



HAL
open science

Contribution de la voie Wnt dans la stabilité de la barrière hémato-encéphalique

Florian Gueniot

► **To cite this version:**

Florian Gueniot. Contribution de la voie Wnt dans la stabilité de la barrière hémato-encéphalique. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0386 . tel-02937442

HAL Id: tel-02937442

<https://theses.hal.science/tel-02937442>

Submitted on 14 Sep 2020

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

École Doctorale : Sciences et vie de la Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par Florian GUENIOT

**CONTRIBUTION DE LA VOIE WNT DANS LA
STABILITÉ DE LA BARRIÈRE HÉMATO-
ENCÉPHALIQUE**

Sous la direction du Dr Cécile DUPLÀA

Soutenue le Jeudi 19 Décembre 2019

Membres du Jury :

Mme DEBETTE Stéphanie Pr Université de Bordeaux.....Président du Jury

Mme LAFFARGUE Muriel Dr Université de Toulouse.....Rapporteur

M DOCAGNE Fabian Dr Université de Caen.....Rapporteur

M BADAUT Jérôme Dr Université de Bordeaux.....Examineur

Mme DUPLÀA Cécile Dr Université de Bordeaux.....Membre invité

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à grandement remercier le Pr Thierry COUFFINHAL pour m'avoir donné la chance de réaliser ma thèse au sein de l'unité INSERM U1034, pour nos discussions ainsi que les encouragements qu'il m'a prodigué au cours de ces 3 années.

Je tiens à remercier le Dr Cécile DUPLÀA, pour avoir supervisé mon travail tout le long de ces 3 années passées au sein du laboratoire, je la remercie aussi pour la patience et la pédagogie dont elle a fait preuve à mon égard, je la remercie de m'avoir boosté et remotivé, dans les moments les plus durs.

Je tiens à remercier les autres doctorants et post-doctorants du laboratoire, Mathieu, Alexandre, Pierre-Louis, Alice, Sarah, Pauline, Candice, Sébastien, Omar et Laura pour nos conversations, conseils et autres rires partagés et avoir fait de ce laboratoire un lieu plus que vivant au cours de ces 3 années.

Je tiens à remercier les étudiants ayant réalisé leur stage à l'unité et ayant de près ou de loin participé à la réalisation de ce travail, Thomas, Julien, Bonnie, Émilie, Fafa, Hélène, Mickaëla, Marin et Ilyès.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de l'Unité 1034, Pascale, Marie-Lise, Sylvie, Marie-Ange, Alain, Christelle, Sylvain, Jérôme, Jérémie, Maxime, Jean-Paul, Étienne, Virginie, Phillipe, Olivier, Chloé, Karinne, Béatrice, Annabelle, Myriam, pour leurs conseils et expériences, je vous remercie aussi et surtout pour les bons moments et les rires partagés.

Enfin je tiens à remercier ma famille pour m'avoir permis de réaliser ces études longues de m'avoir poussé, motivé, encouragé, depuis le début de l'Université, merci à vous, et merci à mes chers parents.

Merci à toi, Édmée d'avoir été à mes côtés chaque jour, merci de m'avoir supporté, je sais que cela n'a pas dû être facile, je ferais de même avec toi, promis.

Table des matières

Remerciements :	2
Table des Figures	5
Liste des abréviations :	10
Introduction :	12
I) Les démences :	12
I-1) Définition de la démence :.....	12
I-2) La démence d'origine vasculaire :.....	13
I-3) La Maladie d'Alzheimer :.....	15
I-4) Autre démences : La démence a corps de Lewy:.....	18
I-5) Classification des démences, ou un seul continuum ?.....	19
II) La Barrière Hémato-Encéphalique :	23
II-1) Historique du concept de barrière hémato-encéphalique:.....	25
II-2) Généralités:.....	27
II-3) La cellule endothéliale :.....	29
II-3-1) Les jonctions inter-endothéliales :.....	33
II-3-2) Les différentes voies de passage des solutés au travers de la BHE :.....	43
II-3-3) Cellules endothéliales et thrombose :.....	50
II-4) Le pericyte:.....	53
II-5) L'astrocyte:.....	58
III) Barrière hémato-encéphalique et démences :	64
IV) La voie Wnt/Frizzled:	66
IV-1) Histoire de l'axe Wnt/Fz :.....	67
IV-2) La Voie Wnt/Fz canonique ou voie de la β -caténine :.....	69
IV-3) Voie Wnt/Fz non-canonique : Voie de Polarité Cellulaire Planaire.....	72
IV-4) Voie Wnt/Fz dans la mise en place et le maintien de la Barrière Hémato-Encéphalique:.....	76
IV-5) Les ubiquitine ligases dans la barrière hémato-encéphalique :.....	78
IV-6) L'E3-ubiquitine ligase PDZRN3:.....	79
V) Projet de Recherche :	82
Matériel et méthodes :	83
Lignées Murines hébergement et éthique :	83
Tamoxifène:.....	85
Procédures chirurgicales :	86
Accident vasculaire cérébral par injection <i>in situ</i> de thrombine (Orset et al., 2007):.....	86
Test de Miles.....	87
Pose de constricteurs améroïdes sur les carotides communes.....	88
Doppler.....	88
Injection de Latex-Barium pour visualisation de l'arbre artériel cérébral :.....	89
Histologie	90
Récupération des cerveaux pour l'histologie:.....	90
Fixation des tissus pour inclusion en paraffine:.....	90
Fixation Méthanol:.....	91
Fixation formaline:.....	91
Fixations des tissus pour inclusion en OCT:.....	92
Traitement des coupes histologiques :.....	92
Immuno-fluorescence sur paraffine :.....	92
Immuno-fluorescence sur cryosections:.....	94
Colorations Histologiques.....	95
Hémalun & Éosine.....	95
Violet Crésyl.....	95
Coloration de Perls.....	96

Acquisition d'images et traitement:	97
Biologie Moléculaire :	97
Isolement de vaisseaux cérébraux murins :	97
Immunomarquage sur vaisseaux isolés :	98
Extraction protéique et Western Blot:	99
Extraction d'ARN, rétrotranscription et qPCR:	100
Comportement	102
Novel Object Recognition	102
Y-Maze :	103
Nesting	104
IRM :	105
Analyses Statistiques :	106
Résultats :	108
Perméabilité vasculaire des souris <i>Pdzn3 iECKO</i> :	108
Modèle d'hypoperfusion cérébrale : Constricteurs améroïdes :	110
I) La pose de constricteurs améroïdes sur les carotides communes de souris entraîne des dommages cérébraux comparables à ceux des patients atteints de démence d'origine vasculaire :	110
II) Impact de la délétion endothéliale de <i>Pdzn3</i> dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :	114
III) Impact moléculaire de la délétion endothéliale de <i>Pdzn3</i> dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :	125
IV) Surexpression endothéliale de <i>Pdzn3</i> et démence d'origine vasculaire :	127
V) Etude de la vascularisation cérébrale des souris <i>Pdzn3 iECKO</i> et <i>Pdzn3 iECO</i>	137
VI) Etude comportementale des souris portant des constricteurs :	139
Impact de la réduction de la perméabilité vasculaire cérébrale sur la mise en place de la maladie d'Alzheimer :	146
I) Histologie des cerveaux du modèle de souris de la maladie d'Alzheimer :	146
II) Analyse moléculaire de la BHE dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer :	154
III) Analyse comportementale des souris <i>APP; PS1</i> et <i>APP/PS1 ;Pdzn3 iECKO</i> :	157
Discussion :	159
Bibliographie:	168

Table des Figures

Figure n°1 : Lésions cérébrales suggérant une démence d'origine vasculaire en IRM.....	15
Figure n°2 : Comparaison schématique et en IRM du phénotype d'une coupe de Charcot de cerveau Humain sain et d'une coupe de Charcot de cerveau de patient atteint de la Maladie d'Alzheimer (Adapté de Prince et al., 2013) :	17
Figure n°3 : Schéma de la synthèse de monomère de protéine β -amyloïde et de son agrégation (adapté de Bachurin et al., 2018) :	18
Figure n°4 : Fonctionnement physiologique de l'unité neurovasculaire (Adapté de Gorelick et al., 2017) :	20
Figure n°5 : L'hypothèse du « Two-Hit » (Adapté de Nelson et al., 2016) :	22
Figure n°6 : Les éléments figurés du sang et leurs produits de dégradation sont nocifs pour les neurones (Adapté de Zhao et al., 2015) :	24
Figure n°7 : Expérience d'injection du Bleu de Trypan de Goldman (1909) :	27
Figure n°8 : Les différents composants de l'unité neuro-vasculaire (Adapté de Miller et al., 2012):	29
Figure n°9 : Schéma d'une jonction serrée :	37
Figure n°10 : Schéma d'une jonction adhérente :	39
Figure n°11 : Schéma d'une jonction GAP vue depuis l'intérieur de la cellule et depuis l'intérieur de la fente endothéliale.	40
Figure n°12 : Schéma d'une jonction inter-endothéliale cérébrale complète :	41
Figure n°13 : Le passage des solutés au travers de la BHE peut se faire via différents mécanismes :	43
Figure n°14 : La triskèle de clathrine et la forme de plusieurs treillis de clathrine simple (Adapté de Fotin et al., 2004):	47

Figure n°15 : Photographie de Microscopie électronique montrant des cavéolines (Adapté de Andreone et al., 2017):.....	48
Figure n°16 : Effets anti-thrombotiques des cellules endothéliales dans la cascade de la coagulation :	51
Figure n°17 : Différentes morphologies et fonctions des péricytes en fonction de leur emplacement le long de l'arbre vasculaire (Adapté de Atwell et al., 2016) :	54
Figure n°18 : Morphologie des Astrocytes (Adapté de Christensen et al., 2013 lui-même adapté de Reichenbach et al., 2010):	59
Figure n°19 : Schéma de la voie Wnt/Fz canonique dite de la β -caténine :	72
Figure n°20 : Schéma de la voie de signalisation Wnt/Fz non-canonique dite PCP :	75
Figure n°21 : Représentation schématique des constructions génétiques des souris utilisées :	85
Figure n°22 : Liste des Anticorps Primaires utilisés :	94
Figure n°23 : Liste des anticorps Secondaires utilisés :	94
Figure n°24 : Tableau des séquences des amorces utilisées en RT-qPCR :	101
Figure n°25 : Photographies représentatives des différents degrés de gradation d'un test de "Nesting" :	105
Figure 26: L'IRM ne montre pas de défaut cérébraux 28 jours après la pose de constricteurs.	106
Figure n°27 : La délétion de <i>Pdzn3</i> dans l'endothélium entraîne une non-induction de la perméabilité vasculaire de la peau dorsale des souris en condition VEGF :	109
Figure n°28 : La pose de constricteurs améroïdes entraîne une occlusion totale des carotides communes de souris en 28 jours :	112
Figure n°29 : La pose de constricteurs sur les carotides communes de souris induit des dommages cérébraux accrus à mesure que le diamètre interne diminue :	113

Figure n°30 : Les constricteurs améroïdes entraînent une baisse chronique du flux sanguin cortical des souris <i>Pdzn3</i> iECKO et contrôles sans entraîner de mortalité sévère :	115
Figure n°31 : La délétion de <i>Pdzn3</i> dans l'endothélium réduit le nombre d'ischémies dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :	116
Figure n°32 : La délétion de <i>Pdzn3</i> dans l'endothélium n'influe pas sur la quantité ou la surface de saignements dans l'encéphale dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :	117
Figure n°33 La délétion de <i>Pdzn3</i> dans l'endothélium protège de la perte neuronale hippocampale de la zone CA1 dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :	119
Figure n°34 : La délétion de <i>Pdzn3</i> dans l'endothélium protège contre l'activation astrocytaire dans un modèle d'hypoperfusion chronique :	120
Figure n°35 : La délétion de <i>Pdzn3</i> dans l'endothélium diminue la perméabilité vasculaire hippocampale au fibrinogène :	122
Figure n°36 : Tableau récapitulatif, comparatif des évènements détectés chez les souris sur lesquelles ont été posés des constricteurs :	124
Figure n°37 : L'hypoperfusion cérébrale entraîne une réduction transcriptionnelle de <i>Wnt7b</i> mais pas <i>Wnt7a</i> et la délétion de <i>Pdzn3</i> entraîne elle une augmentation de <i>Pvlap</i> :	126
Figure n°38 : Survie des souris <i>Pdzn3</i> iECO vs contrôles.....	128
Figure n°39 : La surexpression de <i>Pdzn3</i> dans l'endothélium augmente le nombre de plages d'ischémie dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :	129
Figure n°40 : La surexpression de <i>Pdzn3</i> dans l'endothélium entraîne une augmentation des évènements de saignements de gros calibre dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :	130

Figure n°41 : La surexpression de <i>Pdzn3</i> dans l'endothélium entraîne une augmentation de la perte neuronale hippocampale de la zone CA1 dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :	131
Figure n°42 : La surexpression de <i>Pdzn3</i> dans l'endothélium entraîne une augmentation de l'infiltration des macrophages dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :	132
Figure n°43 : La surexpression de <i>Pdzn3</i> dans l'endothélium entraîne une augmentation de l'activation astrocytaire hippocampale dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :	133
Figure n°44 : La surexpression de <i>Pdzn3</i> dans l'endothélium entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire au fibrinogène ou IgG (blanc) dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :	135
Figure n°45 : Tableau récapitulatif, comparatif des évènements détectés chez les souris <i>Pdzn3 iECO</i> E et littermates sur lesquelles ont été posés des constricteurs :	136
Figure n°46 : Les souris <i>Pdzn3 iECKO</i> , <i>Pdzn3 iECO</i> E et littermates ne montrent pas de différence significative dans la vascularisation de l'encéphale :	138
Figure n°47 : Les souris <i>Pdzn3 iECKO</i> et littermates ne montrent pas de différences en conditions SHAM ou AC dans le test de reconnaissance du nouvel objet :	140
Figure n°48 : La capacité à réaliser le test du labyrinthe en Y est impactée par la surexpression ou la délétion de <i>Pdzn3</i> dans l'endothélium :	143
Figure 49 : Le croisement des souris <i>APP/PS1</i> et <i>APP/PS1 ; Pdzn3 iECKO</i> entraîne une baisse du flux sanguin cérébral cortical avec l'âge :	147
Figure n°50 : La délétion de <i>Pdzn3</i> dans l'endothélium réduit la quantité de peptide β -amyloïde accumulé dans le cortex et l'hippocampe de souris <i>APP/PS1</i> à 12 mois :	148

Figure n°51 : La délétion endothéliale de <i>Pdzn3</i> réduit la perméabilité de la barrière aux IgG et au fibrinogène ainsi que la perte neuronale corticale dans un modèle de maladie d'Alzheimer :	150
Figure n°52 : La délétion endothéliale de <i>Pdzn3</i> réduit l'activation astrocytaire mais n'a aucun effet sur l'activation de la microglie dans le cortex des souris modèle de maladie d'Alzheimer :	151
Figure n°53 : La délétion endothéliale de <i>Pdzn3</i> réduit la perte pericytaire corticale dans un modèle de démence Alzheimer :	153
Figure n°54 : <i>Pdzn3</i> régule l'expression des gènes de claudine-5 ainsi que <i>Wnt7b</i> spécifiques au maintien de la barrière dans la microcirculation cérébrale :.....	157
Figure n°55 : Test du labyrinthe en Y des souris modèle de démence de type Alzheimer :	157

Liste des abréviations :

MA: Maladie d'Alzheimer
VaD: Démence d'origine vasculaire
DSM-5: Manuel Diagnostique et Statistiques des Troubles Mentaux n°5
AVC: Accident vasculaire cérébral
IRM: Imagerie par résonance magnétique
APP: Amyloid precursor protein
A β : Amyloïde- β
CERAD: Consortium to Establish a Registry for Alzheimer Disease
CTF α : Carboxy-terminal fragment α
sAPP α : Soluble APP α
AICD: APP IntraCellular Domain
sAPP β : Soluble APP β
CTF β : Carboxy-terminal fragment β
LBD: Lewy Bodies Dementia
PD: Parkinson's Disease
PDD: Parkinson's Disease with Dementia
CBF: Cerebro-Vascular Flux
BHE: Barrière Hémato-Encéphalique
BHE: Blood Brain Barrier
ECM: Extra cellular Matrix
GR: Globule Rouge
ROS: reactive Oxygen Species
Fe²⁺: Ion Fer
O₂: Oxygène
LCR: Liquide Céphalo-Rachidien
SMC: Smooth Muscle Cell
AEF: Astrocytic End Foot
EC: Endothelial Cell
CD31: PECAM
PECAM: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
ZO: Zona Occludens
ATP: Adénosine Triphosphate
TJ: Tight Junction
JAM: Junction Adhesion Molecules
ESAM: Endothelial cell-Selective Adhesion Molecule
kDa: kiloDalton
PKC: PhosphoKinase C
PDZ: Post synaptic density, Drosophila disc large tumor suppressor, Zona occludens
MAGUK: Membrane Associated GUanylate Kinases
Ca²⁺: ion Calcium
VE-CADH: Vascular Endothelial Cadherine
Wnt: Wingless Int-1
Cx: Connexine
SLC: SoLute Carrier
EAAT: Excitatory Amino Acids Transporters
ABC: ATP Binding-Cassette
LDL: Low Density Lipoprotein
CAV: cavéoline

GPCR: récepteurs couplés aux protéines G
PDGFR β : Platelet Derived Growth Factor Receptor β
TGF β : Transforming Growth Factor β
eNOS: endothelial NO synthase
HIV: Human Immunodeficiency virus
shRNA: small hairpin RNA
EPCR: Endothelial Protein C Receptor
TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor
t-Pa: Tissue plasminogen
 α -SMA : Alpha Smooth muscle actin
IL1 β : Interleukin 1 β
TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha
MMP9: Matrix Metalloprotease 9
GFAP: Gliary fibrillary acidic protein
ALDH1L1: ALdehyde DesHydrogenase 1 family member 1
GLAST: GLutamate ASpartate Transporter
GS: Glutamine Synthetase
AQP1: Aquaporine 1
20-HETE: acide 20-Hydroxy Eicosa Tetra Enoïc
AA: Acide Arachidonique
PGE2: Prostaglandine 2
PGT: Transporteur de Prostaglandines
NO: Oxyde nitrique
K⁺: Ion potassium
GABA: Acide Gamma Amino Butyrique
CSF: Cerebro-Spinal Fluid
PET: Positron emission Tomography
Fz: Frizzled
Wg: Wingless
MMTV: Mouse Mammary Tumour Virus
PCP: Polarité Cellulaire planaire
APC: Adenomatosis Polyposis Coli
PP2A: Protéine Phosphatase 2A
Dvl: Dishevelled
MAK: Metastasis Associated Kinase
DIX: Dishevelled Axin
DEP: Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin Domain
JNK: c-Jun N-terminal Kinase
BRB: Blood-retina barrier
PDZRN3: PDZ Domain containing ring finger 3
MCAO: Middle Cerebral Artery Occlusion
AC: Ameroid Constrictor
PVLAP : Plasmalemma Vesicle Associated protein

Introduction :

I) Les démences :

I-1) Définition de la démence :

Le terme « démence » est définie par le Santé publique Canadienne de la façon suivante : « Le mot démence est un terme générique utilisé pour décrire un ensemble de symptômes touchant le fonctionnement du cerveau qui sont causés par des maladies ou des lésions neurodégénératives et vasculaires. La démence se caractérise par un déclin progressif des capacités cognitives et peut influencer sur l'humeur et le comportement. Les capacités cognitives qui peuvent être affectées comprennent : la mémoire, la conscience de soi, du lieu et du temps, le langage, les compétences de base en mathématiques le discernement ainsi que la planification. En tant que maladie chronique et progressive, la démence peut nuire considérablement à la capacité de s'adonner aux activités de la vie quotidienne ».

La démence est donc un sigle sous lequel est regroupé un continuum de maladies impactant le fonctionnement normal et physiologique du cerveau. Ce continuum représente 40 à 50 000 000 d'individus atteints et est borné : la Maladie d'Alzheimer (MA); première cause de démence dans le Monde avec plus de 50% des cas de démence répertoriés d'une part (Prince et al., 2013; Wu et al., 2017) ; et la démence d'origine vasculaire (VaD) stricte représente entre 15 et 20% des cas de démence d'autre part (O'Brien and Thomas, 2015; Roman et al., 1993). Au sein de ce continuum sont identifiables des cas de démence empruntant des caractéristiques de l'une ou l'autre de ces maladies représentant les 30% restants des cas de démences et comprenant entre autres les démences à corps de Lewy et de type Parkinsonienne.

La démence touche en général plus les Femmes que les Hommes, et son incidence augmente avec l'âge de la population (Prince et al., 2013). En effet l'incidence de la démence, qu'elle soit de type Alzheimer, vasculaire ou mitigée double environ tous les 5 ans d'âge de la population de 65 à 90 ans, soit 4,3 ans pour la maladie d'Alzheimer et 5,3 ans pour la démence d'origine vasculaire (Corrada et al., 2010).

I-2) La démence d'origine vasculaire :

La démence d'origine vasculaire est une maladie du vieillissement. Comprendre sa physiopathologie est un enjeu de plus en plus important à mesure que l'âge moyen de la population Mondiale augmente.

Le diagnostic de démence d'origine vasculaire est décrit selon le Manuel Diagnostique et Statistiques des Troubles Mentaux-5 (DSM-5 pour Diagnostic & Statistical Manual of Mental Disorders) de la façon suivante :

La démence d'origine vasculaire est liée au développement de multiples déficits cognitifs manifestés par des pertes de mémoire visualisées par une habilité réduite à apprendre des nouvelles informations ou à se rappeler d'informations préalablement apprises ainsi que l'une des caractéristiques suivantes: présence d'aphasie ou de problème de langage, présence d'apraxie (incapacité à réaliser des activités motrices malgré une fonction locomotive intacte), présence d'agnosie (incapacité à reconnaître ou à identifier des objets malgré des fonctions sensorielles intactes), ou enfin présence d'une perturbation de la fonction exécutive, de planification, d'organisation, ou d'abstraction. De plus les déficits observés doivent être la cause d'une dysfonction des capacités sociales et occupationnelles et doivent représenter un déclin significatif de ces fonctions depuis le

stade précédent. Ensuite, les patients doivent montrer des symptômes et/ou signes neurologiques focaux, (*i.e.*, exagération des réflexes tendineux profonds, de la réponse de l'extenseur plantaire, paralysie pseudo-bulbaire, anomalie de démarche, faiblesse d'une extrémité) ou des résultats de laboratoire indiquant une maladie cérébro-vasculaire (*i.e.*, infarcts multiples du cortex et de la substances blanche proche) qui sont jugées symptomatique du défaut. Enfin, cette étiologie ne doit pas être exclusivement reliée à une crise de délirium.

La démence d'origine vasculaire touche 1,4% des adultes âgés de 65 à 70 ans et touche jusqu'à 23,6% des personnes au-delà de 85 ans (Corrada et al., 2010). Un des problèmes majeurs de cette pathologie est que le diagnostic ne peut être vérifié que post-mortem par analyse histologique des cerveaux des patients (Beach et al., 2012; Kalaria, 2016; Love, 2005).

Cette pathologie est la résultante d'un ou plusieurs problèmes cardiovasculaires et/ou génétiques entraînant une fragilisation du vaisseau sanguin cérébral (Wang et al., 2018a). Ce dernier ne pouvant alors plus jouer son rôle de barrière endothéliale au niveau du parenchyme cérébral. Elle est la résultante soit d'une atteinte pathologique des vaisseaux cérébraux de petits et moyens calibres, soit d'un Accident vasculaire cérébral (AVC) ou d'une hémorragie cérébrale (Roman et al., 1993). La principale cause de démence d'origine vasculaire est l'hypoperfusion cérébrale (Mansour et al., 2018). Les principaux facteurs de risques de cette maladie sont l'âge, le sexe, le tabagisme, le diabète, ainsi que l'hypertension.

La recherche d'atteintes liées à une démence d'origine vasculaire est faite via IRM, cette dernière montrera alors la présence d'une ou plusieurs des lésions suivantes: Leucoaraiose (perte de substance blanche) visualisée par la présence d'hyper-intensité de la substance blanche, la présence d'infarctus lacunaires, la présence de micro-hémorragies révélées par angio-IRM avec produit de contraste et/ou enfin la présence d'espaces péri-vasculaires dilatés (Engelhardt et al., 2011; Lambert et al., 2018) (Fig n°1).

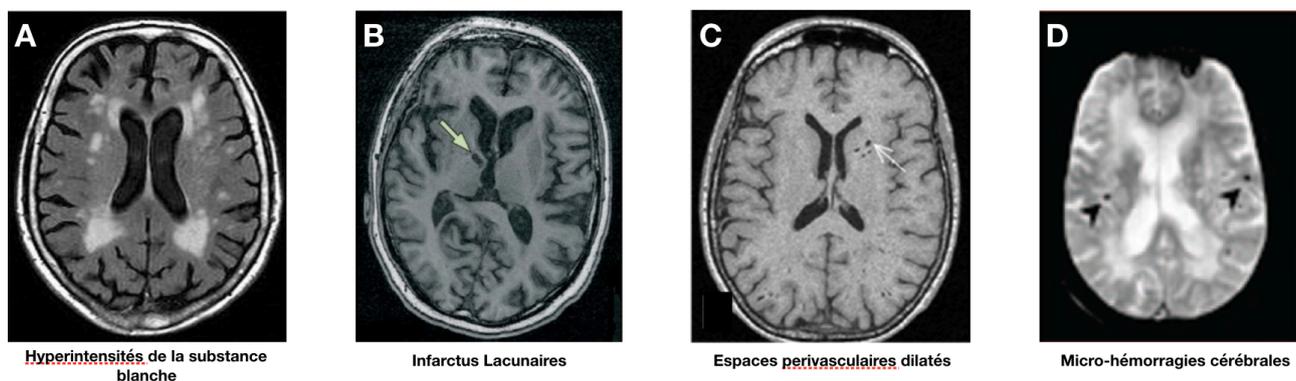


Figure n°1 : Lésions cérébrales suggérant une démence d'origine vasculaire en IRM

(A) Hyperintensités de la substance blanche révélées en séquence FLAIR. (B) Infarctus lacunaires révélés en IRM par séquence T1. (C) Espaces perivasculaires dilatés révélés en IRM par séquence T1. (D) Micro-hémorragies révélées en IRM par séquence T2*.

I-3) La Maladie d'Alzheimer :

La maladie d'Alzheimer doit son nom à Alois Alzheimer neurologue Allemand, qui examina pour la première fois en 1901 une patiente de 51 ans atteinte de ce qu'il décrira comme étant une démence pré-sénile. À la mort de la patiente en 1906, il pratiqua alors une autopsie et décrira son cerveau comme étant grandement atrophié, particulièrement au niveau du cortex. Il utilisa ensuite des colorations aux sels d'argents qui lui permettront de mettre en évidence des dépôts anormaux entre et à l'intérieur des neurones dans le cerveau de la défunte. Ces dépôts avaient déjà été décrits à cette époque, néanmoins, c'est la première fois qu'ils sont retrouvés chez une patiente aussi jeune (Cipriani et al., 2011).

La maladie d'Alzheimer est aujourd'hui la cause la plus courante de démence dans le Monde. C'est aussi un des plus grands challenges que la Santé Publique ait eu à affronter. En effet en Décembre 2013, le conseil du G8 a décrit la démence comme étant un des plus gros enjeux actuels, et leur ambition était alors de trouver une thérapie permettant d'endiguer l'apparition de la maladie d'ici à 2025.

Comme pour la démence d'origine vasculaire l'étiologie de la maladie est complexe, le DSM-5 la décrit de manière similaire à la démence d'origine vasculaire. L'examen histologique des cerveaux de patients est toujours nécessaire pour valider le cas de maladie d'Alzheimer. Cet examen post-mortem doit montrer : une atrophie cérébrale générale, qui peut être plus prononcée dans le lobe temporal notamment au niveau de l'hippocampe. D'autres anomalies peuvent être visualisées, comme l'accumulation de plaques séniles composées de peptide β -amyloïde polymérisés sous forme de fibrilles, ainsi que l'hypertrophie des espaces ventriculaires (Perl, 2010; Selkoe and Hardy, 2016) (Fig n°2). Le peptide β -amyloïde est produit par le clivage de la partie extracellulaire de la Protéine Précurseuse β -Amyloïde (Amyloid β Precursor Protein ou APP) par la β et la γ -secretase clivant respectivement les parties N- et C-Terminales du peptide (Nunan and Small, 2000) (Fig n°3). L' α -secretase elle clive à l'intérieur du peptide A β et empêche son aggrégation (F. Lichtenthaler, 2012). Les dépôts d'A β peuvent mesurer jusqu'à plusieurs centaines de μ m de diamètre et sont distribués dans l'entièreté du Cortex cérébral ainsi que dans les noyaux gris centraux et le Corps Calleux (Iseki et al., 1989). Les plaques peuvent avoir deux apparences distinctes, les premières sont des plaques diffuses formées principalement par de l'A β non fibrillaire extra-cellulaire. Les secondes sont appelées plaques névritiques et contiennent de l'A β principalement sous sa forme de fibrille amyloïde, à proximité desquelles pourront être retrouvées des neurites enflés et

dystrophiques (Love, 2005). Ces plaques névritiques peuvent contenir un centre dense d'amyloïde. Le critère du Consortium pour Établir un Registre de la Maladie d'Alzheimer (CERAD pour Consortium to Establish a Registry for Alzheimer Disease) le plus utilisé pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer est la présence de plaques excédant les illustrations standards après ajustement de l'âge du patient car il est possible de détecter des plaques névritiques chez des individus doté d'une cognition normale (Love, 2005).

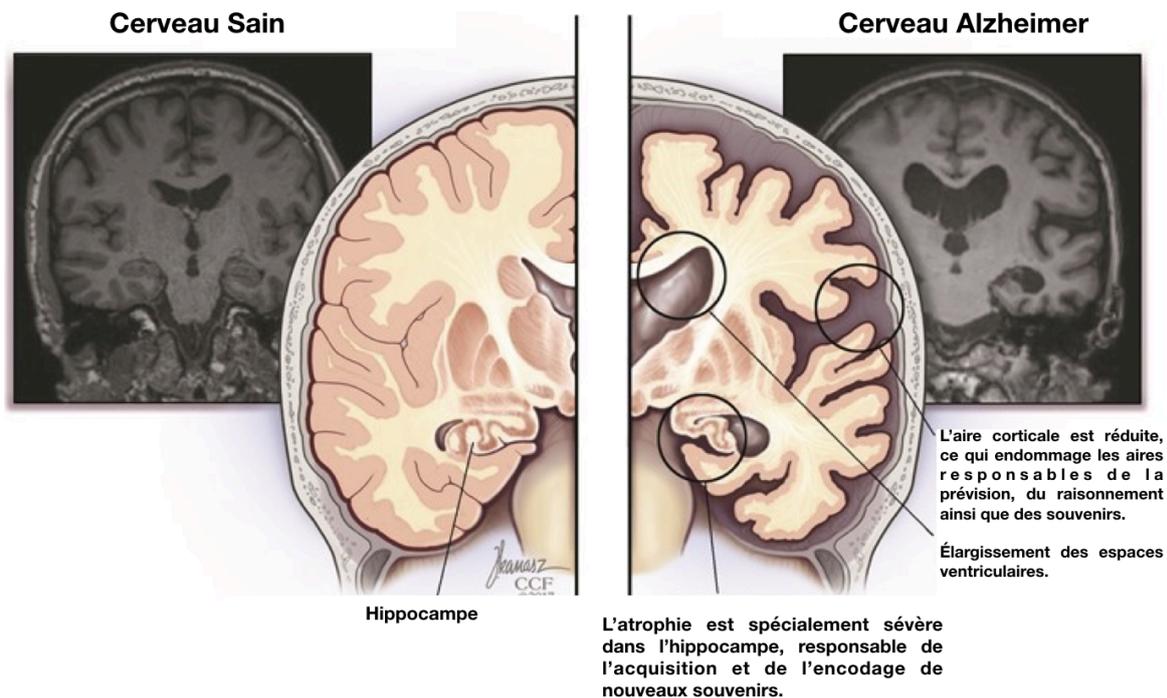


Figure n°2 : Comparaison schématique et en IRM du phénotype d'une coupe de Charcot de cerveau Humain sain et d'une coupe de Charcot de cerveau de patient atteint de la Maladie d'Alzheimer (Adapté de Prince et al., 2013) :

Les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer montrent une atrophie corticale généralisée, une atrophie souvent sévère de l'hippocampe ainsi qu'une hypertrophie des espaces ventriculaires.

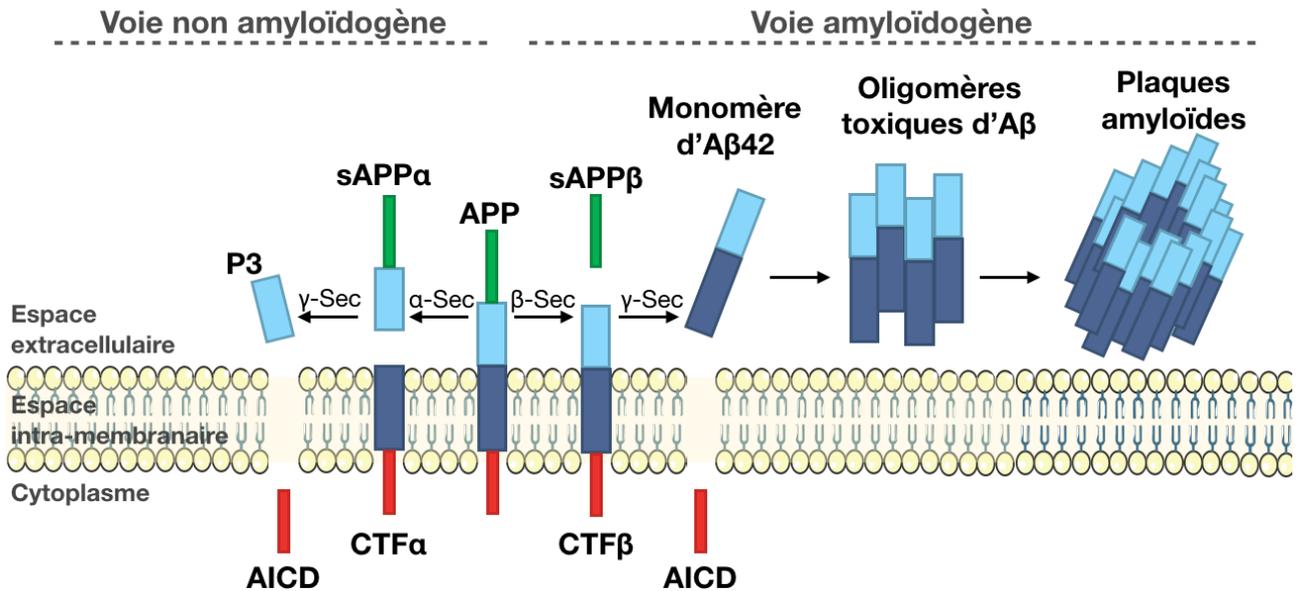


Figure n°3 : Schéma de la synthèse de monomère de protéine β-amyloïde et de son agrégation (adapté de Bachurin et al., 2018) :

Le clivage séquentiel de la protéine APP par la β-secretase puis par la γ-secretase entraîne la formation de monomère d'Aβ capables de s'agglomérer sous forme de plaque amyloïdes. La voie non amyloïdogène, elle, est initiée par le clivage de la protéine APP par l'α-secretase relâchant le peptide soluble APPα (sAPPα) dans l'espace intercellulaire. Le fragment C-terminal (CTFα pour C-Terminal fragment) restant est à son tour clivé par la γ-secretase dans l'espace intermembranaire il en résulte l'apparition du domaine intracellulaire de l'APP (AICD pour APP IntraCellular Domain) d'une part et du peptide P3 de l'autre, tous deux ne permettant pas la formation de plaques amyloïdogènes. La voie amyloïdogène initiée par le clivage de la protéine APP par la β-secretase entraîne la formation du peptide sAPPβ relâché hors de la cellule. Le fragment restant CTFβ est à son tour clivé par la γ-secretase et permet l'apparition de peptides Aβ monomériques contenant 38 à 42 acides aminés. Les fragments Aβ toxiques ainsi synthétisés ont alors la capacité de s'oligomériser formant ainsi des plaques amyloïdes.

