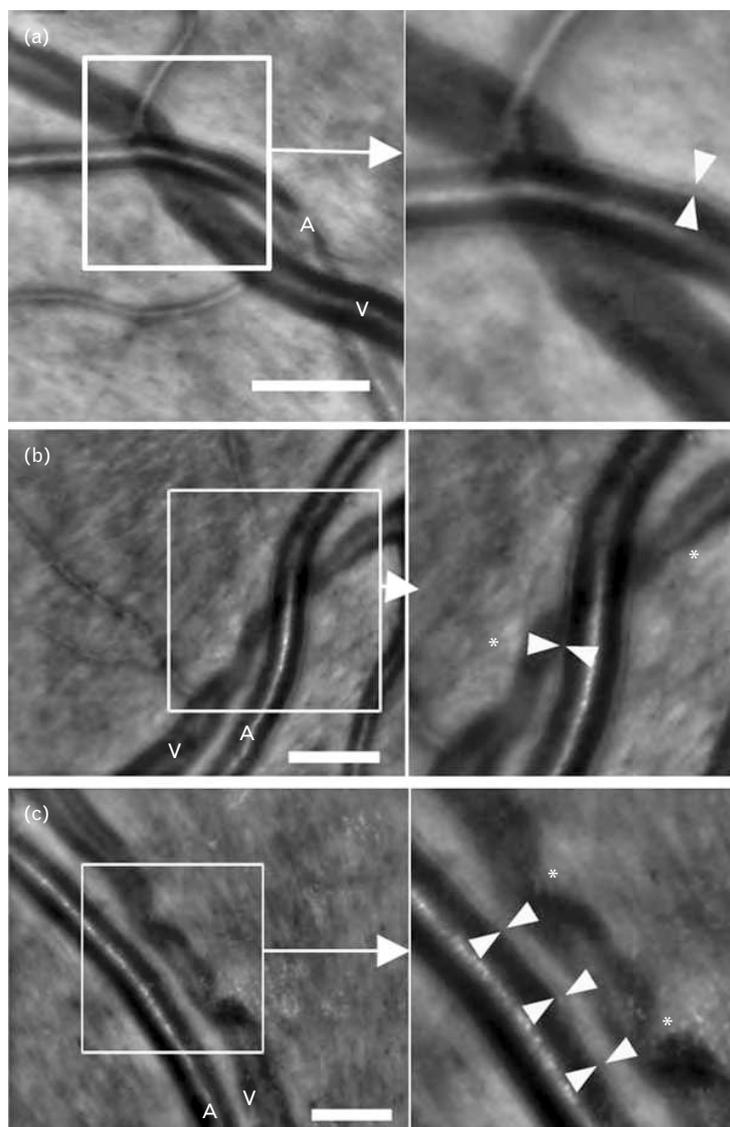


FIGURE 3 Representative adaptive optics (AO) imaging of arteriovenous crossings. Arrowheads bracket the arteriolar wall. (a) Normal arteriovenous crossing (right panel: magnification). (b) Representative cases of arteriovenous nicking (AVN). Note the focal venous narrowings (asterisks) upstream and downstream of the arteriovenous overlap. (c) Case of venous nicking occurring in the immediate vicinity of an arteriole in the absence of arteriovenous overlapping, allowing the direct observation of the arteriovenous interface; note the gap between the arteriolar wall and the vein, suggesting that there is not direct contact (bars, 125 μ m; additional cases are shown in supplementary Figure 1, <http://links.lww.com/HJH/A316>).

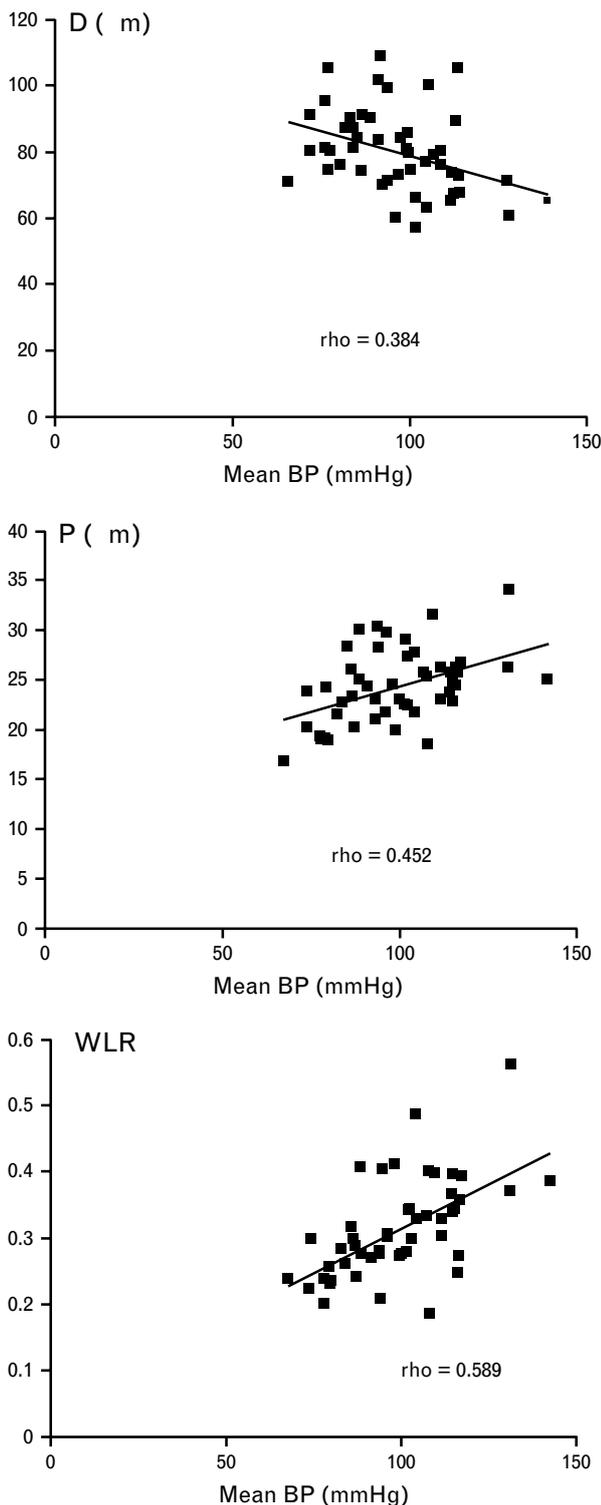


FIGURE 2 Mean blood pressure plotted against parietal (P), diameter (D) and wall-to-lumen ratio (WLR). Pearson's correlation coefficients are inserted. All regressions lines are statistically significant ($P < 0.01$).

any cause–effect relationship between BP rise and vasoconstriction.

Fundus photograph-based studies [27] reported an age-related decline of arterial lumen diameter, which may be

interpreted as indirect evidence of parietal thickening. We did observe an inverse correlation of age with WLR by univariate analysis, and multiple regression analysis confirmed the effect of age on WLR. Additional studies with larger cohorts are necessary to further document the relationship between parietal thickness and age. Nevertheless, the correlation of arterial diameters with age appears somewhat weaker than with BP.

Although it is commonly assumed that diffuse parietal thickening is initiated by a myogenic response, the pathogenesis of focal vascular changes remains uncertain. While most research and hence conceptual efforts on hypertensive microvasculopathy addressed to diffuse changes of parietal thickness, focal microvascular changes received little attention. They are indeed difficult to track by histology. Clinical studies based on fundus photographs have shown that the incidence of focal changes is correlated with age, blood pressure, and inflammation biomarkers [28]. Interestingly, it has been reported that there is a significant turnover of focal changes [29], suggesting that they are dynamic rather than degenerative processes. By adaptive optics, FANS and AVNs showed distinct anatomical features. Interestingly, neither FANS nor AVNs seemed to involve parietal growth as their primary cause. In AVNs, adaptive optics revealed a combination of loss of retinal transparency and presence of focal venous narrowings upstream and downstream of the arteriovenous crossing. Moreover, adaptive optics images of AVNs in which the arteriovenous interface could be observed showed that venous nicking could occur even in the absence of arteriovenous contact. This is in accordance with histology studies, which reports that, instead of arterial compression, changes affecting structures adjacent to the arteriovenous crossing such as axons, glial cells or the extracellular matrix may be found [30–32]. Taken together, adaptive optics and histology data argues against the prevalent model stating that the arteriole compresses the underlying vein, and instead support the hypothesis that venous nicking is mediated by retinal structures, hence implying a diffusible process. At sites of FANS, the inner and outer limits of the arteriolar wall maintained their parallelism and there was no evidence of parietal growth, suggesting that FANS were caused by focal vasoconstriction.

The morphometry of veins is gaining interest as it has been shown that venous diameter is predictive of morbidity and mortality [33,34]. The inner diameter of veins, but not the parietal thickness, can be measured with high precision by adaptive optics, which could help to determine the effect of blood pressure control on venous diameter. Adaptive optics is also of interest for the identification of focal venous narrowing at sites of AVNs, which are likely the site at which venous obstruction may occur. Hence, adaptive optics may provide insights into the factors triggering branch retinal vein occlusion, a common finding during hypertensive retinopathy.

Despite these promising results, they have to be considered as preliminary and hence a number of investigations remain to be done. We did not compare our data to ex-vivo measures by myography; nevertheless, our results on WLR measurement are very close to those observed by SDLF. This is shown in Table 3, which

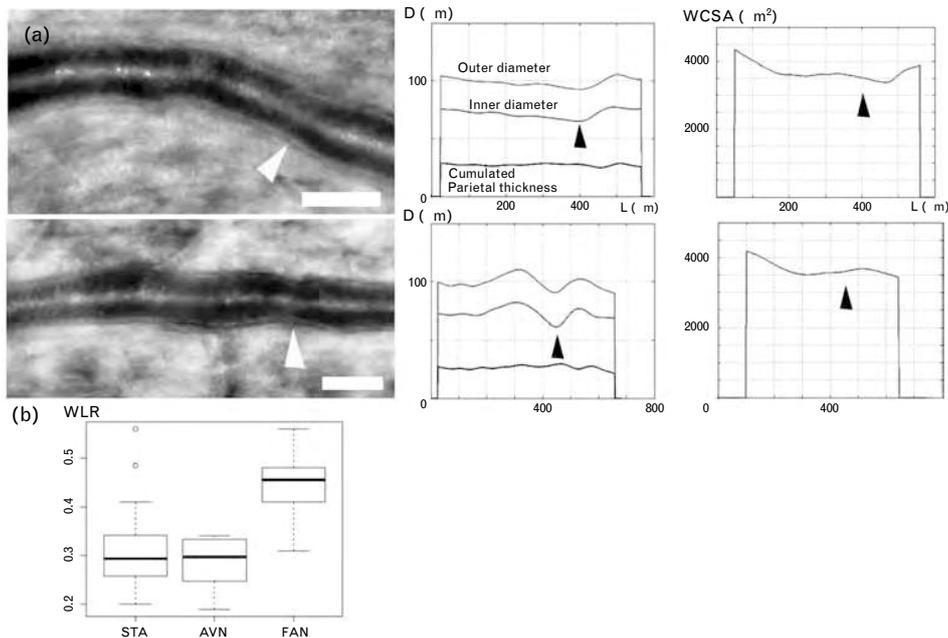


FIGURE 4 (a) Adaptive optics (AO) NIR imaging of two representative cases of focal arteriolar narrowings (FANs) with their corresponding morphograms (arrowheads in AO images and in morphograms show lumen narrowing). In both cases, the parallelism of the inner and outer vascular limits was maintained. There was no detectable increase of WCSA at the site of FAN (bar, 100 μm ; see also supplementary Figure 2, <http://links.lww.com/HJH/A316>). (b): comparison of wall-to-lumen ratio (WLR) between the superotemporal artery (STA), AVN ($n = 12$) and FANs ($n = 10$). The difference between groups is statistically significant ($P < 0.01$).

our knowledge, there is no report of the effect of topical tropicamide on major retinal vessels. In a series of nine eyes, we compared vascular morphometry before and after tropicamide administration. This showed that after tropicamide there was a mean increase of vascular diameter of 0.8%, which was not statistically significant (data not shown). We concluded that topical tropicamide had negligible effects in our measures.

A promising perspective of adaptive optics imaging is the follow-up of patients treated by antihypertensive drugs. There are indeed few reported studies of the effect of blood pressure control on retinal vascular morphometry [35,36] and on the effect of such modifications on the incidence of end-organ damage. It would be of high interest to

determine if ‘microvascular responders’ (i.e. patients showing arteriolar vasodilation under treatment) have a better prognosis in term of end-organ damage. One can hypothesize that if there is no change in microvascular resistances, lowering blood pressure may hamper downstream perfusion. Also, the fact that AVNs may involve damage to adjacent neuroglial structures may also be of interest to understand the pathophysiology of age-related and hypertension-related brain damage given the functional similarities of retinal and cerebral vessels [37].

In conclusion, we show here that adaptive optics imaging of retinal arterioles offers a unique opportunity to explore microvascular changes *in vivo* in humans at a near-histology level, with a simple procedure applicable

TABLE 3. Comparison of adaptive optics data from the present study and scanning laser Doppler flowmetry data from Ritt et al. [16]

	Present study		Ritt 2008	
	Normotensive	Hypertensive	Normotensive	Hypertensive
<i>n</i>	30		29	
Age	42.3 ± 15		36.7 ± 5.9	
Systolic pressure (mmHg)	118 ± 13		129 ± 6.9	
Diastolic pressure (mmHg)	74 ± 9.5		77.8 ± 7.6	
WLR	0.285 ± 0.05		0.28 ± 0.1	
Lumen diameter (μm)	83.5 ± 11.2		85.3 ± 11	
Wall cross-sectional area (μ^2)	3459 ± 915		3740 ± 1415	
<i>n</i>		19		21
Age		48 ± 11		39.1 ± 5.4
Systolic pressure (mmHg)		154 ± 14		145 ± 6.8
Diastolic pressure (mmHg)		95.5 ± 10		87.7 ± 8.3
WLR		0.36 ± 0.08		0.36 ± 0.1
Lumen diameter (μm)		74 ± 12.6		81.8 ± 7.8
Wall cross-sectional area (μ^2)		3338 ± 826		4413 ± 1725

in a routine setting. Quantitative and qualitative microvascular phenotyping by adaptive optics imaging may contribute to a better understanding of hypertensive retinopathy, and possibly improve medical management of small vessel diseases. Indeed, stratification of the risk of end-organ damage may be improved by biomarkers issued from adaptive optics imaging.

ACKNOWLEDGEMENTS

ImagineEye provided technical assistance with image processing. We thank Dennis Han and Gabriel Quentel for helpful comments.

Supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Contrat d'Interface 2011), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-TECS-009 and ANR-12-TECS-0015-03) and the Association Contre l'OVR (www.asso-ovr.fr). The funding organizations had no role in the design or conduct of this research.

Registered in clinicaltrials.gov (NCT01546181).

Conflicts of interest

M.P. is a consultant for the manufacturer of the camera used in the present study.

REFERENCES

- Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension: dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* 1993; 21:391–397.
- Heagerty AM. Predicting hypertension complications from small artery structure. *J Hypertens* 2007; 25:939–940.
- Buus NH, Mathiassen ON, Fenger-Gron M, Præstholm MN, Sihm I, Thybo NK, et al. Small artery structure during antihypertensive therapy is an independent predictor of cardiovascular events in essential hypertension. *J Hypertens* 2013; 31:791–797.
- Mulvany MJ. Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2002; 4:49–55.
- Feihl F, Liaudet L, Levy BI, Waeber B. Hypertension and microvascular remodelling. *Cardiovasc Res* 2008; 78:274–278.
- Martinez-Lemus LA, Hill MA, Meininger GA. The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure. *Physiology* 2009; 24:45–57.
- Wong TY, Klein R, Klein BE, Meuer SM, Hubbard LD. Retinal vessel diameters and their associations with age and blood pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:4644–4650.
- Wong TY, Klein R, Sharrett AR, Duncan BB, Couper DJ, Klein BE, et al. Atherosclerosis Risk in Communities Study. Retinal arteriolar diameter and risk for hypertension. *Ann Intern Med* 2004; 140:248–255.
- Ikram MK, De Jong FJ, Vingerling JR, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM, De Jong PT. Are retinal arteriolar or venular diameters associated with markers for cardiovascular disorders? The Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:2129–2134.
- Ikram MK, Witteman JC, Vingerling JR, Breteler MM, Hofman A, de Jong PT. Retinal vessel diameters and risk of hypertension: the Rotterdam Study. *Hypertension* 2006; 47:189–194.
- Wong TY, Klein R, Nieto FJ, Klein BE, Sharrett AR, Meuer SM, et al. Retinal microvascular abnormalities and 10-year cardiovascular mortality: a population-based case-control study. *Ophthalmology* 2003; 110:933–940.
- Haan M, Espeland MA, Klein BE, Casanova R, Gaussoin SA, Jackson RD, et al. Women's Health Initiative Memory Study and the Women's Health Initiative Sight Exam. Cognitive function and retinal and ischemic brain changes: the Women's Health Initiative. *Neurology* 2012; 78:942–949.
- Lindley RI, Wang JJ, Wong MC, Mitchell P, Liew G, Hand P, et al. Multi-Centre Retina and Stroke Study (MCRS) Collaborative Group. Retinal microvasculature in acute lacunar stroke: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 2009; 8:628–634.
- Yatsuya H, Folsom AR, Wong TY, Klein R, Klein BE, Sharrett AR. ARIC Study Investigators. Retinal microvascular abnormalities and risk of lacunar stroke: Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Stroke* 2010; 41:1349–1355.
- Harazny JM, Ritt M, Baleanu D, Ott C, Heckmann J, Schlaich MP, et al. Increased wall:lumen ratio of retinal arterioles in male patients with a history of a cerebrovascular event. *Hypertension* 2007; 50:623–629.
- Ritt M, Harazny JM, Ott C, Schlaich MP, Schneider MP, Michelson G, Schmieder RE. Analysis of retinal arteriolar structure in never-treated patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2008; 26:1427–1434.
- Rizzoni D, Porteri E, Duse S, De Ciuceis C, Rosei CA, La Boria E, et al. Relationship between media-to-lumen ratio of subcutaneous small arteries and wall-to-lumen ratio of retinal arterioles evaluated non-invasively by scanning laser Doppler flowmetry. *J Hypertens* 2012; 30:1169–1175.
- Liang J, Williams DR, Miller DT. Supernormal vision and high-resolution retinal imaging through adaptive optics. *J Opt Soc Am* 1997; 14:2884–2892.
- Martin JA, Roorda A. Direct and noninvasive assessment of parafoveal capillary leukocyte velocity. *Ophthalmology* 2005; 112:2219–2224.
- Chui TY, Vannasdale DA, Burns SA. The use of forward scatter to improve retinal vascular imaging with an adaptive optics scanning laser ophthalmoscope. *Biomed Opt Express* 2012; 10:2537–2549.
- Rosenbaum D, Koch E, Girerd X, Rossant F, Paques M. Retinal arteries imaging by adaptive optics, feasibility and reproducibility. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 2013; 62:184–188.
- Gocho K, Sarda V, Falah S, Sahel JA, Sennlaub F, Benchaboune M, et al. Adaptive optics imaging of geographic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54:3673–3680.
- Weickert J, Romeny BH, Viergever M. Efficient and reliable schemes for nonlinear diffusion filtering. *IEEE Transac Image Process* 1998; 7:398–410.
- Kass M, Witkin A, Terzopoulos D. Snakes: active contour models. *Int J Computer Vis* 1988; 1:321–331.
- Xu C, Prince JL. Snakes, shapes, and gradient vector flow. *IEEE Trans Image Process* 1998; 7:359–369.
- Ghorbel I, Rossant F, Bloch I, Paques M. Modeling a parallelism constraint in active contours. Application to the segmentation of eye vessels and retinal layers. *18th IEEE International Conference on Image Processing*. 2011, pp. 445–448.
- Kawasaki R, Cheung N, Wang JJ, Klein R, Klein BE, Cotch MF, et al. Retinal vessel diameters and risk of hypertension: the Multiethnic Study of Atherosclerosis. *J Hypertens* 2009; 27:2386–2393.
- Klein R, Sharrett AR, Klein BE, Chambless LE, Cooper LS, Hubbard LD, Evans G. Are retinal arteriolar abnormalities related to atherosclerosis? The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1644–1650.
- Liew G, Campbell S, Klein R, Klein BE, Sharrett AR, Cotch MF, et al. Ten-year longitudinal changes in retinal microvascular lesions. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Ophthalmology* 2011; 118:1612–1618.
- Seitz R. *The retinal vessels: comparative ophthalmoscopic and histologic studies on healthy and diseased eye*. Saint-Louis: Mosby; 1964; Translated by Frederick C and Blodi CV.
- Kimura T, Mizota A, Fujimoto N, Tsuyama Y. Light and electron microscopic studies on human retinal blood vessels of patients with sclerosis and hypertension. *Int Ophthalmol* 2005; 4:151–158.
- Jefferies P, Clemett R, Day T. An anatomical study of retinal arteriovenous crossings and their role in the pathogenesis of retinal branch vein occlusions. *Aust N Z J Ophthalmol* 1993; 21:213–217.
- Wong TY, Islam FM, Klein R, Klein BE, Cotch MF, Castro C, et al. Retinal vascular caliber, cardiovascular risk factors, and inflammation: the multiethnic study of atherosclerosis (MESA). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:2341–2350.
- Ikram MK, de Jong FJ, Vingerling JR, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM, de Jong PT. Are retinal arteriolar or venular diameters associated with markers for cardiovascular disorders? The Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:2129–2134.
- Thom S, Stettler C, Stanton A, Witt N, Tapp R, Chaturvedi N, et al. Differential effects of antihypertensive treatment on the retinal microcirculation: an anglo-scandinavian cardiac outcomes trial substudy. *Hypertension* 2009; 54:405–408.

36. Hughes AD, Stanton AV, Jabbar AS, Chapman N, Martinez-Perez ME, Thom SA. Effect of antihypertensive treatment on retinal microvascular changes in hypertension. *J Hypertens* 2008; 26:1703–1707.
37. Baker ML, Hand PJ, Liew G, Wong TY, Rojchchina E, Mitchell P, *et al.*, Multi-Centre Retinal Stroke Study Group. Retinal microvascular signs may provide clues to the underlying vasculopathy in patients with deep intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2010; 41:618–623.

Reviewers' Summary Evaluations

Reviewer 1

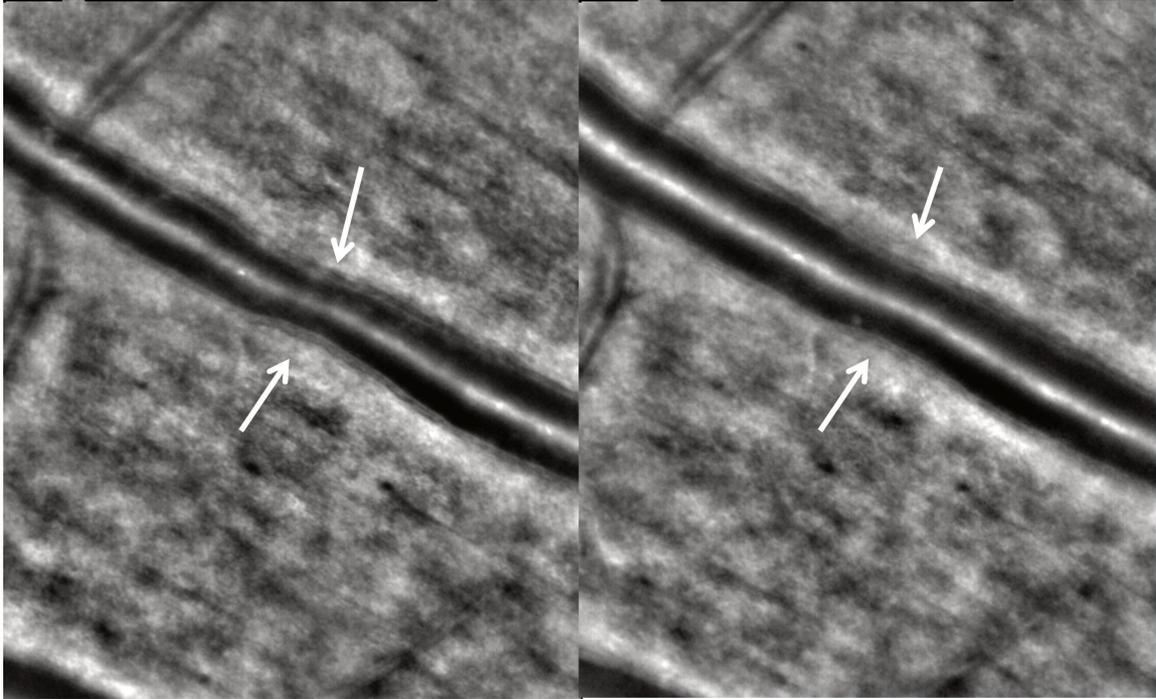
Small artery/arteriolar remodeling is a hallmark of hypertensive microangiopathy. In particular, increased wall/lumen ratio of the microvascular wall is associated with cardiovascular disease and end-organ damage. In the present study by Koch *et al.* Adaptive Optics (AO)-based fundusphotography was used to study (micro)vascular remodeling in both naive and treated hypertensive patients. The strength of this technique is that microvascular remodeling now can be studied noninvasively, which facilitates longitudinal follow-up (e.g. of treatment effects). An important requisite, however, is that this technique first needs validation to histological analysis (e.g. from gluteal biopsies).

Reviewer 2

The study proposes an innovative and promising method of evaluation of retinal small artery morphology, and provides evidence of an association between wall–lumen ratio (WLR) of retinal arterioles and blood pressure values. However, no validation of the method in respect to other available techniques is provided.

Adaptive optics should be directly compared with scanning laser Doppler flowmetry, or, even better, with the evaluation of the media-to-lumen ratio of subcutaneous small resistance arteries with micromyographic approaches, which represent, at present, the 'gold standard' and prognostically relevant approach to the evaluation of small artery morphology in human beings.

Afin de rechercher l'évolution de ces rétrécissements focaux, nous avons suivi certains patients. Ceci nous amené a observer la disparition spontanée de rétrécissements focaux chez plusieurs patients ce qui semble confirmer notre hypothèse d'une vasoréactivité focale.



2.4 3^{ème} article: Rétrécissement veineux sans contact artérioveineux: rôle du microenvironnement artériolaire dans le signe du croisement artérioveineux.

Paques M, Brolly A, Benesty J, Lermé N, Koch E, Rossant F, Bloch I, Girmens JF. Venous nicking without arteriovenous contact: the role of the arteriolar microenvironment in arteriovenous nickings. JAMA Ophthalmology, 2015.

Résumé :

Le signe du croisement artérioveineux dans la rétine est la cause des occlusions veineuses rétinienne et est un marqueur du vieillissement cérébrovasculaire. Cependant, on ne connaît pas le mécanisme en jeu même si le modèle mécanique répandu, selon lequel les artères écrasent les veines, n'a pas été mis en doute malgré le manque de preuves autres que les photographies du fond d'œil. Ici, nous avons observé que la coupure veineuse peut être observée en l'absence de contact physique avec une artériole.

Cette étude observationnelle, menée de janvier 2013 à septembre 2014, a inclus 7 patients présentant un remodelage d'un segment veineux proche d'une artériole rétinienne sans chevauchement artérioveineux, réalisé par ophtalmoscopie par optique adaptative. Les segments veineux affectés présentaient une association variable de coupure, de rétrécissement, de déviation et d'opacification. Les segments veineux ont été déviés vers les artérioles dans 6 cas sur 7. Le degré de rétrécissement veineux variait de 40% à 77%, tandis que sur ces sites, la largeur de l'espace intervasculaire variait de 16 à 42 µm. Des caractéristiques similaires ont été identifiées dans les croisements artérioveineux typiques.

Les croisements artérioveineux n'impliquent pas nécessairement une compression artérioveineuse. Au lieu de cela, la topologie des modifications veineuses suggère un processus rétractile prenant naissance dans l'espace intra-vasculaire. Ces résultats ont des implications importantes pour la compréhension des occlusions veineuses rétinienne et du vieillissement cérébrovasculaire.

Conclusion :

Nos données suggèrent que l'hypothèse d'une compression mécanique est partiellement fautive, et qu'un autre facteur tissulaire ou moléculaire pourrait être le médiateur de l'interaction artérioveineuse observée.

Brief Report

Venous Nicking Without Arteriovenous Contact

The Role of the Arteriolar Microenvironment in Arteriovenous Nickings

Michel Paques, MD, PhD; Aurélie Brolly, MD; Jonathan Benesty, MD, PhD; Nicolas Lermé, PhD; Edouard Koch, MD, PhD; Florence Rossant, PhD; Isabelle Bloch, PhD; Jean-François Girmens, MD

[+ Supplemental content at jamaophthalmology.com](#)

IMPORTANCE Arteriovenous nickings (AVNs) in the retina are the cause of retinal vein occlusions and are also surrogates of cerebrovascular aging. The prevalent mechanistic model of AVNs stating that arteries crush veins remains somewhat unchallenged despite the lack of evidence other than fundus photographs. Here, we observed that venous nicking may be observed in the absence of physical contact with an arteriole.

OBSERVATIONS This observational study, conducted from January 2013 to September 2014, included 7 patients showing remodeling of a venous segment close to a retinal arteriole without arteriovenous overlap were imaged by adaptive optics imaging. Affected venous segments showed a variable association of nicking, narrowing, deviation, and opacification. Venous segments were deviated toward the arterioles in 6 of the 7 cases. The degree of venous narrowing ranged from 40% to 77%, while at these sites, the width of the intervacular space ranged from 16 μm to 42 μm . Similar features were identified in typical AVNs.

CONCLUSIONS AND RELEVANCE Arteriovenous nickings do not necessarily involve an arteriovenous compression. Instead, the topology of venous changes suggests a retractile process originating in the intervacular space. These findings have important implications for the understanding of retinal vein occlusions and of cerebrovascular aging.

JAMA Ophthalmol. 2015;133(8):947-950. doi:10.1001/jamaophthalmol.2015.1132
Published online May 21, 2015.

Author Affiliations: Quinze-Vingts Hospital, DHU SightMaintain, INSERM-DHOS CIC 1423, Paris, F-75012 and Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France (Paques, Brolly, Benesty, Koch, Girmens); Institut Supérieur d'Electronique de Paris, Paris, France (Lermé, Rossant); Institut Mines Telecom, Telecom ParisTech, CNRS LTCl, Paris, France (Bloch).

Corresponding Author: Michel Paques, MD, PhD, Clinical Investigation Center 1423, Quinze-Vingts Hospital, 28 rue de Charenton, 75012 Paris, France (mp@cicoph.org).

Arteriovenous nickings (AVNs) may cause branch retinal vein occlusion,¹ and their prevalence correlates with arterial pressure² and with lacunar stroke.³ Thus, AVNs are surrogates of the retinal and cerebral micro-circulations. However, despite its clinical importance, the pathophysiology of AVNs has received limited attention. This may be because there is a general acceptance of the concept postulating that the vein is crushed by the bypassing artery. This belief persists despite the fact that histologies have consistently reported that venous changes were related to perivascular changes described either as glial proliferation,⁴ glial edema,⁵ or extracellular deposits.⁶ Furthermore, clinical studies of AVNs using high-resolution imaging have failed to evidence external compression of veins⁷ or parietal thickening of arterioles.⁸

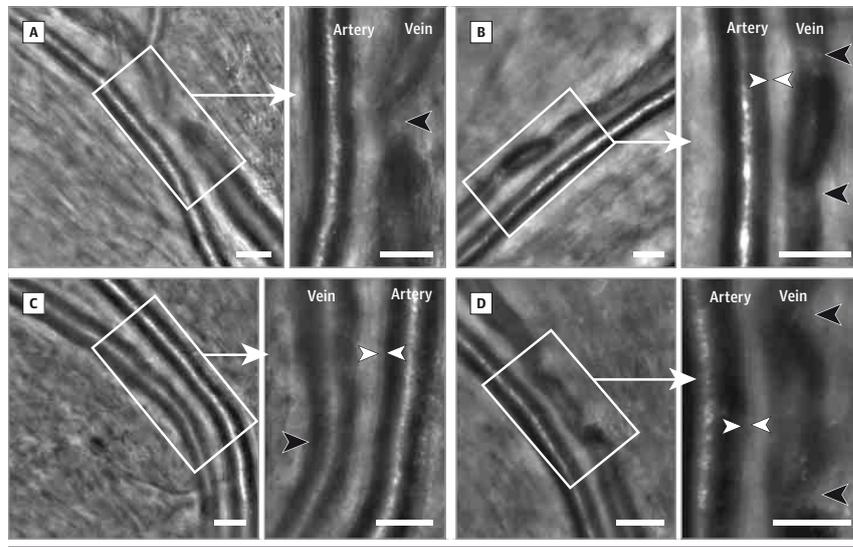
Clinical studies of AVNs are impaired by the extreme variability of their presentation and the difficult access of the arteriovenous interface. In this regard, of interest are cases of venous remodeling occurring where an artery and a vein are close yet not overlapping^{8,9} because the arteriovenous interface is directly observable. Here, we analyzed such cases using high-resolution imaging to better understand the relationship between the arteriovenous interface and venous changes.

Methods

This institutional clinical study, conducted from January 2013 to September 2014, was carried out according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Approval of the Ethics Committee of the Saint-Antoine Hospital (Paris, France) was obtained. Seven adult patients showing venous remodeling proximal to arterioles were recruited. Each patient received full oral and written information and gave written consent prior to inclusion.

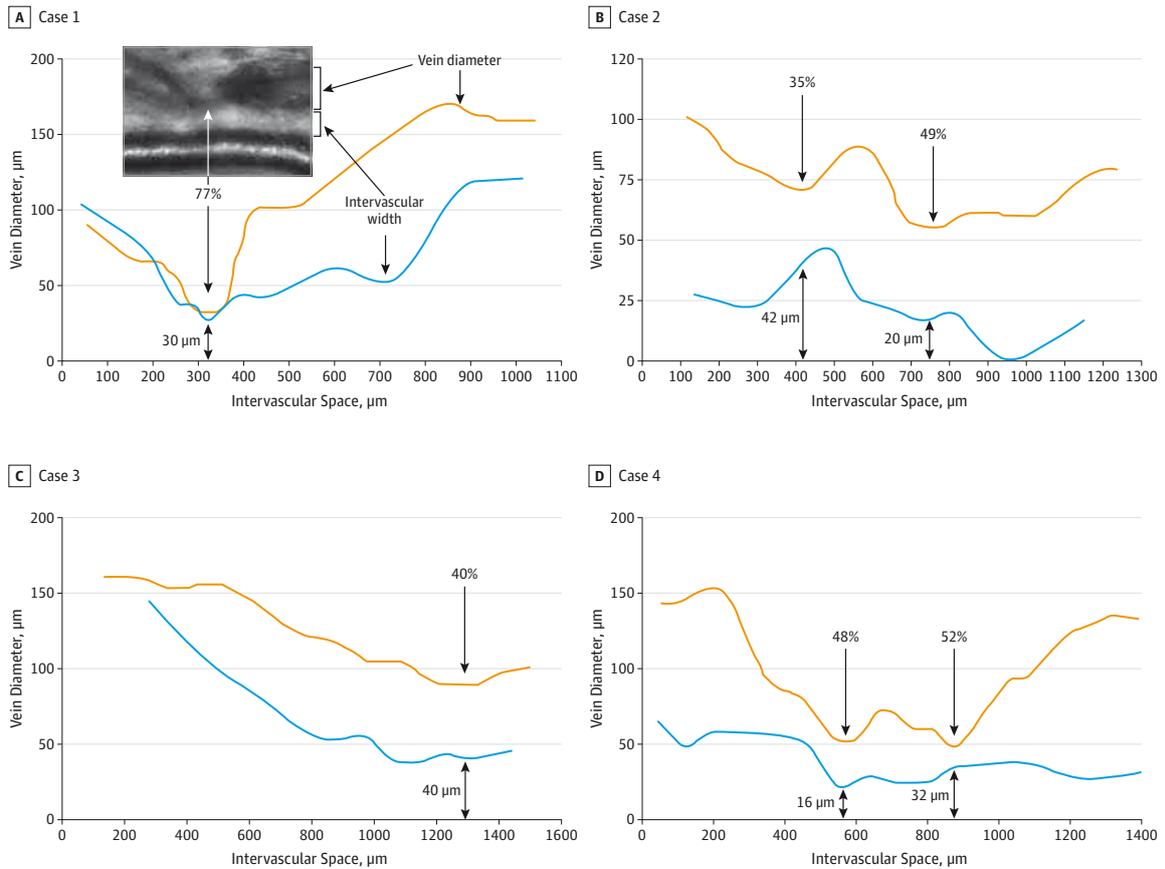
Infrared and 488-nm reflectance imaging and optical coherence tomography were obtained using combined scanning laser ophthalmoscope-optical coherence tomography (Spectralis; Heidelberg Engineering). Adaptive optics (AOs) infrared fundus images were obtained with a commercially available flood imaging AO camera (rtx1 camera; Imagine Eyes) using a previously described procedure.⁸ The AO camera illuminates the fundus with a noncoherent light delivered by a superluminescent diode at 840 nm, covering a 4° × 4° area (ie, approximately 1.2 mm × 1.2 mm in emmetropic eyes). For image acquisition, the gaze of the left eye was oriented with an external target, which allowed the exploration of the fundus of the right eye up to approximately 30° from the disc.