I-4) Autre démences : La démence à corps de Lewy:

La démence à corps de Lewy (LBD pour Lewy Body Dementia), est un terme englobant ici encore plusieurs pathologies telles que la maladie de Parkinson (PD pour Parkinson Disease), la maladie de Parkinson avec démence (PDD pour Parkinson's Disease Dementia), ainsi que la démence avec corps de Lewy dans lesquelles la démence va être associée à la présence de corps de Lewy dans le cortex cérébral (Outeiro et al., 2019; Spillantini et al., 1998). Les corps de Lewy sont des inclusions cytoplasmiques éosinophiles retrouvées dans les corps neuronaux dont le principal composant est l'α-synucléine (Outeiro et al., 2019). Ces corps de Lewy sont visualisables dans la plupart de l'encéphale avec un tropisme pour la substance noire, et le locus ceruléen (Shults, 2006). Il est aussi

possible de retrouver des corps de Lewy par plage dans le cervelet, dans l'amygdale, dans le gyrus singulaire ou encore à proximité de l'hippocampe (Apaydin et al., 2002; Tsuboi and Dickson, 2005). Dans le cortex, les plages de corps de Lewy apparaissent homogènes et sont souvent associées à un déplacement excentrique du noyau neuronal. En plus des corps de Lewy, pourront être observés des neurites dits « de Lewy » qui sont des prolongements des cellules nerveuses qui contiennent des agrégats de la protéine α - synucléine (Volpicelli-Daley et al., 2014). C'est cette agrégation qui serait à l'origine de la neuro-dégénérescence observé chez les patients atteints de ce type de démences (Outeiro et al., 2019; Spillantini et al., 1998).

I-5) Classification des démences, ou un seul continuum ?

Les cas de démence sont aujourd'hui discriminés les uns des autres, en effet chaque pathologie a été décrite selon certains critères permettant de différencier une des pathologies des autres. Néanmoins l'étude et la recherche sur ces pathologies permet aujourd'hui de trouver des évènements et causes communes à ces différentes maladies. En effet les facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer ainsi que de la démence d'origine vasculaire sont partagés comme: le sexe, le diabète, l'hypertension, le taux de cholestérol, le tabagisme, l'alcoolisme, la présence de maladie cardiovasculaire, ou enfin des antécédents de thromboses ou d'inflammation chronique (Breteler, 2000). L'étude de ces causes communes, permettant la mise en place de la plupart des cas de démence est donc un axe de recherche phare, à privilégier.

La théorie récente émergente du « Two-Hit » permettrait d'expliquer ces causes communes. En effet, cette théorie stipule que la mise en place de la maladie d'Alzheimer comme la démence d'origine vasculaire, commencerait par une atteinte des vaisseaux cérébraux de petits et moyens calibres. Dans les conditions physiologique et non

pathologique, l'unité neurovasculaire fonctionnelle, composée des neurones, des astrocytes, des pericytes ainsi que des cellules endothéliales, serait responsable de la conservation d'un flux sanguin cérébral (CBF) normal et régulé, la perméabilité de la barrière, le trafic des cellules immunitaire, ainsi que de la fonction neurotrophique et la clairance des divers produits de dégradation du métabolisme cérébral. Tous ces mécanismes permettent un fonctionnement normal et physiologique du cerveau (Fig n°4) (Gorelick et al., 2017).

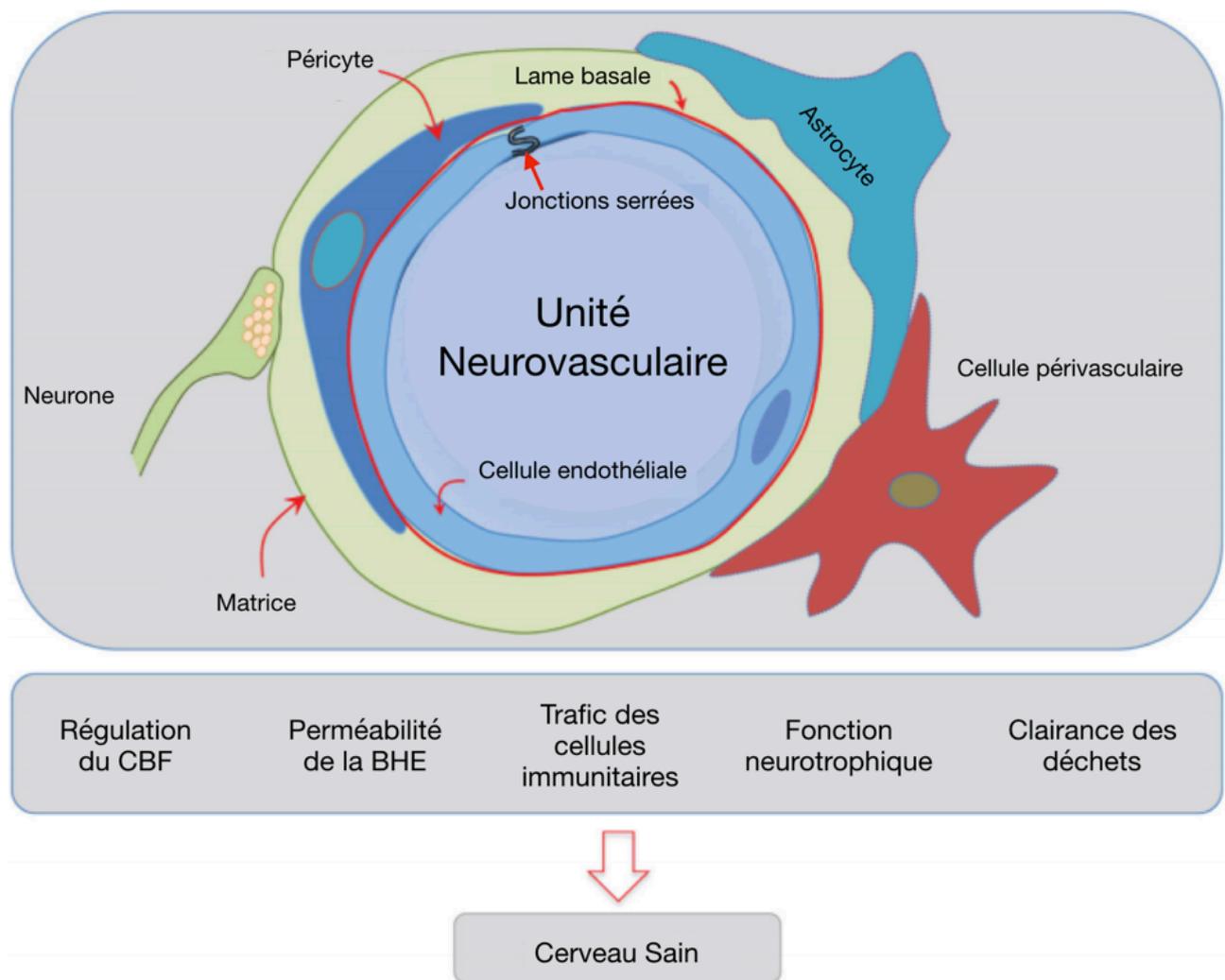


Figure n°4 : Fonctionnement physiologique de l'unité neurovasculaire (Adapté de Gorelick et al., 2017) :

L'unité neurovasculaire composée des neurones, des astrocytes, des pericytes, de la matrice extra-cellulaire ainsi que des cellules endothéliales a pour but le maintien du flux sanguin cérébral, le maintien de la perméabilité de la barrière à un niveau faible, permet le trafic des cellules de l'immunité, permet la nutrition des neurones en fonction de leurs besoins et enfin permet l'export des toxines hors du parenchyme cérébral.

Dans le cas de la pathologie, une réduction du flux cérébral est retrouvée chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer et de démences d'origine vasculaire (Schuff et al., 2009);

induisant de l'hypoxie du tissu neuronal. Cette hypoxie va induire « l'ouverture de barrière », entraînant une dérégulation de l'homeostasie cérébrale, permettant le passage des composés du sang dans le parenchyme cérébral induisant alors des dommages tissulaires. De plus, la baisse du flux sanguin va aussi altérer la nutrition des neurones, ce qui va entraîner la vulnérabilité du neurone à l'apoptose. Enfin, le flux sanguin réduit sera aussi un mécanisme dérégulant la clairance de la protéine β -amyloïde, qui pourra alors librement s'accumuler sous forme de plaques séniles dans les cerveaux des patients. Tous ces mécanismes mis ensemble forment le « premier hit » vasculaire, précédant les désordres neurologiques (Nelson et al., 2016).

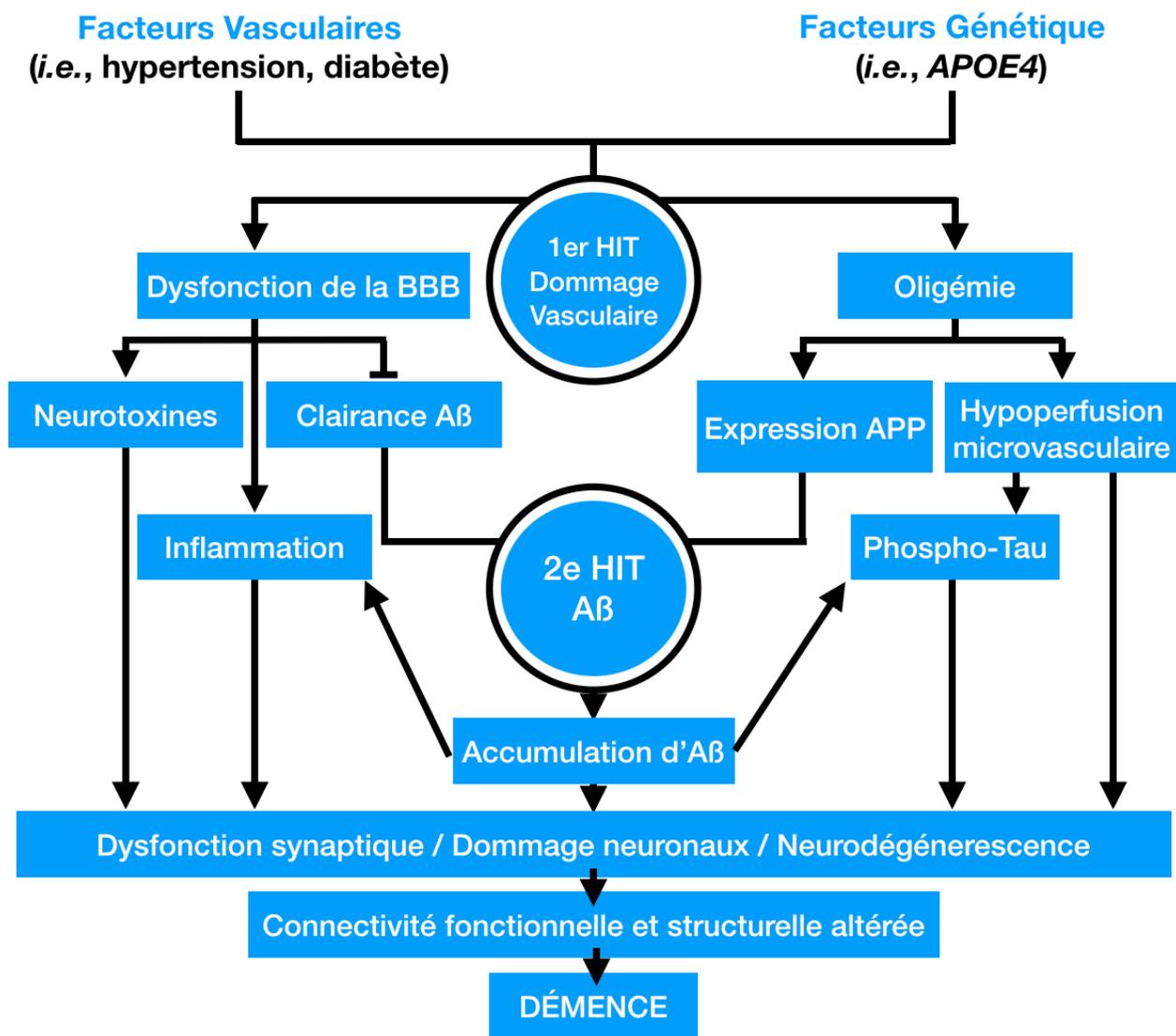


Figure n°5 : L'hypothèse du « Two-Hit » (Adapté de Nelson et al., 2016) :

Selon l'hypothèse du « Two-Hit », la dysfonction vasculaire cérébrale qu'elle soit liée à des facteurs de risques vasculaires et/ou génétiques entraîne une dysfonction de la barrière hémato-encéphalique, ainsi qu'une perte de substance blanche (oligémie). Ces dysfonctions vont à leur tour permettre le passage de neurotoxines dans le parenchyme cérébral, entraîner une réduction de la clairance de l'Aβ, entraîner une augmentation de l'expression de la protéine APP ainsi que de son clivage, enfin ces dysfonctions vont aussi entraîner une hypoperfusion microvasculaire. Ces dysfonctions additionnées les unes aux autres vont permettre l'accumulation des peptides β-amyloïdes, entraînant une augmentation de l'inflammation cérébrale à proximité de ces plaques et dans le même temps une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau, elle aussi impliquée dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. L'ensemble de ces dysfonctions vont entraîner une dysfonction neuronale généralisée allant jusqu'à la neurodégénérescence du tissu nerveux, responsable de la diminution des capacités cognitives entraînant *in fine* la démence.

De plus, des études récentes tendent à montrer une réduction de l'incidence de la démence en général dans les cohortes de patients suivis pour des troubles cardiovasculaires. Par exemple Hoffman et al., 2009 montrent que les patients hypertendus sous médication ont tendance à avoir une neuropathologie de type Alzheimer moins avancée que les contrôles normotensifs. D'autres études s'accordent sur ce point et montrent un

retard dans l'apparition de la démence dans les cohortes de patients atteints de maladies cardiovasculaires sous traitements médicamenteux (Santos et al., 2017). Ici aussi, la prescription de β -bloquants, traitement antihypertenseur de première intention, entraîne une diminution du risque de développer une démence chez les patients âgés (Gelber et al., 2013; Rosenberg et al., 2008).

En apprendre plus sur le fonctionnement et les interactions des différents composants de cette barrière hémato-encéphalique devient donc indispensable afin de trouver des cibles permettant de moduler la ou les fonctions des différents acteurs de cette barrière pour permettre d'endiguer l'avancée de la démence dans le Monde.

II) La Barrière Hémato-Encéphalique :

L'architecture de la vascularisation cérébrale est très différente des autres vasculatures, en effet cette dernière est hautement spécialisée et possède un rôle très précis à jouer. Les neurones contenus dans le parenchyme cérébral sont des cellules très « fragiles » vis-à-vis des éléments figurés du sang ainsi que de leurs produits de dégradation (Bell et al., 2010; Chow and Gu, 2015; Di Marco et al., 2015; Winkler et al., 2014) (Fig n°6).

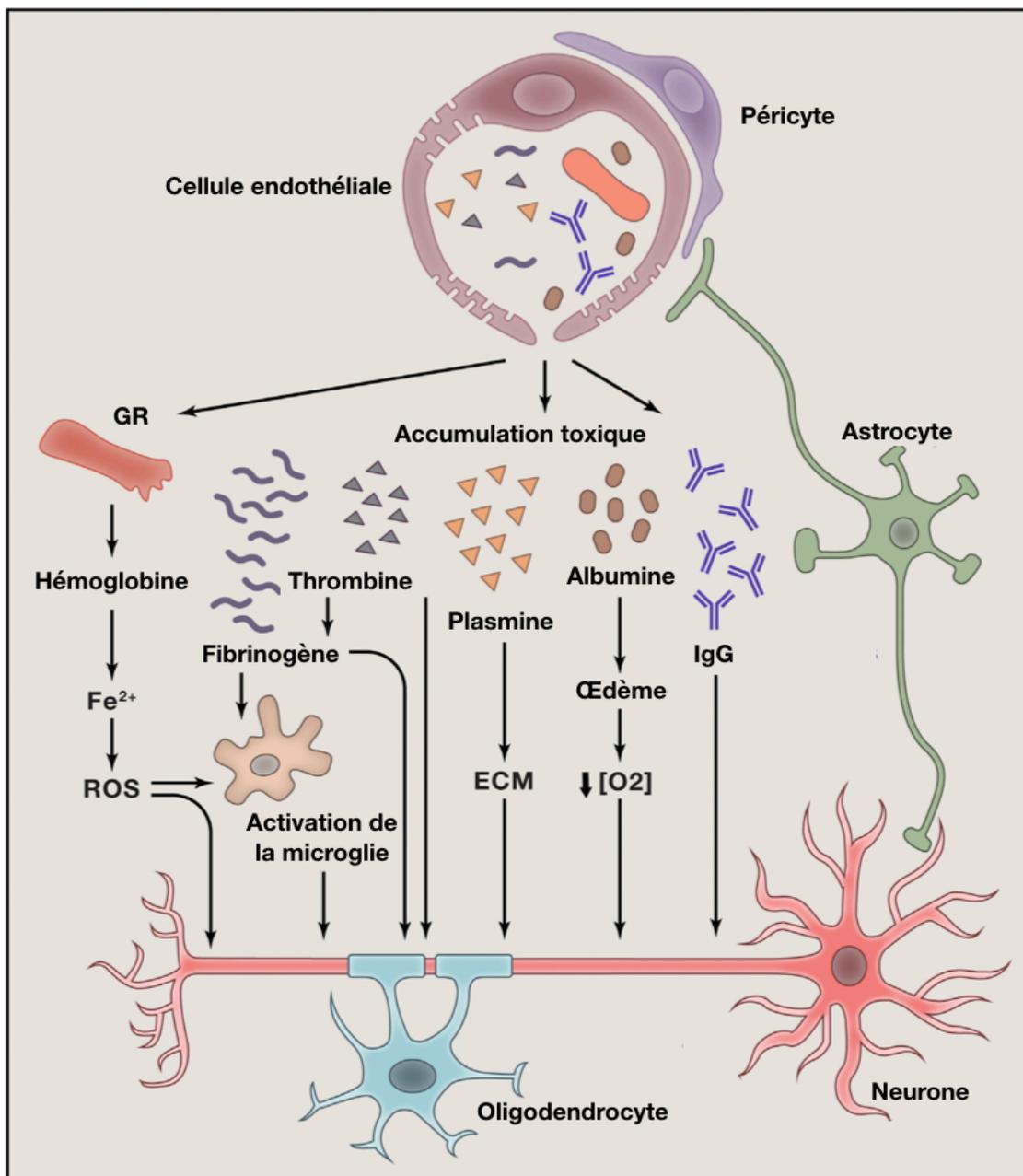


Figure n°6 : Les éléments figurés du sang et leurs produits de dégradation sont nocifs pour les neurones (Adapté de Zhao et al., 2015) :

L'ouverture de la barrière hémato-encéphalique résulte en l'accumulation de : (1) l'hémoglobine et les ions Fe^{2+} dérivés des globules rouges (GR) qui sont neurotoxiques car ils permettent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et sont cause de stress oxydatifs aux neurones ; (2) les protéines dérivées du sang (*i.e.* fibrinogène, thrombine, plasmine) qui permettent la dégradation de la matrice extracellulaire (ECM) ce qui induit le détachement des neurones et leur mort. (3) le fibrinogène qui active la microglie, promeut l'inflammation et la démyélinisation et empêche la myélinisation des neurones par les oligodendrocytes. (4) l'albumine qui contribue au développement de l'œdème vasogénique, de l'hypoperfusion capillaire ainsi que de l'hypoxie. La rupture de barrière peut aussi entraîner la perte du privilège immunitaire du cerveau et entraîner la création d'anticorps reconnaissant les différents composants des axones ou de la membrane des neurones.

Le passage de ces éléments et/ou leur diffusion hors de la barrière hémato-encéphalique peut entraîner des conséquences très délétères pour les neurones pouvant aller jusqu'à provoquer une neurodégénérescence massive.

II-1) Historique du concept de barrière hémato-encéphalique:

La mise en évidence du concept de barrière hémato-encéphalique est principalement due à Paul Ehrlich (1885, 1906) & Edwin Goldman (1909, 1913). Ils observèrent que l'injection intraveineuse périphérique de colorants hydrosolubles ne colorait jamais la circulation cérébrale ou le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Fig n°7). Goldman cite même des travaux préalable de Bouffard (1906), utilisant des colorants avant lui. Néanmoins Goldman (1913) est à l'origine de la découverte de la forte coloration des plexus choroïdes (Fig n°7). Mais ni Ehrlich, ni Bouffard, ni Goldman ne discutèrent le rôle des cellules vasculaires dans ce phénomène. Des expériences supplémentaires ont montré que l'injection directe de ces mêmes colorants dans l'espace sous-arachnoïdal coloraient cette fois ci les vaisseaux et le LCR mais pas les tissus périphériques. C'est à Lewandowsky alors expérimentant sur la pénétration du ferrocyanure de potassium dans le cerveau (1900), que l'on doit l'origine du concept de barrière hémato-encéphalique qu'il explicitera ainsi : « L'hypothèse que la paroi endothéliale bloque le transfert de certaines molécules comme le ferrocyanide de sodium, ou en d'autres mots, qu'une affinité des cellules capillaires du système nerveux central est nécessaire pour permettre le transfert de certaines molécules aux cellules nerveuses ». Il proposa donc que les cellules endothéliales capillaires possèdent des propriétés restrictives auprès de certains composés. On donne souvent à Lewandowsky l'origine du mot « barrière » selon l'expression « Bluth-Hirnschranke » mais la paternité de cette première utilisation du concept de « barrière » revient à Stern & Gautier (1918a&b) dont le nom de l'article est le suivant : « La barrière qui s'oppose au passage dans le liquide céphalo-rachidien de substances circulant dans le sang présente des différences notables suivant les espèces animales » (Stern & Gautier 1918b). Ce sont ces premières expérimentations qui ont permis de mettre à jour le concept de barrière entre le sang et le parenchyme cérébral ainsi qu'entre le sang et le liquide cérébro-spinal. De nombreuses

études sont ensuite réalisées sur le sujet, multipliant les espèces chimiques servant de colorants ou encore les espèces utilisées ainsi que de nombreux stades embryonnaires, mais peu d'avancées sont ensuite faites jusqu'en 1942. C'est alors que Friedemann montre via l'utilisation de colorants hautement lipophiles (Bleu de Trypan) injectés dans la circulation, que ces derniers sont capables de colorer le cerveau, ainsi que le Liquide Cerebro-Spinal (LCR) et ce via la micro-circulation. Broman (1941) observe et décrit alors deux barrières distinctes dans le cerveau, une première, « la Barrière Sang-Liquide Cerebro-Spinal » entre le sang et le LCR au niveau des plexus choroïdes ainsi qu'une autre, « la Barrière Hémato-Encéphalique » entre le sang et le parenchyme cérébral. Broman (1941) décrit également que la fonction de barrière serait réalisée non pas via l'astrocyte et ses pieds astrocytaires mais bien au niveau du capillaire par la cellule endothéliale. La réponse fut obtenue quelques années plus tard en 1960 par des expériences de microscopie électronique réalisées par Reese & Karnovsky (1967) puis plus tard par Brightman et al., (1970). Ces expériences mirent en évidence que le passage de soluté d'un côté vers l'autre de la barrière, et ce dans les deux sens, était conscrit par les jonctions inter-endothéliales. En effet les injections réalisées en intra-cerebral montrèrent le passage des colorants jusqu'aux pieds astrocytaires, les dépassant et étant conscrit à l'extérieur du vaisseau par les jonctions inter-endothéliales. A l'inverse, les injections réalisées en systémiques, elles, montrèrent la même conscription des colorants de l'autre côté de la cellule endothéliale, ici encore au niveau des jonctions inter-endothéliales.

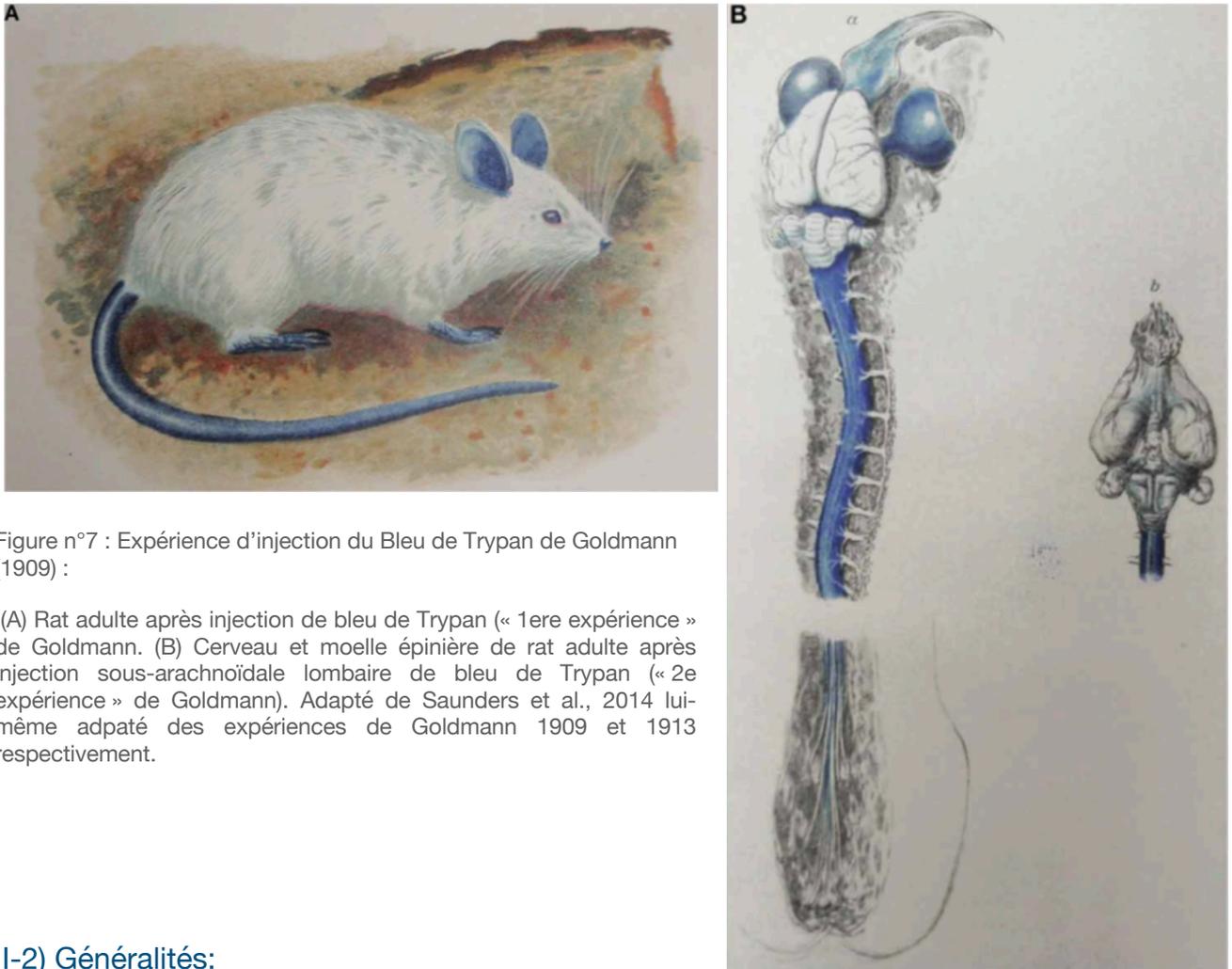


Figure n°7 : Expérience d'injection du Bleu de Trypan de Goldmann (1909) :

(A) Rat adulte après injection de bleu de Trypan (« 1ere expérience » de Goldmann). (B) Cerveau et moelle épinière de rat adulte après injection sous-arachnoïdale lombaire de bleu de Trypan (« 2e expérience » de Goldmann). Adapté de Saunders et al., 2014 lui-même adapté des expériences de Goldmann 1909 et 1913 respectivement.

II-2) Généralités:

Le cerveau est l'un des plus grands consommateurs d'O₂ et de glucose des organes du corps humain. En effet, bien qu'il ne représente que 2% du poids du corps humain, jusqu'à 20% du débit cardiaque y est dédié et acheminé au repos. La vascularisation du cerveau humain mise bout à bout représente environ 650 km de réseau (Magistretti, 2009; Sweeney et al., 2018) nécessaire pour acheminer les nutriments nécessaires au bon fonctionnement des neurones et autres cellules cérébrales (*i.e* astroglie et microglie etc...). En plus de ce territoire vasculaire conséquent, la vascularisation cérébrale présente quelques différences avec le reste de la circulation systémique. Pour permettre l'acheminement du sang jusqu'à lui, le cerveau Humain a évolué en formant l'unité neurovasculaire : une unité multi-cellulaire complexe qui va connecter le tissu sanguin au parenchyme cérébral. Composé pour la partie cérébrale stricte : des neurones excitatoires, inter-neurones inhibiteurs, astrocytes

et microglie, interagissant avec la composante vasculaire stricte représentée par les pericytes sur les capillaires et artérioles, les cellules musculaires lisses (SMC pour Smooth Muscle Cells) sur les artères de plus gros calibres et enfin les cellules endothéliales.

La cellule endothéliale joue un rôle crucial dans la barrière hémato-encéphalique. Néanmoins, la cellule endothéliale bien qu'actrice majeure de la barrière n'en est pas le seul composant mais en est la première ligne au contact direct du tissu sanguin. Elle est entourée par une lame basale composée de laminine et de collagène dans laquelle sont enchâssés les pericytes, petites cellules d'origine mésenchymateuse avec une capacité de contraction au niveau des artères de petits calibre, artérioles et capillaires. Sur les artères de plus gros calibres seront retrouvées des cellules musculaires lisse présentant une activité contractile responsable en partie de la régulation du flux sanguin dans ces territoires. Au-delà de cette lame basale se trouvent les astrocytes et notamment leurs prolongements membranaires appelés « pieds astrocytaires » dont le but est d'imperméabiliser la barrière du côté des neurones cette fois-ci. En effet, ces prolongements astrocytaires recouvrent 99% des vaisseaux dans le cerveau (Barar et al., 2016). La cellule-endothéliale, le pericyte ou la SMC, la lame basale ainsi que les astrocytes forment la barrière hémato-encéphalique, gardienne de l'homéostasie cérébrale.

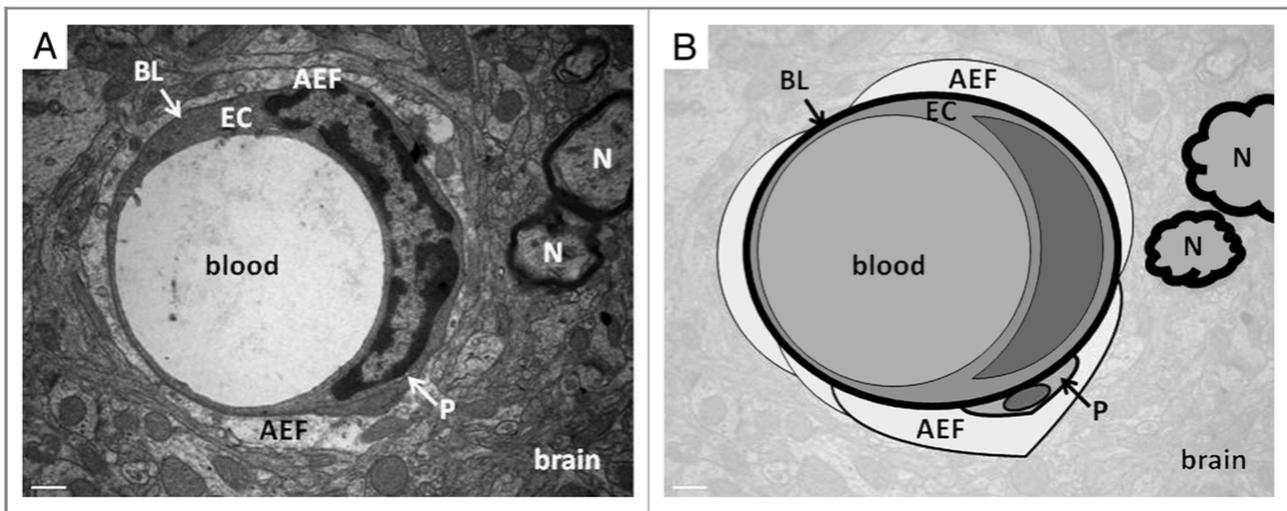


Figure n°8 : Les différents composants de l'unité neuro-vasculaire (Adapté de Miller et al., 2012):

(A) Photographie de microscopie électronique à transmission des composants de l'unité neurovasculaire. « BL » montre la lame basale, « EC » la cellule endothéliale, « AEF » les pieds astrocytaires, « N » le neurone, « P » le pericyte, « brain » le reste du parenchyme cérébral. Barre d'échelle = 0,5 μm . (B) Vue schématique de la photographie en (A).

II-3) La cellule endothéliale :

La première ligne de défense est donc composée des cellules endothéliales, petites cellules aplaties formant un tube dans lequel est conduit le sang. Ces cellules de par leur capacité à réguler la perméabilité vasculaire permettent l'oxygénation et la nutrition du tissu cérébral, tout en permettant l'export des produits de dégradation du métabolisme et autres « déchets ». Enfin elles jouent un rôle anti-thrombotique très important, notamment au niveau cérébral, car l'apparition d'AVC est catastrophique pour ce dernier et peut entraîner des conséquences très délétères pour les neurones.

L'endothélium cérébral microvasculaire (< 20 μm de diamètre) est le principal lieu d'échange entre le sang et le parenchyme cérébral, il est composé d'une fine mono-couche cellulaire, interconnectée, nécessitant un ancrage à la matrice présente autour de ces cellules et composée entre autres de laminine et de collagène. Les cellules endothéliales constituent l'interface entre le sang et la paroi vasculaire solide mais déformable.

Au niveau microscopique, les cellules endothéliales sont aplaties avec un noyau central fusiforme. Elles possèdent des corps de Weibel-Palade, de longues organelles de stockage et de sécrétion contenant nombre de facteurs comme le von Willebrand ou la P-selectine.

La mise en évidence des cellules endothéliales peut se faire de diverse manière dans le tissu cérébral et plusieurs marqueurs sont aujourd'hui admis et utilisés dans la littérature. Tout d'abord les cellules endothéliales expriment à leur surface PECAM-1 (aussi nommé CD31) (Privratsky and Newman, 2014). Elles expriment aussi la protéine Podocalyxine sur leur face luminale (Cait et al., 2019). La cellule endothéliale peut aussi être mise en évidence via le marquage des protéines de jonctions inter-endothéliales, telles que la Claudine-5 (Greene et al., 2019), les protéines de la zona occludens ZO-1 & 2 (Stamatovic et al., 2008; Tornavaca et al., 2015) ou encore par le biais de lectines reconnaissant spécifiquement les cellules endothéliales telles que la lectine de tomate *lycopersicum esculentum* (Robertson et al., 2015).

L'étude en microscopie électronique des cellules endothéliales cérébrales montre des caractéristiques différentes de ces dernières vis-à-vis des autres cellules endothéliales de l'organisme (Eliceiri et al., 2011; Stamatovic et al., 2008). Tout d'abord ces cellules endothéliales cérébrales contiennent très peu ou pas de vésicules pinocytotiques. Elles présentent aussi une concentration accrue en mitochondries (Villegas and Broadwell, 1993), véritables bio-usines cellulaires permettant la synthèse d'ATP nécessaire à la fonction des nombreux transporteurs situés de part et d'autre de la cellule endothéliale (Caja and Enríquez, 2017). De plus les cellules endothéliales cérébrales présentent une expression polarisée et spécifique de transporteurs de peptides et d'ions (Brown et al.,

2007). Ces transporteurs sont localisés à la membrane apicale sont hautement spécifiques et participent au transport de petite molécules incapables de passer par diffusion passive. À l'instar des autres cellules endothéliales capillaires de l'organisme, l'endothélium cérébral microvasculaire n'est pas fenêtré (Chow and Gu, 2015; Engelhardt and Wolburg, 2004). La cellule endothéliale cérébrale possède comme les autres cellules endothéliales un glycocalyx. Ce dernier est un canevas de glycosaminoglycanes, protéoglycanes et glycolipides hydratés, sécrétés par les cellules endothéliales. Le glycocalyx est à l'interface entre la membrane de la cellule endothéliale et le sang. Ce glycocalyx des cellules endothéliales cérébrales est décrit comme étant plus dense que celui des cellules endothéliales cardiaques ou pulmonaires (Ando et al., 2018). Les cellules endothéliales cérébrales présentent une dernière caractéristique différentes vis-à-vis des autres lits vasculaires de l'organisme au niveau de l'infiltration leucocytaire. En effet les cellules leucocytaires sont normalement capables de passer la barrière vasculaire via le phénomène de diapédèse ou migration leucocytaire transendothéliale. Au niveau de la BHE, ce mécanisme ne leur permet pas de passer de manière facilitée dans le parenchyme cérébral du fait d'une double barrière : la barrière endothéliale caractérisée par la présence de jonctions inter-endothéliales serrées non perméables, et la barrière astrocytaire (Glia Limitans astrocytaire)(Horng et al., 2017). La barrière astrocytaire empêcherait le passage des leucocytes grâce à un changement de composition en laminine ; les leucocytes ne peuvent la franchir sans digestion de cette matrice par les métalloprotéases matricielles, notamment MMP9 (Engelhardt and Ransohoff, 2012; Takeshita and Ransohoff, 2012). Des données récentes suggèrent que migration transendothéliale des leucocytes au niveau de la barrière hémato-encéphalique se ferait principalement de manière paracellulaire (Winger et al., 2014). Le tissu Plasminogen activator (tPa) permettrait via un effet sur les cellules endothéliales et les astrocytes de la BHE, la production de ces métalloprotéases,

augmentant alors la perméabilité de la barrière et *in fine* la diapedèse des leucocytes au travers de cette dernière (Mehra et al., 2016).

La distance séparant les membranes de deux cellules endothéliales cérébrales est appelée « fente endothéliale » et mesure environ 10 à 20 nm (Clough & Michel, 1988). Les cellules endothéliales sont connectées entres-elles par des complexes jonctionnels comprenant des jonctions GAP, des jonctions adhérentes ainsi que des jonctions serrées. Ces jonctions permettent de réguler principalement la perméabilité endothéliale, le transfert d'informations entre les cellules endothéliales ainsi que la régulation du passage des solutés par les voies transcellulaire et paracellulaire (Dejana et al., 2008).

II-3-1) Les jonctions inter-endothéliales :

II-3-1a) La jonction serrée :

La jonction serrée ou « Tight Junctions » (TJ), est une structure complexe de filaments protéiques intra-membranaires, parallèles, anastomosés, hautement élaborées, arrangées comme une série de barrières multiples. Ces jonctions sont localisées le long de la membrane plasmique latérale et servent à « imperméabiliser » la fente endothéliale. Structurellement ce complexe est composé de protéines d'adhésion transmembranaires interagissant physiquement avec leurs homologues localisés à la membrane plasmique des cellules adjacentes. Ce complexe est ancré dans la membrane plasmique par les « plaques protéiques cytoplasmiques » qui permettent d'établir le lien d'ancrage entre le complexe jonctionnel et le cytosquelette d'actine jouant un rôle de support physique pour ce dernier.

Les protéines formant les jonctions serrées incluent les claudines, les occludines , les molécules d'adhésion jonctionnelles ou JAM (Jonctionnal Adhesion Molecule) de type A, B et C (Martin-Padura et al., 1998), ainsi que les molécules d'adhésion cellules-sélectives endothéliales ou ESAM (pour Endothelial cell-Selective Adhesion Molecule) (Nasdala et al., 2002).

Les claudines, formant le premier niveau d'adhésion des jonctions serrées, sont une famille de protéines transmembranaires de 20 à 24 kDa avec plus de 24 isoformes identifiées (Krause et al., 2008; Wolburg & Lippoldt, 2002). La plupart des claudines montrent une expression de type tissu-spécifique et leur présence dans la cellule est caractérisée comme étant soit constitutive soit inductible en fonctions des différentes isoformes. La claudine principalement rencontrée le long de la barrière hémato-encéphalique est la claudine-5 (Greene et al., 2019). Par exemple, dans les micro-vaisseaux cérébraux, la concentration

en claudine-5 est décrite comme étant 1 000 fois supérieure à celle des autres claudines présentes à la barrière hémato-encéphalique comme la claudine-12. Il est à noter que les souris déficientes pour le gène de la claudine-5 montrent une hyperperméabilité de la barrière hémato-encéphalique et meurent dans les 10 heures post-partum de la suite d'œdèmes cérébraux, la suppression de la claudine-5 chez la souris adulte entraîne des crises épileptiques et la mort (Daneman et al., 2010; Greene et al., 2018; Nitta et al., 2003).

Les protéines suivantes composant les jonctions serrées sont les occludines, elles sont les premières protéines transmembranaires de ce complexe à avoir été décrites. Ces protéines sont responsables de l'interaction entre les protéines d'échafaudage (scaffold protein) et le cytosquelette d'actine (Li et al., 2005; Nusrat et al., 2005). Les occludines permettent aussi de réguler les propriétés d'adhésion entre les cellules. Il est à noter que les souris déficientes en occludines montrent des jonctions serrées normalement développées sans signes d'hyper-perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Saitou et al., 2000). Enfin les occludines ne sont pas capables de former des fibres protéiques d'elles-mêmes, elles sont principalement associées avec des fibres formées de claudines. De fait, le rôle des occludines dans les cellules endothéliales cérébrales serait plus un rôle de régulation que d'adhésion *per se*. Les occludines ont la capacité d'interagir avec la claudine-5, cruciale pour l'organisation des fibres de claudines. L'interaction avec les protéines de la zona occludens (ZO-1 et ZO-2) ainsi que l'actine fibrillaire (F-actine) est très important pour leur incorporation dans le complexe protéique que forme la jonction serrée (Buschmann et al., 2013).

Un autre groupe de protéines composant les jonctions serrées sont les JAMs et les ESAMs (Stamatovic et al., 2016). Ces protéines sont des membres de la superfamille des

immunoglobulines. Les interactions des JAMs sont décrites comme étant homophiliques, formant des dimères permettant l'ancrage de deux cellules adjacentes entre différents membres de la famille des JAMs, ainsi qu'avec d'autres molécules d'adhésions comme les intégrines. Les JAMs, A, B et C sont des protéines clefs pour la formation de tubule ainsi que pour la mise en place du complexe de jonction serrées via l'interaction avec Par3, partie intégrante du complexe de polarité Par3/Par6/aPKC (Ebnet, 2003). De plus les JAMs jouent aussi un rôle régulateur dans l'adhésion et le passage des leukocytes à travers la barrière hémato-encéphalique. En effet le blocage de JAM-1 via l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques entraîne une réduction de l'infiltration des leucocytes *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de méningite (Del Maschio et al., 1999).

Les ESAM sont des protéines jonctionnelles transmembranaires, ce sont des molécules d'adhésions possédant une structure similaire à celle des JAMs, et joueraient un rôle crucial dans l'interaction entre les cellules endothéliales pour le développement vasculaire ainsi que l'extravasation des neutrophiles durant la phase précoce de l'inflammation (Nasdala et al., 2002).

Les protéines d'échaffaudage représentent le coeur du large réseau protéique que forme la jonction serrée, ce qui implique la connexion structurelle aux protéines transmembranaires, d'une part, et le cytosquelette d'actine, d'autre part. Les protéines d'échaffaudage sont par définition divisées en deux groupes celles possédant un domaine PDZ (PDZ pour Post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, Zona occludens-1 protein : PDZ est un initialisme des 3 premières protéines découvertes possédant ce domaine) et celles pour lesquelles ce n'est pas le cas. Les protéines possédant au moins un motif PDZ (comprenant 90 à 100 acides aminés) dans leur séquence sont impliquées dans les interactions avec les parties C-terminales des protéines

transmembranaires leur permettant de les rapprocher et de les ancrer dans la membrane plasmique. Les protéines possédant un domaine PDZ peuvent également interagir avec d'autres protéines des jonctions serrées au pôle cytoplasmique ainsi qu'avec les filaments d'actines. Cette propriété permet de rapprocher et de maintenir ensemble le cytosquelette, les protéines de signal ainsi que les protéines intégratives dans certaines régions de la membrane plasmique (González-Mariscal et al., 2000; Van Itallie et al., 2015).

Les protéines d'échaffaudage avec domaine PDZ des jonctions serrées incluent les membres de la famille des guanylates kinases associées à la membrane (MAGUK, pour Membrane Associated GUanylate Kinases), et ZO-1, -2 et -3. Les protéines ZO ont pour rôle de se lier aux protéines de signalisation ainsi qu'aux éléments du cytosquelette et possèdent une activité guanylate cyclase permettant la transformation ATP-dépendante du GMP en GDP. Enfin, leur domaine PDZ leur permet de se lier avec les extrémités intracytoplasmiques des protéines transmembranaires. Le rôle des protéines ZO ainsi que leur localisation est considérée comme étant crucial pour la formation des fibres de claudines, l'assemblage des occludines et des JAM-A dans les jonctions serrées, ainsi que pour l'ancrage de ce complexe multi-moléculaire au cytosquelette d'actine.

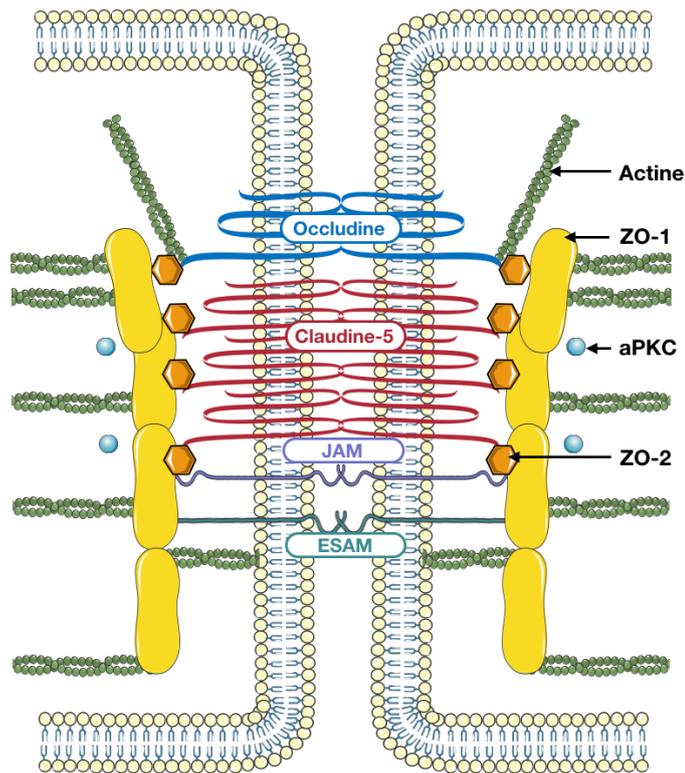


Figure n°9 : Schéma d'une jonction serrée :

Les occludines, les claudines notamment la claudine 5 les JAMs et les ESAMs servent à l'adhésion entre-elles des cellules endothéliales et empêchent la diffusion passive de la plupart des composés du sang. Les protéines ZO servent d'ancrages aux protéines impliquées dans la jonction et permettent de lier ces dernières au cytosquelette d'actine. La protéine PKC permet de réguler la mise en place et le maintien de ces jonctions.

La jonction serrée est un complexe multi-protéique permettant l'ancrage de deux cellules endothéliales adjacentes entres-elles et permettant la fermeture de la « fente endothéliale ». Les protéines la composant ont soit un rôle de « lien intercellulaire » comme les occludine, les claudine, les JAM et les ESAM, soit un rôle d'échaffaudage permettant l'ancrage des protéines transmembranraires au cytosquelette d'actine comme les protéines ZO. Enfin d'autres protéines comme la PKC jouent un rôle dans la régulation et la mise en place des jonctions.

II-3-1b) Les Jonctions Adhérentes:

Les jonctions adhérentes ont une organisation assez similaire à celle des jonctions serrées. Elles contiennent des protéines transmembranaire, les cadhérines, principalement responsables des adhésions entre les cellules et les protéines d'échaffaudage cytoplasmique : les caténines. Ces dernières sont impliquées dans le support et la régulation de l'association des cadhérines ainsi que dans la régulation des processus de signalisations allant de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule.

Les cadhérines sont des protéines transmembranaire dépendantes du Ca^{2+} , dont le rôle principal est l'adhésion cellule/cellule via des interactions homotypiques. Dans les cellules endothéliales cérébrales, la principale protéine des jonctions adhérentes est la VE-cadhérine (pour Vascular Endothelial Cadherin), bien que la N-cadhérine (pour Neural Cadherin) soit elle aussi présente dans l'endothélium en quantité plus faible, bien que cette dernière n'y est pas exclusive, en effet elle est aussi rencontrée dans le tissu neuronal (Dejana, 2010).

La partie cytoplasmique des jonctions adhérentes est formé d'un complexe multi-protéique composé des cadhérines, de la protéine p120, de la β -caténine ainsi que la γ -caténine (aussi nommée plakoglobine) qui se lie elle-même à l' α -caténine ainsi que les protéines pontantes (bridging proteins) permettant le lien entre les protéines des jonctions adhérentes et ZO-1 liant les filaments d'actines. La β -caténine permet ici la stabilisation des jonctions en stabilisant les caténines aux protéines pontantes et donc au cytosquelette d'actine. Néanmoins, une controverse a toujours lieu dans la littérature quant au rôle ambivalent de la β -caténine en tant que facteur de transcription dans la voie de signalisation Wnt dite canonique et dans la stabilisation des jonctions inter-endothéliales.

En effet la littérature n'est pas en accord sur le fait que la β -caténine présente à l'interface jonctionnel soit la même que celle ayant le rôle de facteur de transcription après translocation dans le noyau. Il serait possible que la β -caténine soit présente sous la forme de deux pools ayant des rôles différents à jouer (Dejana, 2010). Néanmoins la β -caténine demeure cruciale pour les propriétés adhésives de la VE-cadhérine ainsi que le regroupement de l'actine, contrôlant la perméabilité de la barrière endothéliale. (Dejana, 2010; Liebner et al., 2008a).

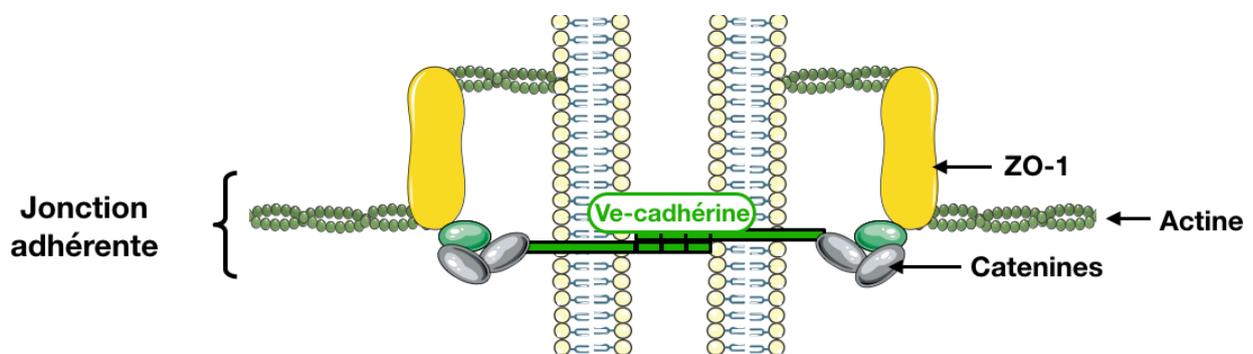


Figure n°10 : Schéma d'une jonction adhérente :

La VE-cadhérine transmembranaire permet l'ancrage homotypique cellule à cellule et est ancrée dans le cytoplasme grâce au complexe formé par la protéine p120 ainsi que l' α , β et γ -caténine, elles-mêmes liées à ZO-1 permettant la liaison à l'actine.

II-3-1c) Les Jonctions Gaps:

Les jonctions communicantes ou « GAP » sont des jonctions en forme de pores composés d'une famille de protéines appelées connexines (Cx). Cette famille est composée de plusieurs isomères transmembranraires sous contrôle d'une expression tissu-spécifique. Les cellules endothéliales cérébrales sont dotées des connexines Cx37, Cx40 et Cx43. Plusieurs connexines vont s'associer ensemble sous forme d'homo ou d'hétéro-hexamère dans le Reticulum Endoplasmique ainsi que dans l'appareil de Golgi pour ensuite être transportées à la membrane plasmique des cellules endothéliales afin de former un tube permettant un passage direct de composés d'une cellule endothéliale

jusqu'à une autre cellule endothéliale voisine. Il est à noter qu'à la membrane plasmique, les jonctions GAP peuvent exister sous forme d'hémi-canal ou connexon, cet état de fait nécessite l'alignement de deux connexons à la membrane de cellules voisines pour pouvoir fonctionner (Hirst-Jensen et al., 2007). Une jonction GAP fonctionnelle est donc un dimère de connexons, eux-mêmes, composés d'un hexamère de connexines. Les jonctions GAP sont essentielles voire cruciales pour l'inter-communication des cellules endothéliales car les ions et les petites molécules peuvent diffuser librement, sans consommation d'énergie, au travers de ces canaux pour ensuite transduire des signaux entre deux cellules adjacentes (Hirst-Jensen et al., 2007).

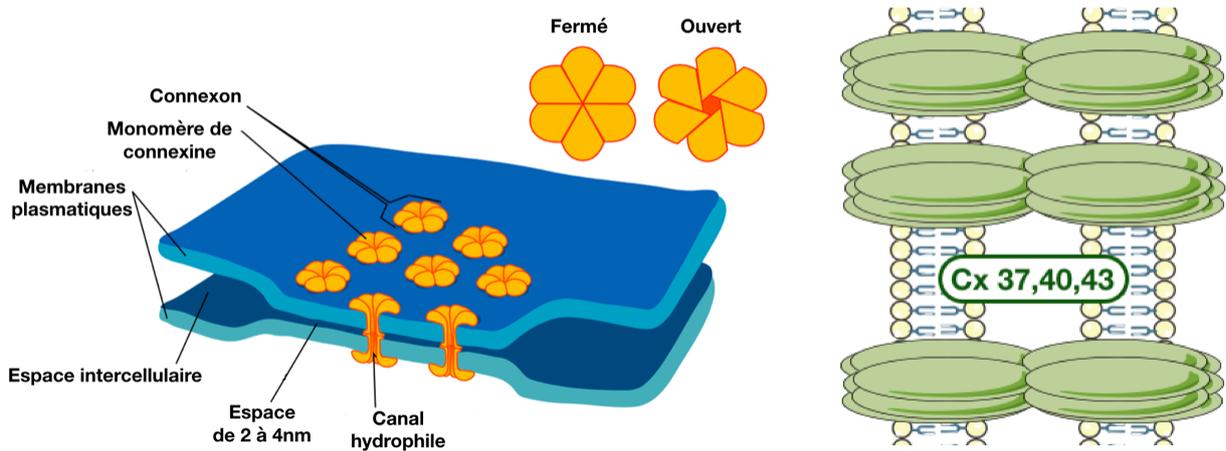


Figure n°11 : Schéma d'une jonction GAP vue depuis l'intérieur de la cellule et depuis l'intérieur de la fente endothéliale.

Une GAP jonction est formée de deux connexons transmembranaires eux-mêmes formés de 6 connexines s'arrangeant en homo ou hétéro-hexamères composés de Cx37, 40 ou 43 permettant la réduction de la fente endothéliale de 10-20 nm jusque 2 à 4 nm.

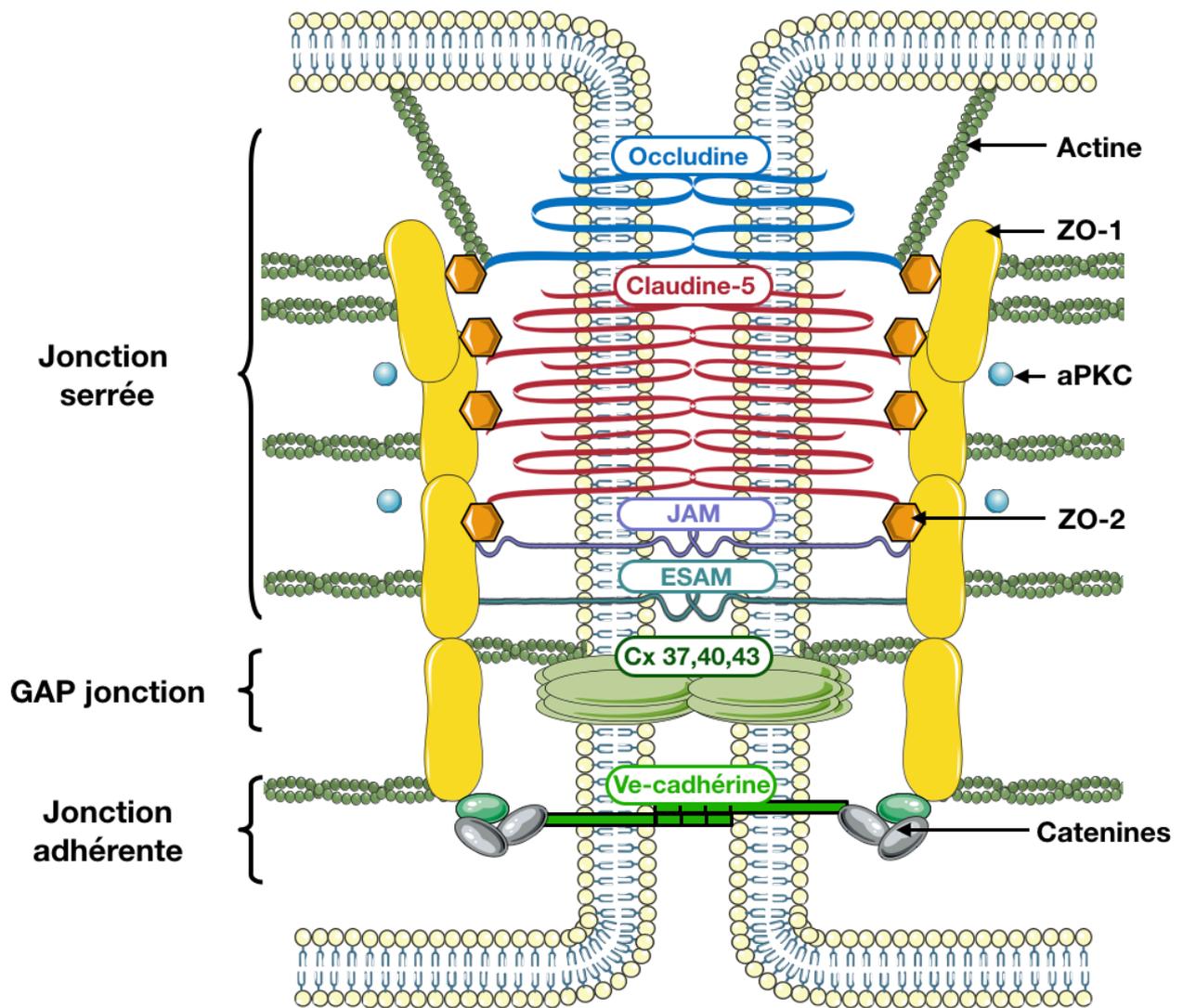


Figure n°12 : Schéma d'une jonction inter-endothéliale cérébrale complète :

Le complexe jonctionnel inter-endothélial est formé des jonctions serrées, les jonctions GAP, ainsi que les jonctions adhérentes et permettent de concert la fermeture de la fente endothéliale. Permettant une réduction du passage paracellulaire, tout en permettant le passage de molécules de signaux entre les cellules endothéliales.

Il est évident que ces différents types de jonctions exercent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité du vaisseau sanguin cérébral et à plus haute échelle au maintien de la barrière hémato-encéphalique dans des conditions physiologiques permettant un fonctionnement optimal de l'activité neuronale. Néanmoins, ces jonctions peuvent devenir et/ou être dysfonctionnelles, à la fois à l'origine ou résultantes de pathologies souvent graves.

Les protéines composant ces jonctions peuvent être dysfonctionnelles que ce soit par le biais de mutations génétiques, d'altérations post-transcriptionnelles, de dégradation

excessive ou encore d'un mauvais signal d'adressage redistribuant alors ectopiquement ces protéines. Ces différentes atteintes des protéines jonctionnelles peuvent contribuer de manières différentes à la dysfonction de la barrière hémato-encéphalique. Ces protéines peuvent directement réguler la perméabilité de la barrière (particulièrement la voie paracellulaire), elles peuvent aussi être responsable d'une altération des échanges transcellulaires, affecter l'expression ou la localisation de certains interactants ou transporteurs, ou encore modifier certains processus métaboliques endothéliaux.

De par sa nature propre de barrière, ainsi que de la neurotoxicité de la plupart des composés figurés du sang, la barrière hémato-encéphalique s'est donc rendue imperméable à la quasi-totalité des espèces moléculaires. Néanmoins, une nutrition du parenchyme cérébral, notamment en glucose et lactate ainsi que d'une oxygénation sans faille est nécessaire au bon fonctionnement de l'encéphale. En effet, les neurones (notamment hippocampaux) sont les cellules les plus fragiles du corps humain vis-à-vis de l'hypoxie (Bartsch et al., 2010). La nécessité de transporteurs spécialisés le long de la barrière est donc extrême pour permettre aux neurones d'accéder aux substrats qui leur sont nécessaires. Les cellules endothéliales cérébrales se sont donc spécialisées tout au long de l'évolution, elles ont acquis toute une gamme de transporteurs plus ou moins spécifiques d'une large gamme d'espèces chimiques et protéiques.

II-3-2) Les différentes voies de passage des solutés au travers de la BHE :

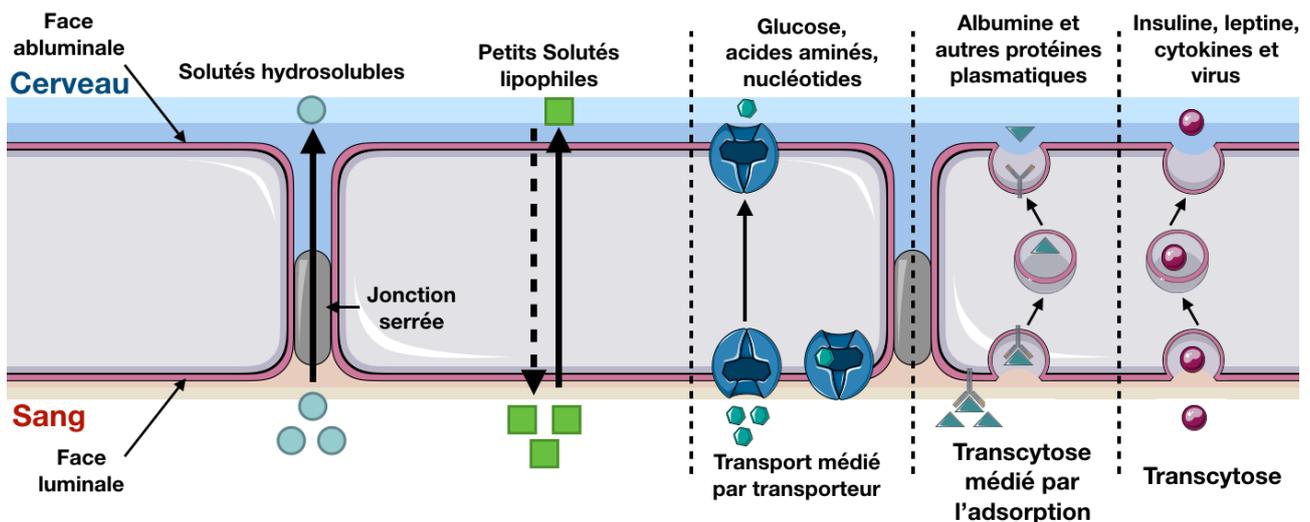


Figure n°13 : Le passage des solutés au travers de la BHE peut se faire via différents mécanismes :

Le passage de solutés au travers de la BHE peut se faire par passage paracellulaire, au niveau des jonctions interendothéliales, ce mécanisme est réduit au niveau de la circulation cérébrale. La voie transcellulaire elle permet le passage des espèces lipophile de petites tailles par diffusion passive, les espèces comme le glucose, les acides aminés et les nucléosides sont eux transportés à travers la BHE par diffusion facilitée grâce à des transporteurs spécialisés. Enfin les lipides de haut poids moléculaires ainsi que les espèces chimiques restantes sont transportés via des vésicules permettant la transcytose, qu'elle soit médiée par l'adsorption sur une récepteurs spécifiques ou non via les vésicules à clathrines, le système cavéoline ou les vésicules macropinocytotiques.

La deuxième fonction principale de la cellule endothéliale après la mise en place et la régulation de la perméabilité vasculaire cérébrale *via* ses jonctions, est donc le transport de composés de part et d'autre de la BHE. Dans les conditions physiologiques standards la cellule endothéliale permet l'influx de nutriments et de molécules régulatrices dans le cerveau *via* des mécanismes de transports actifs et passifs principalement paracellulaires et transcellulaires.

La voie paracellulaire est principalement régulée par les jonctions serrées inter-endothéliales, et notamment des claudines qui composent ces jonctions (Liebner et al., 2018). Ces jonctions serrées permettraient le passage passif de molécules hydrosolubles par le biais de petits pores intercellulaire. Les espèces moléculaire impliquées dans ce transport ne sont pas encore complètement connues, néanmoins des données récentes

obtenues grâce à des simulations suggèrent que les claudines seraient capable de « s'auto-assembler » pour créer de tels pores (Irudayanathan et al., 2017).

La voie transcellulaire elle, est divisée en 3 catégories. La première catégorie concerne la diffusion passive. En effet les molécules lipophiles d'un poids moléculaire inférieur à 400 Da et capable de moins de 8 liaisons hydrogènes sont capable de diffuser librement à travers la cellule endothéliale, ainsi que l'O₂ et le CO₂. Dans un deuxième temps intervient la diffusion facilitée du glucose, des acides aminés, ainsi que des nucléosides via l'intervention de transporteurs spécialisés. Enfin la 3^e catégorie correspond à la transcytose (passage à travers la cellule endothéliale) vésiculaire de macro-molécules par adsorption sur un récepteur spécifique (Pardridge, 2005; Sweeney et al., 2018; Wang et al., 2018a).

Certaines protéines agissent comme des cargo/transporteurs et permettent le transport de nutriments ou molécules essentiels dans le cerveau. La superfamille des transporteurs de solutés (SoLute Carrier superfamily ou SLC) est un des types de transporteurs qui sont abondamment exprimés dans la cellule endothéliale et permettent le transport de petites molécules comme le glucose, acides aminés, nucléotides, et peptides de part et d'autres de la barrière hémato-encéphalique (Barar et al., 2016). Dans cette super-famille, un des transporteurs les plus cruciaux est le transporteur de glucose GLUT-1, ce dernier permet de maintenir une fonction cérébrale physiologique. En effet, bien que le cerveau soit un organe avec très peu de réserves en glucose, ce dernier est nécessaire aux neurones pour pouvoir fonctionner de manière optimale (Winkler et al., 2015). Une étude montre d'ailleurs que la réduction du transporteur GLUT-1 dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer entraîne une dégénérescence, une ouverture de barrière ainsi qu'une subséquente

exacerbation de la maladie d'Alzheimer (Winkler et al., 2015). Démontrant le rôle crucial que jouent les transporteurs spécialisés de l'endothélium.

Les acides aminés nécessaires à la synthèse de neurotransmetteurs ainsi que des protéines sont eux aussi critiques pour le métabolisme des neurones. Le passage de ces molécules au travers de la barrière hémato-encéphalique est aussi lié au bon fonctionnement de transporteurs spécialisés endothéliaux. Par exemple, l'acide aminé glutamate est un neurotransmetteur excitatoire, et la concentration extracellulaire de ce dernier peut être maintenue basse grâce au fonctionnement des transporteurs d'acides aminés excitatoires EAATs (Excitatory Amino Acids Transporters) qui sont exprimés du côté abluminal de la cellule endothéliale, empêchant alors les neurones d'être hyper-stimulés. Des altérations de ces voies de transport de molécules ont été décrites comme pouvant entraîner une déficience cognitive (Zhang et al., 2013).

Les petits lipides sont capables de diffuser librement au travers de la barrière hémato-encéphalique, néanmoins les lipides de haut poids moléculaire comme le cholestérol, ou les acides gras à longues chaînes en sont incapables alors qu'ils sont nécessaires au bon fonctionnement cérébral, ne serait-ce que pour la synthèse de myéline des axones neuronaux. L'entrée de ces derniers dans le parenchyme cérébral est facilitée par la famille des transporteurs à cassette liant l'ATP (ATP Binding-Cassette ABC transporter family). Cette famille de protéines est principalement retrouvée à la surface luminale de la cellule endothéliale (Theodoulou and Kerr, 2015). Dans cette famille, la glycoprotéine ABCB1 (P-gp), protéine la plus étudiée dans la littérature, est essentielle pour l'export de déchets métaboliques, de toxines, de substances étrangères ou encore de drogues hors du parenchyme cérébral (De Lange et al., 2018). Une mauvaise, ou une non-

fonction de ces récepteurs entraîne une accumulation de ces composés toxiques, catastrophique pour le parenchyme cérébral.