Figure 1. Adaptive Optics Images of Arteriovenous Interfaces of Venous Nicks



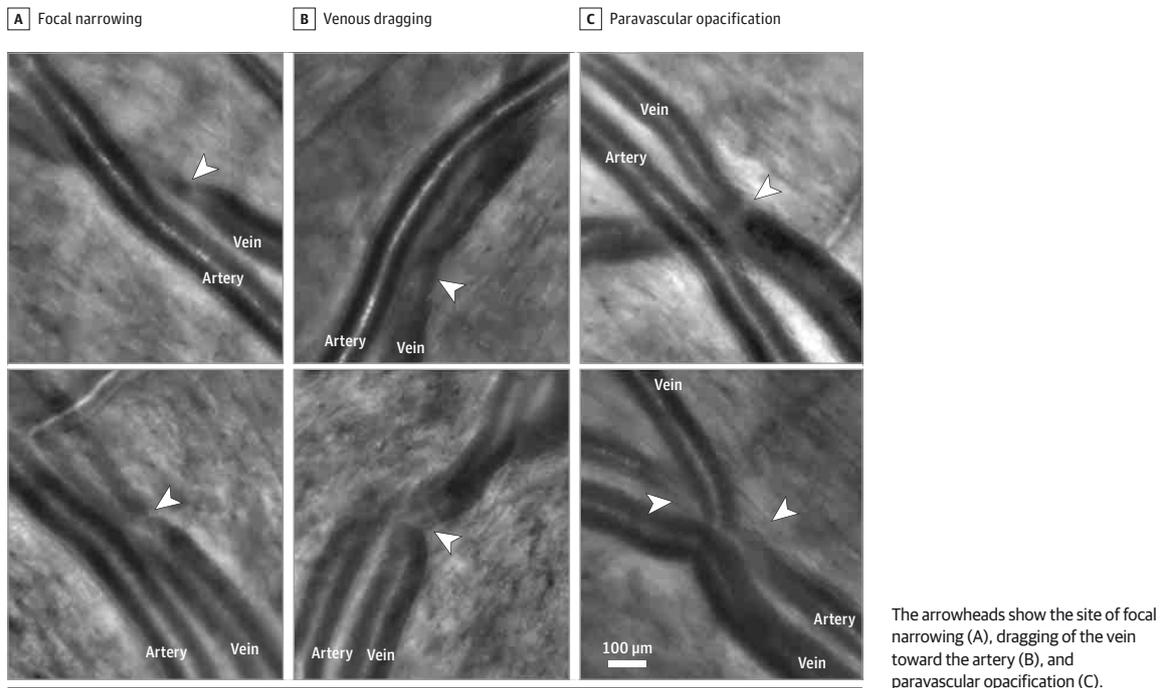
From A to D, the adaptive optics images are of cases 1 to 4. In each panel, the magnification is shown to the right of the original adaptive optics image. The arteriolar wall (between white arrowheads) does not enter in contact with the venous lumen. The black arrowheads indicate peak venous narrowing (bars = 125 μ m; see also eFigure 1 in the Supplement).

Figure 2. Morphometric Analysis of Arteriovenous Interfaces



Variations of lumen diameter (orange lines) and of intervacular space (blue lines) were measured along venous segments. The black arrows point to venous narrowings.

Figure 3. Adaptive Optics Images of Classic Arteriovenous Nickings (With Arteriovenous Crossings)



Arteries and veins were semiautomatically segmented from AO images using a custom software running under Matlab (MathWorks).¹⁰ The segmentation algorithm is based on the detection of 4 curves parallel to the central reflection, which are refined using a deformable model incorporating a parallelism constraint. Graphic representations of the venous diameter and of the width of the intervacular space (ie, the distance between the venous lumen and the outer limit of the arteriolar wall) along a given venous segment were generated.

Results

Seven cases of focal venous remodeling without arteriovenous crossing from 7 patients were documented. Their mean age was 65.9 years (range, 54-80); 3 were women; and 4 had arterial hypertension. Three were fellow eyes of branch retinal vein occlusion. Part of the data from case 4 was previously reported.⁸ The regions of interest were located along temporal arcades, up to 3 mm from the disc. The affected vessels had a diameter of 100 μm to 150 μm . There was unequivocal deviation of the vein toward the arteriole in 6 of the 7 cases. Adaptive optics imaging allowed a high-power view of the arteriolar wall, the arteriovenous interface, and the venous morphology (Figure 1 and eFigure 1 in the Supplement). Nicking of the vein at the side opposite to the arteriole was noted in 3 cases (1, 4, and 5). Adaptive optics imaging could delineate the area between the outer boundary of the arteriole and the venous lumen. At sites of maximal narrowings, the reduction of venous diameter ranged from 40% to 77%, while the width of the intervacular space ranged from 16 μm to 42 μm (Figure 2; eFigure 1 in the Supplement).

We then examined AO images of common presentations of AVNs (that is, within arteriovenous crossing) to search for similar venous changes. For this, we retrospectively examined AO images of AVNs occurring at arteriovenous crossings from other eyes to determine whether similar changes may be present (Figure 3). Focal narrowing, venous dragging toward the arteriole, and paravascular opacification in AVNs were present; some combined several of these features.

Discussion

There has been a longstanding yet unsubstantiated consensus among clinicians about the compressive nature of the arteriovenous conflict underlying AVNs. Our findings support the conclusions of histology and in vivo studies suggesting that the paradigm of arterial crushing as the cause of venous nicking stems from a misinterpretation of fundus photographs.⁴ We indeed found here that veins close to arterioles, but without detectable arteriovenous contact, may undergo marked phenotypical changes comprising nicking, narrowing, opacification, and/or dragging. Nicking of the venous wall on the side opposite to the arteriole, venous dragging toward the arteriole, and the presence of an arteriovenous gap up to 40 μm do not fit easily with the hypothesis of an arterial compression. Similar findings were retrospectively evidenced in AVNs occurring with arteriovenous overlap from other patients, which suggest that classic AVNs may also imply indirect arteriovenous interaction.

Our findings suggest that the interaction between arteries and veins leading to AVNs is mediated by the paravascular milieu. Such hypothesis of an indirect arteriovenous interaction has been pre-

viously proposed.¹¹ Our results suggest that retraction of the intervacular space plays a key role in venous changes; however, this somewhat conflicts with histology findings, which would rather imply its expansion. Therefore, the various ophthalmoscopic presentations of AVNs may result from the combined effects of hypertrophy and retraction of the intervacular space. The common adventitia and/or the inner limiting membrane may provide a scaffold transmitting retractile forces. The lower mechanical resistance of veins would explain their predominant deviation.

The process that initiates such arteriovenous interaction remains to be characterized. Molecular compounds in the circulation and/or derived from the metabolism of arteries may leak into the arteriolar microenvironment and modify glial, microglial, and/or venous metabolism. The factors mediating such arteriovenous interaction may either be immunomodulators or vasomodulators. It is known that AVNs are related to biological markers of inflammation¹² and that veins are responsive to vasoactive compounds.¹³ Chronically increased venous tone could induce rearrangement of the scaffold of smooth muscle cells of veins, similarly to what is observed in arterioles during arterial hypertension.¹⁴ The role of venous flow turbulence in this process is unclear because laminar flow may be present even in severe venous narrowings (eFigure 2 in the Supplement).

There is indirect evidence that AVNs may regress,¹⁵ suggesting that AVNs have a dynamic component. Therefore, further investigations may address the natural history of AVNs. Histology of arteriovenous crossings may address glial cells, the arrangement of intracellular actin networks, and/or the extracellular matrix. The presence of vasoactive or inflammatory metabolites, in particular small and/or lipophilic molecules,¹¹ which may cross the blood-retinal barrier, may also be explored. It is unclear whether experimental studies will be contributive because we have as of yet failed to identify AVNs in rodent and nonhuman primate eyes (M.P.; unpublished data; 2013). Given the proximity of the central artery and vein within the optic nerve, it is plausible that central retinal vein occlusion may be related to a similar interaction. It may also be of interest to document whether similar changes occur in the brain.

Conclusions

In summary, this study found that arteriovenous nickings do not necessarily involve an arteriovenous compression. Instead, the topology of venous changes suggests a retractile process originating in the intervacular space. These findings have important implications for the understanding of retinal vein occlusions and cerebrovascular aging.

ARTICLE INFORMATION

Submitted for Publication: December 17, 2014; final revision received March 12, 2015; accepted March 16, 2015.

Published Online: May 21, 2015.
doi:10.1001/jamaophthalmol.2015.1132.

Author Contributions: Drs Paques and Brolly had full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. All authors had access to data and analysis and participated in the redaction of the manuscript.

Study concept and design: Paques, Benesty, Lermé, Rossant.

Acquisition, analysis, or interpretation of data:

Paques, Brolly, Koch, Bloch, Girmens.

Drafting of the manuscript: Paques, Brolly, Benesty, Rossant.

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Paques, Lermé, Koch, Bloch, Girmens.

Obtained funding: Paques.

Administrative, technical, or material support:

Benesty, Lermé, Koch, Rossant.

Study supervision: Paques, Bloch.

Conflict of Interest Disclosures: All authors have completed and submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Dr Paques is a consultant for Imagine Eyes, the manufacturer of the adaptive optics camera used in this study, and has received personal fees from Merck Serono. Dr Girmens has received grants and/or personal fees from Allergan, Bayer, Novartis, and Sanofi-Fovea Pharmaceuticals. No other disclosures were reported.

Funding/Support: This study was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Contrat d'Interface 2011), the Agence Nationale

de la Recherche (ANR-09-TECS-009 and ANR-12-TECS-0015-03), and the Association Contre l'OVR.

Role of the Funder/Sponsor: The funders had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication.

Previous Presentation: This study was presented in part at the 29th Annual Jules Gonin Meeting; September 6, 2014; Zurich, Switzerland.

REFERENCES

1. Klein R, Klein BE, Moss SE, Meuer SM. The epidemiology of retinal vein occlusion: the Beaver Dam Eye Study. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2000; 98:133-141.
2. Wong TY, Klein R, Nieto FJ, et al. Retinal microvascular abnormalities and 10-year cardiovascular mortality: a population-based case-control study. *Ophthalmology.* 2003;110(5):933-940.
3. Hanff TC, Sharrett AR, Mosley TH, et al. Retinal microvascular abnormalities predict progression of brain microvascular disease: an atherosclerosis risk in communities magnetic resonance imaging study. *Stroke.* 2014;45(4):1012-1017.
4. Seitz R. *The Retinal Vessels: Comparative Ophthalmoscopic and Histologic Studies on Healthy and Diseased Eyes.* Saint Louis, MO: CV Mosby Co; 1964.
5. Kimura T, Mizota A, Fujimoto N, Tsuyama Y. Light and electron microscopic studies on human retinal blood vessels of patients with sclerosis and hypertension. *Int Ophthalmol.* 2005;26(4-5):151-158.
6. Jefferies P, Clemett R, Day T. An anatomical study of retinal arteriovenous crossings and their role in the pathogenesis of retinal branch vein occlusion. *Aust NZ J Ophthalmol.* 1993;21(4):213-217.
7. Kumagai K, Tsujikawa A, Muraoka Y, et al. Three-dimensional optical coherence tomography evaluation of vascular changes at arteriovenous crossings. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(3):1867-1875.
8. Koch E, Rosenbaum D, Brolly A, et al. Morphometric analysis of small arteries in the human retina using adaptive optics imaging: relationship with blood pressure and focal vascular changes. *J Hypertens.* 2014;32(4):890-898.
9. Wise GN, Dollery CT, Henkind P. *The Retinal Circulation.* New York, NY: Harper & Row Publishers Inc; 1971: 231.
10. Lermé N, Rossant F, Bloch I, et al. Segmentation of retinal arteries in adaptive optics images. International Conference on Pattern Recognition. 2014; 574-578.
11. Fraenkl SA, Mozaffarieh M, Flammer J. Retinal vein occlusions: the potential impact of a dysregulation of the retinal veins. *EPMA J.* 2010;1(2):253-261.
12. Klein R, Sharrett AR, Klein BE, et al. Are retinal arteriolar abnormalities related to atherosclerosis? the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(6):1644-1650.
13. Raffetto JD, Barros YV, Wells AK, Khalil RA. MMP-2 induced vein relaxation via inhibition of [Ca²⁺]_i-dependent mechanisms of venous smooth muscle contraction: role of RGD peptides. *J Surg Res.* 2010;159(2):755-764.
14. Mulvany MJ. Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2002;4(1):49-55.
15. Liew G, Campbell S, Klein R, et al. Ten-year longitudinal changes in retinal microvascular lesions: the atherosclerosis risk in communities study. *Ophthalmology.* 2011;118(8):1612-1618.

2.5 4^{ème} Article: Etude morphométrique des petites artères rétiniennes en ophtalmoscopie par optique adaptative lors de la phase aiguë d'un infarctus cérébral: relation avec la leucopathie et la rétinopathie. (en cours de rédaction)

Koch E, Buch D, Labreuche J, Kyheng M, Rossant F, Girerd X, Chadenat ML, Pico F, Paques M. Morphometric study of small retinal arteries by adaptive optics imaging in the acute phase of a stroke: relationship with vascular leukopathy and retinopathy.

Résumé :

La maladie des petites artères (<150µm) est incriminée dans une grande proportion des infarctus cérébraux. Ces vaisseaux sont difficiles d'accès in vivo. Etant donné les similitudes fonctionnelles entre vaisseaux cérébraux et rétiniens, la vascularisation de la rétine peut être considérée comme un indicateur de l'état de la circulation cérébrale. L'imagerie rétinienne améliorée par l'optique adaptative (OA) permet d'observer la microcirculation rétinienne humaine de manière non invasive avec une résolution transversale d'environ 2 microns. Nous rapportons ici la première étude de morphométrie vasculaire rétinienne utilisant l'OA chez des patients ayant récemment présenté un infarctus cérébral.

Il s'agit d'une étude observationnelle monocentrique. Vingt contrôles, 21 patients hypertendus chroniques, 31 patients ayant subi un infarctus cérébral récent (<7 jours) ont été inclus: hypertendus (n=18) ou non hypertendus (n=13). Les facteurs de risque cardiovasculaires ont été recueillis, de même que les scores d'IRM de Fazekas évaluant les hyperintensités de la substance blanche, la cause de l'infarctus et la présence d'une rétinopathie hypertensive. Des mesures du rapport paroi sur lumière (WLR) ont été effectuées, en plus de celles de la lumière artérielle (LD) et de la vasoconstriction induite par l'hyperoxie.

Le WLR était significativement plus élevé ($p < 0,001$) dans le groupe HTA (0,38 [0,31; 0,43]) que dans le groupe témoin (0,27 [0,24; 0,30]). Après ajustement pour la pression artérielle et l'âge, il n'y avait pas de différence de WLR entre le groupe ayant subi un infarctus cérébral et le groupe témoin. Chez les patients ayant subi un AVC, il n'y avait pas de corrélation indépendante entre le score de Fazekas et le WLR. Le LD était réduit dans le groupe HTA (93 [79; 100]) par rapport au groupe témoin (106 [94; 114]), mais il n'y avait pas de différence de LD entre les groupes contrôle et AVC après ajustement pour la pression artérielle et l'âge. Aucune différence de vasoconstriction induite par l'oxygène n'a été observée entre les groupes.

Conclusion:

Notre étude montre que les patients victimes d'un AVC récent ne présentent pas de changement significatif dans l'épaisseur de la paroi par rapport à un groupe post-contrôle après ajustement pour l'âge et la pression artérielle. Le score d'hyperintensité de la substance blanche ne semble pas non plus être corrélé avec le WLR.

Morphometric analysis of small retinal arteries using adaptive optics imaging in the acute stage of brain infarct: relationship with vascular white substance disease and retinopathy.

Key words: stroke, brain infarction, retinopathy, small vessel diseases, white matter.

E. Koch^{1,2}; D. Buch³; J. Labreuche⁴; M. Kyheng⁴; F. Rossant⁷; X. Girerd⁶; F. Pico^{3,5}; M. Paques²

¹ Versailles Hospital Center, Ophthalmology Department, Versailles, France.

² INSERM Unit 1423, Clinical Investigation Center, Quinze-Vingts National Ophthalmic Hospital, INSERM and Pierre et Marie Curie University, Paris 6, France.

³ Versailles Hospital Center, Neurology Department, Neurovascular Unit, Versailles, France.

⁴ Lille University, Lille University Hospital, EA 2694 – Public Health : Epidemiology and Quality of Care Lille, France.

⁵ INSERM Unité 1148, Laboratory for Vascular Translational Science, Paris.

⁶ Unité de prévention cardiovasculaire, Institut of Cardiometabolism and Nutrition, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris Public Hospital Network. Paris, France

⁷ Electronics Institute of Paris, Paris, France

Abstract:

Introduction: Small artery disease (<100µm) is incriminated in a large proportion of brain infarctions (stroke). These vessels are difficult to access *in vivo*. Given the functional similarities between cerebral vessels and retinal vessels, retinal vascularization can be considered an indicator of how blood is flowing in the brain. Adaptive Optics (AO) enhanced retinal imaging enables to observe non-invasively human retinal microcirculation with transverse resolution of some 2 microns. We report here the first study of retinal vascular morphometry using AO in recent stroke patients.

Material and method: A single center observational study. Twenty controls, 21 chronic hypertensive patients, 31 recent stroke patients (<7 days) were included: hypertensive (n=18) or non-hypertensive (n=13). Cardiovascular risk factors were collected, as were Fazekas MRI scores assessing white matter hyperintensities, cause of stroke, and presence of hypertensive retinopathy. Wall to lumen ratio (WLR) measurements were performed, in addition to that of arterial lumen (lumen diameter, LD) and oxygen-induced vasoconstriction measurements.

Results: the WLR was significantly higher ($p<0.001$) in the HTN group (0.38[0.31; 0.43]) than in the control group (0.27[0.24; 0.30]). There was no difference in WLR between the stroke and control groups after adjustment for blood pressure and age. Among stroke patients, there was no independent correlation between the Fazekas score and the WLR. The LD was reduced in the HTN group (93[79; 100]) compared to the control group (106[94; 114]), but there was no difference in LD between the control and stroke groups after adjustment for blood pressure and age. No difference in oxygen-induced vasoconstriction was found between the groups.

Conclusion: Our study shows that patients with recent stroke do not show a significant change in wall thickness compared to a post-control group after adjustment for age and blood pressure. The white matter hyperintensity score also does not appear to be correlated with WLR.

Introduction:

Small artery diseases account for one-third of symptomatic brain infarcts (stroke), two-thirds of which are due to large arteries greater than 0.1mm. (1) They are also the

cause of silent ischemic brain infarcts and the main cause of cognitive decline. (2) As such, the Rotterdam Scan Study demonstrated in 2003 that in the 20% of healthy subjects between 60 and 90 years of

age with MRI signs of silent stroke, the risk of developing dementia was doubled. (3) Currently, the main marker for these small artery diseases is the T2 FLAIR hyperintensity of the periventricular and subcortical white matter in brain MRI. (4) However, this small artery disease can lead to intracerebral bleeding often resulting in disastrous consequences. In addition to the brain, one of the organs affected by this disease that is easy to study in vivo and whose arterial abnormalities are associated with the risk of stroke is the eye. (5) For this reason, many studies have focused on the relationship between retinal vascular disease and cerebral vascular disease. (6-10)

The purpose of our study was to demonstrate that remodeling of small arteries of the human retina was detectable with a high-resolution camera in patients with cerebral infarction and to evaluate the influence of cardiovascular risk factors on the remodeling of these small arteries.

Materials and method:

Population:

We studied 72 patients who underwent Adaptive Optics (AO) imaging of the retinal arteries at the Quinze-Vingts Hospital clinical investigation center in Paris, France and in the ophthalmology department of Versailles hospital, Versailles, France. The cohort included a group of controls examined at Quinze-Vingts Hospital of 20 individuals (27.7%), a group of hypertensive patients recruited in the cardiovascular prevention unit of Pitié-Salpêtrière of 21 individuals (29.2%), and a group of recent stroke patients (under 7 days) hospitalized in the neurovascular unit of the Versailles hospital center of 31 patients (43.1%), including 13 normotensive and 18 hypertensive subjects. Four groups were identified: a control group, a hypertensive group, a normotensive stroke group, and a hypertensive stroke group.