Le transport via vésicules transcytotiques joue aussi un rôle critique pour le maintien de l'homéostasie cérébrale, bien que les cellules endothéliales cérébrales présentent moins de vésicules que les cellules endothéliales du reste de l'organisme. La transcytose est la voie privilégiée pour le passage de macromolécules, dans le cerveau (Parkar et al., 2009). La transcytose est bi-directionnelle, même si la transcytose du pôle luminal vers le pôle abluminal de la cellule endothéliale semble être le sens de trafic principal au niveau de la BHE. Il existe 3 types de vésicules à la surface des cellules endothéliales cérébrales. Tout d'abord les vésicules couvertes de clathrines qui jouent la plus grande part du transport transcytotique dans les cellules endothéliales cérébrales (Villaseñor et al., 2019). Viennent ensuite les cavéoles, qui participent elles-aussi à la transcytose médiée par l'adsorption sur un récepteur spécifique. Enfin viennent les vésicules macropinocytotiques, larges vésicules de forme tubulaire de 0,2 à 5 μm permettant l'emmagasinement des fluides extracellulaires (Mayor & Pagano, 2007).

Le système clathrine :

Les vésicules à clathrines, sont les vésicules les plus étudiées notamment au niveau des cellules endothéliales cérébrales. Ces vésicules sont formées par des invaginations de la membrane entourées de clathrines, elles ont une taille de 60 à 200 nm de forme sphérique. La clathrine est une protéine formée d'une chaîne lourde d'environ 190 kDa et d'une chaîne légère d'environ 25 kDa, 3 chaînes lourdes et 3 chaînes légères vont s'assembler ensemble sous la forme d'une triskèle, en s'assemblant en treillis les triskèles permettent de couvrir les vésicules en suivant une forme de polyèdre (Fotin et al., 2004).

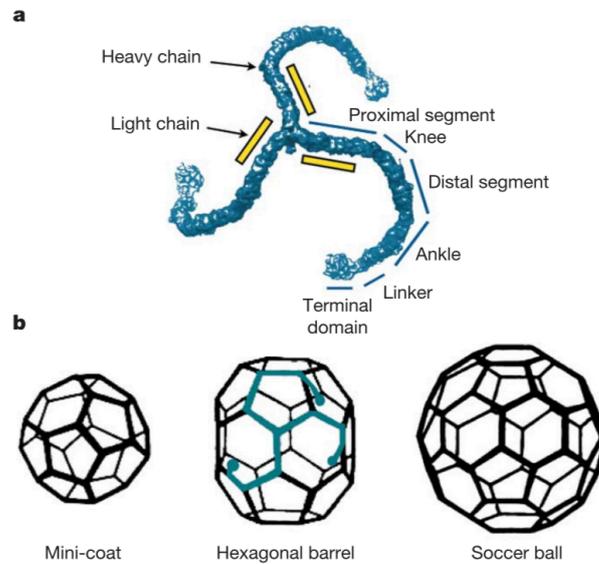


Figure n°14 : La triskèle de clathrine et la forme de plusieurs treillis de clathrine simple (Adapté de Fotin et al., 2004):

(a) Représentation 3D de la conformation d'un squelette de clathrine. Les noms des différents segments des chaînes lourdes sont visibles sur la figure et les positions des chaînes légères sont schématisées par les boîtes jaunes. (b) Trois structures formées *in vitro* par l'assemblage des triskèles de clathrines. Représentation schématique d'une triskèle visible en bleu insérée dans le tonneau hexagonal.

Les vésicules à clathrines recrutent des récepteurs, aujourd'hui environ une vingtaine de ces récepteurs sont connus et comprennent une vaste gamme de récepteurs de la membrane plasmique tels que le récepteur au LDL (pour Low Density Lipoprotéine) pour le transport du cholestérol ou encore de l'apolipoprotéine E impliqué dans la maladie d'Alzheimer, le récepteur LRP1 (pour Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1) notamment impliqué dans la clairance de la protéine β -amyloïde, le récepteur à la transferrine ou encore à l'insuline (Preston et al., 2014). Ces récepteurs se situent à l'intérieur de l'invagination de la membrane au pôle luminal et c'est là que viendront s'adsorber spécifiquement les ligands. Ces derniers se retrouvent alors piégés dans la vésicule qui, après plusieurs étapes hautement régulées, se ferme. Une fois la vésicule à clathrines fermée, elle perd alors ses clathrines. La vésicule « nue » peut alors fusionner avec un endosome. Après cela le ou les récepteurs sont internalisés et les ligands sont alors transportés à l'autre pôle de la cellule endothéliale, où la vésicule fusionnera avec la

membrane plasmique pour relarguer son contenu au pôle abluminal de la cellule endothéliale (Hervé et al., 2008; Pulgar, 2019).

Le système cavéoline :

Control

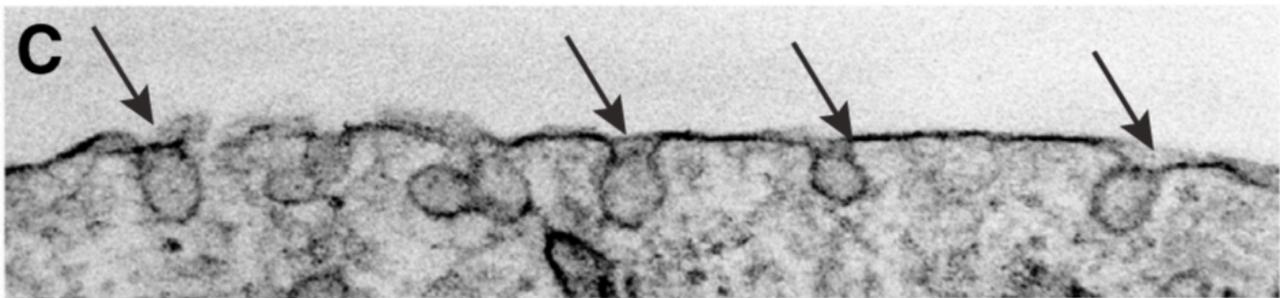


Figure n°15 : Photographie de Microscopie électronique montrant des cavéolines (Adapté de Andreone et al., 2017):

La photographie a été obtenue sur une cellule de la lignée bEnd3, lignée cellulaire endothéliale cérébrale murine, les flèches noires pointent les cavéolines petites structures sphériques de 50 à 100 nm

Les cavéolines sont des structures spécialisées « en citernes » d'une taille variant de 50 à 100 nm créées à partir d'invagination de la membrane et qui peuvent occuper jusqu'à 50% de cette dernière au pôle luminal de la cellule endothéliale (Gratton et al., 2004). Les protéines marqueurs de ces vésicules sont les cavéolines 1 à 3 (CAV-1, -2 et -3), qui sont abondamment exprimées dans les cellules endothéliales cérébrales et jouent un rôle dans la transduction de signaux, le transport vésiculaire ainsi que la perméabilité de la barrière.

Tout d'abord, les cavéoles sont impliquées dans le transport transmembranaire de nombreuses macromolécules, comme l'albumine ou les lipoprotéines. De plus, les cavéolines ont une grande quantité de micro-domaines leur permettant de lier quantité de molécules de signaux comme les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) comme l'acétylcholine, la bradykinine, ou encore l'endothéline. Les cavéolines peuvent aussi se lier aux canaux à ions (Ca^{2+} ATPase), aux récepteurs de facteurs de croissance dérivés des

plaquettes (Platelet-Derived Growth Factor Receptor PDGFR) ainsi qu'aux récepteurs de facteurs de croissance transformants (Transforming Growth Factor TGF- β) impliqués dans la transduction de signaux. De plus, la protéine CAV-1 est capable de fixer l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) pour la garder dans sa conformation non-activée. Quand cette dernière est alors nécessaire, l'eNOS peut alors se dissocier de CAV-1 et aller promouvoir la production d'oxyde nitrique (NO) et ainsi entraîner la relaxation des vaisseaux (Gratton et al., 2000). Les cavéoles peuvent aussi réguler la perméabilité de la barrière en affectant le transport transcellulaire endothélial. En effet, en conditions ischémiques les cavéoles sont capables d'augmenter fortement la perméabilité de la barrière (Chen et al., 2016; Nahirney et al., 2016). En concordance avec les données de la littérature, il a été récemment démontré que l'ablation d'une protéine inhibant la formation de cavéolines, le Facilitateur majeur de la superfamille à domaine 2a (Mfsd2a pour Facilitator Superfamily Domain containing 2a) entraîne une hyperperméabilité de la barrière à des traceurs de haut poids moléculaires. Ces observations démontrent le rôle crucial de cet acteur Mfsd2a dans la régulation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique via la régulation des cavéolines (Andreone et al., 2017). Enfin une étude récente sur le modèle de dysfonction des jonctions serrées *in vitro* induite par la protéine Tat du virus de l'immunodéficience humaine (HIV pour Human Immunodeficiency Virus) décrit une réduction de la quantité des protéines dont le rôle est l'export de la protéine β -amyloïde. Cette réduction est liée à la régulation négative des occludines et du récepteur LRP-1 qui peut être sauvé par la réduction de l'expression de Cav-1 médiée par shRNA. Ces expériences démontrent un rôle *a minima* régulateur des cavéolines dans la clairance de la protéine β -amyloïde (Zou et al., 2019).

La cellule endothéliale permet également le maintien de l'homéostasie vasculaire et joue un rôle prépondérant dans la vasoconstriction ou vasodilatation du vaisseau sanguin. De plus, elle est capable de sécréter des facteurs anticoagulants permettant d'éviter la formation de caillots sanguins cérébraux pouvant amener à des évènements hautement délétères tels que les AVC.

II-3-3) Cellules endothéliales et thrombose :

Rôle anti-thrombotiques des cellules endothéliales :

Les cellules endothéliales sont les premières cellules au contact direct du sang et ces dernières possèdent des rôles anti-thrombotiques à jouer lors de la « cascade de la coagulation ». En effet les cellules endothéliales peuvent lier l'antithrombine III permettant l'inhibition du IIa et du X. De plus, elles expriment la thrombomoduline (sauf dans le cerveau) et peuvent activer la protéine C. Les cellules endothéliales expriment aussi le récepteur endothélial à la protéine C (EPCR pour Endothelial Protein C Receptor) qui permet la liaison de la protéine C dont le rôle est l'inactivation du Va et du VIIIa. Les cellules endothéliales sont aussi capables de relâcher l'inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI pour Tissue Factor Pathway Inhibitor) inhibant le complexe FT-VIIa et Xa. Elles jouent aussi un rôle dans le contrôle de l'adhésion des plaquettes et leur activation ainsi que dans la fibrinolyse car elles synthétisent et relâchent l'activateur tissulaire du plasminogène (t-Pa pour Tissue Plasminogen Activator) permettant la lyse du plasminogène en plasmine permettant entre autres la lyse des caillots dans l'encéphale (van Hinsbergh, 2012).

La littérature actuelle montre que l'accumulation du fibrinogène, produit final de la cascade de coagulation, dans le parenchyme cérébral est d'une part nocif pour les neurones et d'autre part un potentiel marqueur du déficit cognitif d'origine vasculaire (Merlini et al., 2019; Wallin et al., 2017a). De façon concordante la quantité de facteur VII a été retrouvée augmentée chez les patients atteints de déficit cognitif d'origine vasculaire, et la quantité en antithrombine à elle été retrouvée réduite dans les mêmes conditions (Vischer, 2006; Wallin et al., 2017b). Démontrant ici encore un rôle majeur de la cellule endothéliale dans la mise en place de la démence.

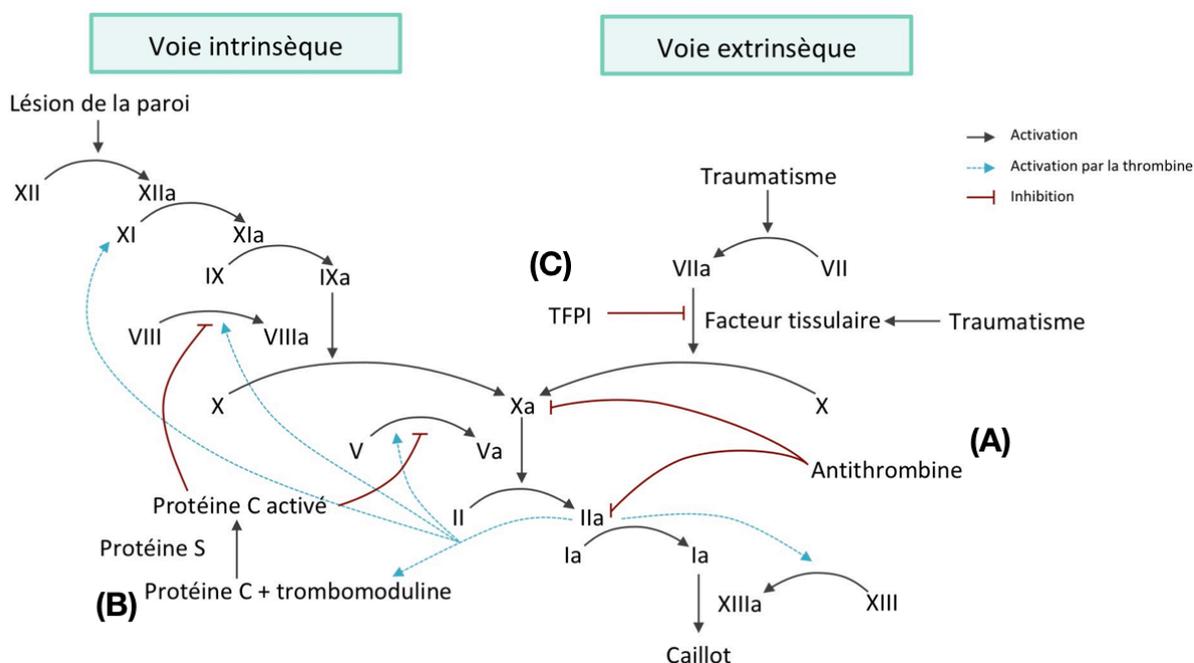


Figure n°16 : Effets anti-thrombotiques des cellules endothéliales dans la cascade de la coagulation :

Les cellules endothéliales ont un effet sur la thrombose en (A) en effet elles lient l'antithrombine inhibant l'activation du facteur X ainsi que du facteur IIa. (B) La thrombomoduline exprimée par les cellules endothéliales (sauf dans le cerveau) leur permet avec leurs EPCR de fixer la protéine C et d'empêcher l'activation du facteur VIII et du facteur V. (C) Enfin les cellules endothéliales peuvent relâcher le TFPI pour inhiber l'activation du facteur X médiée par le facteur VIIa.

Les cellules endothéliales cérébrales sont donc des cellules hautement spécialisées, agencées et jointives grâce à une forte concentration en jonctions inter-cellulaires leur garantissant une étanchéité quasi-parfaite vis-à-vis des composés du sang. Cette étanchéité à la plupart des composés entraîne la présence d'une myriade de transporteurs

et autres mécanismes permettant le passage des composés nutritifs nécessaires aux neurones dans le parenchyme cérébral. Enfin les cellules endothéliales de par leurs rôles anti-thrombotiques participent au maintien d'une perfusion physiologique du tissu neural, en empêchant la formation ou en lysant les caillots potentiellement responsables d'AVC ou d'évènement ischémiques. La cellule endothéliale est donc un membre majeur à part entière de l'unité neurovasculaire.

II-4) Le pericyte:

Les pericytes ont été mis en évidence pour la première fois en 1871 par Eberth puis découverts en 1873 par Rouget, ils ont alors été définis comme des cellules contractiles isolées en forme de « bosse » à la surface extérieure des capillaires, le long de ces derniers ainsi qu'à leurs embranchements. Peu d'attention leur est alors donné jusqu'à ce qu'en 1923 Zimmermann les nomme « cellules de Rouget » et propose alors le nom de « Pericyte » reflétant mieux leur localisation et morphologie. Il engloba dans sa définition de pericyte différents sous-types présents le long de l'arbre vasculaire de la façon suivante : les pericytes sont enchâssés dans la membrane basale des cellules endothéliales, ils possèdent des prolongements membranaires cerclant les capillaires, avec des prolongements plus circonférentiels à proximité des artérioles et une morphologie plus stellaire à proximité des veinules (Fig n°17).

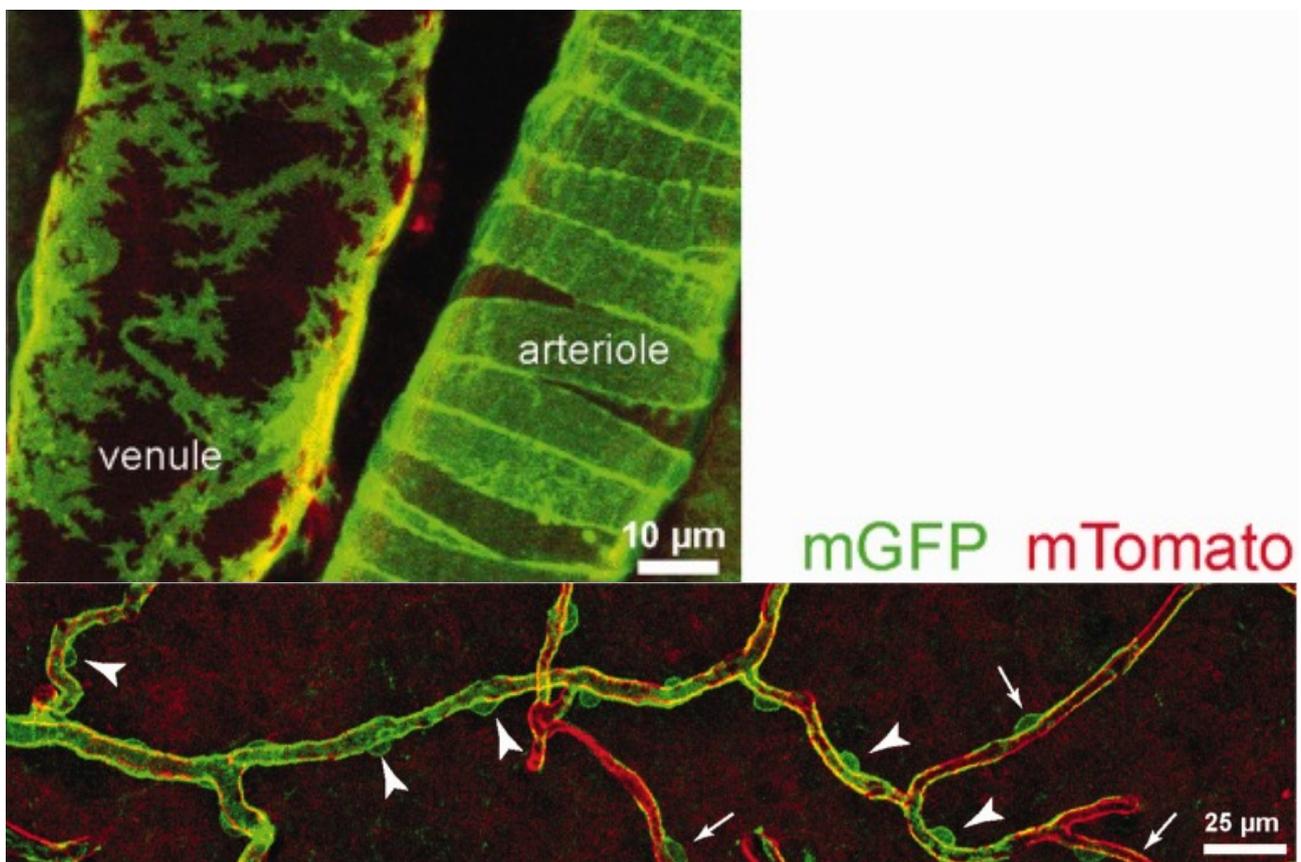


Figure n°17 : Différentes morphologies et fonctions des péricytes en fonction de leur emplacement le long de l'arbre vasculaire (Adapté de Atwell et al., 2016) :

(A) Cellules exprimant le NG2 sur une artériole (Cellules musculaires Lisses) et sur une veinule adapté de de Hill et al., 2015. (B) Cellules exprimant le marqueur NG2 sur la microvasculature (Hill et al., 2015). La partie terminale des artérioles est à gauche ; les parties terminales des veinules est à droite. Les flèches montrent les pericytes. Les cellules marquées par des pointes de flèches sont les cellules sujet à controverse quant à leur nature de péricytes, celles avec des flèches complètes sont celles considérées comme des péricytes universellement. La définition actuelle d'Atwell et al., correspond à celle donnée par Zimmerman et considère toutes les cellules fléchées comme étant des pericytes.

Depuis il a été reconnu que les pericytes varient non seulement dans leur morphologie mais aussi dans leur expression protéique. Néanmoins, bien que les pericytes cérébraux soient de plus en plus étudiés, la littérature est actuellement en désaccord sur leur rôle précis et demeure aujourd'hui encore assez floue. Un grand problème sur la recherche pericytaire vient du manque d'une définition claire en consensuelle du pericyte ainsi qu'un manque flagrant de marqueurs spécifiques aux pericytes qui faciliterait leur étude stricte. Les marqueurs aujourd'hui utilisés étant exprimés par plusieurs lignées cellulaires telle que les cellules musculaires lisses dans le cas du PDGFR β , ou encore la lignée macrophagique pour le NG2 (Sweeney et al., 2016). Restreindre les études à ce seul type cellulaire est donc compliqué bien que des études récentes parviennent à identifier des traceurs permettant la mise en évidence de tout ou une partie de la population pericytaire (Damisah et al., 2017).

Néanmoins plusieurs morphologies principales des pericytes ont été mises en évidence. Tout d'abord les pericytes possédant des prolongements circonférentiels autour du vaisseaux tendent à exprimer l' α -SMA (α -Smooth Muscle Actine), par définition, spécifique des cellules musculaires lisses absentes du réseau capillaire cérébral. De plus tous les pericytes présents sur le réseau capillaire n'expriment pas l' α -SMA (Atwell et al., 2016). Ces différences d'expression ainsi que le flou régnant autour de la définition des pericytes contribuent hautement à la controverse autour de ces derniers, que ce soit à propos de

leur contenu protéique ou de leur réelle fonction physiologique, notamment dans le cerveau, mais aussi dans le reste de l'organisme.

Il est néanmoins aujourd'hui admis que les pericytes sont des cellules faisant partie intégrante de l'unité neuro-vasculaire. La littérature récente leur donne les rôles suivants : La régulation du flux sanguin cérébral notamment au niveau du couplage neurovasculaire. Ce couplage est un mécanisme qui permet le contrôle local de du flux sanguin cérébral (CBF), qui assure une augmentation rapide du CBF dans les régions où les neurones sont actifs (Attwell et al., 2010). Ce couplage neurovasculaire est assuré par les cellules composant l'unité neurovasculaire dont font partie intégrante les pericytes situés stratégiquement au sein des différents types cellulaires avec lesquels ils peuvent interagir.

Les pericytes possèdent des protéines contractiles, incluant α -SMA, la tropomyosine, ainsi que la myosine, principale protéine impliquée dans la contraction dans l'organisme entier. Ces dernières assurent aux pericytes qui les expriment, la possibilité de contraction. Néanmoins, il apparaît dans la littérature que tous les pericytes ne possèdent pas cette capacité contractile. En effet, cette dernière serait présente uniquement sur les péricytes exprimant un haut niveau de α -SMA retrouvés au niveau des divisions des artérioles comparés aux pericytes présents sur le réseau capillaire et au niveau des divisions veineuses du lit capillaire. Cette capacité de contraction demeure aujourd'hui encore sujet à controverse (Alarcon-Martinez et al., 2018). De plus, la déformation des globules rouges dans le lit capillaire peut être modulée par le tonus et la rigidité des parois capillaires. De fait, les pericytes ont la capacité de moduler le flux sanguin cérébral, en modulant le temps de transit des globules rouges dans les capillaires (Attwell et al., 2016).

Les pericytes jouent aussi un rôle non négligeable dans la mise en place et le maintien de la barrière hémato-encéphalique et donc de la perméabilité de cette barrière. En effet, chez les souris déficientes en pericytes, la perte de ces derniers entraîne une dysfonction vasculaire via une réduction de la microcirculation cérébrale, une réduction de la perfusion des capillaires, une perte du couplage neurovasculaire ainsi qu'une ouverture de barrière entraînant le passage et l'accumulation de composés neurotoxiques présents dans le sang (Bell et al., 2010; Sagare et al., 2013).

De plus, les pericytes jouent un rôle dans la signalisation entre les différents composants de la barrière qui leur est conféré par leur emplacement stratégique à l'interface entre les cellules endothéliales et les astrocytes d'une part. D'autres part les pericytes ont aussi la capacité de libérer des facteurs de signalisations déterminant la quantité de jonctions serrées des cellules endothéliales ou encore la polarisation des pieds astrocytaires (Armulik et al., 2010; Sweeney et al., 2016).

Les pericytes permettraient aussi de faciliter les processus neuro-inflammatoires, de par leur capacité à réaliser des fonctions de cellules immunitaires (Jansson et al., 2014). Ils auraient également la capacité de phagocyter d'autres cellules, ainsi que la capacité d'exprimer et de répondre aux signaux de molécules inflammatoires et de cytokines. En effet, l'exposition de pericytes à des cytokines comme l'interleukine-1 β (IL-1 β), ou au Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) déclenche le relargage de molécules inflammatoires ainsi que des protéines remaniant la matrice comme la Metalloprotéase matricielle 9 (MMP9 pour Matrix MetalloProtase 9) entraînant la rupture de la matrice et donc de la barrière hémato-encéphalique.

Enfin, les pericytes auraient une fonction similaire à celle des cellules souches. En effet, ces cellules sont considérées comme étant similaires aux cellules souches mésenchymateuses. Les pericytes peuvent se différencier en de multiples cellules, incluant les angioblastes, cellules souches donnant naissance aux cellules endothéliales, les progéniteurs neuraux, les cellules vasculaires ainsi que les cellules de la microglie (Nakagomi et al., 2015; Özen et al., 2014). Il faut néanmoins préciser que les médiateurs permettant ces différenciations sont encore en cours d'études et que peu d'informations à leur sujet sont actuellement disponibles.

Les pericytes ont donc des fonctions dans le couplage neuro-vasculaire, la régulation du CBF, la mise en place des jonctions inter-cellulaires endothéliales et dans la perméabilité vasculaire cérébrale. Les pericytes jouent aussi un rôle pivot dans les échanges entre les différents composants de la barrière, et ils auraient aussi des fonctions de cellules immunitaires et de cellules souches. Le pericyte est donc une cellule positionnée stratégiquement entre les cellules endothéliales et les astrocytes, il possède une multitude de rôles tous cruciaux pour le maintien de l'homeostasie du système nerveux central. Le pericyte est donc effectivement un membre à part entière de l'unité neurovasculaire.

II-5) L'astrocyte:

Nous devons la découverte ainsi que l'existence du concept de « neuroglie » à Rudolf Virchow, qui dès 1858 dans un de ces cours à l'« Institut für Pathologie » de Berlin parla publiquement pour la première fois du « Nerven Kitt » traduisible par « ciment neural », qu'il appellera plus tard « neuroglie ». Il oppose alors le tissu neural, comprenant les neurones et axones, au reste du parenchyme cérébral, alors considéré comme un simple tissu de maintien architectural. Ce n'est qu'en 1893 que Michael von Lenhossek proposa le terme « Astrocyte » pour ces cellules en forme d'étoile positionnées entre les neurones. En 1913, pour Ramon et Cajal, il existe alors trois éléments cellulaires différents dans le parenchyme cérébral, le premier représente les neurones, le deuxième les astrocytes, le troisième comprend le reste des cellules du parenchyme cérébral. Enfin, c'est en 1918 que Pio del Rio Hortega fut capable de colorer et de différencier ce troisième élément : la microglie. Il arrive aussi à discriminer le deuxième élément en oligodendrocytes et astrocytes, qui jusqu'alors étaient considérés comme la même entité de par leur origine ectodermale commune.

Les astrocytes, dont l'ensemble est aussi appelé astroglie, représentent entre 20 et 40% du nombre total de cellules cérébrales (Tower & Young, 1972 ; Herculano-Houzel, 2014). Ces cellules bien que pensées comme ayant un rôle de soutien et nourricier du tissu neuronal, jouent bien d'autres rôles dans la physiologie du cerveau. De par leur localisation à l'interface entre le vaisseau sanguin cérébral et le tissu neuronal, ces cellules sont décrites comme très versatiles.

Les astrocytes sont donc un sous-type des cellules gliales cérébrales, ils sont présents dans le système nerveux central ainsi que dans la moelle épinière. Ils ont de manière générale une forme étoilée et possèdent des prolongements membranaires proche de leur corps cellulaire au contact direct des synapses des neurones adjacents. Enfin ils possèdent aussi des prolongements membranaires polarisés appelés « pieds astrocytaires » recouvrant quasi-entièrement la vascularisation cérébrale (Mathiisen et al., 2010). Les astrocytes sont en général divisés en deux groupes en fonction de leur morphologie, bien que cette dernière puisse varier d'une zone cérébrale à une autre. Il existe d'une part les astrocytes protoplasmiques situés dans la substance grise, et les astrocytes fibreux situés dans la substance blanche (Oberheim et al., 2012). Néanmoins la morphologie des astrocytes dans le cortex Humain permet de les diviser dans cette zone cérébrale en deux populations distinctes : les astrocytes inter-laminaires dans les couches superficielles du cortex (spécifique aux primates) d'une part et les astrocytes polarisés dans les couches corticales profondes d'autre part (Oberheim et al., 2006, 2009).

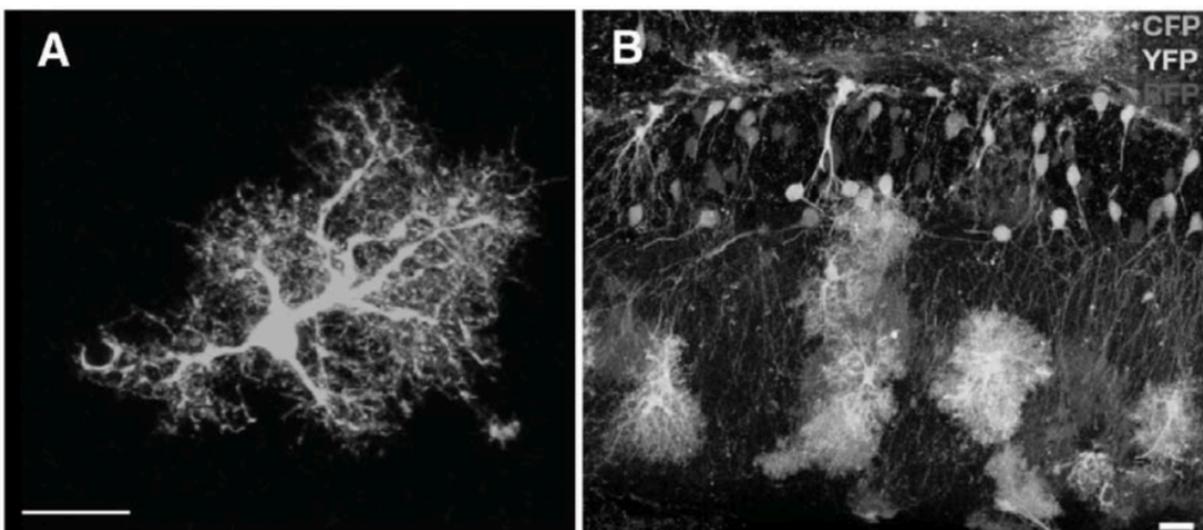


Figure n°18 : Morphologie des Astrocytes (Adapté de Christensen et al., 2013 lui-même adapté de Reichenbach et al., 2010):

(A) Astrocyte de neocortex murin, présentant un prolongement entourant un vaisseau sanguin (gauche). (B) Gyrus denté de souris « Brainbow » présentant des astrocytes (forme de nuages) et des neurones (présentant leur corps neuronaux et l'axones marqués). Les territoires occupés par les astrocytes ne se chevauchent pas et sont unique à chaque astrocyte. Barres d'échelles 20 µm.

Les marqueurs permettant de mettre en évidence les astrocytes sont nombreux mais ne sont pas exclusifs à ces derniers. Tout d'abord le marqueur le plus utilisé dans la littérature actuelle est la Protéine Acide Gliale Fibrillaire (GFAP pour Glial Fibrillary Acidic Protein), c'est le filament intermédiaire majeur présent dans ce type cellulaire (Liem and Messing, 2009). L'élévation de l'expression de la GFAP est d'ailleurs un marqueur sensible et fiable des astrocytes réactifs. Néanmoins l'expression de la GFAP n'est pas détectable dans tous les astrocytes et n'est pas exclusive à ces derniers, elle est aussi exprimée par les cellules dites de la famille astrogliale « étendue » (*i.e.* Cellules de la glie de Bergmann, les tanocytes de la base du 3^e ventricule, certaines cellules de la neurohypophyse, ou encore les cellules gliales de Müller dans la rétine) (Sofroniew, 2009; Sofroniew and Vinters, 2010). Un autre marqueur utilisable identifié par analyse transcriptomique des astrocytes est un membre de la famille des aldéhyde deshydrogénase 1, membre 1 (ALDH1L1 pour ALdéhyde DesHydrogenase 1 family member 1), mais ce dernier marque aussi les oligodendrocytes (Cahoy et al., 2008; Zhang et al., 2019). Dans le même cas les marqueurs de la famille des transporteurs d'acides aminés excitatoires : le transporteur du Glutamate/aspartate (GLAST pour GLutamate ASpartate Transporter) est aussi un marqueur accepté des astrocytes, ainsi que la Glutamine Synthase (GS pour Glutamine Synthetase), le transporteur du glutamate-1 (GLT-1 pour Glutamate Transporter-1), la vimentine, l'aquaporine 4 (AQP4) sont aussi des marqueurs des astrocytes présentant des limitations, soit car ils ne sont pas exprimés par tous les astrocytes soit parce qu'ils mettent en évidence d'autre sous-population gliales cérébrales (Zhang et al., 2019).

Au sein de l'unité neuro-vasculaire l'astrocyte est nécessaire à nombre de processus physiologiques. Tout d'abord l'astrocyte joue un rôle prépondérant dans le couplage

neurovasculaire, en effet de par la position de ses prolongements membranaires à proximité des fentes synaptiques il joue un rôle de senseur de l'activité synaptique. Ce rôle lui permet de coordonner l'apport d'O₂ et de glucose en fonction de l'activité des neurones (Bélangier et al., 2011; Howarth, 2014). En effet les astrocytes ont la possibilité de moduler le diamètre des artérioles. Cette capacité est liée aux mouvements transitoires de Ca²⁺ dans les astrocytes. Brièvement dans le cas où la concentration en O₂ est élevée une augmentation de la concentration transitoire en Ca²⁺ dans le pied astrocytaire entraîne la synthèse de l'acide 20-HydroxyEicosaTetraEnoic (20-HETE), lipide vasoconstricteur, à partir d'Acide Arachidonique (AA), ainsi que le relargage du 20-HETE à proximité des cellules musculaires lisses. Cette synthèse entraîne aussi une réduction de la glycolyse. L'augmentation de la concentration en 20-HETE dans la SMC entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺ induisant la vasoconstriction de l'artériole. À l'inverse maintenant en cas de concentration faible en O₂, l'AA est alors transformé non pas en 20-HETE mais en Prostaglandine E2 (PGE2) et relâché par diffusion. L'augmentation de la concentration en PGE2 dans le milieu extra-cellulaire entraîne une baisse de la concentration calcique dans les SMC, entraînant cette fois une vasodilatation de l'artériole. Dans le même temps la glycolyse n'est plus inhibée, entraînant la synthèse de lactate, diffusant dans le milieu extracellulaire et dont la concentration croissante inhibe le transporteur de prostaglandines (PGT) permettant de maintenir et d'augmenter la concentration en prostaglandines extra-cellulaire (Iadecola and Nedergaard, 2007; MacVicar and Newman, 2015).

De par leur localisation à l'interface entre les neurones et les vaisseaux les astrocytes peuvent jouer d'autres rôles, tout d'abord ils peuvent moduler les jonctions inter-endothéliales, l'expression et la localisation polarisée des transporteurs, ainsi que les

enzymes responsables de la métabolisation de neurotransmetteurs ou substrat nutritifs. Les astrocytes ont donc des rôles à jouer en tant que barrière physique, barrière de transport et enfin en tant que barrière métabolique entre le sang et les neurones (Liu et al., 2018).

En ce qui concerne leur rôle de barrière physique, les astrocytes jouent un rôle prépondérant dans la perméabilité de la barrière. En effet, dans un modèle murin de perte focale d'astrocytes, une baisse locale de l'expression des protéines des jonctions serrées telles que la claudine-5, les occludines et ZO-1 a été démontrée, entraînant une ouverture de barrière démontrée par la diffusion de traceurs de 10 kDa, ainsi que par la présence de micro-hémorragies dans le parenchyme cérébral (Willis et al., 2004).

Les astrocytes sont aussi connus aujourd'hui pour le rôle qu'ils jouent dans le transport de l'eau *via* leurs pieds astrocytaires exprimant fortement l'Aquaporine-4 (Aq4). Ce canal aqueux permet le passage de molécules d'eau librement directement depuis l'espace perivasculaire (Nielsen et al., 1997). Il est à noter que cette Aq4 pourrait aussi jouer un rôle dans le transport des gaz tels que le CO₂, l'O₂ et le NO (Wang and Tajkhorshid, 2009).

Du côté neuronal, une des fonctions principales des astrocytes est leur contribution au maintien de la concentration extra-cellulaire en potassium (K⁺) dans l'intervalle physiologique via leur quantité abondante en canaux rectifiant le courant potassique entrant situés à leur membrane plasmique. Ce maintien permet aux neurones de fonctionner correctement durant les augmentations intenses de leurs fonctions synaptiques, permettant de contrecarrer une dépolarisation neuronale excessive ainsi que la potentielle hyperexcitabilité des neurones. De plus les astrocytes contrôlent également la concentration des neurotransmetteurs dans la fente synaptique par le biais de protéines membranaires spécialisées pouvant absorber ces derniers. Au niveau des synapses

glutamatergique, les astrocytes sont le moyen majeur de recapture du glutamate permettant de mettre fin à son effet excitatoire évitant ainsi une potentielle hyper-activation des neurones. Enfin les astrocytes ont un rôle similaire pour le GABA, neurotransmetteurs inhibiteur cette fois-ci, permettant sa recapture et empêchant cette fois-ci une hyper-inhibition des neurones (Lajtha et al., 1959; Sattler and Rothstein, 2006; Zonta et al., 2003).

Dans le cas de dommages cérébraux, les astrocytes sont capables d'entrer en état d'astrogliose (Astrogliosis ou Reactive Gliosis), les astrocytes sont alors caractérisés comme étant réactifs. Il n'existe actuellement pas de définition consensuelle de l'astrogliose, néanmoins Sofroniew (2009) propose dans ses travaux une définition englobant 4 caractéristiques majeures. L'astrogliose est proposé comme étant le résultat d'un continuum de changements moléculaires et cellulaires des astrocytes pouvant être finement gradés et pouvant influencer les cellules à proximité de ces derniers, résultats de dommages du système nerveux central. Le marqueur principal de cette astrogliose comme précisé préalablement est la surexpression de la GFAP dans le corps cellulaire de l'astrocyte activé (Liu et al., 2018). L'astrogliose est notamment retrouvée chez les patients atteints de démence de type Alzheimer (Kamphuis et al., 2014). De plus l'astrogliose est aussi retrouvée dans un modèle murin de rat spontanément hypertendus entraînant des dommages cérébraux d'origine vasculaire (Tomassoni et al., 2004) seulement dans la condition où les rats sont hypertendus. Le modèle d'hypoperfusion graduelle de Hattori et al., (2014, 2015) induit lui aussi l'astrogliose chez les souris.

Ensemble ces résultats montrent que l'astrogliose et l'induction de cette dernière est retrouvée dans la plupart des cas de démences qu'ils soient d'origine vasculaire ou de type

Alzheimer. De fait une induction de la quantité de GFAP dans le tissu cérébral peut être considéré un marqueur supplémentaire de la mise en place de la démence.

III) Barrière hémato-encéphalique et démences :

La barrière hémato-encéphalique est la gardienne de l'homéostasie dans le système nerveux central et ce grâce aux rôles de ses différents composants (*i.e* cellules endothéliales, pericytes, et astrocytes) jouant un rôle dans la régulation des concentrations en ions, le transport d'espèces moléculaires nutritives ou encore dans la prévention de la diffusion d'espèces toxiques pour le tissu neuronal (Chow and Gu, 2015). La dysfonction de cette barrière peut donc avoir des conséquences désastreuses pour le tissu neuronal. Un faisceau d'arguments croissant obtenus par l'étude de modèles animaux permet aujourd'hui de dire que l'ouverture de la barrière peut entraîner de graves conséquences pour les neurones pouvant aller jusqu'à la dégénérescence du tissu neuronal (Bell et al., 2010; Sagare et al., 2013; Winkler et al., 2014, 2015).

De plus en plus d'études de cohortes humaines suggèrent que la fonctionnalité de la barrière hémato-encéphalique est impactée chez les patients atteints de démences. Ces études utilisent principalement 3 approches pour étudier « l'état » de la barrière hémato-encéphalique dans les cohortes de patients. Tout d'abord la mesure du ratio de l'albumine contenue dans le liquide cérébro-spinal (CSF)/ l'albumine contenue dans le sang (CSF/sérum albumine), marqueur de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. L'analyse histologique de la présence des composés sanguins dans le parenchyme cérébral est aussi utilisée mais ne peut être réalisée que post-mortem. Enfin les cohortes de patients sont aussi suivies avec de l'imagerie cérébrale, qu'elle soit de type Tomographie à Emission de Positron (PET scan) ou l'Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) (van de Haar et al., 2016; Taheri et al., 2011). Des lésions microvasculaires ont été

prises en évidence chez les patients atteints d'autres types de démence telle que la démence à corps de Lewy (De Reuck et al., 2013) néanmoins la littérature manque aujourd'hui d'informations concernant l'état et la fonctionnalité de la barrière hémato-encéphalique dans la démence à corps de Lewy. Une dernière étude sur plusieurs types de démence a réussi à mettre en évidence une augmentation du ratio CSF/sérum albumine chez les patients atteints de démence d'origine vasculaire, de démence de type Alzheimer ainsi que des démences à corps de Lewy. Cette augmentation du ratio CSF/sérum albumine a même été corrélée positivement avec l'augmentation des marqueurs de dysfonction endothéliale ou d'angiogenèse dans le CSF (Janelidze et al., 2017). Une étude reportant une cohorte de plus de 5000 patients montre que les patients atteints de la MA présentaient une plus haute prévalence pour les pathologies vasculaires que les α -synucléinopathies mais que la présence de maladies cerebro-vasculaires augmentait le risque d'apparition de la démence chez les patients atteints d' α -synucléinopathie (Toledo et al., 2013).

Une autre caractéristique des patients atteints de démence de type Alzheimer ou d'origine vasculaire est la présence d'une hypoperfusion cérébrale, en effet des études de cohortes humaines de personnes de plus de 60 ans récentes, montrent qu'une perfusion cérébrale réduite est associée avec un plus grand risque de démence (Gorelick et al., 2017; Wolters et al., 2017). Les études réalisées sur des modèles murins de MA montrent une réduction du flux sanguin cérébral, et montrent que la réduction de ce flux entraîne une accélération de l'avancée de la maladie potentiellement liée à une perte de l'intégrité de la substance blanche, ainsi qu'à une augmentation de l'inflammation et du stress oxydatif dans le cerveau des souris (Feng et al., 2018; Zhai et al., 2016a, 2016b).

Les résultats de ces études suggèrent que la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique ainsi que l'hypoperfusion sont des paramètres clés, voire cruciaux, de la mise en place des démences de type vasculaire, Alzheimer ou à corps de Lewy. Une augmentation de la perméabilité vasculaire cérébrale ainsi qu'une réduction du flux sanguin cérébral. Ces démences semblent apparaître avant l'apparition des plaques séniles ou des enchevêtrements neurofibrillaires (The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative et al., 2016).

IV) La voie Wnt/Frizzled:

Mon travail de thèse s'est articulé autour de la voie de signalisation Wnt et plus particulièrement autour de la voie Wnt dite PCP, cette voie de signalisation permet l'orientation des cellules dans le plan. En effet de par leur nature ainsi que leur fonction les cellules endothéliales sont des cellules polarisées et ce, en trois dimensions. En effet elles possèdent un pôle sanguin, la face luminale de la cellule endothéliale, ainsi qu'un pôle « parenchymal » au contact du tissu nourri par le vaisseaux aussi appelé face abluminale. De plus, la cellule endothéliale possède aussi une orientation antéro-postérieure régie par le sens du flux sanguin (Lee et al., 2006; Tkachenko et al., 2013). Cette orientation est planaire c'est à dire dans le plan et serait en partie contrôlée par une voie de signalisation, la voie de signalisation Wnt/Fz.

IV-1) Histoire de l'axe Wnt/Fz :

En 1973, un mutant de *Drosophila Melanogaster* dans lequel les ailes sont manquantes est décrit et le gène responsable de cette mutation est alors nommé Wingless (Wg) par Sharma de l'Université de New Delhi. La mutation Wg cause des défauts de segmentation dans les embryons de drosophile, et quelques années plus tard un grand nombre de gènes impliqués dans la polarité segmentaire sont mis en évidence et caractérisés par Nüsslein-Volhard et Wieschaus entre 1980 et 1984. Concomitamment, en 1982 Roel Nusse et Harold Varmus de l'Université de Californie, reportent que le virus tumoral mammaire murin (MMTV pour Mouse Mammary Tumour Virus) induit des tumeurs mammaires aux souris en activant l'expression d'un gène jusqu'alors inconnu qu'ils nomment alors int1 (pour Integration 1). En 1987 un lien est établi entre le gène Wg de drosophile et le gène int1 murin par Rijsewijk et al. En effet, ces deux gènes présentent une très forte homologie de séquences et sont alors décrits comme les homologues de ces deux espèces. En 1990 une mutation perte de fonction de la souris, *swaying*, dans laquelle le cervelet antérieur est absent (décrite pour la première fois en 1967) est montrée comme étant un allèle du gène int1, démontrant alors un rôle majeur de int1 dans le développement embryonnaire. Un nouveau nom général est alors choisi pour ces homologues, résultat de la contraction de Wingless et int1 : Wnt1 (pour Wingless-related integration site). Ce n'est qu'en 1993 que des mutations oncologiques humaines sont reliées à la voie de signalisation Wnt par Rubinfeld et al.,. En 1995, Nüsslein-Volhard et Wieschaus sont alors récompensés par le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine pour leurs travaux sur les différents mutants Wg. À l'heure actuelle 19 ligands Wnt ont été mis en évidence chez l'Homme.

Les récepteurs aux ligands Wnt, les récepteurs Frizzled ont été identifiés à la même période que leurs ligands mais indépendamment de ces derniers. Ils ont été découverts suite à des criblages entraînant des mutations des gènes de polarité de la Drosophile. (Calvin, 1944). En effet, la drosophile est un excellent système permettant l'étude du développement embryonnaire, en particulier la polarité cellulaire et tissulaire. Après ces découvertes l'axe frizzled devint un modèle pour l'étude de la polarité planaire dans différentes régions corporelles de la drosophile, comme les ailes, les yeux etc... (Gubb and García-Bellido, 1982; Vinson and Adler, 1987; Wong et al., 1994).

Néanmoins, la connexion entre les ligands Wnt et les récepteurs Frizzled ne fût faite que bien après la découverte de ces différentes protéines. Il a tout d'abord été montré que les mutations dans les gènes frizzled et dishevelled, plus tard identifiés comme protéines d'échafaudage cruciales de la voie Wnt/Fz, causait un phénotype similaire *in vivo* (Krasnow et al., 1995). Quelques années plus tard, plus de preuves sont apportées renforçant l'idée selon laquelle les protéines Frizzled fonctionnent comme des récepteurs aux ligands Wnt (Bhanot et al., 1996; Wang and Shackleford, 1996). Aujourd'hui dix récepteurs Frizzled différents ont été mis en évidence.

La signalisation Wnt est donc la résultante de l'interaction entre l'un des 19 ligands Wnt avec l'un des 10 récepteurs Frizzled.

Cette voie de signalisation Wnt/Fz, est aujourd'hui divisée en plusieurs voies. La voie dite canonique ou de la β -caténine, et la voie non-canonique divisée en deux voies distinctes : la voie de polarité cellulaire planaire, ou PCP, et enfin la voie dépendante du calcium qui ne sera pas traitée ici.

IV-2) La Voie Wnt/Fz canonique ou voie de la β -caténine :

La voie canonique de la voie de signalisation Wnt/Fz est étroitement liée à la protéine β -caténine. Cette protéine est un des composants clés des jonctions adhérentes où elle joue le rôle de lien entre la partie cytoplasmique des cadhérines classiques comme la N- et la VE-cadhérine qu'elle relie au cytosquelette d'actine via l' α -caténine, mais joue aussi le rôle de facteur de transcription lorsque les conditions sont réunies.

En l'absence de fixation de ligand Wnt à son récepteur, la β -caténine contenue dans le compartiment cytoplasmique est présente dans les jonctions serrées ou dégradée afin de maintenir des concentrations cytoplasmiques basse en β -caténine (Nelson & Nusse, 2004). Cette dégradation est réalisée par le complexe de dégradation de la β -caténine, qui comprend l'Axine 2, l'APC (pour Adenomatosis Polyposis Coli), la Protéine Phosphatase 2A (PP2A), la Glycogène Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) ainsi que la Caséine Kinase 1 α (CK1 α). Lors de sa dégradation la β -caténine est séquestrée par protéines Axine2 et APC (Hinoi et al., 2000), elle est ensuite phosphorylée sur les résidus sérine/thréonine de son extrémité N-terminale par CK1 α par la protéine GSK3 β . Ces phosphorylations de la β -caténine entraînent le recrutement et la liaison de l'E3-ubiquitine-ligase E3 β -TrCP. L'ubiquitination de la β -caténine induit ensuite son adressage vers le complexe protéique que forme le protéasome pour être dégradée afin de maintenir un niveau faible de β -caténine dans le cytosol. La liaison d'un ligand Wnt au complexe récepteur Fz et co-récepteur LRP5/6 (Cong et al., 2004) induit la translocation à la membrane d'un régulateur négatif du signal: Axine2, qui va se lier à la partie cytoplasmique de LRP5/6. Après translocation à la membrane de la protéine Axine2, sa liaison à LRP5/6 est catalysée par la phosphorylation de LRP5/6, médiée soit par GS3K ou CK1 γ . Il est important de noter que CK1 et GSK3 β apparaissent comme jouant des rôles différents à deux niveaux distincts de la signalisation Wnt canonique: Un rôle au niveau de la phosphorylation de LRP5/6 ou leur

influence est dite positive, ainsi qu'un rôle au niveau de la β -caténine elle-même où leur rôle sera négatif.

La liaison de l'Axine2 à LRP5/6 a été proposée comme étant le signal retirant l'activité négative d'axine2 sur la signalisation Wnt, entraînant d'une manière ou d'une autre l'activation de la phosphoprotéine Dvl (Dishevelled). Il est à noter ici aussi que Dvl est connu pour sa capacité à lier l'axine et Fz, néanmoins le mécanisme d'activation de Dvl demeure aujourd'hui encore non résolu. Dvl est phosphorylé par plusieurs kinases comme la Caséine Kinase (CK1), la Caséine Kinase 2 (CK2), la Kinase Associée aux Métastases (MAK pour Metastasis Associated Kinase), la Protéine Kinase C (PKC) et enfin Par1. Il n'est pas impossible que cet événement de phosphorylation régule à la fois la localisation sub-cellulaire de Dvl ainsi que sa capacité à interagir avec les effecteurs de plusieurs branches de la signalisation Wnt. En effet, Dvl est une protéine modulaire qui contient trois domaines distincts : Un domaine DIX, un domaine PDZ, ainsi qu'un domaine DEP pour la signalisation canonique. Les domaines DIX et PDZ semblent jouer un rôle pivot dans la médiation du signal. Une fois Dvl activé, il va inhiber l'activité de l'enzyme GSK3 β , induisant une série d'évènements complexes entraînant la prévention de la dégradation de la β -caténine, entraînant donc sa stabilisation et son accumulation dans le cytoplasme. La β -caténine une fois accumulée dans le cytoplasme est transloquée dans le noyau par un mécanisme encore peu compris aujourd'hui et encore sujet à débats.

Une fois importée dans le noyau la protéine β -caténine est alors capable de jouer son rôle sur la transcription de gènes en fonctionnant comme un co-activateur transcriptionnel. Un grand nombre de partenaires ont été mis en évidence pour la β -caténine dans le noyau. L'un de ces partenaires les mieux décrits est le facteur de transcription liant l'ADN TCF/LEF (pour T-Cell Factor et Lymphoid Enhancer binding Factor respectivement).

TCF/LEF est normalement séquestré dans le noyau par la protéine Groucho, ce qui assure la répression des gènes d'intérêts (Kimelman and Xu, 2006). Dans le cas où la β -caténine est transloquée dans le noyau, le complexe TCF/LEF/ β -caténine va se lier sur le promoteur des gènes cibles comme les gènes organisant la formation de l'embryon: *Siamois* et *Twin*, importants durant l'embryogenèse, ainsi que des gènes impliqués dans le cycle cellulaire comme la Cycline D1. La β -caténine va aussi réguler la transcription de gènes comme c-Myc (He et al., 1998), c-jun (Mann et al., 1999)(Mann et al., 1999), la E-cadhérine (Anna et al., 2003), ainsi que des composants de la voie Wnt incluant WNT3A (Zhang et al., 2009), Axine2 (Jho et al., 2002), et TCF/LEF (Filali et al., 2002).

La voie de signalisation Wnt canonique joue donc un rôle crucial dans la mise en place de l'embryon durant l'embryogenèse, notamment dans l'organisation de l'axe antéro-postérieur, la mise en place de la tête, de la queue et de nombre d'organes comme le coeur, les poumons, les reins, la peau, les os, etc... La voie Wnt canonique joue également un rôle clef dans la régulation de la prolifération, la différenciation, l'apoptose cellulaire ainsi que l'homéostasie tissulaire générale. La dérégulation de cette voie peut entraîner des dysfonctions graves telles que l'apparition de cancers, ce qui explique son étude poussée en cancérologie.

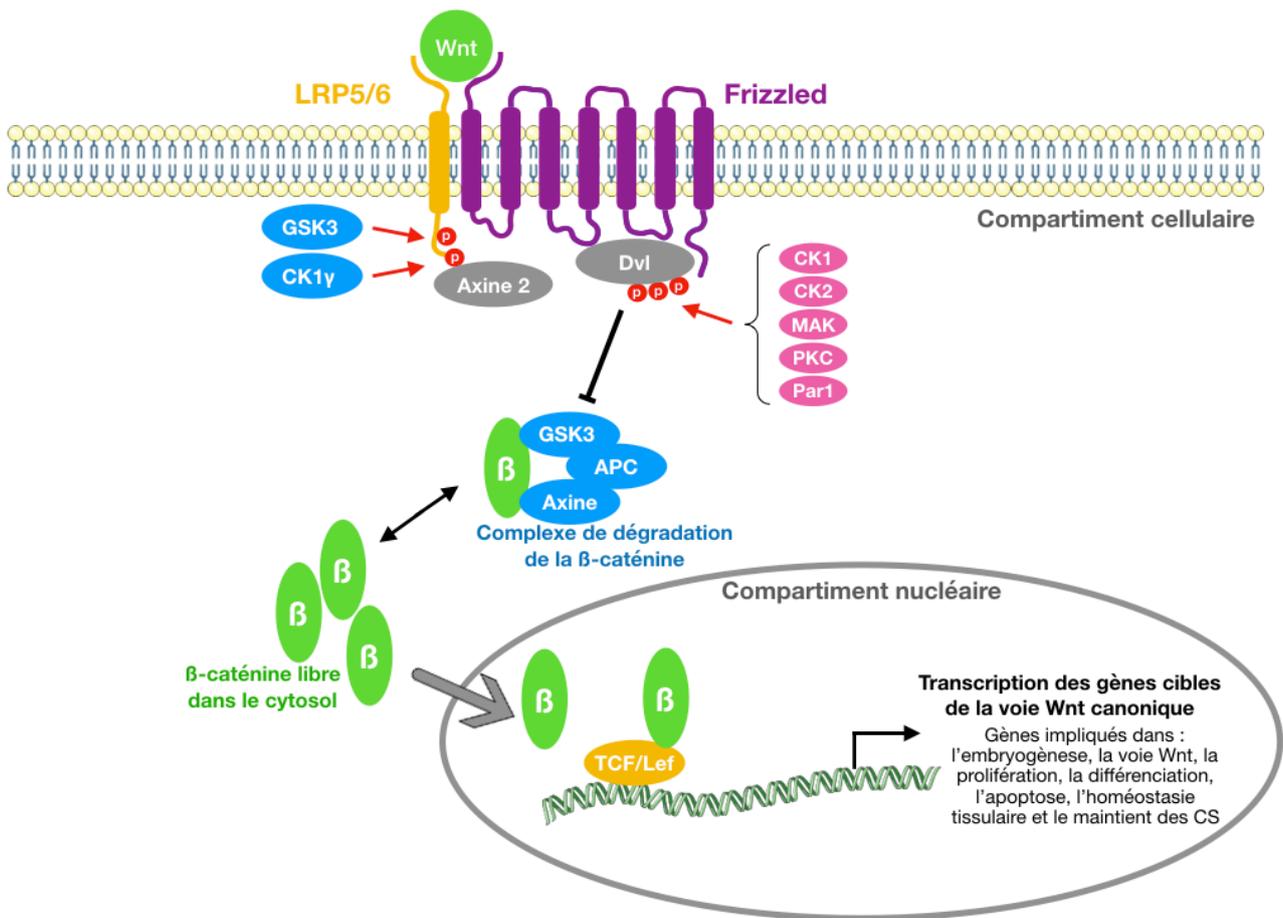


Figure n°19 : Schéma de la voie Wnt/Fz canonique dite de la β-caténine :

La liaison d'un ligand Wnt sur le récepteur Fz et son co-récepteur LRP5/6 entraîne la migration de l'axine 2 à la membrane et entraîne la phosphorylation de LRP5/6 par CK1γ et GSK3β, entraînant à son tour l'activation de Dvl alors capable d'inhiber le complexe axine/APC/GSK3β qui ne peut alors plus séquestrer la β-caténine dans le cytoplasme et la dégrader et permet son import dans le noyau où elle peut entraîner la transcription des gènes cibles.

IV-3) Voie Wnt/Fz non-canonique : Voie de Polarité Cellulaire Planaire

La voie de signalisation non-canonique est souvent appelée voie indépendante de la β-caténine et est divisée en deux voies, la voie de Polarité Cellulaire Planaire (PCP) ainsi que la voie dépendante du Calcium (Wnt/Ca²⁺).

La découverte de la voie PCP nous vient des études génétiques réalisées sur la drosophile où les mutations des composants de la voie Wnt comme Fz ou Dvl avaient entraîné une randomisation de l'orientation des structures épithéliales comme les poils de la cuticule ou

encore les soies sensorielles (Seifert & Mlodzik, 2007). En effet, les cellules épithéliales sont connues pour leur polarité apico-basale mais en plus de cela ces cellules sont aussi polarisées dans le plan de la couche épithéliale. Cette organisation stricte gouverne l'orientation des structures cellulaires telles que l'orientation des follicules pileux, des soies sensibles ou encore la forme hexamériques des ommatidies de l'œil de drosophile (Fanto & McNeill, 2004; Zallen, 2007). Chez les vertébrés maintenant, cette voie régule, par exemple, la mise en place des stéréo-cils dans l'épithélium sensitif de l'oreille interne (Montcouquiol et al., 2003), l'organisation des follicules pileux (Guo et al., 2004), ainsi que la morphologie et l'organisation de la migration des cellules du mésoblaste dorsal durant la gastrulation embryonnaire (Wang & Nathans, 2007). Récemment des nouvelles études ont montré l'implication de la voie Wnt PCP dans le développement des structures critiques pour le tissu neural comme la migration neuronale ou encore la guidance des axones chez le nématode (He et al., 2018; Hilliard and Bargmann, 2006; Pan et al., 2008; Prasad, 2006).

Dans la voie de signalisation Wnt-PCP, le signal Wnt est pensé aujourd'hui comme étant médié par les récepteurs Fz indépendamment du co-récepteur LRP5/6. Néanmoins, les co-récepteurs de Fz sont encore méconnus dans cette voie de signalisation PCP quelques candidats ont néanmoins été mis en évidence tel que NRH1 (Sasai et al., 2004), Ryk (Lu et al., 2004a), PTK7 (Lu et al., 2004b) ou encore ROR2 (Nishita et al., 2006). La transduction du signal serait donc initiée par la liaison du ligand Wnt au récepteur Fz lui-même lié à un co-récepteur. Le signal est ensuite transduit jusque Dvl activé par phosphorylation. Ces domaines PDZ et DEP sont ensuite utilisés pour activer des voies parallèles activant elles-mêmes les petites GTPases Rho et Rac (Wallingford and Habas, 2005). Pour ce qui est de l'activation de la branche Rho, la signalisation Wnt induit la formation d'un complexe Dvl-Daam1 qui entraîne l'activation de Daam1 et va conséquemment activer les Rho-GTPases.

Daam1 pour Activateur de Morphogenèse associé à Dishevelled (Dishevelled Associated Activator of Morphogenesis 1) qui est une protéine qui peut lier Dvl et RhoA suggérant la possibilité d'une boucle de rétro-contrôle positif de ce signal. L'activation des Rho-GTPases va induire l'activation des kinases associées aux protéine Rho (ROCK pour Rho-associated kinases) ainsi que de la myosine ce qui entraînera en conséquence la modification et le réarrangement du cytosquelette d'actine. Pour ce qui est de la deuxième voie, elle nécessite la présence du domaine DEP de Dvl et va activer les Rac-GTPases de façon indépendante à Daam1. L'activation des protéines Rac va à son tour entraîner la stimulation de l'activité de la kinase N-terminale de c-Jun (c-Jun N-terminal kinase ou JNK) (Fanto and McNeill, 2004; Yamamoto et al., 2007). Les mécanismes régulant cette voie, ainsi que son fonctionnement général sont conservés à mesure de l'avancée dans l'arbre évolutif. Néanmoins chez les vertébrés de nouveaux interactants ont été mis en évidence dans cette voie pour pallier la nécessité de régulation venant avec la complexification des organismes.

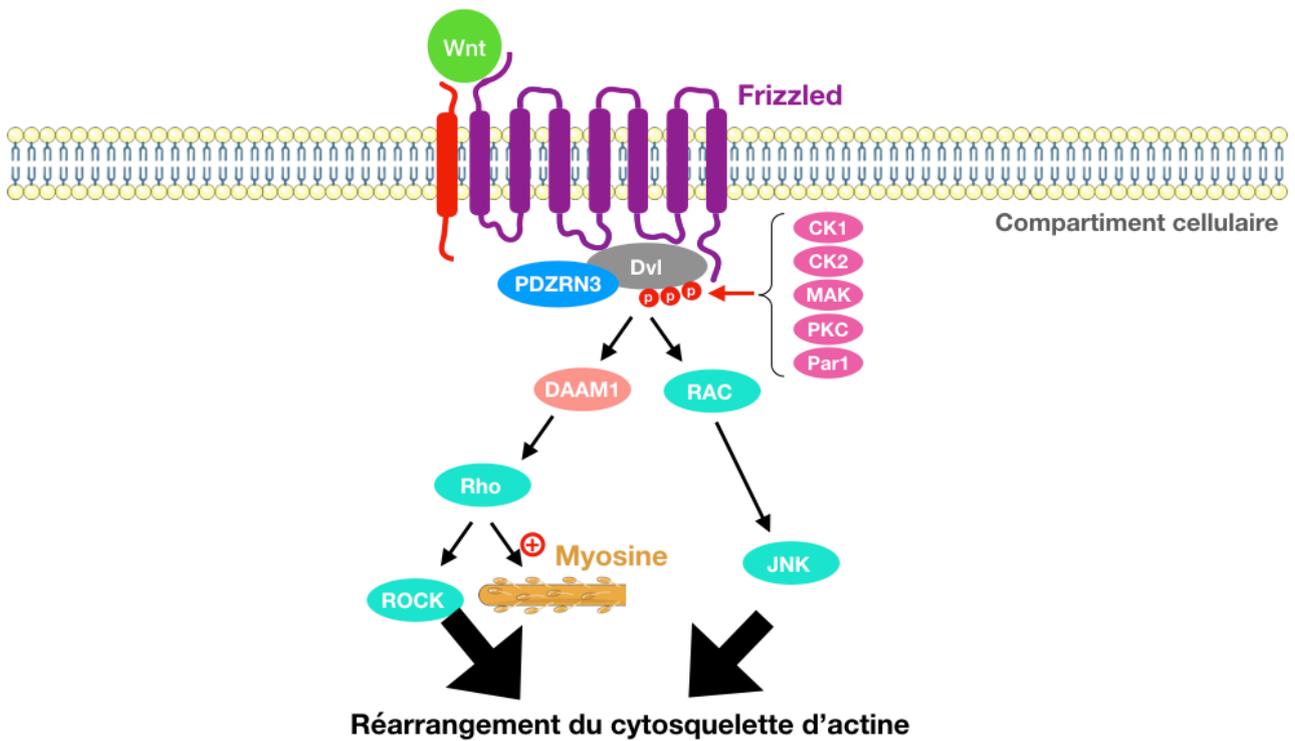


Figure n°20 : Schéma de la voie de signalisation Wnt/Fz non-canonique dite PCP :

La fixation du ligand Wnt sur son récepteur Fz et un co-récepteur entraîne la phosphorylation de Dvl qui peut alors s'associer à Daam1 et permet d'activer les Rho GTPases permettant l'activation des ROCK ce qui permettra *in fine* le réarrangement du cytosquelette. D'autre part l'activation de Dvl va aussi permettre l'activation des Rac GTPases de façon indépendante de Daam1 et entraîner l'activation de JNK permettant *in fine* ici aussi le réarrangement de cytosquelette d'actine.

IV-4) Voie Wnt/Fz dans la mise en place et le maintien de la Barrière Hémato-Encéphalique:

La voie de signalisation Wnt est une voie importante pour la mise en place de l'embryon, et le maintien des fonctions biologiques dans un état physiologique. Cette voie de signalisation a été hautement étudiée dans le cadre de la maintenance de la perméabilité de la BHE.

La mise en place et le maintien de la BHE est contrôlée par de multiples voies de signalisations, ces voies incluent la voie Wnt qu'elle soit canonique ou PCP. En effet dans le cerveau et la moelle épinière embryonnaire, les principaux ligands de la voie Wnt canonique nécessaires à la mise en place et au développement de la BHE sont les ligands Wnt7a et b provenant des cellules gliales cérébrales (Daneman et al., 2009; Liebner et al., 2008a; Stenman et al., 2008). Néanmoins aujourd'hui un faisceau d'argument venant de la bibliographie montre que le rôle de la voie Wnt n'est pas exclusive au développement embryonnaire et que cette signalisation permet aussi le maintien de la BHE après sa formation. Il a été récemment montré dans un modèle *in vivo* de déstabilisation de la perméabilité vasculaire cérébrale, que la transcription constitutive de la β -caténine dans les cellules endothéliales permettait un sauvetage du phénotype de perméabilité de la BHE et ce *via* une augmentation de la quantité de claudine-5 permettant une stabilisation des jonctions (Benz et al., 2019) alors qu'à l'inverse la délétion constitutive du gène codant pour la β -caténine chez la souris adulte entraîne une ouverture de barrière ainsi que des hémorragies, ici aussi, potentiellement lié aux effets de la β -caténine sur les jonctions adhérentes (Tran et al., 2016). Une autre équipe montre que la délétion du gène Gpr124 codant pour un interactant de la voie Wnt est embryonnaire létale, mais lorsque la délétion est achevée après la naissance en présence d'un endothélium mature, la BHE garde son

intégrité en condition physiologique. Mais une fois placé dans un contexte pathologique, ici par expériences de MCAO, les souris présentent alors des ischémies et des saignements plus importants que leurs contrôles. Enfin cette dysfonction de la BHE en contexte pathologique peut être sauvée par activation constitutive de la voie de signalisation Wnt- β -caténine (Chang et al., 2017). Dans la même voie, la délétion endothéliale du gène codant pour le récepteur Fz4 entraîne une dysfonction de la perméabilité de la barrière chez la souris adulte (Wang et al., 2012).

Enfin, d'autres équipes ont obtenu des résultats similaires sur des modèles de vaisseaux cérébraux perméables (*i.e* les vaisseaux de la barrière sang-rétine BRB pour Blood-Retina Barrier ou encore les vaisseaux des plexus choroïdes, site de synthèse du liquide céphalo-rachidien) et montrent une réduction de la perméabilité vasculaire à des niveaux correspondant à ceux de la BHE dans le cas d'une augmentation de l'expression des facteurs de la voie Wnt ou une dysfonction de la BHE en cas de délétion d'un ou plusieurs des gènes codant pour des membres de la voie de signalisation Wnt. (Benz et al., 2019; Cho et al., 2019; Mazzoni et al., 2017; Wang et al., 2019). Il est d'ailleurs proposé par Wang et al., que le phénotype de perméabilité des cellules endothéliales cérébrales dépend non pas de leur localisation mais de l'état de la signalisation β -caténine dans ces cellules.