The inclusion criteria for the control group was the absence of history of hypertension, diabetes and stroke. The control population was recruited by the staff of the Quinze-Vingts clinical investigation center on a voluntary basis between January and April

2012. For hypertensive patients, the inclusion criteria were: a SBP > 140 mmHg/DBS > 90 mmHg, untreated or inadequately controlled hypertension, age > 18 years. Subjects were recruited consecutively from consults at the Pitié-Salpêtrière cardiovascular prevention unit between January and April 2012. The inclusion criteria for the stroke group was the occurrence of a symptomatic brain infarct under 7 days old that resulted in hospitalization in a neurovascular unit. Infarction was defined as a positive diffusion on a weighted brain imaging in an area with acute neurological deficit. Patients were enrolled consecutively between July 2014 and October 2015. The criteria for non-inclusion were the existence of a contraindication to pupil dilation, a refractive disorder with power greater than 4 diopters, instability fixation, lack of compliance with the protocol, retinal photosensitivity. The exclusion criteria were the existence of an ocular disease and the presence of opacification of the ocular environments or any other cause permanently deteriorating the quality of the retinal images, the hemorrhaging nature of the stroke.

Type of study:

This study was carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. This study was supported by a grant from the National Research Agency (ANR iPhot) awarded to the Clinical Investigation Centre (CIC 1423 INSERM) of the CHNO des Quinze-Vingts. This study had received a favourable opinion from the Ethics Committee of Saint Antoine Hospital (Paris, France). All patients received comprehensive oral and written information and gave their written consent before inclusion.

Data collected:

All patients underwent retinal artery imaging with a high-resolution adaptive optics camera, which was then analyzed so as to extract from it vascular morphometric data using dedicated software. In patients in the stroke group, cardiovascular risk factors, treatment, cause of stroke,

retinophotography and brain MRI were collected.

Adaptive Optics Imaging (AO):

Background images in adaptive optics (AO) were obtained using a flow imaging AO camera (rtx1 camera, Imagine Eyes, Orsay, France) using a slightly modified protocol from the one described above.(11) The baseline site was a segment of the supero-temporal artery of the right eye, at least 250 mm long with an internal diameter of at least 50 mm, with no bifurcations, at a disc diameter of the optic disc (see example in Figure 1). Blood pressure (BP) was measured while sitting while an adaptive optics image was being acquired using an automated oscillometric device using a cuff (VS800, Mindray Corporation, Shenzhen, China). All recent stroke patients took an oxygen test: inhalation using a high oxygen mask at 10 liters/min for 10 minutes. For this test, an OA image was taken before the start of the test, 10 minutes after the start of the test under O₂, and finally 10 minutes after the test was stopped.

Image analysis:

AO images were segmented semi-automatically using previously described customized software. (11) Graphical representations of morphometric parameters along a given vessel segment (called morphograms) were generated. The ratio of total wall thickness (WT) to light diameter (LD) over an average of 250 mm defines the WLR. The total vein diameter (VD) was measured with this method. All measurements were made in a hidden way.

Retinophotographs:

A photograph of the retina of the right eye was taken on the same day as the adaptive optics retinal photograph. The reader, for whom the patient characteristics were masked, assessed the photographs for the presence of microvascular abnormalities. Hypertensive retinopathy was defined as present in a patient if one of the following lesions were detected: microaneurysms, retinal bleeding, soft exudates and other less common lesions (e.g., hard exudates, macular edema, swelling of the optic disc).

Brain imaging:

Brain MRI and image interpretation were performed in patients in the stroke upon entry. In short, T1- and T2-weighted magnetic resonance images were obtained. The MRI reader, unaware of the results of the patients' retinal photography, evaluated the digitized data on a personal display workstation at Versailles Hospital. In the evaluation of white matter lesions, focal anomalies were ignored. Thus, if one or both sides of the brain were carrying focal abnormalities, estimates were based on areas not reached or unaffected. Spin density images (repetition time, 3000 milliseconds, echo time, 30 seconds) were used to estimate the overall volume of the periventricular and subcortical white matter signal abnormalities. These were coded on a scale from 0 to 3, based on the Fazekas classification. (12)

Statistical analysis:

Continuous variables are expressed as medians (interquartile range) and categorical variables are expressed as numbers (percentages). Comparison in clinical characteristics and retinal vascular morphometry (WLR, Wall and ratio) between the 4 study groups (healthy, hypertensive, stroke without hypertension and stroke with hypertension) was performed using Chi-Square test for sex and using Kruskal-Wallis for continuous variables. For retinal vascular morphometry, post-hoc pre-specified pairwise comparisons were done before and after adjustment on age and systolic blood pressure; adjustments were done using non-parametric covariance analysis and p-values were corrected for multiple comparisons using Bonferroni correction. In stroke patients, we studied the univariate association of cardiovascular risk factors with retinopathy diagnosis using Chi-Square test for categorical factors and using Mann-Whitney U tests for continuous factors. We also studied the univariate association of cardiovascular risk factors with retinal vascular morphometry parameters (WLR, Wall and Ratio) using Mann-Whitney U-tests for categorical (all binary) factors and using Spearman's rank correlation for continuous factors. Statistical testing was

conducted at the two-tailed α -level of 0.05. Data were analyzed using the SAS software version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC).

Results:

72 patients were examined (32 women and 40 men; average age 58.7 years (SD=20.2)). The population description for each retinal vascular morphometry parameter: wall/arterial lumen ratio (WLR), arterial light diameter (LD), venous diameter (VD), variation in arterial diameter under oxygen, is summarized in Table 1. As such, in the HTN group, the arterial vessel lumen is smaller than in the other three groups, while the WLR is higher. In addition, there appears to be less variation in arterial lumen under the effect of oxygen, (p=0.046).

Table 2 shows the relationships between the presence of retinopathy in retinophotography and cardiovascular risk factors in patients with recent stroke. There is a significant relationship between the presence of retinopathy in fundus photographs and the presence of hypertension (p=0.003), but also in high Fazekas scores (p=0.022).

An analysis of the relationships between retinal arteriolar morphometry and cardiovascular risk factors in the stroke patient group was performed (Table 3). Among the risk factors correlated with retinal arteriolar morphometry are diabetes, hbA1c and the Fazekas score, which are associated, based on a univariate analysis, with a higher WLR. Similarly, stating dosing is associated with a higher WALL. No cardiovascular risk factors were associated with the ratio variation LD O2/LD.

Table 4 describes the retinal vascular markers obtained by standard retinophotography and by OA with analysis software based on stroke cause. It appears that WLR is higher in cardio-embolic, atherothrombotic and lacunar stroke than in cryptogenic stroked or those from other causes.

Table 5 shows the comparison of retinal arteriolar morphometry parameters over

the 4 groups. The WLR is significantly higher in the HTN group compared to the normotensive group (p<0.001). However, when the analysis is adjusted for age and SBP, there is no longer a significant difference (p=0.086). There is no difference in WLR between the control and normotensive stroke groups nor between the hypertension and hypertensive stroke groups.

Discussion :

Our study showed that WLR had not increased during a recent stroke. Thus, there was no difference in WLR between the control group and the non-hypertensive stroke group or between the hypertensive group and the hypertensive stroke group. There does not seem to be any remodeling of retinal microcirculation when the stroke is related to small artery disease. However, some patients in the non-hypertensive stroke group presented with morphometric abnormalities. Subsequently, 4 patients (76 years old[60; 92]) out of 13 in this group, or 30%, had a WLR greater than 0.35 (0.364[0.351; 0.506]), for a normal of less than 0.31 (Figure 2). There is indeed a remodeling of the small arteries in some normotensive stroke patients. It is therefore possible that some causes of stroke related to small artery disease may be correlated with wall remodeling or endothelial dysfunction of the body's small arteries. Only remodeling in some patients was observed in our study, no endothelial dysfunction could be observed in these patients during the oxygen test. (13-15) Retinal arteriolar WLR appears to be a marker strongly correlated with HTN and age remodeling. The measurement of WLR in a patient could provide a phenotypic evaluation of arteriolar remodeling related to these two cardiovascular risk factors: age and hypertension. As such, WLR is less than 0.3 in 75% of controls, greater than 0.3 in 74% of patients with recent stroke and 85% of patients with hypertension. WLR could also confirm the presence of hypertension in the event of doubt by completing systemic vascular phenotyping. The analysis of these results is limited by the size of the study population, probably indicating a lack of study power. In fact, it is

difficult to recruit patients with a recent stroke who can sit for an adaptive optics examination. It is possible that selection bias is related to this recruitment and therefore to the least severe stroke patients. Another criticism that could be made of our study is that the examination was not blinded for the presence of a cerebral infarction. The relationship between vascular risk factors and WLR was carried out blindly and was consistent with the data in the literature. No significant effects of sex, tobacco, LDL, statin use, atrial fibrillation, cerebral infarction subtypes and alcohol consumption were found as risk factors for small artery disease in our study, but only with age and hypertension, which is consistent with literature data.

Small vessel disease is suspected as a systemic disease affecting all small vessels and which would be exacerbated by cardiovascular risk factors and age. (13) In any case, it is clear that the detection of vascular abnormalities in retinal arterioles should result in further investigation and treatment of potential cardiovascular risk factors since they are associated with an increased risk of brain damage.(5-7, 10, 16, 16, 16-19) Subsequently, Wong in 2001 demonstrated, after adjusting for age, diabetes and mean blood pressure, that photographic presence of retinal vascular abnormalities was associated with a relative risk of stroke of 2.58 (1.59-4.20)(5) This type of association would be more specific for certain lacunar strokes with a relative risk multiplied by 2.2 to 3.5 according to studies on retinal focal arteriolar narrowing. (6,7)

Data from the literature on WLR and stroke occurrence report different results from those in our study with an increase in WLR in the stroke group. (20) In our study, we found no difference in WLR between groups when age and systolic blood pressure were adjusted. In Baleanu's study, a univariate statistical analysis showed an increase in WLR in the stroke group with hypertension, which we also found in our univariate assessment. However, when this difference in WLR is adjusted, it is no longer significant (Table 6). There is also a higher median WLR for the hypertensive stroke group in the Baleanu study than in our study (0.44 vs

0.33). This difference can be explained by a population difference: In fact, hypertensive patients with a recent stroke in our study seem to have lower blood pressure than in the Baleanu study (systolic pressure: 135mmHg versus 148mmHg) but are treated proportionally on average in a comparable way: 51.6% of hypertensive patients are treated in our study versus 56.5% in the Baleanu study. Thus, the difference observed in this group may only be due to a more pronounced severity of hypertension. It would be interesting to study more specifically treated and untreated patients for hypertension in order to ascertain if there is a correction of WLR with hypotensive therapy.

Finally, the correlation between white matter hyperintensity and vascular abnormalities in the fundus was studied in the ARIC study in 2014 where they found an odds ratio of 3.18[1.17-5.89] between the presence of retinopathy and the progression of white matter hyperintensity (21). In our study we found a correlation between the presence of retinopathy in fundus photography and the Fazekas white matter hyperintensity score ($p=0.022$). This confirms that the presence of retinal microvascular abnormalities can predict cerebral white matter hyperintensity

Subsequently, in our study, we did not find an increase in retinal WLR during stroke but we found an association between the presence of retinopathy in fundus photography and white matter hyperintensity. This suggests that certain microcirculation disease mechanisms may be common between the eye and the brain, but that others are closely related to hypertension and age, such as increased WLR. A study with a larger cohort needs to be conducted to confirm these hypotheses.

Bibliography:

1. Greenberg SM. Small vessels, big problems. *N Engl J Med.* 2006 Apr 6;354(14):1451-3.
2. Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges.

Lancet Neurol. 2010 Jul;9(7):689-701.

3. Vermeer SE, Prins ND, den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MMB. Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *N Engl J Med.* 2003 Mar 27;348(13):1215-22.

4. DeBette S, Markus HS. The clinical importance of white matter hyperintensities on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2010 Jul 26;341:c3666.

5. Wong TY, Klein R, Couper DJ, Cooper LS, Shahar E, Hubbard LD, et al. Retinal microvascular abnormalities and incident stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Lancet.* 2001 Oct 6;358(9288):1134-40.

6. Lindley RI, Wang JJ, Wong M-C, Mitchell P, Liew G, Hand P, et al. Retinal microvasculature in acute lacunar stroke: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.* 2009 Jul;8(7):628-34.

7. Yatsuya H, Folsom AR, Wong TY, Klein R, Klein BEK, Sharrett AR. Retinal Microvascular Abnormalities and Risk of Lacunar Stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Stroke J Cereb Circ.* 2010 Jul;41(7):1349-55.

8. Haan M, Espeland MA, Klein BE, Casanova R, Gaussoin SA, Jackson RD, et al. Cognitive function and retinal and ischemic brain changes: the Women's Health Initiative. *Neurology.* 2012 Mar 27;78(13):942-9.

9. Cabrera DeBuc D, Somfai GM, Koller A. Retinal microvascular network alterations: potential biomarkers of cerebrovascular and neural diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016 Dec 6;ajpheart.00201.2016.

10. Mutlu U, Adams HHH, Hofman A, Lugt A van der, Klaver CCW, Vernooij MW, et al. Retinal Microvascular Calibers Are Associated With Enlarged Perivascular Spaces in the Brain. *Stroke.* 2016 May;47(5):1374-6.

11. Koch E, Rosenbaum D, Brolly A, Sahel J-A, Chaumet-Riffaud P, Girerd X, et al. Morphometric analysis of small arteries in the human retina using adaptive optics imaging: relationship with blood pressure and focal vascular changes. *J Hypertens.* 2014 Apr;32(4):890-8.

12. Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A,

Hurtig HI, Zimmerman RA. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJR Am J Roentgenol.* 1987 Aug;149(2):351-6.

13. Thompson CS, Hakim AM. Living beyond our physiological means: small vessel disease of the brain is an expression of a systemic failure in arteriolar function: a unifying hypothesis. *Stroke.* 2009 May;40(5):e322-30.

14. Rosenbaum D, Kachenoura N, Koch E, Paques M, Cluzel P, Redheuil A, et al. Relationships between retinal arteriole anatomy and aortic geometry and function and peripheral resistance in hypertensives. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens.* 2016 Jul;39(7):536-42.

15. Polak JF, Pencina MJ, Herrington D, O'Leary DH. Associations of Edge-Detected and Manual-Traced Common Carotid Intima-Media Thickness Measurements With Framingham Risk Factors: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Stroke J Cereb Circ [Internet].* 2011 May 5 [cited 2011 May 9]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546477>

16. Wong TY, Klein R, Sharrett AR, Couper DJ, Klein BEK, Liao D-P, et al. Cerebral white matter lesions, retinopathy, and incident clinical stroke. *JAMA.* 2002 Jul 3;288(1):67-74.

17. Bogouslavsky J, Van Melle G, Regli F. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke.* 1988 Sep;19(9):1083-92.

18. Deplanque D, Lavalley PC, Labreuche J, Gongora-Rivera F, Jaramillo A, Brenner D, et al. Cerebral and extracerebral vasoreactivity in symptomatic lacunar stroke patients: a case-control study. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc.* 2013 Aug;8(6):413-21.

19. McGeechan K, Liew G, Macaskill P, Irwig L, Klein R, Klein BEK, et al. Prediction of Incident Stroke Events Based on Retinal Vessel Caliber: A Systematic Review and Individual-Participant Meta-Analysis. *Am J Epidemiol.* 2009 Dec 1;170(11):1323-32.

20. Baleanu D, Ritt M, Harazny J, Heckmann J, Schmieder RE, Michelson G. Wall-to-lumen ratio of retinal arterioles and arteriole-to-venule ratio of retinal vessels in patients with cerebrovascular damage.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009
Sep;50(9):4351-9.
21. Hanff TC, Sharrett AR, Mosley TH,
Shibata D, Knopman DS, Klein R, et al.
Retinal microvascular abnormalities predict

progression of brain microvascular disease:
an atherosclerosis risk in communities
magnetic resonance imaging study. Stroke.
2014 Apr;45(4):1012-7.

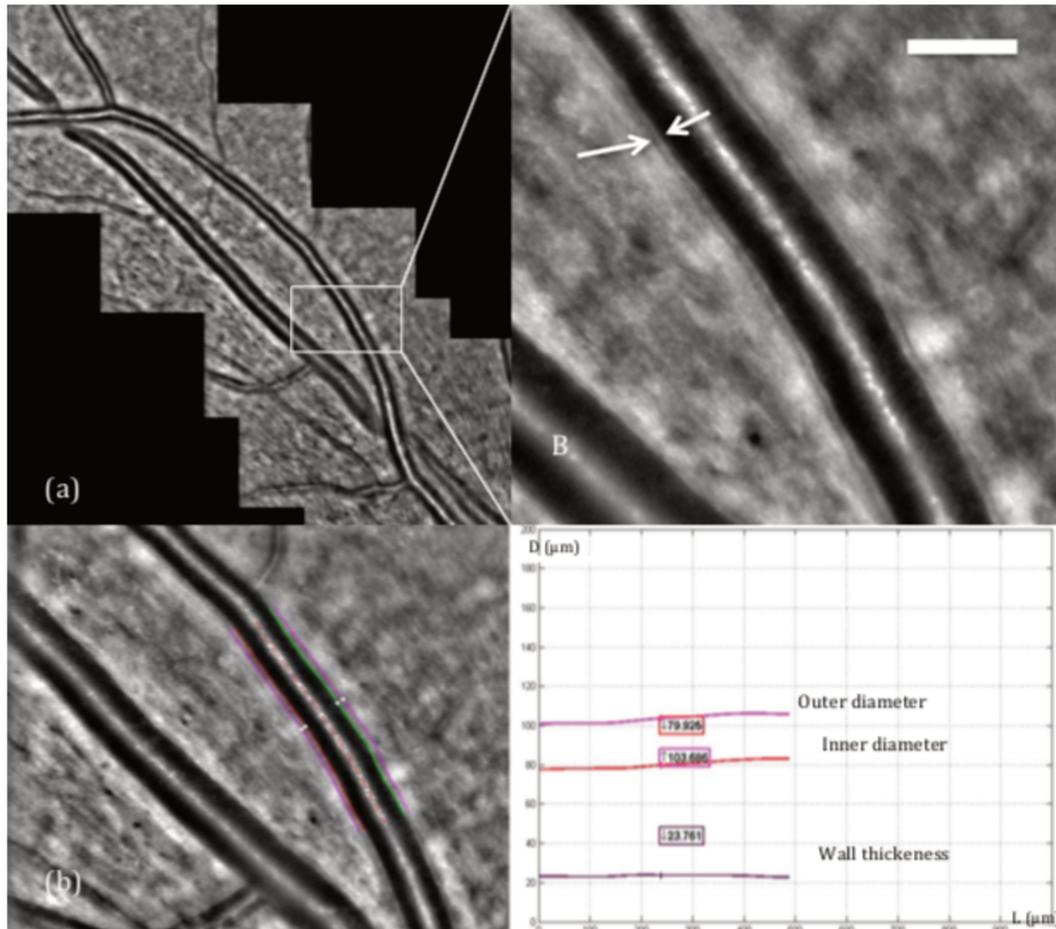


Figure 1. Adaptive optics image and segmentation of a retinal arteriole. (a) Video acquired image (enlargement on right). Note that wall structures are visible (between the arrow) (A: arteriole, V: venule; bar: 100µm). (b) Segmentation with morphogram of the segmented arteriole (D: diameter, L: length).

Table 1. Clinical characteristics of study subjects: healthy, hypertensive, stroke with no hypertension, stroke with hypertension.