Ces résultats démontrent un rôle crucial de la voie Wnt dans la mise en place ainsi que le maintien de l'intégrité de la BHE *in vivo* dans différents modèles murins. De manière intéressante, l'augmentation de la translocation de la β -caténine au noyau est retrouvée dans le cadre de l'étude du mutant délété pour *Pdzn3* dans l'endothélium, gène codant pour une E3-ubiquitine ligase, jouant un rôle dans la voie de Polarité Cellulaire de la voie

Wnt, plus précisément un rôle inhibiteur de la voie canonique de la β -caténine (Honda et al., 2010; Sewduth et al., 2014a, 2017).

IV-5) Les ubiquitine ligases dans la barrière hémato-encéphalique :

L'ubiquitinylation est un processus comprenant 3 étapes dans lesquelles un résidu ubiquitine est transféré depuis une E1-ubiquitine ligase sur une E2-ubiquitine ligase permettant après l'association d'une E3-ubiquitine ligase de catalyser la réaction d'ubiquitinylation d'une protéine. Cette ubiquitinylation est considérée comme étant principalement un signal de destruction de la protéine dans le protéasome. Néanmoins à l'heure actuelle les données de la littérature suggèrent que ce signal ne sert pas uniquement à la dégradation *via* le protéasome mais contrôlerait plusieurs fonctions cellulaires clés telles que la régulation des interactions protéines-protéines, le trafic vésiculaire, l'internalisation de récepteurs, et la localisation sub-cellulaire de protéines de signaux (Majolée et al., 2019; Rape, 2018). La littérature récente montre d'ailleurs un rôle clé des enzymes E3-ubiquitine ligases et de dé-ubiquitinylation (DUB pour DeUBiquitinyllating enzymes) dans le maintien des jonctions inter-endothéliales (Majolée et al., 2019). L'expression ectopique des E3-ubiquitine ligases de la famille MARCH : (MARCH2 et 4) dont les ARNm sont exprimés dans les cellules endothéliales microvasculaires du derme, impacte la localisation de la VE-cadhérine aux jonctions intercellulaires (Nanes et al., 2017). Néanmoins, cela n'exclue pas le mécanisme impliquant l'ubiquitinylation des protéines associées à la VE-cadhérine capable de réguler l'internalisation de cette dernière. L'E3 ubiquitine-ligase MARCH3 serait capable de réguler négativement l'intégrité endothéliale. Dans les cellules cérébrales endothéliales humaines, la diminution de l'expression de MARCH3 induit une diminution de la perméabilité induite par l'histamine (Leclair et al., 2016). De plus, les cellules endothéliales cérébrales

transfectées avec un siRNA ciblant MARCH3 présentent une augmentation du nombre de transcrits ainsi que de la quantité protéique des protéines d'adhésion que sont la claudine-5 et l'occludine ainsi qu'une légère élévation de la quantité de transcrits ou de protéines VE-cadhérine. MARCH3 est alors décrit comme jouant un rôle répresseur de la claudine-5 et de l'occludine *via* le répresseur transcriptionnel FoxO1. De fait la réduction des ARNm codant pour les protéines des jonctions serrées impacte aussi la stabilisation des jonctions adhérentes et impacte *in fine* l'intégrité vasculaire (Leclair et al., 2016).

IV-6) L'E3-ubiquitine ligase PDZRN3:

Le laboratoire d'accueil s'intéresse à une ubiquitine ligase E3, appelée PDZRN3, qui régulerait la voie Wnt ; les travaux ont montré son rôle dans le maintien de l'intégrité des jonctions inter-endothéliales et *in fine* de l'intégrité de la BHE (Sewduth et al., 2014a, 2017).

Le laboratoire a été mis en évidence un rôle crucial de Dvl3 dans l'induction des cellules endothéliales vers la voie PCP (Descamps et al., 2012). Dans le but de décrypter cette voie de signalisation dépendante de Dvl3 au sein de la voie PCP, un criblage en double hybride a été réalisé chez la levure. Ce dernier a permis la mise en évidence de plusieurs interactants potentiels de Dvl3 dont un, sur lequel l'attention du laboratoire s'est tout particulièrement portée. Cet interactant est PDZRN3, une E3-ubiquitine ligase contenant plusieurs domaines PDZ.

PDZRN3 est une protéine dont le rôle est peu connu à l'heure actuelle. Il a été montré que PDZRN3 est exprimé chez l'Homme, au niveau du cœur, du muscle squelettique, du foie, mais aussi au niveau du cerveau (Ko et al., 2006). PDZRN3 a été étudié dans le cadre de la différenciation des ostéoblastes où il jouerait un rôle inhibiteur de la voie de signalisation canonique de la voie Wnt/Fz (Honda et al., 2010).

Les premiers résultats obtenus par le laboratoire montrent que la délétion de *Pdzn3* dans l'endothélium durant l'embryogenèse murine induit des défauts vasculaires au niveau des vaisseaux vitellins ainsi qu'une insuffisance de l'invasion des capillaires au niveau du placenta. Un retard de développement est retrouvé chez ces embryons ainsi qu'une mortalité intra-utérine augmentée aux alentours de E11,5. En post-natal, la délétion de *Pdzn3* induit des défauts de ramification ainsi qu'une régression excessive des vaisseaux de la rétine. De plus les analyses *in vitro* et *ex vivo* des mutants perte et surexpression de PDZRN3 montrent un rôle de ce dernier dans la coordination de l'extension, de la polarisation ainsi que de la formation des plexus tubulaires dans les cellules endothéliales (Sewduth et al., 2014b). PDZRN3 régulerait la migration et la polarité planaire des cellules endothéliales, il est donc un partenaire crucial de la voie de signalisation de Polarité Cellulaire Planaire de la voie Wnt/Fz.

La suite du travail du laboratoire a permis de mettre en évidence que la surexpression embryonnaire de PDZRN3 dans la cellule endothéliale entraîne la présence d'hémorragies dans différents tissus de l'organisme, notamment au niveau de l'encéphale. Ces dernières entraînant le décès des animaux. Il a alors ensuite été décidé d'éprouver cet effet sur la perméabilité vasculaire cérébrale dans un modèle pathologique d'AVC aigu, obtenu grâce à la technique chirurgicale d'Occlusion transitoire de l'Artère Cérébrale Médiane (MCAO pour Middle Cerebral Artery Occlusion). Cette chirurgie va entraîner une ischémie drastique du cortex du côté où l'artère cérébrale médiane a été occlue. Après reperfusion une ouverture de barrière pourra être mise en évidence par la présence d'un œdème vasogénique entraînant le passage de liquide à l'intérieur du parenchyme cérébral entraînant un deuxième type d'évènement de compression des neurones entraînant lui-même leur apoptose. La taille de l'œdème est ensuite visualisée via la révélation des IgG de souris normalement absents du parenchyme cérébral. Cette technique a permis de

mettre en évidence une réduction allant jusqu'à deux fois la taille de l'œdème des souris dans lesquelles *Pdzrn3* a été délété après la naissance vis-à-vis des souris contrôles.

La réduction de la perméabilité obtenue avec le knock-out de *Pdzrn3* peut être obtenue par inhibition pharmacologique de la protéine PKC ζ , kinase dont le rôle est de déstabiliser les jonctions inter-endothéliales.

Ces résultats indiquent que la variation d'expression de PDZRN3 dans la cellule endothéliale influe sur l'activité de la kinase PKC ζ ainsi que sur sa localisation aux jonctions intercellulaires et donc *in fine* sur la perméabilité vasculaire. PDZRN3 ou PKC ζ peuvent donc être décrits comme des cibles de choix pour le traitement de l'œdème post-AVC (Sewduth et al., 2017).

V) Projet de Recherche :

La littérature a montré un rôle potentiel de la perméabilité vasculaire cérébrale dans la mise en place de la démence qu'elle soit de type Alzheimer ou d'origine vasculaire. De plus la littérature montre aussi une baisse du flux sanguin cérébral ainsi qu'une augmentation de la perméabilité chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de démences d'origine vasculaire, ainsi que des dysfonctions de l'unité neurovasculaire notamment au niveau de la cellule endothéliale.

Du fait du rôle de *Pdzn3* dans la perméabilité endothéliale, nous avons donc mis en place un modèle d'hypoperfusion cérébrale phénocopiant les défauts mis en évidence chez les patients atteints de démence d'origine vasculaire et nous nous sommes demandés si les souris dont l'endothélium surexprime ou n'exprime plus le gène *Pdzn3* présenteraient des dommages cérébraux modulés par cette délétion ou surexpression. Nous avons vérifié par histologie et corrélés des études comportementales avec la quantification de ces dommages tissulaires. Nous nous sommes alors demandés si dans un modèle de souris atteintes de la maladie d'Alzheimer, l'ablation endothéliale de *Pdzn3* réduirait le phénotype et/ou l'avancée de la maladie.

Matériel et méthodes :

Lignées Murines hébergement et éthique :

Plusieurs lignées murines transgéniques ont été utilisées pour la réalisation des expérimentations suivantes. Tout d'abord les souris C57/b6J ont été utilisées pour la mise au point du modèle de constricteurs carotidiens, ainsi que pour le choix du diamètre interne des constricteurs. Ensuite la lignée de souris délétée pour *Pdzrn3* de façon inducible dans l'endothélium (*pdgfb-creERT2; Pdzrn3^{fl/fl}* ou *Pdzrn3 iECKO*) ont été utilisées. Ces souris possèdent le gène codant pour la Cre-recombinase sous contrôle du promoteur endothélium-spécifique : Facteur de croissance dérivé des plaquettes sous-unité B (*pdgfb* pour *Platelet Derived Growth Factor subunit B*) (Sewduth et al., 2014). Les souris contrôles pour ces expérimentations sont les souris issues des mêmes croisements que les souris *Pdzrn3 iECKO* mais ne possédant pas la Cre-Recombinase, elles sont dénommées « littermates » (*Pdzrn3^{fl/fl}*). La Cre-recombinase est une endonucléase capable de couper sur les séquences Flox, dans le cas de la souris *Pdzrn3 iECKO*, le gène *Pdzrn3* étant flanqué de part et d'autre par ces séquences *Flox*, l'activation de la Cre-recombinase par injection de Tamoxifène entraîne la délétion spécifique de *Pdzrn3* dans l'endothélium sous contrôle du promoteur *pdgfb*.

Les souris surexprimant *Pdzrn3* spécifiquement dans l'endothélium de façon inducible ont elles aussi été utilisées pour les expérimentations avec des constricteurs carotidiens. Ces souris expriment la Cre-recombinase sous contrôle du promoteur *pdgfb* spécifique de l'endothélium. Elles possèdent aussi une séquence tTa disruptée par un codon STOP flanqué de deux séquences Flox. Elles possèdent une dernière cassette sous contrôle tetO permettant l'overexpression du gène inséré en aval, ici *Pdzrn3* flanqué d'un « tag-V5 ». Les

souris surexprimant PDZRN3 dans l'endothélium sont donc *pdgfb-creERT2*; tTA; *Pdzrn3-V5* (*Pdzrn3 iECO*E). Cette triple construction permet l'induction de *Pdzrn3-V5* spécifiquement dans l'endothélium après injection de tamoxifène et du gène rapporteur, LacZ. La cre-recombinase est activée par le tamoxifène, ce qui lui permet de cliver le codon STOP flanqué de séquences Flox du gène codant pour tTa, permettant sa synthèse et donc entraînant la surexpression du gène *Pdzrn3-V5*. La vérification de l'induction est faite en vérifiant l'apparition du substrat bleu dans l'endothélium après ajout de X-Gal permettant de vérifier l'activité β -galactosidase.

Enfin les souris *Pdzrn3 iECKO* ont aussi été croisée avec les souris possédant les mutations humaines familiales de la maladie d'Alzheimer : Swedish et de la Preseniline-1 APPSwe/PSEN1dE9 (APP/PS1) pour obtenir la lignée triple mutante *APP/PS1; Pdzrn3 iECKO*. La délétion de *Pdzrn3* est induite par l'injection de Tamoxifène dans les mêmes quantités et concentrations que précédemment.

Les souris sont hébergées en animalerie conventionnelle avec une photopériode de 12h, elles sont hébergées en cage communes sur portoirs ventilés, et ont accès à de l'enrichissement dans chaque cage, et à l'eau et à la nourriture *ad libitum* en accord avec les protocoles internationaux d'hébergement d'animaux de laboratoire. L'expérimentation est conforme aux recommandations du guide des soins et de l'utilisation des animaux de laboratoire et a obtenu l'approbation du comité d'éthique local de l'Université de Bordeaux sous la saisine #11656 pour le projet coinstructeurs et #16699 pour le projet Alzheimer. Dans le respect de la règle des 3R nous nous sommes efforcés de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans ces expérimentations, de plus afin de respecter la notion de raffinement, le bien être des animaux a été pris en compte, de fait les souris ont été

surveillées quotidiennement, celles ayant atteints un des points limites avant la fin des expérimentations ont été sacrifiées et retirées des études.

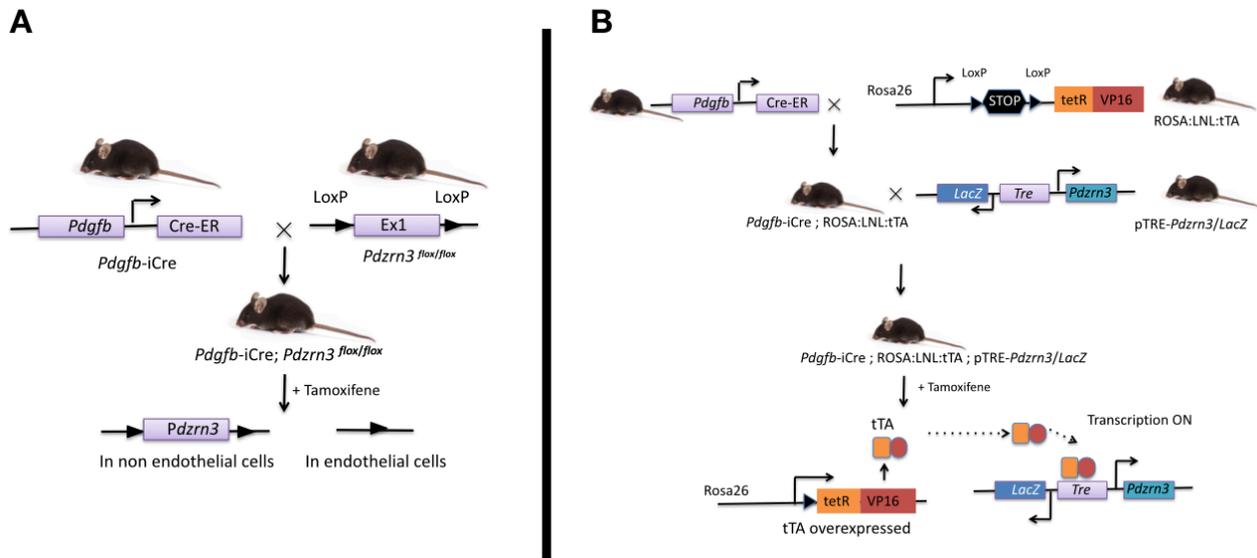


Figure n°21 : Représentation schématique des constructions génétiques des souris utilisées :

(A) Construction génétique des souris *Pdzrn3* iECKO réalisée en croisant des souris *Pdzrn3^{F/F}* et des souris *Pdzrn3^{F/F} Pdgfb-iCre*. La délétion de *Pdzrn3* dans l'endothélium est obtenue par injection de Tamoxifène. (B) Construction génétique des souris *Pdzrn3* iECOE réalisée en croisant des souris *Rosa26^{LoxP/STOP}tTA* et des souris *Pdgfb-iCre* donnant des souris *Pdgfb-iCre ; ROSA26^{LoxP/STOP}tTA* elles-mêmes croisées avec des souris *pTRE-Pdzrn3/LacZ* pour donner des souris *Pdgfb-iCre ; ROSA26^{LoxP/STOP}tTA ; pTRE-Pdzrn3/LacZ*. La surexpression de *Pdzrn3* dans l'endothélium est obtenue par injection de Tamoxifène.

Tamoxifène:

La solution injectée aux souris est réalisée à partir de poudre de Tamoxifène (Sigma-Aldrich #T5648) dilué à 1mg/mL dans de l'huile de tournesol et alcool 96° (9/10;1/10 respectivement). L'injection est réalisée par voie intra-péritonéale 4 à 5 semaines après la naissance chez les souris *Pdzrn3* iECKO (3 injections en trois jours successifs) et 2 semaines après la naissance chez les souris *Pdzrn3* iECOE (2 injections en deux jours successifs).

Procédures chirurgicales :

Accident vasculaire cérébral par injection *in situ* de thrombine (Orset et al., 2007):

Cette expérience d'ischémie-reperfusion permet de quantifier un volume oedemateux suite à l'ouverture de barrière subséquente à l'ischémie. Pour ce faire la souris est tout d'abord anesthésiée dans une cage à induction avec 4% d'isoflurane, le maintien de l'anesthésie est ensuite réalisé à 2% d'isoflurane. La souris est ensuite analgésiée une demi-heure au préalable par injection sous-cutanée de Vétergésic (Vetergésic CÉVA) à une dose de 50 µg/kg. L'animal est ensuite posé sur un cadre stéréotaxique (Stoelting®), une légère craniotomie est ensuite réalisée au-dessus d'un départ de collatérale de l'artère cérébrale médiane (MCA). La dure-mère est ensuite délicatement réclinée pour permettre l'insertion tangentielle d'une micropipette préalablement chargée avec 2 µL de thrombine (Tissucol Baxter 500 UI thrombine/mL). L'injection de thrombine entraîne la disparition visuelle de l'artère indiquant l'apparition d'un caillot. La souris est ensuite monitorée pendant 10 min pour vérifier que le caillot n'est pas lysé. L'animal est ensuite suturé et remis dans sa cage pendant 6h avant sacrifice et récupération du cerveau. 4h avant sacrifice un bolus de 50 µL de FITC-Dextran 40kDa est injecté par voie retro-orbitaire. Après 6h passée dans sa cage la souris est sacrifiée par injection létale d'un mélange d'Exagon (Exagon Axience 400mg/mL)/Lurocaïne (Lurocaïne Vétoquinol 20mg/mL) à une concentration finale de 300mg/kg et 30mg/kg respectivement. La souris est perfusée avec du PBS pendant 5min puis 5 min en formaline 4% tamponnée en phosphate (Phosphate Buffer Formalina 4% Diapath), le cerveau est ensuite récupéré, fixé 4h en formaline (À raison de 1mm/heure de fixation). Il est ensuite sectionné en coupe sériées épaisse de 200 µm d'axe coronal. Les lames sériées sont ensuite imagées avec un AxioZoom Zeiss muni d'une AxioCAM ERC5 pour révéler la diffusion du FITC-Dextran 40 kDa. La plage de diffusion est ensuite

quantifiée en utilisant le logiciel ImageJ (Bethesda Maryland). Chaque coupe possède les deux hémisphère et la plage de fluorescence est quantifiée grâce à la formule suivante:

(Fluorescence moyenne du cortex contro-latéral) + 2SD = Seuil de fluorescence du côté ischémié

Cette formule permet d'éviter le biais pouvant venir de l'auto-fluorescence non homogène dans le cortex des animaux. La valeur ainsi obtenue est le résultat de la fluorescence obtenue uniquement par la diffusion du FITC-Dextran 40kDa. Une somme des valeurs de surface obtenue pour chaque coupe est ensuite calculée permettant de définir une surface de diffusion dans l'entièreté du cortex de l'animal.

Test de Miles

Cette expérience de perméabilité vasculaire épithéliale permet de quantifier l'extravasation de Bleu Evans en conditions standard et en condition de perméabilité augmentée *via* l'utilisation de VEGF.

La veille du test, le dos des souris femelle est épilé pour laisser apparaître la peau à nue. Le lendemain, les souris sont anesthésies à l'isoflurane 4% et l'induction est maintenue à 2%, une injection d'analgésique est administrée par voie sous-cutanée et une injection de Bleu Evans 2% (MERCK AG DARMSTART) est réalisée par voie retro-orbitaire. 3 injection sous cutannée de 50 µL de PBS sont réalisées, en 3 points sur le coté droit du dos de l'animal. 3 injections sous cutannée de 50 µL VEGF-A (20 ng/50 µL) sont réalisées en 3 points similaires sur le coté gauche de l'animal. L'animal est laissé pendant 30 min dans sa cage puis est sacrifié, par dislocation cervicale la peau est récupérée, les sites d'injections sous-cutannés sont récupérés puis pesés. Les sites d'injections sont alors incubés avec

250 µL de formamide (NORMAPUR) overnight à 60-70°C. Le lendemain la DO de 100µL de formamide est observée à 620-740 nm (TECAN Infinite®).

Pose de constricteurs améroïdes sur les carotides communes

Ce modèle de constricteur à pour but de mettre en évidence suite à une hypoperfusion graduelle cérébrale les dommages liés à l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique. La souris est anesthésiée a l'isoflurane 4% et l'induction est maintenue a 2%, une injection d'analgésique est administrée par voie sous-cutanée 30min avant la chirurgie. Une cervicotomie antérieure est ensuite réalisée, la glande salivaire est disséquée en deux, permettant l'accès à la trachée, le muscle trachéal est alors récliné permettant l'accès aux nerfs vagues ainsi qu'aux carotides communes. Les carotides et les nerfs sont ensuite séparés les uns des autres et les constricteurs améroïdes (Research Instrument, Escondido California) sont mis en position sur les carotides communes. Les constricteurs existent avec plusieurs diamètres internes : 0,25 mm; 0,5 mm ou 0,75 mm. L'animal est ensuite suturé et remis dans sa cage après réveil.

Doppler

L'utilisation de laser-doppler nous permet de quantifier le flux sanguin cérébral cortical des souris sur lesquelles ont été posés des constricteurs ou des souris modèles de la maladie d'Alzheimer.

La souris est anesthésiée a l'isoflurane 4% et l'induction est maintenue a 2%, une injection d'analgésique est administrée par voie sous-cutanée. La peau craniale est ensuite découpée pour permettre l'accès aux os du crâne, ce dernier est alors hydraté pour le

rendre transparent et le Doppler transcranien est alors réalisé (Doppler Moor LDI-2®). L'animal est ensuite suturé et remis dans sa cage après réveil.

Injection de Latex-Barium pour visualisation de l'arbre artériel cérébral :

Cette expérience permet de visualiser par injection de latex dans l'arbre artériel la conformation des vaisseaux de gros calibre, ici cérébraux.

Extemporément une solution de latex-barium est préparée avec 2g de sulfate de barium micronisé dilué dans 3mL d'eau bidistillée avec qsp 25 mL Latex Néoprène (Dispersion 671 A). Une solution d'héparine est elle-aussi réalisée extemporément dans du NaCl 0,9% dans lequel est ajouté 1250 UI d'héparine et 0,2 mg de Risordan pour 50mL finaux.

La souris est ensuite anesthésiée profondément avec un mélange de kétamine (Imalgène 1000)/Xylazine (Rompun Bayer) /NaCl 0,9% dans les volume 2,5/1/6,5 respectivement. Equivalent à des quantités de 137,5 mg/kg pour la kétamine et 11 mg/kg pour la xylazine.

Une fois le réflexe de mouvement de la patte abolie par l'anesthésie profonde, la souris subit une thoracotomie, permettant l'accès à l'aorte descendante, cette dernière est canulée en amont de la bifurcation rénale. Une fois la canulation réalisée, la souris est euthanasiée avec un mélange d'exagon/lurocaïne. Une fois la mort de la souris détectée, l'animal est perfusé avec 10 mL de la solution d'héparine/risordan après avoir réalisé une décharge de l'oreillette droite, puis par 10 mL de formaline. La souris est ensuite perfusée avec la solution de latex/barium : 2 à 3 mL en continu pendant 5 min. L'animal est ensuite fixé pendant une demi-heure dans l'acide formique 50%, nécessaire à la polymérisation du latex. Le cerveau est enfin récupéré et conservé dans la formaline jusqu'à acquisition des images au Micro-CT Bruker.

L'acquisition d'images, ainsi que la reconstruction de cette dernière se fait grâce au logiciel Bruker. Enfin le traitement des images 3D est réalisé grâce au logiciel Imaris.

Histologie

Récupération des cerveaux pour l'histologie:

Après sacrifice par injection létale par voie intra-péritonéale d'un mélange d'Exagon/Lurocaïne. L'animal est mis en position de décubitus dorsal, une thoracotomie antérieure est ensuite réalisée, permettant l'accès au coeur. Une décharge de l'oreillette droite est ensuite réalisée, puis le coeur est perfusé depuis l'apex dans le ventricule gauche 5 min en PBS puis 5 min en formaline 4% tamponnée en phosphate, le cerveau est ensuite récupéré, et fixé à l'aide de plusieurs fixateurs différents.

Fixation des tissus pour inclusion en paraffine:

Ce type d'inclusion est le plus utilisé dans les laboratoires d'histologie ou d'anatomopathologie, et ce, pour tous les organes. Cette inclusion permet la réalisation de coupes fines du tissu cérébral, ainsi que la réalisation de colorations et d'immuno-fluorescence. Il est à noter que l'inclusion en paraffine nécessite une étape de chauffage des tissus à 52°C, ce qui peut entraîner la disparition des sites antigéniques. Ici 2 fixateurs différents ont été utilisés : Formaline et Méthanol. Il est à noter que ces différents fixateurs ne permettent pas les mêmes études et/ou expérimentations.

Fixation Méthanol:

Après fixation en Méthanol pendant 3 à 4h (1mm de tissu/h), les échantillons sont baignés 2 fois 30 min dans le xylène (NORAMPUR), puis 2 à 3 fois 30 min dans la paraffine à 52°C. Les échantillons sont ensuite inclus en cassette de paraffine et sont conservés à température ambiante jusqu'à la coupe.

La fixation du tissu en méthanol va entraîner la réduction de son volume général, l'architecture cérébrale s'en trouve déstabilisée, ainsi il n'est pas recommandé d'utiliser ce fixateur pour une étude architecturale du tissu. Néanmoins le méthanol permet lui de garder une « immuno-réactivité » du tissu quasi-optimale, permettant la réalisation d'immuno-fluorescence de meilleure qualité qu'en formaline par exemple. De plus les tissus fixés en méthanol présentent aussi une affinité plus grande pour les colorants, et le lavage de ces derniers n'est pas optimal, ne permettant pas ou peu l'utilisation des techniques de colorations histologiques sur ces tissus.

Fixation formaline:

La conservation des tissus avant inclusion se fait dans l'alcool 50°, puis au moment de l'inclusion les tissus sont incubés 3 fois 30 min en EtOH 80%, 3 fois 30 min en EtOH 95°, puis 3 fois 30 min en alcool 100°. Enfin les tissus sont incubés 2 fois 30 min dans le xylène puis 2 à 3 fois 30min en paraffine toujours à 52°C. Les échantillons sont ensuite inclus en cassette de paraffine et sont conservés à température ambiante jusqu'à la coupe. Les tissus sont ensuite coupés à 7 µm et réhydratés sur gouttes d'eau.

NB: Attention a l'étape de ré-hydratation du tissu cérébral. En effet une réhydratation trop longue entraîne un déchirement du tissu et compromet son étude.

Enfin la fixation en formaline est à privilégier pour les cerveaux, en effet elle permet de conserver une architecture du tissu optimale, elle permet la réalisation d'immuno-fluorescence, moins optimale qu'en méthanol cependant, nécessitant souvent la réalisation d'une étape de démasquage des antigènes. Enfin elle permet une parfaite coloration du tissu.

Fixations des tissus pour inclusion en OCT:

L'inclusion en OCT permet la réalisation de cryosections, technique principalement utilisée pour l'étude des cerveaux. Pour cette inclusion un seul fixateur a été utilisé il s'agit de la formaline. Après fixation 3 à 4h (1mm de tissu/h), les tissus sont cryopréservé deux jours en sucrose 30% et inclus en OCT (OCT compound VWR Chemicals) au dessus de vapeur d'isohexane (HiPerSolv CHROMANORM®HPLC VWR Chemicals) refroidi à l'azote liquide (Air Liquide). Le cerveau est ensuite cryo-sectionné à 20 µm (Cryotome Leica CM3050S) et les lames conservées a -20°C avant marquage.

Traitement des coupes histologiques :

Immuno-fluorescence sur paraffine :

Les lames sont déparaffinées avec 2 fois 10 min de xylène, puis réhydratées avec des bains successif d'alcool à concentration décroissante : 2 fois 2min EtOH 100°, 2 fois 2 min EtOH 95°, 2 min EtOH 80° et enfin eau distillée. Les lames sont ensuite saturées avec tampon de saturation durant 30 min (minimum), plus les lames sont saturées, plus les immuno-fluorescences seront réussies. Le tampon de saturation est composé de sérum d'âne (Interchim #UP77719A) 10%, de Triton X100 (Sigma) 0,5% dans du PBS 1X. Les anticorps primaires sont ensuite incubés sur les lames dans le tampon d'immuno-fluorescence à la

dilution voulue overnight à T° ambiante (cf Liste des anticorps). Le tampon d'immunofluorescence est composé de sérum d'âne 1%, de Triton X100 0,5% dans du PBS 1X. Les lames sont ensuite lavées 3 fois 10 min avec du PBS 1X, puis les anticorps secondaires fluorescents sont déposés sur les lames dans du tampon d'immunofluorescence pendant 2 à 4h à température ambiante. Les lames sont ensuite lavées 3 fois 10 min en PBS 1X puis montées sous lamelle avec du milieu de montage avec ou sans DAPI (Invitrogen, Fluoromount-G® with and without DAPI respectivement).

Antigène	Espèce	Dilution	Fournisseur	Référence
CD31	Rat	1/200	BMA Biomedicals	T-2001
α -SMA	Souris	1/200	Sigma Aldrich	A5691
IB4	Lectine	1/200	Sigma Aldrich	L2895
Aq4	Lapin	1/400	Alomone Labs	AQP-004
CD45	Rat	1/200	Pharmingen	01111D
Albumine	Mouton	1/200	Abcam	Ab8940
Fibrinogène	Lapin	1/400	Dako	A0080
GFAP	Lapin	1/200	ThermoFischer	1-06100
GFAP	Rat	1/400	ThermoFischer	13-0300
Laminine	Lapin	1/400	Dako Cytomation	Z0097
NeuN	Lapin	1/400	Merck	#ABN78
ZO-1	Lapin	1/200	Invitrogen	61-7300
Cx43	Lapin	1/800	Sigma Aldrich	C6219
Cl5	Lapin	1/50	Invitrogen	34-1600
MBP	Rat	1/200	Abcam	Ab7349
Podocalyxine	Chèvre	1/300	R&D	AF1556
Glut1	Lapin	1/400	ThermoFischer	PA1-1063
PDGFR β	Lapin	1/100	Santa Cruz	SC-432
Iba-1	Lapin	1/400	Fujifilm	019-19741

AB (6E10)	Mouse	1/500	Biologend	803001
VE-cadhérine	Goat	1/200	R&D	AF1002
β-Galactosidase	Goat	1/200	MP biomedicals	56028

Figure n°22 : Liste des Anticorps Primaires utilisés :

Espèce hôte	Réactivité	Fluorescence	Fournisseur	Référence
Âne	Mouse	488 nm	Invitrogen	A-21202
Âne	Mouse	568 nm	Invitrogen	A-10037
Âne	Mouse	647 nm	Invitrogen	A-31571
Âne	Lapin	488 nm	Invitrogen	A-21206
Âne	Lapin	568 nm	Invitrogen	A-10042
Âne	Lapin	647 nm	Invitrogen	A-31573
Âne	Chèvre	488 nm	Invitrogen	A-11055
Âne	Chèvre	568 nm	Invitrogen	A-11057
Âne	Chèvre	647 nm	Invitrogen	A-21447
Âne	Rat	488 nm	Invitrogen	A-21208
Chèvre	Rat	568 nm	Invitrogen	A-11077
Chèvre	Rat	647 nm	Invitrogen	A-21247

Figure n°23 : Liste des anticorps Secondaires utilisés :

Immuno-fluorescence sur cryosections:

Les cryosections sont sorties du congélateur à -20°C, elles sont laissées sur paillasse 5min pour qu'elles reviennent à température ambiante, elles sont ensuite lavées 5 min en PBS pour retirer toute trace d'OCT gênant les marquages. Une fois l'OCT éliminé les lames sont traitées de la même manière que pour les immuno-fluorescence sur paraffine.

La réalisation de sections de 20µm permet d'obtenir des images en 3D du réseau artériel et permet une meilleure étude de ce dernier dans la hauteur du tissu.

Colorations Histologiques

Les colorations histologiques ont été réalisées sur les coupes de cerveaux fixés en formaline, inclus en paraffine et coupés à 7µm. Les lames sont tout d'abord déparaffinées (cf déparaffinage immuno-fluorescences sur paraffine).

Hémalun & Éosine

Une fois déparaffinées les lames sont réhydratées dans de l'eau distillée, les lames sont ensuite incubées dans l'hémalun pendant 2 min, les lames sont ensuite lavées 2 min sous l'eau du robinet pour faire bleuir l'hémalun. Les lames sont ensuite incubées 2 min dans l'éosine, elles sont ensuite lavées par 3 bains séquentiels d'alcool 100° de 2 min chacun puis sont déshydratées dans 2 bains séquentiels de xylène de 5 min et sont ensuite montées sous lamelles avec de l'Eukitt®, produit de montage.

Violet Crésyl

La coloration Violet Crésyl est obtenue par dilution d'acide acétique pur dans de l'eau distillée à 0,6% (Solution A). Ainsi qu'en mélangeant de l'acétate de sodium 10% dans de l'eau distillée (Solution B), les deux solutions A et B sont ensuite mélangées à 9/1 respectivement et la solution est titrée à pH = 3,7 (Solution C). La poudre de violet Crésyl (Pur Acros Organics) est ensuite diluée à 1% dans de l'eau distillée (Solution D). Les solutions C et D sont ensuite mélangées à V/V pour obtenir une solution finale de Violet Cresyl à 0,5%.

Les lames sont ensuite déparaffinées, puis incubées 15 min dans la solution finale de Violet Crésyl, elles sont ensuite lavées à l'eau distillée pendant 2 min et deshydratées en alcool 100° pendant 3 fois 2 min. Enfin les lames sont incubées 2 fois 5 min en xylène puis montée sous lamelle avec de l'eukitt.

Coloration de Perls

La coloration de Perls nécessite deux réactifs, une solution de d'Acide Chlorhydrique aqueuse à 20%, réalisée par le mélange d'acide chlorhydrique concentré, avec de l'eau distillée (Volume 1/4 respectivement) d'une part. Ainsi qu'une solution de Ferrocyanure de Potassium 10% obtenue par une dilution de Ferrocyanure de potassium trihydrate ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) dans de l'eau distillée d'autre part.

Après déparaffinage, les coupes sont hydratées dans de l'eau distillée. L'acide chlorhydrique et le ferrocyanure de potassium sont mélangés à V/V extemporanément et les coupes y sont incubées durant 20 min. Les coupes sont ensuite lavées 3 fois en eau distillée. Enfin les lames sont contre-colorées au Nuclear Fast Red pendant 5 min puis rincées 2 fois en eau distillée. Elles sont ensuite deshydratées dans un bain d'alcool 95° de 2 min puis dans 2 bains séquentiels d'alcool 100° de min chacun. Enfin les lames sont incubées 2 fois 5 min en xylène et montées avec de l'eukitt.