Variable	Group 1 Healthy (n=20)	Group 2 HTN (n=21)	Group 3 stroke without HTN (n=13)	Group 4 stroke with HTN (n=18)	p-value*
Sex-ratio (H/F)	1	1.1	1.16	2	0.74
Age (years)	32 (26 to 50.5)	70 (62 to 87)	50.7 (44 to 67)	66.5 (58 to 72)	<0.001
SBP (mmHg)	118.5 (103.0 to 124.0)	141.0 (129.0 to 149.0)	124.5 (114.5 to 143.5)	140.0 (124.0 to 147.0)	<0.001
DBP (mmHg)	70.0 (65.5 to 75.5)	88.0 (79.0 to 95.0)	83.0 (76.0 to 90.0)	80.0 (71.0 to 88.0)	<0.001
WLR	0.27 (0.24 to 0.30)	0.38 (0.31 to 0.43)	0.32 (0.27 to 0.35)	0.33 (0.31 to 0.36)	<0.001
Wall (µm)	28.7 (25.4 to 31.1)	34.3 (32.1 to 36.8)	29.9 (25.0 to 34.4)	33.1 (28.6 to 35.9)	0.007
LD (µm)	106.2 (94.3 to 113.6)	92.7 (79.4 to 100.3)	101.8 (86.3 to 105.1)	99.3 (85.1 to 109.0)	0.019
AD (µm)	133.5 (119.3 to 145.0)	122.6 (109.6 to 134.8)	128.6 (116.3 to 138.9)	132.9 (113.5 to 141.2)	0.30
VD (µm)	144.7	123.2	137.1	148.4	NA

	(125.7 to 147.8)	(117.2 to 139.1)	(115.4 to 145.1)	(141.0 to 152.5)	(effectif<8)
LD Variation on O₂ (µm)	3.3 (1.1 to 10.2)	-0.3 (-1.6 to 1.3)	1.9 (0.4 to 4.4)	1.1 (0.3 to 4.1)	0.046
Wall Variation on O₂ (µm)	-1.0 (-2.0 to 0.3)	-0.5 (-1.7 to 1.0)	-0.6 (-0.7 to -0.1)	-0.3 (-2.3 to 2.2)	0.89

Variables are expressed in median (IQR) unless otherwise indicated.

SB : systolic blood pressure ; DBS: diastolic blood pressure ; WLR : wall to lumen ratio ; Wall : arterial wall thickness ; LD: arterial lumen ; AD : arterial diameter ; VD : vein diameter ; WCSA : wall cross sectional area; *statistical significance : p<0.05

Table 2. Relationship between retinopathy in fundus photography and risk factors in stroke patients

Parameters	Retinopathy		p-value*
	Absent (n=20)	Present (n=9)	
Men, n (%)	14 (70.0)	4 (44.4)	0.24
Age, median (IQR)	61.9 (48.7 to 70.0)	67.0 (55.0 to 71.0)	0.38
Alcoholism, n (%)	6 (30.0)	3 (33.3)	1.00
Diabetes, n (%)	2 (10.0)	3 (33.3)	0.29
Hba1c, median (IQR)	5.55 (5.30 to 5.80)	5.55 (5.30 to 6.10)	0.74
HTA, n (%)	8 (40.0)	9 (100.0)	0.003
LDLc, median (IQR)	1.25 (1.10 to 1.50)	1.25 (0.95 to 1.50)	0.78
Statins, n (%)	8 (40.0)	7 (77.8)	0.11
Dyslipidemia, n (%)	13 (68.4)	7 (77.8)	1.00
Current smoker, n (%)	8 (40.0)	3 (33.3)	1.00
ACFA, n (%)	2 (10.5)	3 (33.3)	0.29
Systolic Blood Pressure, median (IQR)	131 (115 to 146)	137 (125 to 148)	0.38
Diastolic Blood Pressure, median (IQR)	83 (74 to 88)	82 (72 to 91)	0.94
Fazekas, median (IQR)	1 (0 to 2)	2 (2 to 3)	0.022

Table 3. Relationship between cardiovascular risk factors and retinal vascular morphometry in stroke patients

Parameters	WLR, median (IQR) or correlation coefficients	p-value*	Wall, median (IQR) or correlation coefficients	p-value*	Ratio variation LD O ₂ /LD, median (IQR) or correlation coefficients	p-value*
Sex						
<i>Men</i>	0.32 (0.29 to 0.35)	0.82	30.9 (26.6 to 34.1)	0.28	0.03 (0.01 to 0.05)	0.20
<i>Women</i>	0.33 (0.27 to 0.36)		34.0 (28.6 to 36.2)		0.01 (0 to 0.03)	
age	0.30	0.10	0.24	0.19	-0.23	0.25
Alcoholism						
<i>Absent</i>	0.33 (0.29 to 0.35)	0.40	31.5 (26.6 to 35.7)	1.00	0.002 (0 to 0.04)	0.61
<i>Present</i>	0.31 (0.29 to 0.33)		31.8 (28.6 to 34.1)		0.01 (0 to 0.04)	
Diabetes						
<i>Absent</i>	0.32 (0.27 to 0.35)	0.034	30.5 (26.6 to 34.6)	0.15	0.02 (0 to 0.04)	0.81
<i>Present</i>	0.36 (0.35 to 0.40)		33.6 (32.6 to 37.8)		0.01 (-0.01 to 0.06)	
Hba1c	0.40	0.032	0.29	0.13	-0.18	0.38
HTA						
<i>Absent</i>	0.32 (0.27 to 0.35)	0.19	30.0 (25.0 to 34.4)	0.14	0.02 (0 to 0.04)	0.94
<i>Present</i>	0.33 (0.31 to 0.36)		33.1 (28.6 to 35.9)		0.01 (0 to 0.05)	
LDLc	0.14	0.48	0.06	0.76	-0.29	0.15
Statins						
<i>Absent</i>	0.31 (0.27 to 0.35)	0.14	29.6 (24.8 to 33.4)	0.046	0.02 (0.01 to 0.04)	0.72
<i>Present</i>	0.34 (0.31 to 0.38)		34.1 (28.6 to 35.6)		0.02 (0 to 0.04)	
Dyslipidemia						
<i>Absent</i>	0.31 (0.27 to 0.35)	0.47	30.0 (27.0 to 33.7)	0.47	0.01 (0 to 0.04)	0.60
<i>Present</i>	0.33 (0.31 to 0.35)		32.0 (28.4 to 35.8)		0.02 (0.01 to 0.04)	
Current smoker						
<i>Absent</i>	0.32 (0.27 to 0.35)	0.28	30.0 (37.3 to 34.2)	0.31	0.03 (0.01 to 0.05)	0.28
<i>Present</i>	0.33 (0.31 to 0.38)		34.1 (28.4 to 35.9)		0.01 (0 to 0.03)	
Atrial Fibrillation						
<i>Absent</i>	0.33 (0.27 to 0.36)	1.00	30.0 (26.5 to 34.8)	0.36	0.03 (0.01 to 0.05)	0.079

<i>Present</i>	0.32 (0.31 to 0.34)		33.3 (31.8 to 35.8)		0.01 (0 to 0.01)	
SBP	0.14	0.48	0.26	0.18	0.003	0.99
DBP	0.15	0.42	0.15	0.43	-0.20	0.32
Fazekas score	0.45	0.011	0.30	0.11	-0.22	0.28

Table 4. Description of stroke patients based on cause.

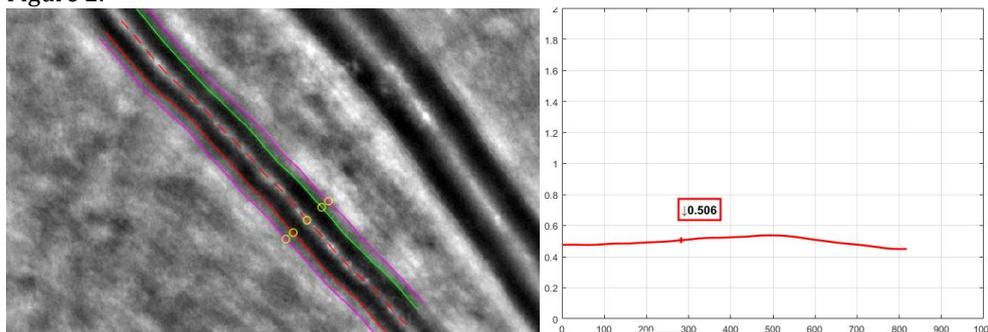
	Cryptogenic (n=9)	Cardioembolic (n=7)	Artherothrombotic (n=9)	Lacunar (n=3)	Others (n=3)
Retinopathy, n (%)	1 (11.1)	2 (33.3)	6 (75.0)	2 (66.7)	2 (66.7)
WLR, median (IQR)	0.29 (0.26 to 0.35)	0.32 (0.31 to 0.35)	0.33 (0.32 to 0.36)	0.33 (0.25 to 0.47)	0.29 (0.27 to 0.36)
Wall, median (IQR)	28.4 (25.1 to 35.0)	33.6 (31.8 to 33.6)	34.1 (28.4 to 34.6)	32.7 (28.6 to 37.8)	29.3 (24.1 to 30.9)
Ratio variation LD O ₂ /LD, median (IQR)	0.02 (-0.02 to 0.03)	0.01 (0 to 0.04)	0.02 (0 to 0.05)	0.01 (0.01 to 0.06)	0.06 (0.03 to 0.10)

Table 5. Comparison of retinal arteriolar morphometry parameters

	Group 1 Normotensive Control Group	Group 2 Hypertensive Group	Group 3 Cerebrovascular with Normotensive Event group	Group 4 Cerebrovascular with Hypertensive Event group	p-value (Group 1 vs 3) Unadjusted/adjusted	p-value (Group 2 vs 4) Unadjusted/adjusted	p-value (Group 1 vs 2) Unadjusted/adjusted	p-value (Group 1 vs 4) Unadjusted/adjusted
WLR	0.27 (0.24 to 0.30)	0.38 (0.31 to 0.43)	0.32 (0.27 to 0.35)	0.33 (0.31 to 0.36)	0.17/1.00	0.65/1.00	<.001/0.086	<.001/0.37
Wall	28.7 (25.4 to 31.1)	34.3 (32.1 to 36.8)	29.9 (25.0 to 34.4)	33.1 (28.6 to 35.9)	1.00/1.00	1.00/1.00	0.009 /0.74	0.12/1.00
variation LD O ₂ /LD	0.03 (0.01 to 0.08)	0 (-0.02 to 0.02)	0.02 (0 to 0.04)	0.01 (0 to 0.05)	1.00/1.00	0.26/0.77	0.11/1.00	1.00/1.00
LD	106 (94 to 114)	93 (79 to 100)	102 (86 to 105)	99 (85 to 109)	0.78/1.00	0.77/1.00	0.008 /1.00	0.58/1.00

P-value obtained with post-hoc comparisons after Bonferroni adjustment (unadjusted : Kruskal-Wallis test; age and systolic adjusted : non-parametric analysis of covariance)

Figure 2.



81 year old female patient with recent ischemic normotensive brain infarction with a WLR measured at 0.5. Note wall thickness and decrease in arterial caliber.

Table 6.

	Present study				Baleanu 2014		
	Normotensive	Hypertensive	Normotensive stroke	Hypertensive stroke	Normotensive	Hypertensive	Hypertensive stroke
n	20	21	13	18	16	83	23
Age, y	38.5±15.76	74.21±15.65	56.7±16.3	66.1±11.05	52.2±8.3	53.7±5.5	57.5±9.4
Systolic pressure (mmHg)	114±13	143±19	129±18	135±14	127±7	145±9	148±21
WLR	0.27±0.04	0.38±0.07	0.32±0.07	0.35±0.08	0.3±0.10	0.34±0.11	0.44±0.10
Lumen diameter (µm)	106.36±15.6	90.84±13.67	95.86±15.57	97.16±14.32	85±10.9	80±9.2	76.52±6.45

2.6 Etude préliminaire sur la vasomotricité rétinienne normale induite par différents stimuli

Résumé :

Nous avons également étudié l'effet de tests dynamiques sur les vaisseaux de la rétine. Le but de cette étude préliminaire était de démontrer qu'il était possible d'observer des modifications des paramètres morphométriques des artérioles rétiniennes. Nous avons donc procédé à différents tests : des tests ayant pour effet une vasoconstriction et d'autres une vasodilatation. Nous avons ainsi réalisé quatre types d'expériences chez l'Homme :

- **Test au froid** (cold pressor test)(81) : il consiste en l'immersion de la main du patient jusqu'au poignet dans de l'eau glacée durant 5 minutes. Ce test est utilisé en cardiologie pour évaluer l'effet vasoconstricteur du froid sur la circulation artérielle. Des photographies de l'artère temporale supérieure rétinienne prises en OA étaient effectuées avant le test, pendant le test après 5 minutes d'immersion, et 10 minutes après le test. Le test au froid a permis d'observer une vasoconstriction diffuse de l'artériole rétinienne chez deux patients d'environ 12% avec certaines zones pouvant se réduire de calibre de 14%.
- **Test d'hyperoxie** (82) : il consiste à inhaler de l'oxygène pur au masque à haute concentration (Eco High concentration oxygen Mask, 2.1m Tubing, Intersurgical®, UK) pendant 10 minutes . Des études précédentes ont mis en évidence une vasoconstriction de 9% des artères rétiniennes et 14% pour les veines. Dans notre étude, des photographies en OA étaient prises à différents moments du test dans un échantillon de sujets sains (n=5). Nos résultats suggèrent une diminution du calibre artériolaire rétinien lors de l'hyperoxie de 12%.
- **Test médicamenteux** : une population de patients atteints de leucémie a été étudiée en OA après l'initiation d'un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase (ITK), ce traitement ayant pour effets indésirables un syndrome de Raynaud et une vasoconstriction sévère des vaisseaux des membres inférieurs.(83–85) Dans notre étude, aucune différence significative concernant la morphométrie des artérioles rétiniennes n'a été mise en évidence entre les sujets sains (n=20) et les sujets sous ITK (n=27). Par ailleurs, nous avons suivi sur six mois un patient hypertendu naïf de traitement mis sous inhibiteur calcique et avons observé une vasodilatation progressive de l'artère temporo-supérieure de la rétine de 30%.
- **Test Flicker** : stimulation lumineuse par flash de la rétine. Notre étude pilote n'a porté que sur 3 sujets sains afin de démontrer la faisabilité de ce test en OA. Nous avons pu observer une vasodilatation diffuse de l'artériole rétinienne de premier ordre d'environ 1 à 3% et pour la veine de premier ordre de 7%. De plus, nous avons calculé le coefficient de jonction pour chaque embranchement artériel et celui-ci a tendance à augmenter et se rapprocher de 3 donc de l'optimum avec une réduction des résistances à l'écoulement lors du Flicker. Par

contre au niveau des bifurcations veineuses, ce coefficient de jonction a tendance à diminuer. Ainsi, il semble qu'en cas d'augmentation du métabolisme rétinien, les résistances au flux diminuent grâce à une augmentation du coefficient de jonction des embranchements des artères rétiniennes afin d'optimiser la distribution des nutriments et de l'oxygène.

Conclusion :

Les différents tests vasomodulateurs ont montré la possibilité d'une vasoréaction locale et focale des artères rétiniennes. Cela permettra de décrire un phénotype plus complet des petites artères en décrivant à la fois leur morphométrie mais aussi leur modification sous différents tests dont le plus prometteur est le Flicker car peu contraignant et rapide.

Test au froid (Cold Pressor Test):

Ce test au froid a été réalisé au CIC des Quinze-Vingts sur deux témoins. Le premier témoin a pu effectuer le test en totalité et une image de l'artère rétinienne temporale supérieure a été prise à différents moments du test : avant le test, pendant le test après 5 minutes d'immersion, et 10 minutes après l'arrêt. Nous avons effectué une analyse morphométrique à partir de ces trois images de l'artère rétinienne supérotemporale (figure 15).

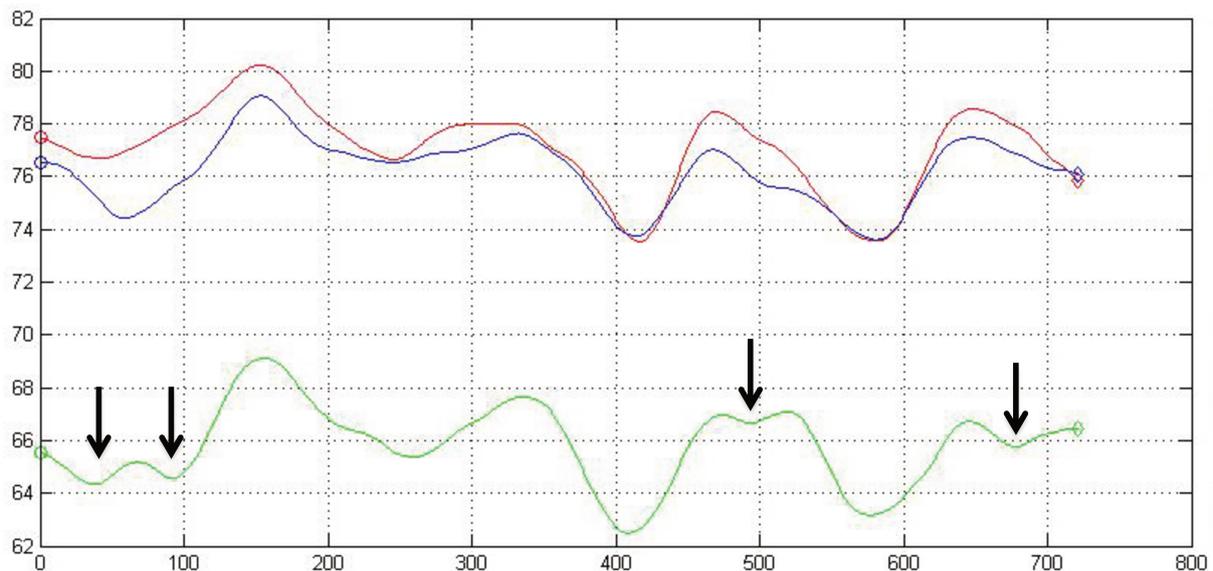


Figure 15 : morphogramme de l'artère rétinienne temporale supérieure avant (tracé bleu), après 5 minutes de test au froid (tracé vert), et 10 minutes après l'arrêt du test (tracé rouge).

Ce test objective une diminution du calibre artériel rétinien sur l'ensemble de la portion étudiée. A noter que la diminution du calibre artériel ne semble pas identique sur toute la longueur du segment étudié et que certaines zones semblent plus réagir au test au froid que d'autres (flèches noires). Un test au froid a été réalisé sur un deuxième témoin. Cependant, la survenue d'un événement indésirable (malaise vagal) durant le test a nécessité son interruption. Devant la survenue de cet événement indésirable, il a donc été décidé de ne pas poursuivre le test sur d'autres patients.

Test d'hyperoxie:

Le test d'hyperoxie a été effectué sur 4 groupes de patients : témoins, hypertendus, infarctus cérébral sans HTA et infarctus cérébral avec HTA. Afin d'étudier l'effet de l'oxygène sur la vascularisation artérielle rétinienne et pour écarter un effet lié au diamètre de l'artère, nous avons rapporté les variations du diamètre de l'artère rétinienne temporale supérieure de l'œil

droit d'une zone donnée sur le diamètre interne de cette artère : ratio variation LD O₂/LD (tableau 1). Les résultats montrent une variation du diamètre lié à l'oxygénothérapie mais également mettent en évidence une différence faiblement significative de réponse au test à l'oxygène entre le groupe HTA et le groupe infarctus cérébral avec HTA (p=0,04). Ceci pourrait s'expliquer par l'effet de traitements différents qui pourraient interagir sur la réactivité artérielle rétinienne. Il faut toutefois rester prudent quant à l'interprétation de ces résultats car les variations enregistrées par l'effet de l'oxygène sont petites et certaines parties des artères semblent plus réagir à l'oxygène que d'autres, ce qui introduirait la notion d'une réactivité différente sur des sections d'artères rétiniennes.