Acquisition d'images et traitement:

Les lames sont ensuite imagées à l'aide de plusieurs microscopes :

Les champs larges sont imagés à l'aide d'un Axiozoom muni d'une caméra AxioCam ERc5.

Les champs plus petits sont obtenus avec le Video-microscope Zeiss Axio Observer. Z1 muni d'une caméra Hamamatsu Digital Camera C11440 ORCA-Flash4.0. Enfin les images de microscopie confocales sont obtenues avec le microscope Confocal Zeiss Imager.Z2 LSM700. Les images de microscopie optique sont elles obtenues avec le microscope à lumière transmise Zeiss Axio ScopeA.1 équipé d'une caméra AxioCam 105 color. Toutes les images sont obtenues à l'aide du logiciel Zeiss ZEN. Les seuillages et quantifications des images d'immuno-fluorescence ainsi que des images de microscopie optiques sont réalisées avec les algorithmes par défaut de ImageJ.

Biologie Moléculaire :

Isolement de vaisseaux cérébraux murins :

Pour les expérimentations de biologie moléculaires, les souris ne sont pas perfusées, elles sont euthanasiées par dislocation cervicale et le cerveau est instantanément récupéré. Les vaisseaux sanguins cérébraux sont isolés à partir de broyats de cerveaux de souris dans un récipient en verre (Potter Sigma Aldrich). Depuis le prélèvement de cerveau jusqu'à leur traitement, les échantillons sont conservés sur glace à 4°C pour limiter l'altération des tissus.

Lors de la récupération, les bulbes olfactifs ainsi que le cervelet sont disséqués car ils ne sont pas utilisés pour les expérimentations, le reste de l'encéphale est alors prélevé et immédiatement conservé dans du PBS froid. Dans un volume de 2 mL de Tampon

HBSS/HEPES 0,1 M pH=7,4/0,1% BSA (Tampon A), les cerveaux sont broyés à l'aide d'un pilon (± 70 homogénéisations), puis le broyat est transféré dans un tube de 15mL, complété à 4mL de tampon A et d'une préparation de Dextran (150 kDa, 30%) pour obtenir un volume final de 10mL. La suspension est centrifugée à 4°C, 3000g, pendant 25 minutes. À l'issue de cette première centrifugation, le surnageant est transféré dans un tube de 15mL et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Les culots obtenus à l'issue de ces deux centrifugations contiennent la fraction vasculaire, ils sont resuspendus dans 2 mL de tampon A, et rassemblés. Le surnageant restant, contenant la myéline et l'essentiel du parenchyme neuronal, est éliminé. La fraction vasculaire est transférée sur un filtre de nylon (20 μ m) préalablement saturé à l'aide du tampon A. Les vaisseaux retenus sur le filtre sont resuspendus avec 10mL de tampon A. Les préparations de vaisseaux sont utilisées ensuite soit pour l'analyse de l'organisations des protéines de jonctions inter-endothéliales après marquages soit pour analyse protéique par Western Blot, ou encore transcriptionnelle par RT-qPCR.

Ce protocole permet la purification des fragments des vaisseaux cérébraux, tout en maintenant l'intégrité de ces derniers. Il est à noter que ces vaisseaux isolés possèdent encore les différents composants de la barrière hémato-encéphalique et ne représentent pas une purification de cellules endothéliales pures, mais contient aussi des pericytes, des SMC ainsi que des astrocytes.

Immunomarquage sur vaisseaux isolés :

Les vaisseaux isolés sont repris dans une solution de Matrigel (Corning®) dilué au 10e dans le Tampon A. 125 μ L de cette solution est ensuite déposé dans un puit de culture cellulaire sur Labteck, cette dernière est ensuite placée à 37°C pendant 30 min pour permettre la

polymérisation du matrigel. Les préparations sont ensuite fixées en formaline pendant 10 min, puis saturées avec la solution de saturation. Chaque puit est ensuite incubé avec des anticorps primaires dans le tampon d'immuno-fluorescence à la dilution voulue overnight à 4°C. Après lavage en PBS, l'incubation des secondaires est réalisée durant 2h à température ambiante. Les noyaux cellulaires sont ensuite marqués grâce à une solution de Hoechst au 1/10 000e pendant 20min (longueur d'excitation du Hoechst = 350 nm).

Ces marquages sont ensuite imagés grâce au microscope Confocal. La reconstruction des piles d'images est faite grâce au logiciel Imaris® et les analyses sont réalisées grâce au logiciel ImageJ.

Extraction protéique et Western Blot:

Une évaluation de l'expression protéique des protéines contenues dans les jonctions serrées (Cl-5 et occludine), des jonctions adhérentes (Ve-cadhérine) ainsi que des péricytes (NG2), des cavéoles (Cav-1) ainsi que des CML (alpha-SMA) a été réalisée sur les vaisseaux isolés par Western Blot.

A l'issue de la dernière étape de centrifugation du protocole d'isolement de vaisseaux, le culot est pris dans 150 µL de tampon RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay) (PBS10X/NaDéoxycholate 0,5% / NP401% / SDS 0,1%) additionné d'antiprotéases (AEBSF 1/500; Leupeptin 1/1000; Apropeptin 1/1000; Orthovanadate de sodium 1/1000), vortexé pendant 10 sec, la lyse se faisant sur glace pendant 1h. Le lysat ainsi obtenu est ensuite centrifugé à 4°C, à 1000 g pendant 10 minutes. Le surnageant contenant les protéines d'intérêt est ensuite récupéré et un dosage protéique est ensuite effectué pour chaque condition, de manière à homogénéiser la quantité de protéines chargée dans les

puits du gel de concentration. Le dosage est effectué via la méthode BCA (Bicinchoninic Acid Assay), méthode colorimétrique mettant en présence les protéines du lysat et un réactif chromogène sensible au cuivre réduit par ces protéines en milieu alcalin. La lecture se fait au spectrophotomètre à 562 nm.

Les lysats sont ensuite déposés sur un gel de concentration (stacking gel 5%), coulé au-dessus du gel de séparation SDS-PAGE à 7,5% de polyacrylamide pour l'analyse des protéines de poids moléculaire supérieur à 45 kDa, et à 12% pour les protéines de poids moléculaire inférieur. La migration des protéines se fait dans un tampon composé de Tris/glycine/SDS à 150 V. On procède ensuite à un transfert de protéines sur une membrane de Polyfluor de Vinylidène (PVDF) dans un tampon de Tris/glycine/éthanol à 100V pendant 1h.

Un immunomarquage primaire visant à analyser le niveau d'expression des protéines est réalisé dans un tampon composé de PBS/tween 0,05%/Lait2% contenant les anticorps primaires utilisés à la dilution voulue. Le lendemain, le marquage secondaire est réalisé et analysé par spectrophotométrie infra-rouge (Odyssey, LI-COR Biosciences).

Extraction d'ARN, rétrotranscription et qPCR:

La mesure de l'expression transcriptionnelle des marqueurs de la BHE et des modulations de son intégrité dans le contexte de la démence chez la souris, a été réalisé par RT-qPCR. Les ARN ont tout d'abord été extraits selon la méthode Phénol-Chloroforme. Pour chaque condition, ont été utilisés les vaisseaux d'une seule souris, lysés dans 1 mL de Trizol additionné de 200 μ M de chloroforme, centrifugés à 13 000 g à 4°C, pendant 15min. À l'issue de cette étape, 350 μ L sont prélevés de la phase intermédiaire contenant les acides nucléiques et notamment les ARN. Cette phase est additionnée d'une solution d'isopropanol/glycogène (V/V), centrifugée à 13 000G à 4°C pendant 10min. Après

traitement à la DNase, la transcription inverse est réalisée sur 0,5 µg de matériel ARN. La PCR quantitative a permis de déterminer par amplifications des ADNc, le taux initial des ARN correspondants dans le vaisseau isolé par la méthode de quantification relative des $\Delta\text{-}\Delta\text{-Ct}$. Les amorces des ADNc utilisées sont référencées dans le tableau correspondant (Fig n°24).

Gène	type	Séquence	Gène	type	Séquence
Marqueurs vasculaires et neuronaux			Transporteurs et récepteurs de la BHE		
<i>P0</i>	F	GCGACCTGGAAGTCCAAC	<i>Mfsd2a</i>	F	GCACTGAGCAGCTGTTCTTC
	R	CCATCAGCACCACAGCCTTC		R	GTTTCTACATTAGTGTCCGAGC
<i>Tuj</i>	F	TCAGCGATGAGCACGGCATA	<i>Mdr1a</i>	F	GATAGGCTGGTTGATGTGC
	R	CACTCTTCCGCACGACATC		R	TCACAAGGGTTAGCTCCAG
<i>Glia</i>	F	CTGGAGAAGCCATGGTTGC	<i>Mrp1</i>	F	TGATACAGCTTGAACGGAGG
	R	CTCCAGGAAGTGAGAGAGCT		R	AGCACAAGGGTGAAGTACAG
<i>Pecam</i>	F	AGGGGACCAGCTGCACATTAG G	<i>Lrp1</i>	F	ACTATGGATGCCCTAAAACCTTG
	R	AGGCCGCTTCTCTTGACCACT T		R	GCAATCTCTTTCACCGTCACA
<i>Cldn5</i>	F	GCA AGG TGT ATG AAT CTG TGC T	<i>Lrp5</i>	F	AAG GGT GCT GTG TAC TGG AC
	R	GTC AAG GTA ACA AAG AGT GCC A		R	AGA AGA GAA CCT TAC GGG ACG
<i>Tjp1</i>	F	TTTGAGAGCAAGCCTTCTGC	<i>Cav-1</i>	F	TTGCCATTCTCTCCTTCCTG
	R	AGCATCAGTTTCGGGTTTTC		R	TCTCTTCTGCGTGCTGATG
<i>Occludin</i>	F	GTCCGTGAGGCCTTTTGA	<i>Cav-2</i>	F	CTCAAGCTAGGCTTCGAGGA
	R	GGTGCATAATGATTGGGTTTG		R	ACAGGATACCCGAATGAAG
Régulateurs de la voie Wnt/Frizzled			Ligands de la voie Wnt/Frizzled		
<i>Ndp</i>	F	GTG AGG GGC ACT GCA GCC AG	<i>Wnt3</i>	F	CAAGCACAACAATGAAGCAGGC
	R	CAG CGC AGA CGC AGA GCC TT		R	TCGGGACTCACGGTGTTCCTC
<i>Lef1</i>	F	ACCCGTGATGGGATAAACAG	<i>Wnt5a</i>	F	CTCCTTCGCCAGGTTGTATAG
	R	TCCTGAAATCCCCACCTTC		R	TGTCTTCGCACCTTCTCCAATG
<i>Axin2</i>	F	AACCTATGCCGTTTCCTCT	<i>Wnt7a</i>	F	CTTCATGTTCTCCTCCAGGATCTTC
	R	CTGGTCACCCAACAAGGAGT		R	CGACTGTGGCTGCGACAAG
<i>Fzd4</i>	F	TTC CTT TGT TCG GTT TAT GTG CC	<i>Wnt7b</i>	F	TCTCTGCTTTGGCGTCTCTAC
	R	CTC TCA GGA CTG GTT CAC AGC		R	GCCAGGCCAGGAATCTTGTTG
<i>Gpr124</i>	F	CCCCTCATAATCTGCGGCAT			
	R	ACTACTCCTGAGCCTGGTGG			
<i>Pdzrn3</i>	F	CTGACTCTGTCTGCATCGGGACTC			
	R	ATGGGCTCCTGGCTGTCTTGAAAGC			

Figure n°24 : Tableau des séquences des amorces utilisées en RT-qPCR :

Comportement

Pour toutes expérimentations de comportement les souris sont tout d'abord habitués à être manipulées par un expérimentateur, pour se faire les animaux sont habitués à la pièce où se dérouleront les expérimentations et sont ensuite habitués à l'expérimentateur une fois par jour, au minimum une semaine avant le début des test (Crawley, 2007). De plus les souris sont séparées en cage individuelle et laissées 30 min dans la pièce d'expérimentation avant le début de chaque test de comportement, sans que le(s) labyrinthe(s) soi(en)t visible(s).

Novel Object Recognition

Pour évaluer la capacité des animaux à établir une carte spatiale de leur environnement ainsi que pour évaluer leur capacité mnésique, et de reconnaissance, les souris ont subi un test de reconnaissance de nouvel objet.

Pour se faire les souris sont tout d'abord placées dans un « Open Field » dont les dimensions sont: 45 x 45 x 54 cm, pendant 10 min elles sont ensuite remises dans leur cage. Cette habitude est réalisée 1 fois par jour pendant 3 jours consécutifs, le quatrième jour les souris sont remise dans « l'Open Field » dans lequel deux objets préalablement testés, parfaitement similaires, ont été placés et ce pendant 10 minutes. A la fin de cette session les animaux sont replacés dans leur cage pendant 30 min, un objet de l'arène est ensuite remplacé et les souris sont remise dans « l'Open Field » pendant 5 min. Les souris ayant passé moins de 20 sec à proximité des 2 premiers objets sont retirés de l'étude. Aussi une alternance de l'objet retiré a été mis en place pour éviter un potentiel effet de côté lors du test.

Un index de reconnaissance est ensuite calculé vis à vis du temps passé près du Nouvel Objet de la façon suivante :

$(T_{\text{new}} - T_{\text{old}}) / (T_{\text{new}} + T_{\text{old}})$ donnant une valeur comprise entre 1 et -1.

Y-Maze :

Deux protocoles différents ont été utilisés pour visualiser la capacité mnésique des souris. Selon le protocole de Nicole et al., 2016.

Les souris sont tout d'abord déposées dans le bras de départ du labyrinthe en Y de dimensions 35 x 8 x 14 pour chaque bras, un bras est fermé et la souris est autorisée à explorer pendant 5 min complètes. À la fin du temps imparti l'animal est récupéré et reposé dans sa cage pour 10min, il est ensuite remis dans le bras de départ du labyrinthe en Y et cette fois ci les deux bras sont ouverts. La souris est autorisée à explorer le labyrinthe pendant 2 min.

Le deuxième protocole de labyrinthe en Y est lui moins stringent en effet, ici l'étape d'habituation est réalisée non pas une seule fois mais trois fois en vue d'augmenter les chances de l'animal de pouvoir encoder les positions de l'ancien et du nouveau bras.

L'index de reconnaissance est ensuite calculé de la même façon pour les deux protocoles de labyrinthe en Y, de la façon suivante :

$(T_{\text{new}} - T_{\text{old}}) / (T_{\text{new}} + T_{\text{old}})$ donnant ici aussi un rapport compris entre 1 et -1 avec 1 l'animal n'a exploré que le nouveau bras et -1 l'animal n'a pas du tout exploré le nouveau bras.

Il est à noter que le labyrinthe est doté de repères disposés au-dessus des bras d'intérêts. De plus une alternance du nouveau et de l'ancien bras ont été mis en place pour éviter le potentiel biais d'un « effet de bras ». Enfin les souris ont réalisé un test dit de « la falaise » (Fox, 1965) dans lequel les souris sont placées sur une plateforme surélevée dont les bordures sont ouvertes. Ce test permet de vérifier que les souris sont effectivement douées de vision et que les résultats obtenus ne sont pas la résultante d'un défaut de vision des animaux. En effet si la souris n'est pas/plus capable de voir, elle tombe de la plateforme. Ici aucune souris sur laquelle a été placé un constricteur n'est tombée. Nous en avons conclu que le modèle de constricteurs n'entraîne pas de défaut de vision chez nos souris.

Nesting

Les souris sont séparées une heure avant la fin de la période de jour de l'animalerie en cage individuelle, un carré de coton de 5 x 5 x 0,5 cm est ajouté à chaque cage. Le lendemain la capacité des souris à construire un nid est alors notée de 1 à 5 selon le protocole de Deacon (Deacon, 2006) de la manière suivante :

- 1: La souris n'a quasiment pas touché au bout de coton.
- 2: La souris a déchiré moins de la moitié du coton.
- 3: Jusqu'à 90% du bout de coton a été déchiré mais aucun lieu de nid n'est observable.
- 4: Un nid est observable mais n'est pas rond, ou les bords de ce derniers ne sont pas plus haut que l'animal une fois sur le flan.
- 5: Le nid est parfaitement rond et les bords sont plus haut que l'animal une fois sur le flan.

NB: Il est possible d'ajouter des demi-crans dans la notation quand l'expérimentateur hésite entre deux notes.

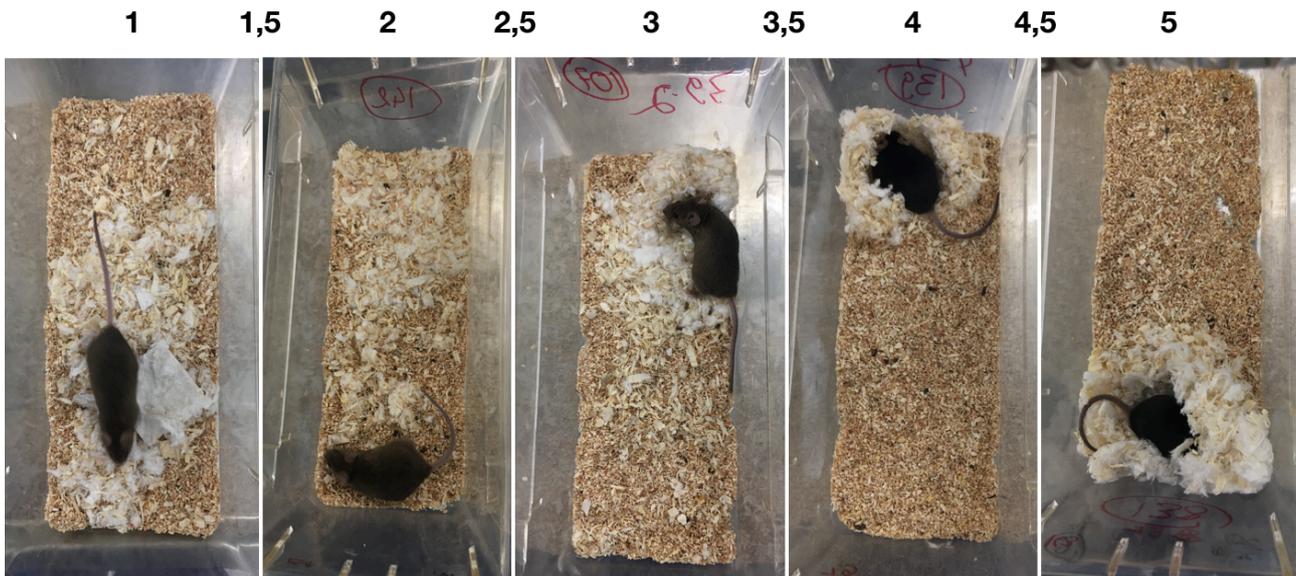


Figure n°25 : Photographies représentatives des différents degrés de gradation d'un test de "Nesting" :

IRM :

Les souris sur lesquelles ont été posés des constricteurs ont pu passer une IRM sur une IRM spéciale petit rongeur Brucker 7 tesla. Pour se faire ces souris ont reçu des constricteurs en titane autour de leurs carotides communes. Plusieurs séquences d'images ont été prises notamment T1, T2, T2* ainsi qu'une angiographie avec produit de contraste. Et ce à 0, 7, 14, 21 et 28 jours après la pose de constricteurs. Pour l'acquisition des images d'IRM les souris ont été induites dans une cage à induction à 4% d'isoflurane puis ont été maintenues anesthésiées à 2% d'isoflurane pendant toute la durée d'acquisitions des différentes séquences soit 1h30. Pour l'injection de gadolinium, ce dernier a été injecté par voie rétro-orbitaire à un volume de 100 μ L.

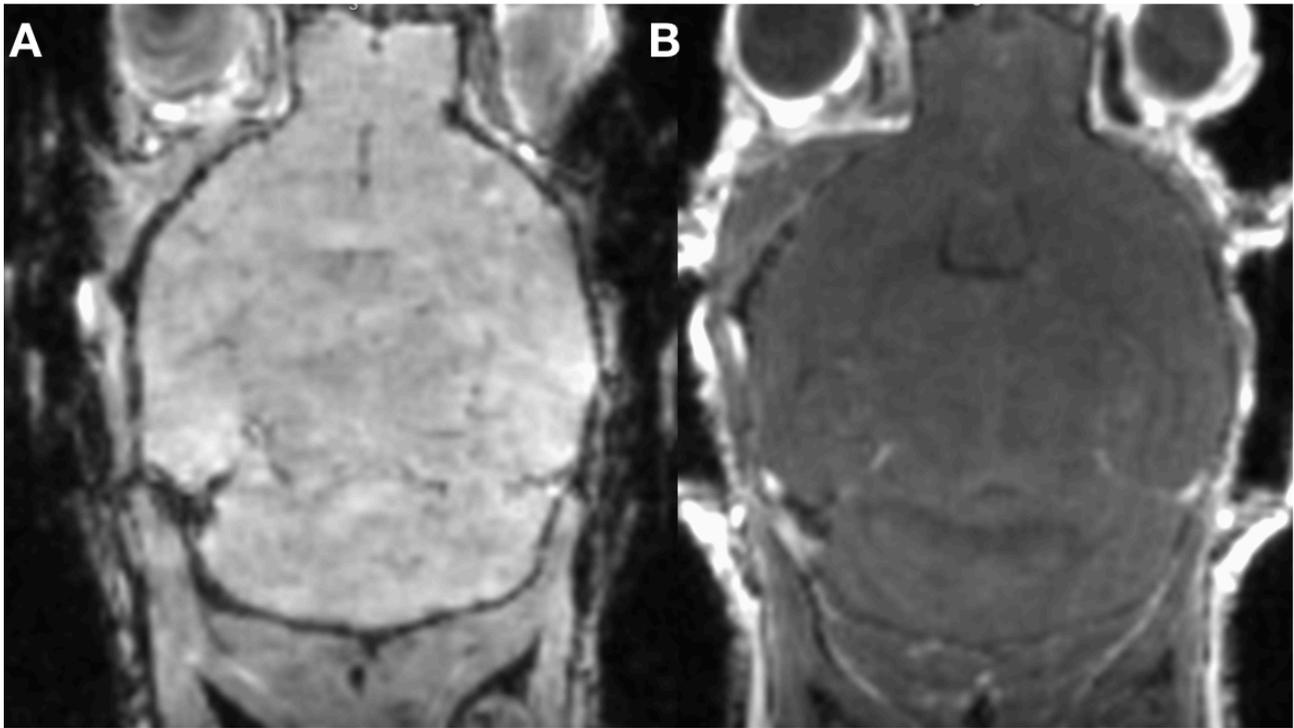


Figure 26: L'IRM ne montre pas de défaut cérébraux 28 jours après la pose de constricteurs.

Images représentatives des cerveaux de souris C57bl/6J sur lesquelles ont été posés des constricteurs 28 jours après la pose. (A) Séquence IRM T2. (B) Séquence IRM T1 avec injection de gadolinium.

Analyses Statistiques :

Les analyses statistiques présentés dans ce travail ont été obtenus à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Elles sont le résultat de la moyenne (\pm écart-types) d'au moins 5 individus pour les études de mortalités ainsi que les études histologiques d'immunofluorescence, le test statistique utilisé pour comparer les souris d'intérêts à leur contrôle est le t-test de Student. Pour la comparaison des taux d'expression transcriptionnels des différents biomarqueurs analysés, les données sont présentées sous forme de moyennes (\pm écart-types) sur au moins 3 expériences indépendantes. Les données issues du calcul (Δ - Δ -Ct) ont été comparées par un t test ou un test non paramétrique de Mann-Whitney lorsque la taille de l'échantillon était inférieure à 5. L'expression de la Cl-5 au niveau des jonctions inter-endothéliales dans les différentes conditions a été comparée par régression non-linéaire. Enfin les analyses comportementales ont été analysés statistiquement par

l'analyse de variance Two-Way ANOVA. Les analyses statistiques réalisées durant l'entièreté de ce travail sont faites au risque $\alpha = 5\%$.

Résultats :

Les travaux réalisés ici s'inscrivent dans la dynamique de recherche du laboratoire d'accueil, en effet les premiers résultats obtenus montrent un rôle de PDZRN3 dans le contrôle de la perméabilité vasculaire cérébrale, bien que le mécanisme d'action de la protéine PDZRN3 ne soit pas encore entièrement décrypté. Nous avons alors voulu continuer en posant l'hypothèse suivante, la perméabilité vasculaire cérébrale est un des facteurs cruciaux de la mise en place de la démence qu'elle soit de type vasculaire ou encore de type Alzheimer. Une modification de cette perméabilité obtenue soit par surexpression ou délétion de la protéine PDZRN3 dans l'endothélium devrait donc permettre de moduler les dégâts cérébraux visualisés chez les patients, dans un modèle d'hypoperfusion chronique cérébrale d'une part, puis dans un modèle de maladie d'Alzheimer d'autre part.

Perméabilité vasculaire des souris *Pdzrn3* *iECKO* :

Nous avons tout d'abord voulu évaluer la perméabilité générale des souris délétées pour *Pdzrn3* dans l'endothélium (*Pdzrn3* *iECKO*). Pour vérifier si comme lors des expérimentations de MCAO, l'ablation de *Pdzrn3* dans l'endothélium entraînerait une baisse de la perméabilité vasculaire. Pour se faire un test de Miles (Radu and Chernoff, 2013) a été réalisé sur les mutants délétés (*Pdzrn3* *iECKO*) ainsi que leur contrôles « littermates ». Il n'y a pas de différence significative entre les littermates et les souris *Pdzrn3* *iECKO* dans la diffusion du Bleu Evans en condition PBS. Néanmoins les souris littermates présentent une induction significative de la diffusion du Bleu Evans en condition VEGF-A vs PBS. Enfin en condition VEGF-A les souris *Pdzrn3* *iECKO* présentent une différence significative vis-à-vis de leurs contrôles dans cette condition. Cette expérience

démontre une perméabilité réduite des souris *Pdzn3 iECKO* en condition VEGF-A. Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus préalablement par le laboratoire lors des expérimentations de MCAO (Sewduth et al., 2017).

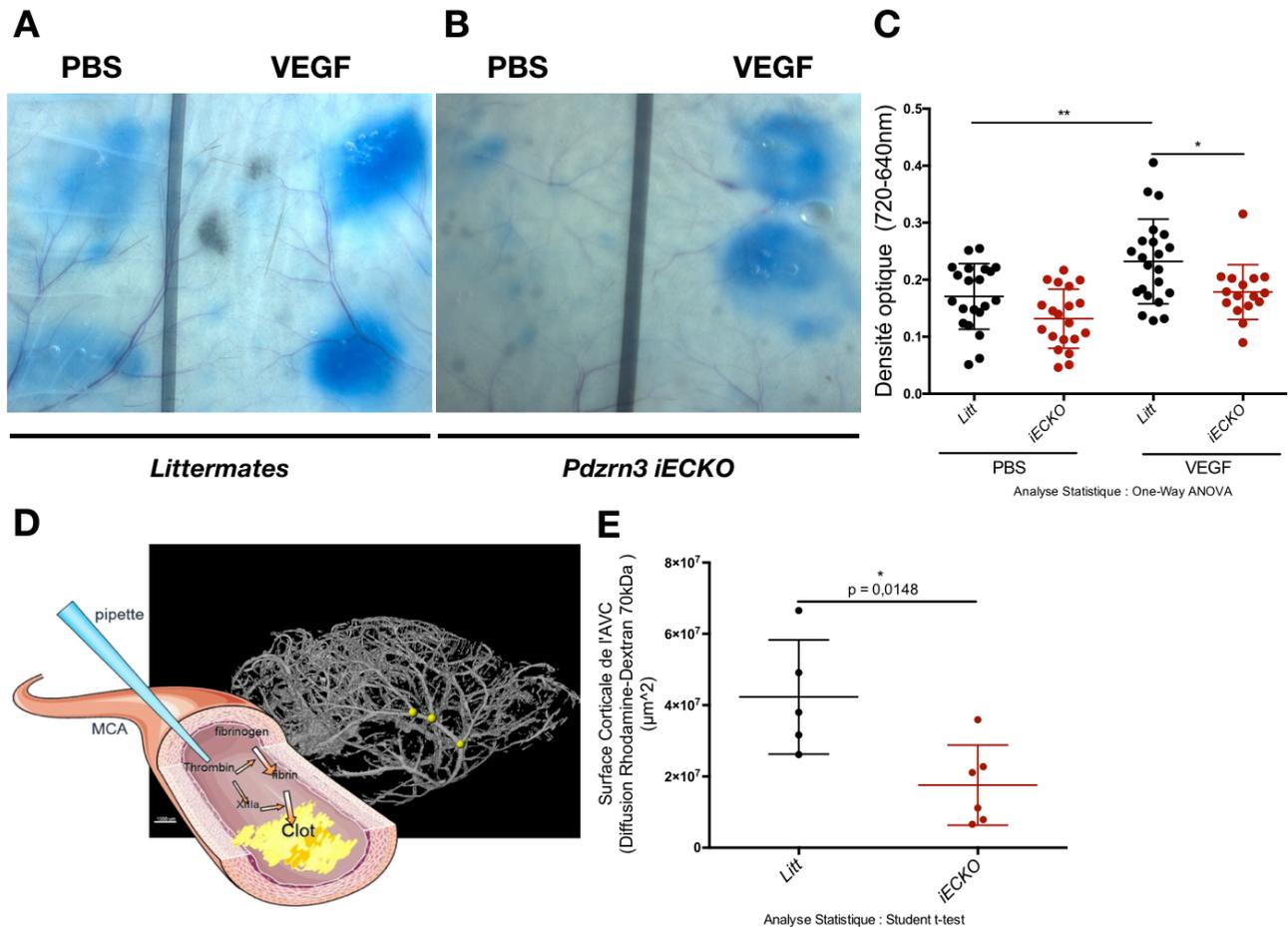


Figure n°27 : La délétion de *Pdzn3* dans l'endothélium entraîne une non-induction de la perméabilité vasculaire de la peau dorsale des souris en condition VEGF :

(A) Peau dorsale de souris après injection de Bleu Evans par voie intraveineuse puis de PBS sous-cutané (gauche) ou de VEGF-A (droite) sur les souris littermates. (B) Peau dorsale de souris après injection de Bleu Evans par voie intraveineuse puis de PBS sous-cutané (gauche) ou de VEGF-A (droite) sur les souris *Pdzn3 iECKO*. (C) Densité optique du formamide après incubation sur la nuit des morceaux de peau dorsale des souris injectées de Bleu Evans. Chaque point correspond à un patch de peau dorsale de souris. (n=6/groupe). (D) Représentation schématique de la technique d'AVC par injection *in situ* de thrombine. Les bulles jaunes correspondent aux sites potentiels d'injection de la thrombine. (E) Résultats des expériences d'injections de thrombine dans l'artère cérébrale médiane (n= 5 vs 6 Littermates vs *Pdzn3 iECKO*) Moyenne \pm écarts-types. Analyse statistique One-Way ANOVA. $p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; n.s = non significatif.

Nous avons ensuite voulu valider cette réduction de perméabilité de la peau de souris après la délétion de *Pdzn3* dans la cellule endothéliale, et ce, au niveau cérébral. Pour ce faire, le modèle d'AVC par injection intra-artérielle de thrombine (modèle Orset et al., 2007) a été utilisé. Six heures après induction de l'AVC par chirurgie les souris *Pdzn3 iECKO* montrent un front de diffusion cortical du FITC-Dextran 40 kDa significativement réduit de moitié vis-

à-vis de leur contrôles littermates, démontrant une fois de plus dans le cadre cérébral, une diminution significative de l'œdème vasogénique, impliquant une réduction de la perméabilité vasculaire des souris *Pdzrn3 IECKO*. Ce résultat est en adéquation avec les résultats obtenus préalablement par le laboratoire (Sewduth et al., 2017) où après occlusion de l'artère cérébrale médiane (MCAO pour Medial Cerebral Artery Occlusion) les souris *Pdzrn3 IECKO* démontraient une surface de diffusion significativement réduite des IgG vis à vis de leurs contrôles littermates.

Modèle d'hypoperfusion cérébrale : Constricteurs améroïdes :

l) La pose de constricteurs améroïdes sur les carotides communes de souris entraîne des dommages cérébraux comparables à ceux des patients atteints de démence d'origine vasculaire :

La bibliographie ayant montré la présence d'un flux cérébral réduit ainsi qu'une augmentation de perméabilité de la BHE chez les patients atteints de démence d'origine vasculaire (Balestrini et al., 2013; Cheng et al., 2012; Iadecola, 2013; Johnston et al.; Marshall et al., 2012; Schuff et al., 2009), nous avons développé un modèle chirurgical d'hypoperfusion cérébrale par pose de constricteurs carotidiens à constriction graduelle (Hattori et al., 2014, 2015). La constriction totale de la carotide est achevée en 10 à 12 jours post-opération entraînant une réduction graduelle du flux sanguin cérébral. Ce modèle d'hypoperfusion cérébrale par réduction du flux des artères carotides communes n'est pas le premier à avoir été mis en place. En effet plusieurs autres dispositifs et/ou chirurgies ont déjà été décrites dans la littérature (Venkat et al., 2015). Nous avons choisi ce modèle de constricteur améroïde car il permet une constriction **graduelle** des artères carotides communes. Là où les ligations de ces artères (extrêmement létales) ou encore la pose de micro-ressorts entraînent une phase de réduction du flux aiguë, compensées en quelque

jours pour un retour à un flux quasi-normal (Hattori et al., 2014, 2015); nos dispositifs entraînent une réduction graduelle du flux pouvant aller jusqu'à 40% du CBF normal (Fig n°27). Il faut néanmoins ajouter que la pose de constricteurs n'élimine pas la compensation réalisée par l'augmentation du diamètre des artères basilaires perfusant elles-aussi le polygone de Willis chez la souris, expliquant pourquoi la fermeture des constricteurs et donc l'absence totale de flux dans les carotides communes n'est pas létale pour l'animal.

Il est à noter qu'à l'instar de l'Humain le polygone de Willis n'est pas complet dans toutes les souches murines. En effet la souche de souris C57BL/6J possède par exemple les communications postérieures du polygone de Willis P1 (Fig n°X). Enfin les résultats d'expériences d'ischémie sont directement corrélés à la vascularisation des souris, cette dernière étant différente d'une souche à l'autre, un soin tout particulier est donc nécessaire quant au choix de la lignée murine utilisée pour ce genre d'expérimentations (Barone et al., 1993; Qian et al., 2018).