	Group 1 Normotensive Control Group	Group 2 Hypertensive Group	Group 3 Cerebrovascular with Normotensive Event group	Group 4 Cerebrovascular with Hypertensive Event group	p-value* (Group 1 vs 3)	p-value* (Group 2 vs 4)
Ratio variation LD O ₂ /LD, median (IQR)	0.03 (0.01 to 0.08)	0 (-0.02 to 0.02)	0.02 (0 to 0.04)	0.01 (0 to 0.05)	0.56	0.040

Tableau 1 : Comparaison du paramètre de variation du diamètre artériolaire rétinien entre les groupes lors du test à l'oxygène

Nous avons également analysé la morphométrie rétinienne lors de test à l'oxygène chez 5 patients sains et constaté l'effet vasoconstricteur de celui-ci (figure 16). On observe ainsi une diminution du calibre artériel en moyenne de 12% [8 ; 15].

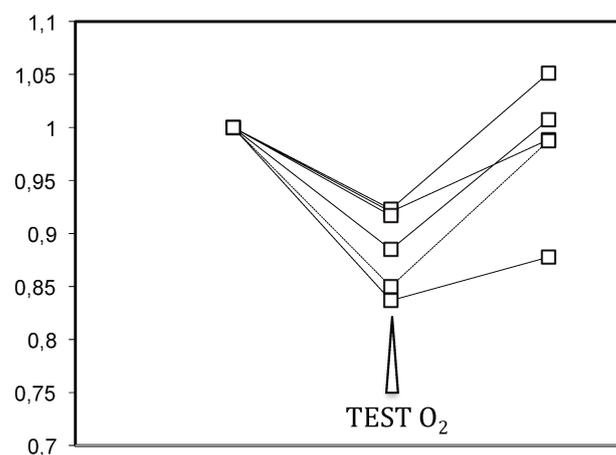


Figure 16. Variation du diamètre artériolaire rétinienne sous l'effet de l'oxygène (Diamètre au repos normé à 1, deuxième mesure après 5 min d'oxygène au masque, troisième mesure après 10 min de repos).

Nous avons également constaté que certaines zones de segment d'artères pouvaient présenter un rétrécissement du calibre plus important que sur l'ensemble du segment analysé. Cette différence entre les sections d'artère rétinienne susceptible de réagir différemment à un stimulus tel que l'hyperoxie doit être à mettre en parallèle des zones de vasoconstriction artériolaire focale vues lors de l'HTA. Ceci introduirait l'hypothèse de la présence de segments d'artères plus sensibles aux stimuli vasoconstricteurs tel que l'hyperoxie ou l'HTA et suppose donc un effet local de ces tests d'où une réelle vasoconstriction locale rétinienne.

Test médicamenteux:

- Inhibiteurs de Tyrosine Kinase :

Nous avons réalisé une analyse morphométrique des artères rétiniennes de patients ayant un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase introduit depuis moins d'un mois. Ce traitement a pour effet secondaire possible, la survenue de vasoconstriction et notamment d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs, de syndrome de Raynaud, voire d'hypertension pulmonaire.(83,86) Les variables continues sont décrites par leur médiane [1^{er} et 3^{ème} quartiles] et comparés par un test de Mann Whitney. Les variables catégorielles sont décrites par leurs effectifs (pourcentage) et comparés par un test du Chi2 ou un test exact de Fisher si les conditions de validité du test du Chi2 ne sont pas remplies.

Caractéristiques de la population

Variable	Groupe ITK	Groupe contrôle	P value
n	27	20	
ITK			
-Bosutinib	2 (7.4)		
-Dasatinib	7 (25.9)		
-Imatinib	6 (22.2)		
-Nilotinib	8 (29.6)		
-Ponatinib	4 (14.8)		
Sexe féminin	8 (29.6)	10 (50.0)	0.26
Âge (années)	58.0 [52.0-66.0]	32.0 [26.0-48.8]	< 0.001
Diabète	2 (7.4)	0 (0.0)	0.50
Pression artérielle systolique (mmHg)	131.5 [117.8-144.0]	118.5 [105.5-124.0]	0.001
Pression artérielle diastolique (mmHg)	78.5 [70.5-89.8]	70.0 [65.8-75.3]	0.02

Les populations ITK et contrôles ne sont pas comparables en termes d'âge et de pression artérielle.

Microvascularisation rétinienne

Variable	Groupe ITK	Groupe contrôle	P value
N	27	20	
WLR	0.29 [0.27-0.34]	0.27 [0.26-0.30]	0.08
SSV	3644 [2837-4205]	3424 [3024-4338]	0.69
Odart	105.5 [96.7-116.7]	108.9 [99.0-116.9]	0.66
Idart	85.2 [72.0-89.8]	88.5 [79.9-96.0]	0.07
Wall	24.4 [21.3-27.8]	23.9 [21.2-25.6]	0.78

Même si certaines variables sont à la limite de la significativité, il n'y a pas de différence significative sur ces paramètres entre les deux groupes.

Comparaison des ITK

Variable	Bosutinib	Dasatinib	Imatinib	Nilotinib	Polatinib	P value*
N	2 (7.4)	7 (25.9)	6 (22.2)	8 (29.6)	4 (14.8)	
WLR	0.33 [0.30-0.36]	0.27 [0.23-0.29]	0.32 [0.30-0.35]	0.30 [0.27-0.34]	0.28 [0.26-0.31]	0.48
SSV	4445 [3796-5094]	3191 [2860-3990]	3584 [2954-4028]	4084 [3669-4395]	2821 [2550-3196]	0.39
Odart	114.9 [103.3-126.6]	106.0 [103.3-108.5]	102.4 [97.6-112.3]	114.8 [100.7-121.2]	96.0 [86.8-106.2]	0.47
Idart	87.4 [76.8-98.0]	86.0 [76.6-87.6]	78.6 [71.3-88.3]	88.9 [76.7-93.4]	74.7 [64.9-85.1]	0.46
Wall	27.5 [26.5-28.6]	22.6 [19.0-25.2]	25.6 [23.2-27.8]	24.6 [23.7-30.3]	21.4 [18.8-24.1]	0.34

Il n'y a pas de différence significative entre les différents ITK sur ces paramètres.

Dans cette étude, aucun effet des inhibiteurs de tyrosine kinase significatif n'a été mis en évidence sur la vascularisation rétinienne. Cependant, parmi l'ensemble des patients examinés, aucun d'entre eux n'a eu d'épisode d'artériopathie oblitérante des membres ni de syndrome de Raynaud au moment de l'examen. Une étude des patients ayant un épisode d'artériopathie oblitérante reste à effectuer afin de rechercher si d'éventuelles anomalies artériolaires rétinienne dépistées avant l'épisode occlusif seraient détectables en OA.

- Anti-hypertenseurs :

Nous avons pu observer un patient hypertendu naïf de tout traitement qui a bénéficié de l'instauration d'un traitement antihypertenseur type inhibiteur calcique. Nous avons observé ainsi une augmentation du calibre des artérolaires rétinienne au cours du temps, chaque mesure étant séparées de la précédentes par un intervalle d'un mois (figure 17). Nous n'avons pas pu suivre plus de patients du fait des difficultés de recrutement.

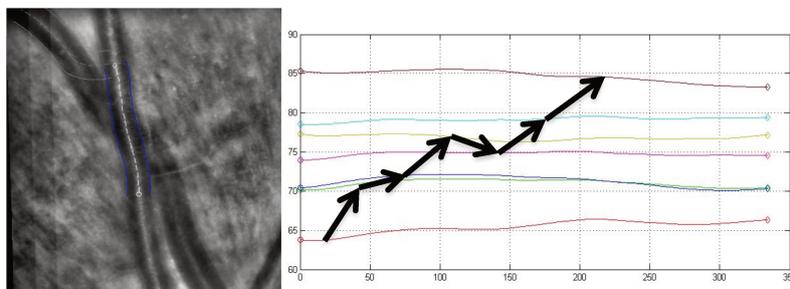


Figure 17 : morphographe sur un an d'un patient hypertendu naïf traité. On observe une dilatation de l'artérolaire rétinienne de 30% en un an (de 64 à 85 microns).

Test Flicker (test de stimulation lumineuse intermittente: SLI):

Il s'agit d'un test lumineux qui consiste à éclairer alternativement l'œil ce qui a pour effet de modifier le diamètre des vaisseaux rétinien.(87–89) Les hypothèses expliquant l'augmentation du flux sanguin en réponse à ce test Flicker serait : 1) une augmentation de la délivrance du glucose aux tissus avec une activité neuronale augmentée dans la rétine,(90) 2) une augmentation des besoins en oxygène pour les astrocytes qui ont un rôle crucial dans la neurotransmission, 3) une production de NO due à une cascade de signaux alimentée par le NADH cytosolique libre.(91–93)

Nous avons donc couplé à la caméra rtx1 un système de Flicker ayant pour paramètres : une fréquence à 12Hz, une durée de 60 secondes, une intensité de $3-4\mu\text{W}/\text{cm}^2$ pour une longueur d'onde de 570nm.

Nous avons ainsi fait ce test avec acquisition d'une image avant et après Flicker chez trois témoins volontaires. Nous avons mesuré les calibres des artères et des veines et calculé les coefficients de jonction et de branchement lorsqu'une bifurcation était présente.

Témoin 1 (fig 18):

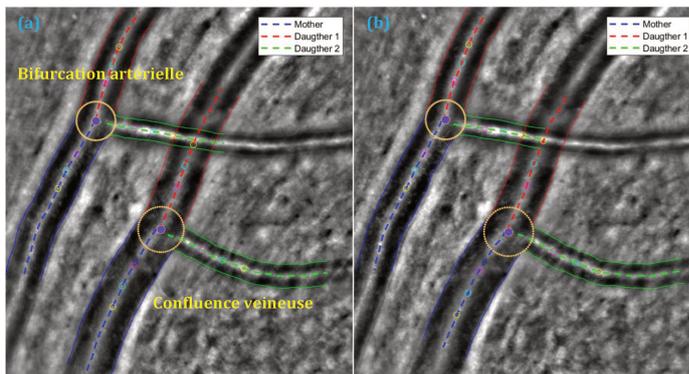
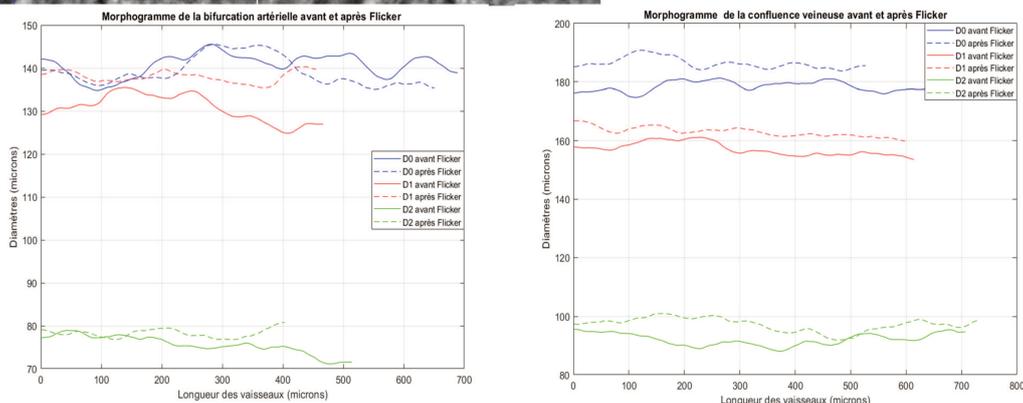


Figure 18 : Segmentation d'une bifurcation artérielle d'un sujet de contrôle avant et après l'application du Flicker. (a) Bifurcation artérielle avant Flicker. (b) Bifurcation artérielle après Flicker. (Thèse de Iyèd Trimèche)



Le tableau ci-dessous montre les résultats de calculs de différents biomarqueurs qui caractérisent la bifurcation artérielle avant et après l'application de Flicker.

	Avant Flicker		Après Flicker	
	M.Moyenne	M.Mediane	M.Moyenne	M.Mediane
D0	146,45	146,35	150,47	150,44
Lambda	0,75	0,76	0,76	0,76
Coefficient de jonction	2,63	2,62	2,8	2,8
Coefficient de branchement	1,17	1,17	1,2	1,2
JED	0,44	0,44	0,35	0,35
Ecart à l'optimum	-0,07	-0,07	-0,04	-0,04

Témoin 2 (fig 19):

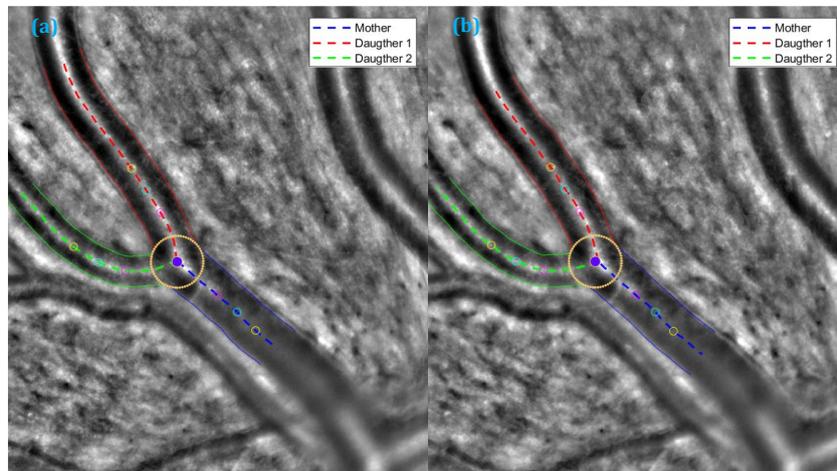


Figure 19 : Segmentation artérielle avant (a) et après Flicker (b) d'une branche mère et de ses deux branches filles.

	Bifurcation artérielle			
	Avant Flicker		Après Flicker	
	M.Moyenne	M.Mediane	M.Moyenne	M.Mediane
D0	135,86	135,62	136,89	136,67
Lambda	0,58	0,58	0,57	0,56
Coefficient de jonction	4,66	5,41	ND	ND
Coefficient de branchement	1,29	1,31	1,32	1,33
JED	0,52	0,54	0,57	0,58
Ecart à l'optimum	0,11	0,12	0,14	0,15

Le coefficient de jonction de la bifurcation artérielle est devenu non calculable après l'application du Flicker. Cela est dû à une augmentation locale de diamètre au niveau de la branche de diamètre D1 ce qui rend la valeur moyenne et la valeur médiane de D1 supérieurs aux valeurs de D0. On peut observer cette augmentation sur le morphogramme de la figure 4.

	Confluence veineuse			
	Avant Flicker		Après Flicker	
	M.Moyenne	M.Mediane	M.Moyenne	M.Mediane
D0	176,78	176,43	189,83	189,79
Lambda	0,58	0,58	0,61	0,61
Coefficient de jonction	2,39	2,43	2,11	2,12
Coefficient de branchement	1,09	1,1	1,03	1,03
JED	0,49	0,47	0,59	0,58
Ecart à l'optimum	-0,09	-0,09	-0,17	-0,16

Témoin 3 (fig 20):

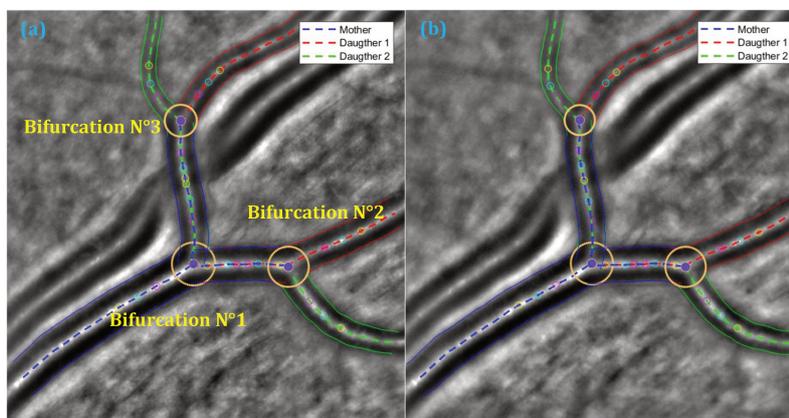


Figure 20 : Segmentation artérielle avant (a) et après Flicker (b) avec croisement artérioveineux.

Bifurcation artérielle N°1				
	Avant Flicker		Après Flicker	
	M.Moyenne	M.Mediane	M.Moyenne	M.Mediane
DO	134,46	134,27	131,96	131,91
Lambda	0,8	0,8	0,77	0,77
Coefficient de jonction	3,26	3,34	3,63	3,62
Coefficient de branchement	1,29	1,3	1,33	1,33
JED	0,38	0,4	0,48	0,48
Ecart à l'optimum	0,04	0,05	0,09	0,09

Bifurcation artérielle N°2				
	Avant Flicker		Après Flicker	
	M.Moyenne	M.Mediane	M.Moyenne	M.Mediane
DO	119,91	119,93	122,19	122,28
Lambda	0,89	0,9	0,91	0,91
coefficient de jonctio	4,3	4,24	3,26	3,22
fficient de branchen	1,44	1,43	1,3	1,3
JED	0,61	0,6	0,38	0,36
Ecart à l'optimum	0,18	0,18	0,05	0,04

Bifurcation artérielle N°3				
	Avant Flicker		Après Flicker	
	M.Moyenne	M.Mediane	M.Moyenne	M.Mediane
DO	94,63	94,84	90,1	90,24
Lambda	0,77	0,76	0,7	0,7
Coefficient de jonction	2,77	2,72	3,17	3,16
Coefficient de branchement	1,2	1,19	1,25	1,25
JED	0,37	0,4	0,31	0,31
Ecart à l'optimum	-0,04	-0,05	0,02	0,02

Ces trois témoins démontrent la faisabilité de ce test et la possibilité de mesurer in vivo les effets du Flicker sur le diamètre des artères et des veines rétiniennes, mais aussi sur leurs parois et sur la géométrie vasculaire pour le calcul du coefficient de jonction. Nous constatons une vasodilatation diffuse de l'artéριοle rétinienne de premier ordre d'environ 1 à 3% et pour

la veine de premier ordre de 7%. Le coefficient de jonction pour chaque embranchement artériel a tendance à augmenter et se rapprocher de 3 donc de l'optimum en terme de consommation énergétique, avec une réduction des résistances à l'écoulement lors du Flicker. Par contre au niveau des bifurcations veineuses, ce coefficient de jonction a tendance à diminuer mais le calcul devra être refait en inversant le flux. Ainsi, il semble qu'en cas d'augmentation du métabolisme rétinien, les résistances au flux diminuent grâce à une augmentation du coefficient de jonction des embranchements des artères rétinienne afin d'optimiser la distribution des nutriments et de l'oxygène.

Discussion :

Une des limites de ces différents tests de vasoréactivité est l'absence de couplage avec le cycle cardiaque. Certains appareils comme le RVA permettent de coupler la mesure du diamètre vasculaire rétinien avec le cycle cardiaque avec cependant une moins bonne résolution.(94) Ceci nous a amené, dans l'objectif de mesurer des variations de diamètre artériel, à développer le logiciel d'analyse AOV avec la possibilité de recalibrer les images prises à différents temps et d'effectuer une mesure au même endroit du vaisseau.(95)

Ces différents tests sur la vasomodulation semblent confirmer la possibilité d'une régulation fine au niveau de la microcirculation. L'intérêt de ces études est d'observer des différences de modulation dans certaines pathologies afin de mieux en expliquer les mécanismes. Ainsi, dans la pathogénie des occlusions veineuses, une conséquence visible de cette vasomodulation est le blanc périveinulaire.(96)

Conclusion :

Ces différents travaux expérimentaux nous ont permis de valider une nouvelle technique d'analyse des artérioles rétinienne, reproductible et fiable avec une précision de l'ordre de 3 microns. Ils nous ont permis de mettre en évidence la possibilité d'une étude in vivo des effets de différents traitements sur la microcirculation rétinienne et d'en mesurer leurs effets. Nous avons ainsi pu observer un effet vasoconstricteur sur les artérioles rétinienne du test au froid, l'effet vasoconstricteur diffus et focal de l'hyperoxie chez plusieurs groupes de patients avec un effet moindre en cas d'HTA. Et enfin, nous avons pu observer l'effet vasodilatateur des inhibiteurs calciques sur les artérioles rétinienne au cours du temps avec un effet progressif sur au moins 6 mois. Nous avons également observé une vasodilatation des artérioles rétinienne avec le test Flicker et une vasodilatation plus importante des veines, avec un test facile à réaliser et peu perturbant (pas de dilatation, indolore) pour le sujet étudié : éblouissement durant quelques secondes. Le domaine d'observation in vivo des vaisseaux est

donc par ces méthodes élargi à l'étude des petits vaisseaux de l'ordre de la dizaine de microns et de leur vasomodulation in vivo chez l'Homme.

3 Discussion

Nos travaux ont pu valider une nouvelle technique d'imagerie basée sur l'ophtalmoscopie par optique adaptative permettant une plus grande résolution que les techniques standards. Grâce à ce niveau de précision, nous avons observé pour la première fois les parois des artéριοles rétiniennes, autorisant ainsi une plus grande fiabilité dans les résultats d'analyse quantitative de la morphométrie microvasculaire. Nos résultats démontrent une plus grande précision dans l'étude de la morphométrie rétinienne avec un coefficient de reproductibilité de Cronbach de 0,95. Grâce à l'amélioration des performances d'imagerie et au développement d'un nouveau logiciel d'analyse d'image, nous avons été en mesure par ces différents travaux d'étudier les modifications de la morphométrie artérielle rétinienne au cours de maladies cardiovasculaires.

Lors de l'HTA, nous avons ainsi pu mettre en évidence des anomalies structurales de la paroi des artéριοles rétiniennes évoquant un mécanisme de remodelage eutrophique. Nous avons ainsi observé dans une large cohorte les rôles respectifs de l'âge et du niveau tensionnel dans les modifications pariétales observées. Ainsi, l'âge et l'HTA favorisent un épaississement des parois artériolaires, mais curieusement seul le niveau tensionnel est responsable de la diminution de calibre de la lumière artérielle. Ces résultats ont été confirmés ultérieurement par les travaux du Dr Rosenbaum de la Pitié Salpêtrière qui a également démontré une corrélation entre le WLR et les résistances périphériques totales, en faveur d'une part importante de remodelage fonctionnel dans l'hypertension.(97–99)

Au cours de l'HTA, on observe aussi des anomalies focales telles que les croisements artéριοveineux pathologiques parfois responsables d'occlusion veineuse rétinienne. Nous avons mis en évidence par nos travaux sur les croisements artéριοveineux l'existence de croisement avec diminution du calibre veineux sans contact direct avec l'artère et donc sans compression directe. Il serait donc intéressant de rechercher ce type d'interactions artéριοveineuses indirectes dans le cerveau.

Concernant les remaniements morphométriques artériolaires au cours des infarctus cérébraux, nous n'avons pas mis en évidence de différence de morphométrie artérielle avec des sujets sains. Ainsi, le WLR et le diamètre artériel ne sont modifiés dans cette population qu'en cas d'HTA. Il n'y a pas de corrélation entre la leucoaraïose cérébrale et les anomalies visibles en OA sur les artéριοles rétiniennes lorsqu'on ajuste à l'âge et à la pression artérielle.

Ceci reste à confirmer sur une population plus grande. En effet, l'hypothèse que les anomalies touchant les artéριοles cérébrales pourraient se retrouver aussi au niveau oculaire est la plus communément admise.(15)

Par ailleurs, nous avons étudié la morphométrie vasculaire au cours d'un cas d'HTA maligne. Nous avons pu observer des anomalies majeures de la paroi vasculaire rétinienne en cas d'HTA maligne correspondant à un œdème de paroi. Cet épaississement pariétal observé n'avait pas disparu après un an de suivi malgré le traitement de l'hypertension. Ceci laisse supposer soit qu'un remodelage a eu lieu malgré le traitement, soit que l'œdème pariétal disparaît sur une durée plus longue qu'une année. Des tests sur la vasomotricité pourraient permettre de faire cette différence.

Enfin, nous avons aussi réalisé des évaluations préliminaires de tests de vasomotricité provoquées. À ce titre, nous avons évalué l'effet du froid qui s'est avéré très efficace pour observer une vasoconstriction du calibre artérielle mais douloureux pour les patients. Nous avons également évalué l'hyperoxie permettant d'observer des vasoconstrictions artérielles dans les limites de la significativité et imposant une plus grande puissance d'étude. Dans une étude préliminaire portant sur une population de patients atteints de leucémie et traités par ITK, médicament potentiellement vasoconstricteur, nous n'avons pas mis en évidence d'anomalies artérielles rétiniennes par cette technique. Plus récemment, nous avons pu disposer d'une nouvelle version de la caméra rtx1 permettant une évaluation du couplage neurovasculaire par le test de stimulation lumineuse intermittente qui sera probablement le test le plus intéressant.

4 Conclusion générale et perspectives

Au cours de cette thèse nous avons contribué à démontrer que l'imagerie microvasculaire rétinienne par imagerie infrarouge utilisant l'optique adaptative est reproductible, robuste, et permet de quantifier le remodelage des petites artères et des veines au cours de différentes pathologies. Des modifications à court terme sous l'effet de différents stimuli sont également détectables. Elle ouvre donc un nouveau champ médical et scientifique dépassant largement le cadre de l'ophtalmologie. Son acceptabilité par les patients est excellente.

Nous avons pu ainsi confirmer quantitativement pour la première fois *in vivo* que l'HTA est ainsi responsable d'un remodelage eutrophique des artérioles rétiniennes. A ces modifications diffuses peuvent se rajouter des anomalies focales affectant aussi bien les artères que les veines. L'OA a contribué à mieux identifier les mécanismes impliqués dans ces anomalies focales, remettant ainsi en cause des paradigmes parfois séculaires. Ces rétrécissements focaux pourraient être en effet la résultante non pas de facteurs mécaniques ou dégénératifs, mais plutôt de facteurs vasoconstricteurs cellulaires ou moléculaires restant à identifier. Cela pourrait ouvrir le champ vers de nouvelles thérapeutiques dans le traitement des pathologies cardiovasculaires et dans celui des occlusions veineuses rétiniennes. Des études de la dynamique microvasculaire sont également possibles, dont l'intérêt en tant que biomarqueur est prometteur.

Les perspectives de développement de cette approche sont liées d'une part à des perfectionnements technologiques comme une acquisition plus rapide permettant de faciliter un échantillonnage plus large, mais également une acquisition automatisée ; à terme, des systèmes d'analyse du flux sanguin (le contenu) compléteront utilement l'analyse du contenant. L'intelligence artificielle permettra aussi l'amélioration des techniques d'analyse de la morphométrie vasculaire rétinienne. En médecine, le développement et la validation de nouveaux biomarqueurs, l'identification de pathologies s'exprimant à un niveau microscopique dans la rétine et des études de suivi de patients sous traitement permettront d'ancrer ce type d'imagerie dans la pratique médicale.(98,100–104) De même, une ophtalmoscopie par OA systématique dans certaines maladies neurovasculaires permettra de découvrir de nouvelles anomalies vasculaires rétiniennes associées (cf images 1 et 2, annexes). Cela ouvre aussi la perspective de biomarqueur en pathologie rénale pouvant prédire la sévérité de l'atteinte vasculaire rénale (étude en cours avec le Pr Boffa dans le

service de néphrologie de l'hôpital Tenon comparant les anomalies vasculaires observées sur biopsie rénale et celles retrouvées en ophtalmoscopie par OA). Plus fondamentalement, il apparaît que, tout comme le microscope a révolutionné la médecine, l'imagerie à haute résolution de la rétine s'apprête à bousculer certains dogmes de la pathologie microvasculaire, et à ce titre mérite tout l'intérêt des chercheurs intéressés par la physiologie et la pathologie microvasculaire.

5 Annexes

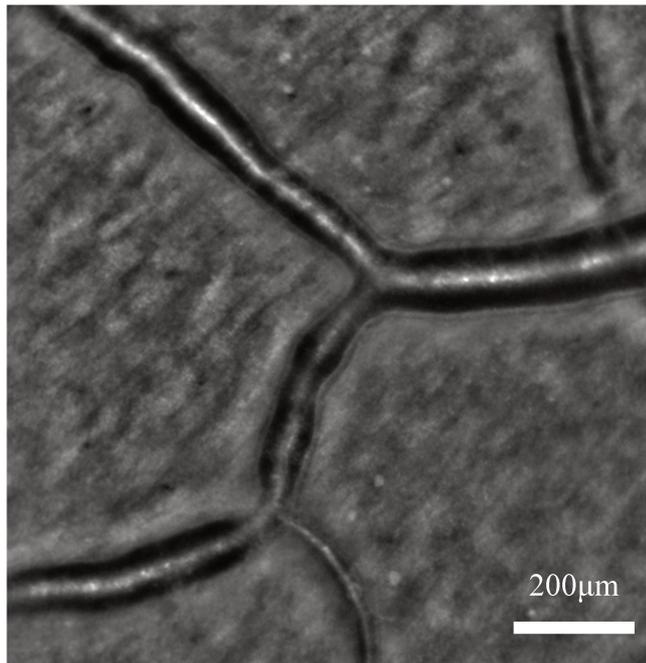


Image 1 : Homme de 56 ans présentant une leucoencéphalopathie vasculaire et des dilatations et rétrécissements multiples des artérioles rétiniennes avec mutation sur l'exon 47 du gène COL4A2.

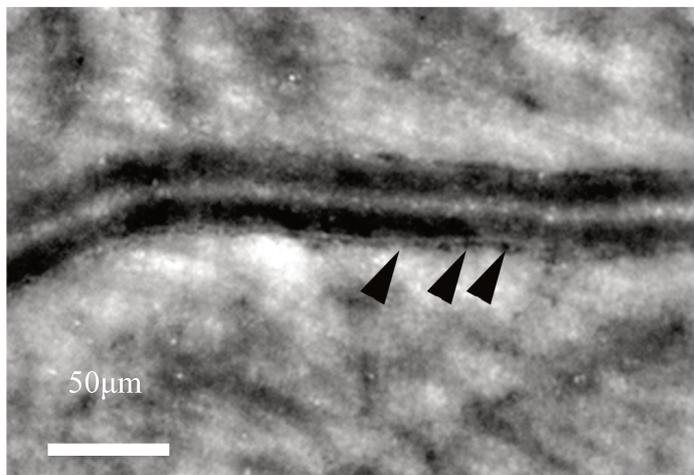


Image 2 : Dépôts dans la paroi artériolaire (flèches noires) chez un patient atteint de maladie de Fabry, illustrant l'intérêt de l'ophtalmoscopie par OA dans les maladies de surcharge. (article en cours)

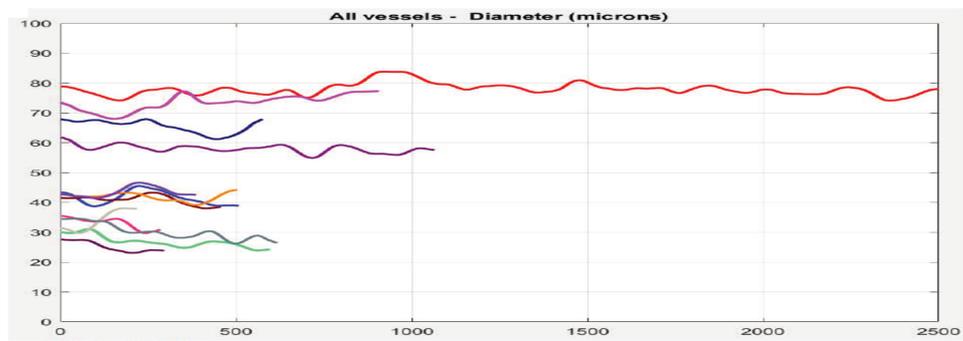
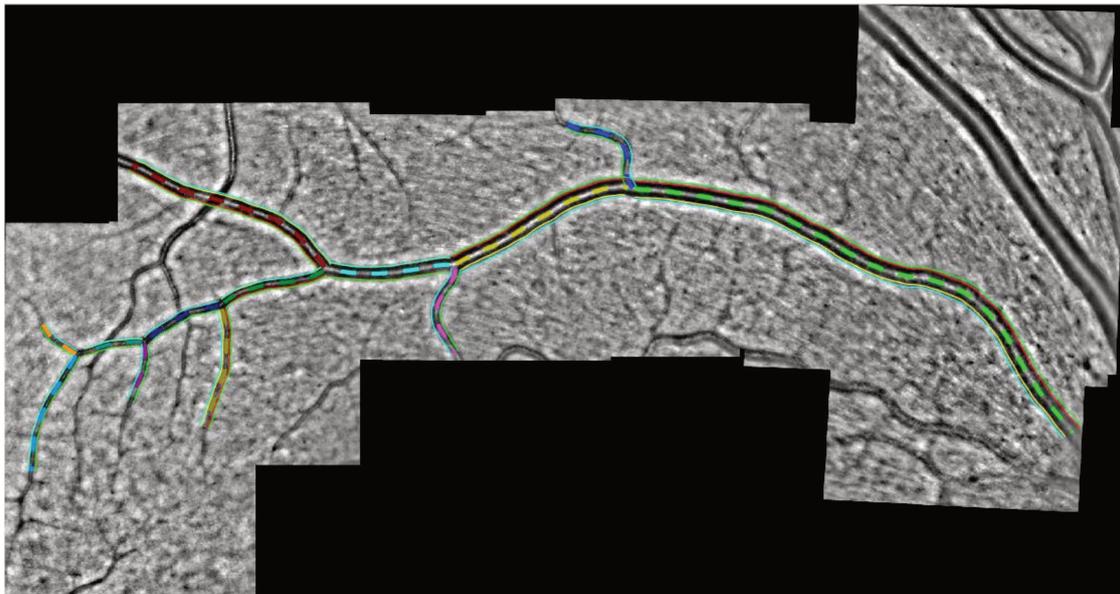


Image 3 : Exemple de segmentation grand champ d'une image d'artère rétinienne. (Thèse de Iyèd Trimèche)

6 Bibliographie

1. Levy BI. Altérations de la microcirculation et hypertension artérielle : cause ou conséquence ? *Sang Thromb Vaiss*. 2007 Jan 1;19(1):9–16.
2. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension*. 1993 Apr;21(4):391–7.
3. Aalkjaer C, Heagerty AM, Petersen KK, Swales JD, Mulvany MJ. Evidence for increased media thickness, increased neuronal amine uptake, and depressed excitation--contraction coupling in isolated resistance vessels from essential hypertensives. *Circ Res*. 1987 Aug;61(2):181–6.
4. Vicaut E. Hypertension and the microcirculation: a brief overview of experimental studies. *J Hypertens Suppl Off J Int Soc Hypertens*. 1992 Jul;10(5):S59–68.
5. Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HA. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation*. 2001 Aug 7;104(6):735–40.
6. Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke*. 1988 Sep;19(9):1083–92.
7. Jackson C, Sudlow C. Are lacunar strokes really different? A systematic review of differences in risk factor profiles between lacunar and nonlacunar infarcts. *Stroke*. 2005 Apr;36(4):891–901.
8. Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol*. 2010 Jul;9(7):689–701.
9. Deplanque D, Lavalley PC, Labreuche J, Gongora-Rivera F, Jaramillo A, Brenner D, et al. Cerebral and extracerebral vasoreactivity in symptomatic lacunar stroke patients: a case-control study. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc*. 2013 Aug;8(6):413–21.
10. Vermeer SE, Prins ND, den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MMB. Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *N Engl J Med*. 2003 Mar 27;348(13):1215–22.
11. Buée L, Hof PR, Bouras C, Delacourte A, Perl DP, Morrison JH, et al. Pathological alterations of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease and related dementing disorders. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1994;87(5):469–80.
12. Hunter JM, Kwan J, Malek-Ahmadi M, Maarouf CL, Kokjohn TA, Belden C, et al. Morphological and pathological evolution of the brain microcirculation in aging and Alzheimer's disease. *PloS One*. 2012;7(5):e36893.
13. Yatsuya H, Folsom AR, Wong TY, Klein R, Klein BEK, Sharrett AR. Retinal Microvascular Abnormalities and Risk of Lacunar Stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Stroke J Cereb Circ*. 2010 Jul;41(7):1349–55.
14. Wong TY, Klein R, Nieto FJ, Klein BEK, Sharrett AR, Meuer SM, et al. Retinal microvascular abnormalities and 10-year cardiovascular mortality: a population-based case-control study. *Ophthalmology*. 2003 May;110(5):933–40.
15. Yatsuya H, Folsom AR, Wong TY, Klein R, Klein BEK, Sharrett AR. Retinal Microvascular Abnormalities and Risk of Lacunar Stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Stroke J Cereb Circ*. 2010 Jul;41(7):1349–55.
16. Liew G, Campbell S, Klein R, Klein BEK, Sharrett AR, Cotch MF, et al. Ten-year longitudinal changes in retinal microvascular lesions: the atherosclerosis risk in communities study. *Ophthalmology*. 2011 Aug;118(8):1612–8.
17. Longstreth W, Larsen EKM, Klein R, Wong TY, Sharrett AR, Lefkowitz D, et al. Associations between findings on cranial magnetic resonance imaging and retinal photography in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Am J Epidemiol*. 2007 Jan 1;165(1):78–84.

18. McGeechan K, Liew G, Macaskill P, Irwig L, Klein R, Klein BEK, et al. Prediction of Incident Stroke Events Based on Retinal Vessel Caliber: A Systematic Review and Individual-Participant Meta-Analysis. *Am J Epidemiol*. 2009 Dec 1;170(11):1323–32.
19. Tikellis G, Arnett DK, Skelton TN, Taylor HW, Klein R, Couper DJ, et al. Retinal arteriolar narrowing and left ventricular hypertrophy in African Americans. the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am J Hypertens*. 2008 Mar;21(3):352–9.
20. Wong TY, Klein R, Couper DJ, Cooper LS, Shahar E, Hubbard LD, et al. Retinal microvascular abnormalities and incident stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Lancet*. 2001 Oct 6;358(9288):1134–40.
21. Wong TY, Klein R, Sharrett AR, Duncan BB, Couper DJ, Klein BEK, et al. Retinal arteriolar diameter and risk for hypertension. *Ann Intern Med*. 2004 Feb 17;140(4):248–55.
22. Helmholtz H. Beschreibung eines Augen-Spiegels, Berlin. Förstnersche Verlagsbuchhandlung. 1851;
23. Haan M, Espeland MA, Klein BE, Casanova R, Gaussoin SA, Jackson RD, et al. Cognitive function and retinal and ischemic brain changes: the Women’s Health Initiative. *Neurology*. 2012 Mar 27;78(13):942–9.
24. Lindley RI, Wang JJ, Wong M-C, Mitchell P, Liew G, Hand P, et al. Retinal microvasculature in acute lacunar stroke: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 2009 Jul;8(7):628–34.
25. Ritt M, Harazny JM, Ott C, Schlaich MP, Schneider MP, Michelson G, et al. Analysis of retinal arteriolar structure in never-treated patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 2008 Jul;26(7):1427–34.
26. Ritt M, Schmieder RE. Wall-to-lumen ratio of retinal arterioles as a tool to assess vascular changes. *Hypertension*. 2009 Aug;54(2):384–7.
27. Paques M, Meimon S, Rossant F, Rosenbaum D, Mrejen S, Sennlaub F, et al. Adaptive optics ophthalmoscopy: Application to age-related macular degeneration and vascular diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2018 Sep;66:1–16.
28. Simonutti M, Paques M, Sahel JA, Gross M, Samson B, Magnain C, et al. Holographic laser Doppler ophthalmoscopy. *Opt Lett*. 2010 Jun 15;35(12):1941–3.
29. Magnain C, Castel A, Boucneau T, Simonutti M, Ferezou I, Rancillac A, et al. Holographic laser Doppler imaging of microvascular blood flow. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. 2014 Dec 1;31(12):2723–35.
30. Pellizzari M, Simonutti M, Degardin J, Sahel J-A, Fink M, Paques M, et al. High speed optical holography of retinal blood flow. *Opt Lett*. 2016 Aug 1;41(15):3503–6.
31. Puyo L, Paques M, Fink M, Sahel J-A, Atlan M. In vivo laser Doppler holography of the human retina. *Biomed Opt Express*. 2018 Sep 1;9(9):4113–29.
32. Rossant F, Badellino M, Chavillon A, Bloch I, Paques M. A Morphological Approach for Vessel Segmentation in Eye Fundus Images, with Quantitative Evaluation [Internet]. 2011 [cited 2018 Sep 25]. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/asp/jmihi/2011/00000001/00000001/art00007>
33. Lagarrigue-Charbonnier M, Rossant F, Bloch I, Errera M, Paques M. Segmentation of retinal vessels in adaptive optics images for assessment of vasculitis. In: 2016 Sixth International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA). 2016. p. 1–6.
34. Segmentation of Retinal Arteries in Adaptive Optics Images [Internet]. [cited 2018 Sep 25]. Available from: <https://www.computer.org/csdl/proceedings/icpr/2014/5209/00/5209a574-abs.html>
35. Modeling a parallelism constraint in active contours. Application to the segmentation of eye vessels and retinal layers - IEEE Conference Publication [Internet]. [cited 2018 Sep 25]. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/6116546/>
36. Coupled Parallel Snakes for Segmenting Healthy and Pathological Retinal Arteries in Adaptive Optics Images | Springer for Research & Development [Internet]. [cited 2018 Sep

- 25]. Available from: https://rd.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-11755-3_35
37. Le Noble FA, Stassen FR, Hacking WJ, Struijker Boudier HA. Angiogenesis and hypertension. *J Hypertens*. 1998 Nov;16(11):1563–72.
 38. Struijker Boudier HA, le Noble JL, Messing MW, Huijberts MS, le Noble FA, van Essen H. The microcirculation and hypertension. *J Hypertens Suppl Off J Int Soc Hypertens*. 1992 Dec;10(7):S147–56.
 39. Connes P, Boisseau M-R, Vicaut E. *Traité de médecine vasculaire*. Tome 1: Principes de base, maladies artérielles. Vols. p72-81. Elsevier Masson; 2012. 748 p.
 40. Paques M, Tadayoni R, Sercombe R, Laurent P, Genevois O, Gaudric A, et al. Structural and hemodynamic analysis of the mouse retinal microcirculation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Nov;44(11):4960–7.
 41. Fouquet S, Vacca O, Sennlaub F, Paques M. The 3D Retinal Capillary Circulation in Pigs Reveals a Predominant Serial Organization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 01;58(13):5754–63.
 42. Garrity ST, Paques M, Gaudric A, Freund KB, Sarraf D. Considerations in the Understanding of Venous Outflow in the Retinal Capillary Plexus. *Retina Phila Pa*. 2017;37(10):1809–12.
 43. Gorczynska I, Migacz JV, Zawadzki RJ, Capps AG, Werner JS. Comparison of amplitude-decorrelation, speckle-variance and phase-variance OCT angiography methods for imaging the human retina and choroid. *Biomed Opt Express*. 2016 Mar 1;7(3):911–42.
 44. Bonnin S, Mané V, Couturier A, Julien M, Paques M, Tadayoni R, et al. NEW INSIGHT INTO THE MACULAR DEEP VASCULAR PLEXUS IMAGED BY OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY ANGIOGRAPHY. *Retina Phila Pa*. 2015 Nov;35(11):2347–52.
 45. Murray CD. The Physiological Principle of Minimum Work: I. The Vascular System and the Cost of Blood Volume. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1926 Mar;12(3):207–14.
 46. Hess WR. *Das Prinzip des kleinsten Kraftverbrauches im Dienste hämodynamischer Forschung [Dissertation]*. [Leipzig, Allemagne]: Veit; 1913.
 47. Sherman TF. On connecting large vessels to small. The meaning of Murray's law. *J Gen Physiol*. 1981 Oct;78(4):431–53.
 48. Zamir M. Shear forces and blood vessel radii in the cardiovascular system. *J Gen Physiol*. 1977 Apr;69(4):449–61.
 49. Mayrovitz HN, Roy J. Microvascular blood flow: evidence indicating a cubic dependence on arteriolar diameter. *Am J Physiol*. 1983 Dec;245(6):H1031–8.
 50. Uylings HB. Optimization of diameters and bifurcation angles in lung and vascular tree structures. *Bull Math Biol*. 1977;39(5):509–20.
 51. Nakamura Y, Awa S. Radius exponent in elastic and rigid arterial models optimized by the least energy principle. *Physiol Rep*. 2014 Feb 1;2(2):e00236.
 52. Koch E, Rosenbaum D, Brolly A, Sahel J-A, Chaumet-Riffaud P, Girerd X, et al. Morphometric analysis of small arteries in the human retina using adaptive optics imaging: relationship with blood pressure and focal vascular changes. *J Hypertens*. 2014 Apr;32(4):890–8.
 53. Guyton AC. Determination of cardiac output by equating venous return curves with cardiac response curves. *Physiol Rev*. 1955 Jan;35(1):123–9.
 54. Levy MN. The cardiac and vascular factors that determine systemic blood flow. *Circ Res*. 1979 Jun;44(6):739–47.
 55. Riva CE, Grunwald JE, Sinclair SH, Petrig BL. Blood velocity and volumetric flow rate in human retinal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985 Aug;26(8):1124–32.
 56. Harder DR, Sanchez-Ferrer C, Kauser K, Stekiel WJ, Rubanyi GM. Pressure releases a transferable endothelial contractile factor in cat cerebral arteries. *Circ Res*. 1989 Jul;65(1):193–8.
 57. Jeppesen P, Aalkjaer C, Bek T. Myogenic response in isolated porcine retinal

- arterioles. *Curr Eye Res.* 2003 Oct;27(4):217–22.
58. Ashton N, Cook C. Direct observation of the effect of oxygen on developing vessels: preliminary report. *Br J Ophthalmol.* 1954 Jul;38(7):433–40.
 59. Perez-Martin A, Faure S, Schuster-Beck I, Martinez C, Goret L, Dauzat M, et al. *Traité de médecine vasculaire. Tome 1: Principes de base, maladies artérielles. Vols. p29-59.* Elsevier Masson; 2012. 748 p.
 60. Colantuoni A, Bertuglia S, Coppini G, Donato L. Superposition of arteriolar vasomotion waves and regulation of blood flow in skeletal muscle microcirculation. *Adv Exp Med Biol.* 1990;277:549–58.
 61. Schiffrin EL. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1992 Feb;19(2 Suppl):II1–9.
 62. Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev.* 1990 Oct;70(4):921–61.
 63. Touyz RM. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol.* 2005 Jul;90(4):449–55.
 64. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, et al. Vascular remodeling. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1996 Sep;28(3):505–6.
 65. Mulvany MJ. Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? *Cardiovasc Res.* 1999 Jan;41(1):9–13.
 66. Park JB, Schiffrin EL. Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J Hypertens.* 2001 May;19(5):921–30.
 67. Furuyama M. Histometrical investigations of arteries in reference to arterial hypertension. *Tohoku J Exp Med.* 1962 May 25;76:388–414.
 68. Rizzoni D, Porteri E, Boari GEM, De Ciuceis C, Sleiman I, Muiesan ML, et al. Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation.* 2003 Nov 4;108(18):2230–5.
 69. Rizzoni D, Porteri E, Guefi D, Piccoli A, Castellano M, Pasini G, et al. Cellular hypertrophy in subcutaneous small arteries of patients with renovascular hypertension. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2000 Apr;35(4):931–5.
 70. Bevan JA, Osher JV. A direct method for recording tension changes in the wall of small blood vessels in vitro. *Agents Actions.* 1972;2(5):257–60.
 71. Korsgaard N, Aalkjaer C, Heagerty AM, Izzard AS, Mulvany MJ. Histology of subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1993 Oct;22(4):523–6.
 72. Intengan HD, Deng LY, Li JS, Schiffrin EL. Mechanics and composition of human subcutaneous resistance arteries in essential hypertension. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1999 Jan;33(1 Pt 2):569–74.
 73. Keith NM, Wagener HP, Barker NW. Some different types of essential hypertension: their course and prognosis. *Am J Med Sci.* 1974 Dec;268(6):336–45.
 74. Chew SKH, Xie J, Wang JJ. Retinal arteriolar diameter and the prevalence and incidence of hypertension: a systematic review and meta-analysis of their association. *Curr Hypertens Rep.* 2012 Apr;14(2):144–51.
 75. Baleanu D, Ritt M, Harazny J, Heckmann J, Schmieder RE, Michelson G. Wall-to-lumen ratio of retinal arterioles and arteriole-to-venule ratio of retinal vessels in patients with cerebrovascular damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Sep;50(9):4351–9.
 76. Harazny JM, Ritt M, Baleanu D, Ott C, Heckmann J, Schlaich MP, et al. Increased wall:lumen ratio of retinal arterioles in male patients with a history of a cerebrovascular event. *Hypertension.* 2007 Oct;50(4):623–9.
 77. Ritt M, Schmieder RE. Wall-to-lumen ratio of retinal arterioles as a tool to assess vascular changes. *Hypertension.* 2009 Aug;54(2):384–7.
 78. Ritt M, Harazny JM, Ott C, Schlaich MP, Schneider MP, Michelson G, et al. Analysis of retinal arteriolar structure in never-treated patients with essential hypertension. *J*

- Hypertens. 2008 Jul;26(7):1427–34.
79. Liang J, Williams DR, Miller DT. Supernormal vision and high-resolution retinal imaging through adaptive optics. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. 1997 Nov;14(11):2884–92.
 80. Le Gargasson J-F, Glanc M, Léna P. Retinal imaging with adaptive optics. *Comptes Rendus Académie Sci - Ser IV - Phys*. 2001 Oct 1;2(8):1131–8.
 81. Lafleche AB, Pannier BM, Laloux B, Safar ME. Arterial response during cold pressor test in borderline hypertension. *Am J Physiol*. 1998 Aug;275(2 Pt 2):H409–15.
 82. Jean-Louis S, Lovasik JV, Kergoat H. Systemic hyperoxia and retinal vasomotor responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 May;46(5):1714–20.
 83. Guignabert C, Phan C, Seferian A, Huertas A, Tu L, Thuillet R, et al. Dasatinib induces lung vascular toxicity and predisposes to pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 2016 Sep 1;126(9):3207–18.
 84. Rea D, Mirault T, Raffoux E, Boissel N, Andreoli AL, Rousselot P, et al. Usefulness of the 2012 European CVD risk assessment model to identify patients at high risk of cardiovascular events during nilotinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015 May;29(5):1206–9.
 85. Maurizot A, Beressi J-P, Manéglier B, de la Marre NH, Spentchian M, Soury P, et al. Rapid clinical improvement of peripheral artery occlusive disease symptoms after nilotinib discontinuation despite persisting vascular occlusion. *Blood Cancer J*. 2014 Sep 19;4:e247.
 86. Montani D, Bergot E, Günther S, Savale L, Bergeron A, Bourdin A, et al. Pulmonary arterial hypertension in patients treated by dasatinib. *Circulation*. 2012 May 1;125(17):2128–37.
 87. Polak K, Schmetterer L, Riva CE. Influence of flicker frequency on flicker-induced changes of retinal vessel diameter. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Aug;43(8):2721–6.
 88. Nagel E, Vilser W. Flicker observation light induces diameter response in retinal arterioles: a clinical methodological study. *Br J Ophthalmol*. 2004 Jan;88(1):54–6.
 89. Kotliar KE, Vilser W, Nagel E, Lanzl IM. Retinal vessel reaction in response to chromatic flickering light. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. 2004 May;42(5):377–92.
 90. Lecleire-Collet A, Audo I, Aout M, Girmens J-F, Sofroni R, Erginay A, et al. Evaluation of retinal function and flicker light-induced retinal vascular response in normotensive patients with diabetes without retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 May 2;52(6):2861–7.
 91. Attwell D, Laughlin SB. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 2001 Oct;21(10):1133–45.
 92. Heeger DJ, Ress D. What does fMRI tell us about neuronal activity? *Nat Rev Neurosci*. 2002 Feb;3(2):142–51.
 93. Ido Y, Chang K, Williamson JR. NADH augments blood flow in physiologically activated retina and visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 13;101(2):653–8.
 94. Euvrard G, Genevois O, Rivals I, Massin P, Collet A, Sahel J-A, et al. A semi-automated computer tool for the analysis of retinal vessel diameter dynamics. *Comput Biol Med*. 2013 Jun;43(5):513–23.
 95. Lermé N, Rossant F, Bloch I, Paques M, Koch E, Benesty J. A Fully Automatic Method For Segmenting Retinal Arteries in Adaptive Optics Images. *Pattern Recognit Lett*. 2016 Mar;72:72–81.
 96. Paques M, Gaudric A. Perivenular macular whitening during acute central retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960*. 2003 Oct;121(10):1488–91.
 97. Rosenbaum D, Kachenoura N, Koch E, Paques M, Cluzel P, Redheuil A, et al. Relationships between retinal arteriole anatomy and aortic geometry and function and peripheral resistance in hypertensives. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens*. 2016

Jul;39(7):536–42.

98. Rosenbaum D, Mattina A, Koch E, Rossant F, Gallo A, Kachenoura N, et al. Effects of age, blood pressure and antihypertensive treatments on retinal arterioles remodeling assessed by adaptive optics. *J Hypertens*. 2016;34(6):1115–22.
99. Gallo A, Mattina A, Rosenbaum D, Koch E, Paques M, Girerd X. Retinal arteriolar remodeling evaluated with adaptive optics camera: Relationship with blood pressure levels. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2016 Jun;65(3):203–7.
100. Gocho K, Sarda V, Falah S, Sahel J-A, Sennlaub F, Benchaboune M, et al. Adaptive optics imaging of geographic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 May 1;54(5):3673–80.
101. Errera M-H, Coisy S, Fardeau C, Sahel J-A, Kallel S, Westcott M, et al. Retinal vasculitis imaging by adaptive optics. *Ophthalmology*. 2014 Jun;121(6):1311–2.e2.
102. Zwillinger S, Paques M, Safran B, Baudouin C. In vivo characterization of lamina cribrosa pore morphology in primary open-angle glaucoma. *J Fr Ophtalmol*. 2016 Mar;39(3):265–71.
103. Burns SA, Elsner AE, Chui TY, Vannasdale DA, Clark CA, Gast TJ, et al. In vivo adaptive optics microvascular imaging in diabetic patients without clinically severe diabetic retinopathy. *Biomed Opt Express*. 2014 Mar 1;5(3):961–74.
104. Dubow M, Pinhas A, Shah N, Cooper RF, Gan A, Gentile RC, et al. Classification of human retinal microaneurysms using adaptive optics scanning light ophthalmoscope fluorescein angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Mar 4;55(3):1299–309.

7 Résumé

Les petites artères (i.e. diamètre inférieur à 150 μ m), dites artères résistives sont essentielles à la régulation de la distribution du flux sanguin. Ces vaisseaux sont modifiés au cours de nombreuses affections, dont en particulier l'hypertension artérielle qui entraîne un épaississement de leur paroi. Jusqu'à une période récente, l'observation directe des vaisseaux rétiniens n'était pas possible chez l'homme. A la suite de la découverte par notre équipe de la possibilité de visualiser la paroi des vaisseaux rétiniens chez l'homme grâce à une technologie d'imagerie utilisant l'optique adaptative (OA), nous avons étudié la morphométrie vasculaire rétinienne humaine normale et pathologique. Pour cela, des protocoles cliniques originaux ont été mis en place, en collaboration avec des informaticiens, des ophtalmologistes et des cardiologues.

Après avoir contribué à élaborer un logiciel de segmentation d'image pour en extraire des données quantitatives sur la morphométrie vasculaire rétinienne, nous avons mené des études cliniques prospectives observationnelles, transversales et longitudinales. Ce travail nous a permis de valider une méthodologie de mesure de paramètres relatifs à la structure microvasculaire, et d'étudier ses variations au cours de l'HTA et lors des pathologies focales (croisement artérioveineux, rétrécissement artériolaire focal). Nous avons pu démontrer que la variabilité du rapport paroi-lumière des artères rétiniennes (WLR) était corrélée pour 43% à la pression artérielle mesurée en consultation et dans une moindre mesure à l'âge. Ce remodelage est eutrophique (i.e. sans augmentation de la quantité du matériau pariétal). L'observation des rétrécissements focaux artériels nous a permis de constater une diminution du diamètre interne sans épaississement pariétal et dans certains cas une disparition du rétrécissement focal, ce qui laisse supposer que ces rétrécissements artériels sont dûs à une vasoconstriction localisée. Enfin, nous avons démontré que des anomalies veineuses se produisent à proximité des artères sans contact direct avec celles-ci, suggérant l'existence d'un effet indirect de la proximité entre artère et veines sur la morphologie veineuse. Chez les diabétiques, l'équipe de Xavier Girerd avec notre concours a démontré l'existence d'un remodelage hypertrophique (augmentation de la quantité du matériau pariétal avec réduction de la lumière et épaississement pariétal). Chez des patients présentant un infarctus cérébral à la phase aiguë, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre le WLR et le score de Fazekas, reflétant le degré de leucoaraïose; le WLR lui-même n'étant pas significativement modifié par rapport à une population contrôle.

Nous avons également étudié la dynamique de la vasomotricité rétinienne. Au travers de différents stimuli vasoconstricteurs (oxygène, froid) et vasodilatateurs (stimulation lumineuse intermittente, traitement hypotenseur), nous avons documenté les modifications correspondantes de calibre des petites artères et des veines. La stimulation lumineuse intermittente apparaît comme la méthode la plus prometteuse, en raison de sa simplicité et de son acceptabilité.

En conclusion, par ce travail, nous avons exploré de nouvelles méthodes d'étude in vivo de la circulation rétinienne humaine. Un large champ d'études cliniques s'ouvre dans le domaine du phénotypage de la microcirculation. Les futurs travaux pourront s'orienter vers une meilleure prédiction du risque de lésion organique, vers le suivi du traitement hypotenseur et vers le rôle des modifications induites par le diabète dans la survenue de la rétinopathie diabétique.

MOTS-CLES : petits vaisseaux ; microcirculation ; optique adaptative ; rétine ; hypertension ; remodelage.