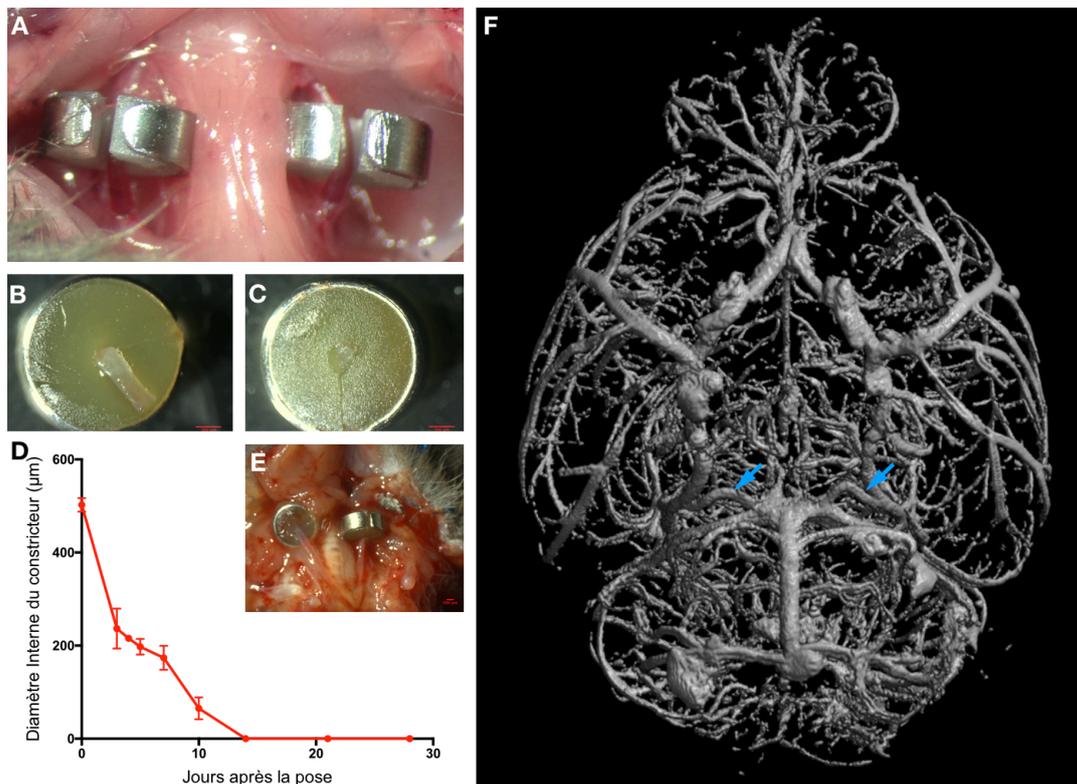


Figure n°28 : La pose de constricteurs améroïdes entraîne une occlusion totale des carotides communes de souris en 28 jours :

(A) Photographie des constricteurs améroïdes de diamètre interne 0,5 mm insérés sur les deux carotides communes à la fin de la chirurgie. (B) Photographie d'un constricteur améroïde de 0,5 mm de diamètre interne, 28 jours après la pose, occlut autour une carotide commune. Barre d'échelle = 500 μm (C) Photographie d'un constricteur améroïde de 0,5 mm de diamètre interne, 28 jours après la pose, occlut, dont la carotide a été extraite. Barre d'échelle = 500 μm (D) Photographie de constricteurs améroïdes d'un diamètre interne de 0,5 mm, *in situ* après perfusion intra-cardiaque démontrant que l'occlusion des constricteurs empêche le passage du sang. Barre d'échelle = 500 μm (E) Cinétique de fermeture des constricteurs après récupération. Les constricteurs sont occlus en 10-14 jours post-opération. (F) Image de micro-tomographie après injection de Latex-Barium en rétro-aortique montre la présence de communication postérieure P1 du polygone de Willis chez les souris en fond génétique C57BL/6J (Flèches bleues).

Une étude préliminaire a été menée avec des constricteurs de 3 diamètres internes différents : 0,25 ; 0,5 et 0,75 mm. Le diamètre moyen d'une carotide de souris est de 500 μm. Les souris sur lesquelles ont été posés les constricteurs de diamètre interne de 0,25 mm sont décédées au bout de 2 jours et présentaient des événements ischémiques importants ne permettant pas l'étude de la démence d'origine vasculaire. Les souris présentaient des signes d'ischémies sévères de la substance blanche notamment du Corps Calleux et du Caudo-Putamen, ainsi qu'une nécroptose des neurones hippocampaux notamment de la zone Cornu Ammonis 1 (CA1) mais aussi dans le Gyrus Denté. Les

constricteurs avec un diamètre interne de 0,75 mm n'ont montré aucune mortalité chez les souris, néanmoins seuls 10% des animaux montraient des signes de légère ischémie 28 jours suivant la chirurgie au niveau du Corps Calleux mais aussi du Caudo-Putamen. Enfin la pose de constricteurs avec un diamètre interne de 0,5 mm ont, eux, permis la mise en place d'évènement phénocopiant au mieux les atteintes vues chez les patients atteints de démence d'origine vasculaire tels que : une perte neuronale dans la zone CA1 de l'hippocampe, ainsi que du Gyrus Denté, l'apparition d'évènements hémorragiques de tailles variables, la présence de plages d'ischémies, ainsi qu'une démyélinisation de la substance blanche. Il est à noter que l'élargissement de l'espace perivasculaire ne peut être vérifié par histologie, en effet l'utilisation de fixateur (Formaline, ou encore Méthanol) clos cet espace et ne permet donc pas son étude. Nous avons donc subséquemment choisi les constricteurs avec un diamètre interne de 0,5 mm pour la suite des expérimentations (Fig n°29).

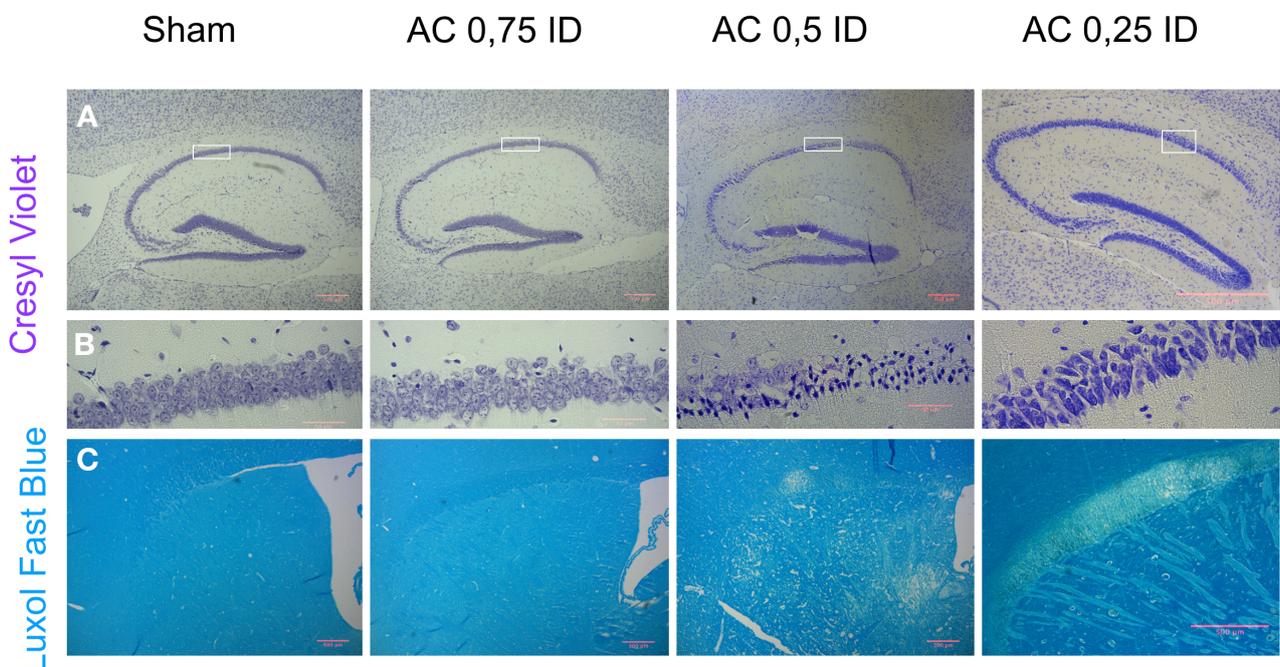


Figure n°29 : La pose de constricteurs sur les carotides communes de souris induit des dommages cérébraux accrus à mesure que le diamètre interne diminue :

(A) Coupe sagittale de cerveau de souris coloré en Violet Cresyl montrant l'hippocampe des souris en fonction du diamètre des constricteurs. Barre d'échelles = 300 μ m. (B) Agrandissement des zones CA1 encadrées en (A). Barres d'échelle = 50 μ m. (C) Coupe sagittale de cerveaux de souris en coloration Luxol Fast Blue montrant les Caudo-Putamen ainsi que les Corps Calleux des souris en fonction du diamètre des constricteurs. Barres d'échelle = 300 μ m.

Après avoir fait le choix du constricteur avec un diamètre interne de 0,5 mm, nous avons réalisé une cinétique de survie ainsi que de mesures du flux sanguin cérébral des souris *Pdzn3 iECKO* ainsi que leurs contrôles (littermates), sans (SHAM) ou avec constricteurs (AC). L'analyse des résultats montre une réduction du flux sanguin cortical des animaux de 53% en 21 jours (Fig n°30)

Une analyse par IRM a ensuite été menée afin de rechercher les dégâts cérébraux vus en histologie. Pour ce faire nous avons réalisé une cinétique d'acquisition d'image à 7, 14, 21 et 28 jours post-opératoires, avec plusieurs séquences différentes, T1, T2*, FLAIR, ainsi qu'angiographie avec injection de produit de contraste ici, gadolinium (Fig n°26).

Malheureusement la technique d'IRM bien que particulièrement utile pour mettre en évidence des lésions chez l'Homme n'est encore pas assez résolutive pour permettre de mettre en évidence les dommages cérébraux des souris avec constricteurs. Tels que des hyperintensités de la substance blanche ou la dilatation des espaces péri-vasculaires.

II) Impact de la délétion endothéliale de *Pdzn3* dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :

Une fois le modèle développé et les types de dégâts occasionnés révélés, des constricteurs ont été posés sur les carotides communes de souris *Pdzn3 iECKO* ainsi que leurs contrôles. Une cinétique de doppler transcranien a ensuite été réalisée de J0 à J20.

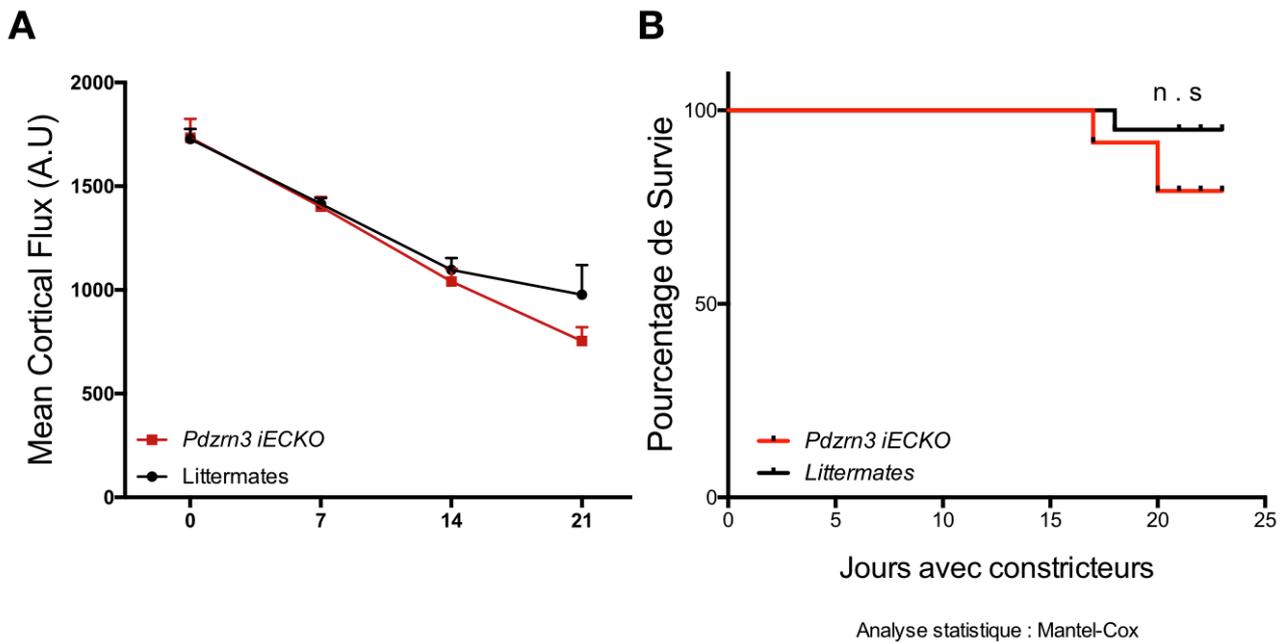


Figure n°30 : Les constricteurs améroïdes entraînent une baisse chronique du flux sanguin cortical des souris *Pdzm3 iECKO* et contrôles sans entraîner de mortalité sévère :

(A) Doppler Transcranien des souris *Pdzm3 iECKO* vs Contrôles. Les données sont présentées en moyenne \pm SEM (n=8 minimum /groupe /temps). (B) Étude de survie des souris *Pdzm3 iECKO* vs Contrôles (n=19-24/groupe). Analyse statistique : Mantel-Cox.

Les résultats obtenus montrent une réduction du flux sanguin cérébral cortical de 53% du flux sanguin cérébral basique, et ce de manière équivalente entre les souris *Pdzm3 iECKO* et leurs contrôles à 21 jours post-opératoires (Fig n°30). De plus les souris *Pdzm3 iECKO* ne présentent pas de différence vis-à-vis des littermates en ce qui concerne la survie suite à la pose de constricteurs améroïdes.

Après la prise du Doppler transcranien les souris ont été euthanasiées, perfusées, leurs cerveaux ont été récupérés, fixés, inclus, coupés et colorés avec les colorations Hémalun & Éosine, Violet Crésyl ainsi que Perl's.

Les zones ischémiques cérébrales dans les cerveaux de souris *Pdzm3 iECKO* ainsi que leurs contrôles ont été quantifiées sur 4 coupes sagittales dans un intervalle de 100 μ m et ce dans l'entièreté d'un hémisphère cérébral pour un total de 32 coupes/hémisphère pour un animal. Les plages d'ischémies sont visualisables par la perte de coloration du colorant

éosine (rose). Les souris montrent des signes d'ischémies, et ce dans différents territoires de l'encéphale à 21 jours après la pose des constricteurs. En effet les souris montrent des signes d'ischémies principalement dans le caudo-putamen et le corps calleux démontrant un tropisme des zones d'ischémies pour la substance blanche. En effet la substance blanche est environ deux fois moins vascularisée que la substance grise. C'est donc un territoire de choix pour la mise en place d'ischémie. Ces ischémies de la substance blanche vont impacter la conduction du signal entre les différentes zones de l'encéphale et impacter le comportement de l'animal (Wang et al., 2016). D'autres zones d'ischémies ont été retrouvées dans le Thalamus, l'Hypothalamus, l'Hippocampe, ainsi que le Cortex. Nous n'avons pas détecté de plages d'ischémies chez les souris contrôles et *Pdzn3* *iECKO* en condition SHAM. La pose de constricteurs est donc suffisante pour induire l'apparition de plages d'ischémies. La quantification du nombre de plages d'ischémies sur les coupes de cerveaux de souris montre une réduction significative du nombre de plages vis-à-vis des contrôles 21 jours après la pose de constricteurs (Fig n°31).

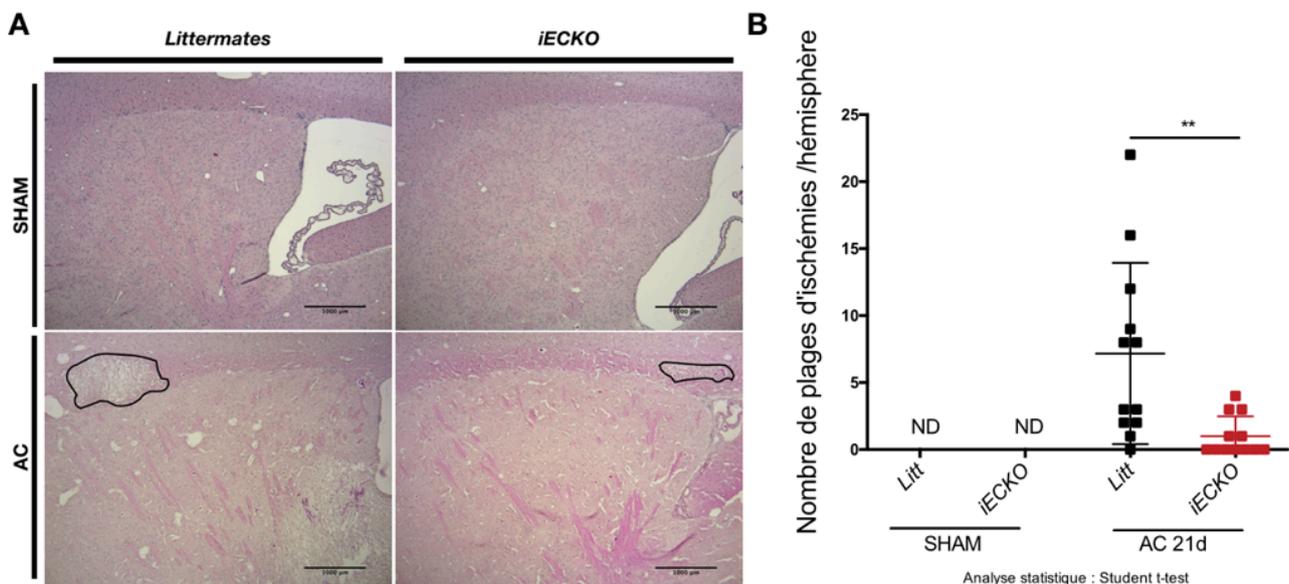


Figure n°31 : La délétion de *Pdzn3* dans l'endothélium réduit le nombre d'ischémies dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :

(A) Images représentatives des cerveaux des souris SHAM et AC *Pdzn3* *iECKO* et littermates coloré en Hémalun & Éosine. Les zones détournées en noir correspondent à des zones d'ischémies, ici dans le corps calleux. Barre d'échelle = 1mm. (B) Quantification de la surface d'ischémie par hémisphère dans les différentes conditions. Analyse statistique : Student t-test **= $p < 0,01$ (n=3/groupe SHAM n=12/groupe AC).

Le modèle de pose de constricteurs induit l'apparition de saignements dans l'encéphale des souris *Pdzn3 iECKO* ainsi que chez les contrôles. Ces saignements ont été mis en évidence au moyen d'une coloration histologique de Perl's. La coloration de Perl's met en évidence les résidus d'hémosidérine (en bleu électrique), produits du métabolisme de dégradation des globules rouges. Ainsi cette coloration n'est capable de mettre en évidence que des évènements de saignements vieux d'au moins 3 à 4 jours, résorbés ou en cours de résorption. Ce fait est à prendre en compte lors de l'étude de ce paramètre (Liu et al., 2014).

Les évènements de saignements ont été quantifiés comme pour les ischémies sur un total de 32 coupes/hémisphère pour un animal. Les résultats de la quantification de ces derniers montrent qu'il n'y a pas de différences dans la quantité ou dans le volume de saignement des souris *Pdzn3 iECKO* vis-à-vis de leurs contrôles (Fig n°32).

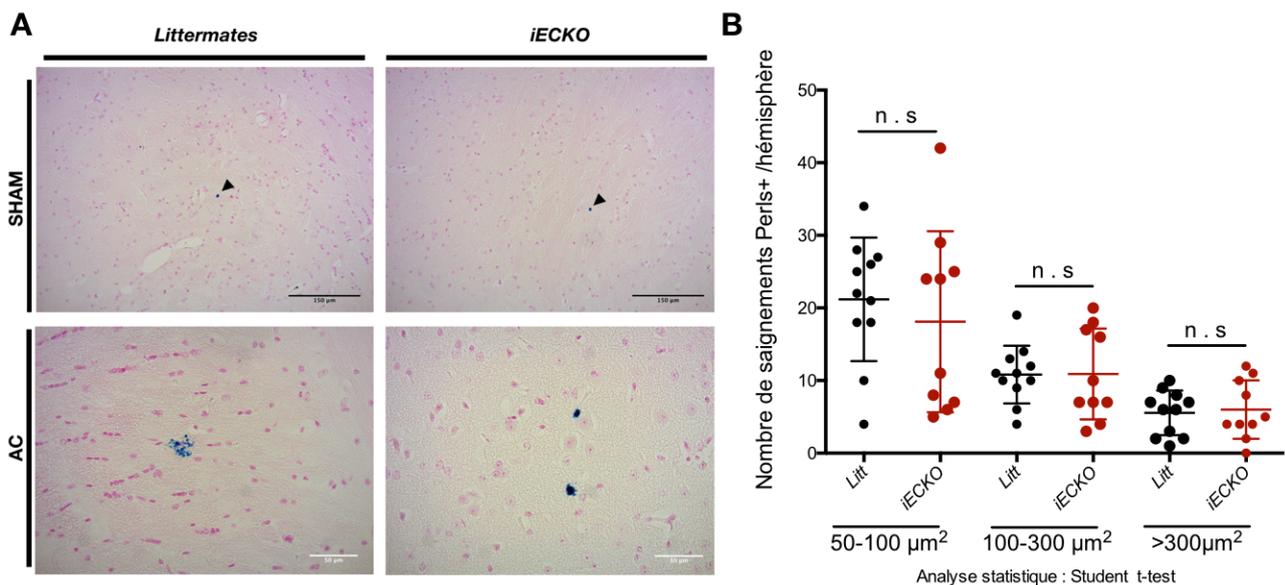


Figure n°32 : La délétion de *Pdzn3* dans l'endothélium n'influe pas sur la quantité ou la surface de saignements dans l'encéphale dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :

(A) Images représentatives des saignements des cerveaux des souris SHAM et AC *Pdzn3 iECKO* et littermates coloré en Perl's. Les pointes de flèches indiquent des « faux-positifs ». Barres d'échelles = 150 µm (Haut) 50 µm (Bas). (B) Quantification du nombre d'évènements de saignements gradés en trois catégories en fonction de leur surface (n=3/groupe SHAM n= 11 littermates vs 10 *Pdzn3 iECKO* AC). Analysis statistique : Student t-test. n.s = non significatif.

Il est à noter que les souris SHAM présentent de petits dépôts bleu électrique sur les coupes correspondant à des dépôts d'hémosidérine, Néanmoins il est établi dans la littérature que la coloration de Perl's peut induire ce genre de petits évènements « faux-positifs » sur les contrôles (Liu et al., 2014). Ce fait a été pris en compte lors de la quantification des évènements des cerveaux des souris ayant été opérées. Ces artefacts de coloration étant tous de taille réduite, inférieure à $50 \mu\text{m}^2$, le seuil minimal de quantification de ces évènements a été placé à cette valeur. La quantification réalisée ici ne permet de mettre en évidence une différence dans la quantité ou dans la surface des évènements de saignement résorbés induit par la pose de constricteurs entre les souris *Pdzrn3 iECKO* et les littermates (Fig n°32).

La perte neuronale des souris sur lesquelles ont été posés des constricteurs ainsi que sur les souris SHAM, a été évaluée par immunomarquage via l'utilisation d'un anticorps anti-NeuN : marqueur spécifique de viabilité neuronale. La perte neuronale est présente dans le cortex et l'hippocampe ainsi que dans les zones d'ischémies. Néanmoins les zones de substances blanches ne possèdent pas de corps neuronaux, la plupart des plages d'ischémies étant dans la substance blanche, ces dernières n'ont donc pas directement entraîné de perte neuronale.

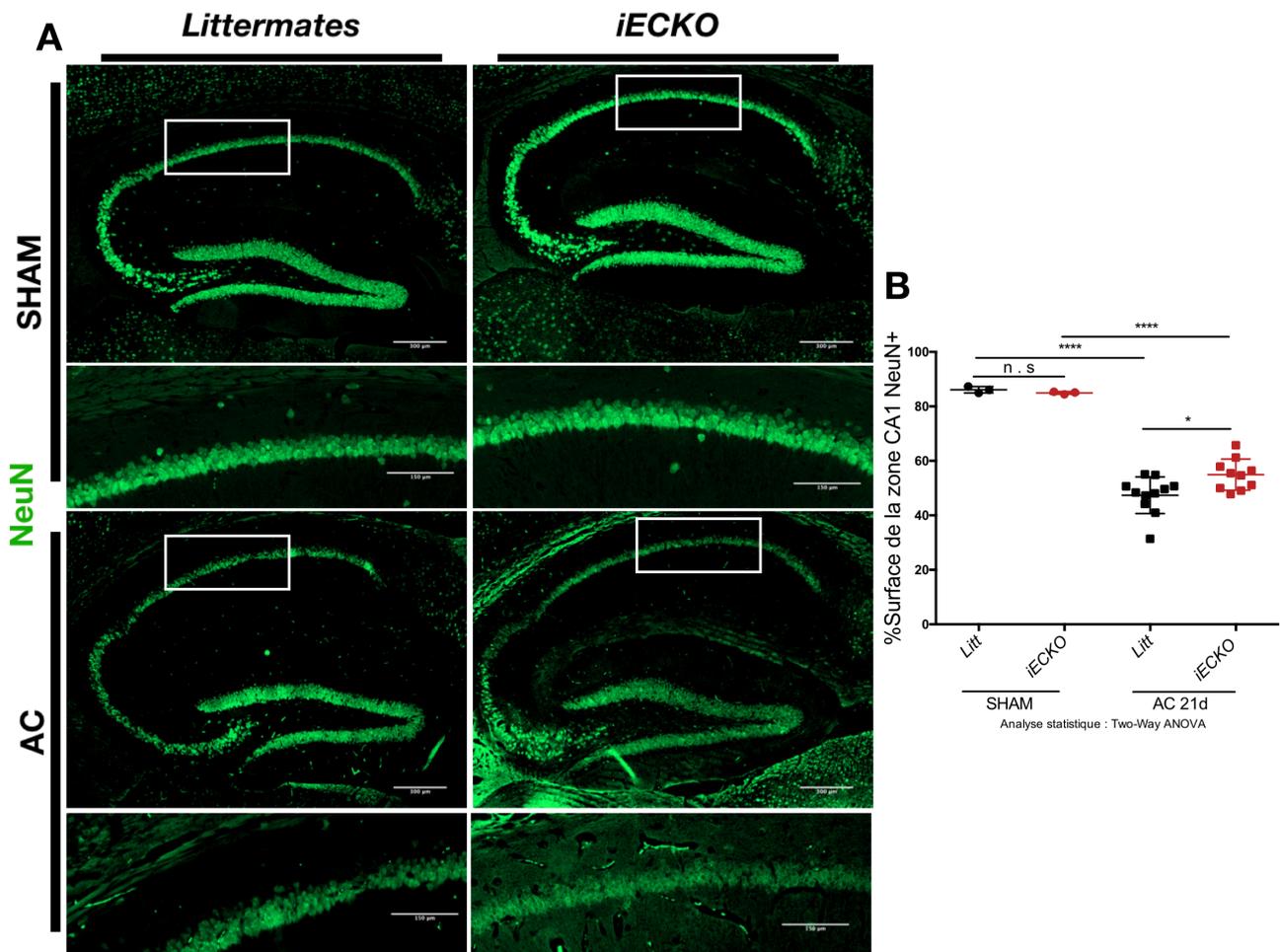


Figure n°33 La délétion de *Pdzn3* dans l'endothélium protège de la perte neuronale hippocampale de la zone CA1 dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :

(A) Images représentatives de coupes de cerveaux de souris immunomarquée pour NeuN, marqueur de viabilité neuronale. Barres d'échelle = 300µm. (Dessous) Aggrandissement des zones encadrées. Barre d'échelle = 150 µm (B) Quantification du pourcentage de surface de la zone CA1 marquée en NeuN (n= 3/groupe SHAM, n= 11 Littermates vs 10 *Pdzn3* iECKO AC). Analyse statistique : Two-Way ANOVA et Test de multiples comparaisons de Tuckey. * = p < 0,05 ; **** = p < 0,001

Nous avons choisi d'étudier la perte neuronale dans la zone CA1 de l'hippocampe car cette région est décrite dans la littérature comme étant une des zones les plus sensibles à l'ischémie, en effet les neurones qui composent cette zone peuvent entrer en apoptose au bout de 5 à 10 min sans perfusion. L'apoptose est visible par le rétrécissement et l'arrondissement des noyaux neuronaux (Müller et al., 2006). Les souris SHAM ne montrent pas de perte neuronale dans la zone CA1 de l'hippocampe qu'elles fassent partie du groupe littermates ou *Pdzn3* iECKO. Néanmoins après 21 jours de constricteurs les souris présentent des signes d'apoptose dans la zone CA1, la quantification de cette perte neuronale montre que les souris contrôle perdent en moyenne 47% des neurones présents

dans cette zone alors que les souris *Pdzrn3* *iECKO* en perdent 35%. Il est à noter que les neurones de la zone CA1 sont capables de déclencher à la fois l'apoptose et la nécrose (Kilinc et al., 2010) néanmoins nous ne sommes pas en position de pouvoir discriminer l'une de l'autre avec l'immuno-marquage NeuN, ce dernier ne mettant en évidence que les neurones viables.

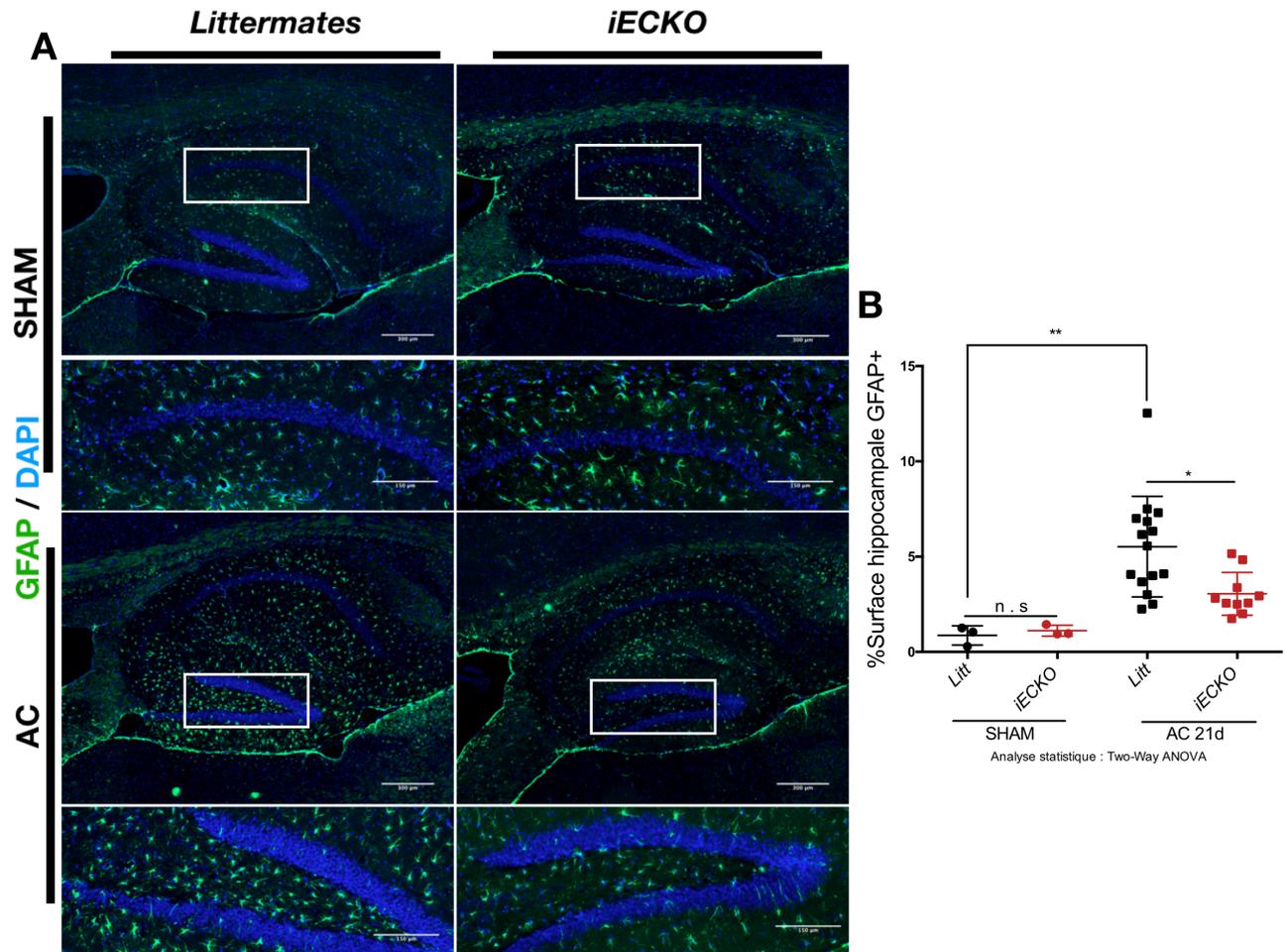


Figure n°34 : La délétion de *Pdzrn3* dans l'endothélium protège contre l'activation astrocytaire dans un modèle d'hypperfusion chronique :

(A) Images représentatives de coupes de cerveaux de souris montrant l'activation astrocytaire hippocampale visualisée par l'immunomarquage de la GFAP. Barres d'échelle = 300µm. (Dessous) Aggrandissement. Barre d'échelles = 150 µm. (B) Quantification de la surface hippocampale marquée en GFAP (n= 3/groupe SHAM, n=14 Littermates vs 10 *Pdzrn3* *iECKO*). Analyse statistique : Two-Way ANOVA et Test de multiple comparaison de Tuckey. * = p<0,05 ; **=p<0,01 ; n . s = non significatif.

Après avoir étudié la perte neuronale dans l'hippocampe nous avons ensuite voulu étudier l'effet de la pose de constricteurs sur l'activation des astrocytes, composant phare de la barrière hémato-encéphalique. Il est connu que les astrocytes induisent la synthèse de Protéine Acide Gliale Fibrillaire (Glial Fibrillary Acidic Protein ou GFAP) lors de la « gliose

réactive » (Reactive Gliosis) (Middeldorp and Hol, 2011). Cette dernière a lieu entre autre dans le cerveau vieillissant, et la première zone touchée se trouve être l'hippocampe (Morgan et al., 1997; Sohal and Weindruch, 1996). C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier ce processus dans l'hippocampe des souris sur lesquelles ont été posés des constricteurs. Nos expériences montrent une augmentation de l'activation astrocytaire mise en évidence par le marquage de la GFAP et ce, dans les deux groupes. Néanmoins les souris *Pdzn3* *iECKO* présentent une activation significativement réduite vis-à-vis des contrôles Littermates. La délétion de *Pdzn3* dans l'endothélium protège donc le tissu hippocampal de la gliose réactive (Fig n°34). Il est à noter que dans le cas de la pose de constricteurs, l'hippocampe n'est pas la seule région de l'encéphale dont l'activation astrocytaire est détectable, toutes les zones de substances blanches sont elles aussi fortement marquées. Un fort marquage est détectable dans l'entièreté du corps calleux ainsi que dans le caudo-putamen. Enfin les bulbes olfactifs ainsi que nerf visuel sont, eux aussi, très marqués sur les immunomarquages de la GFAP réalisées après la pose de constricteurs.

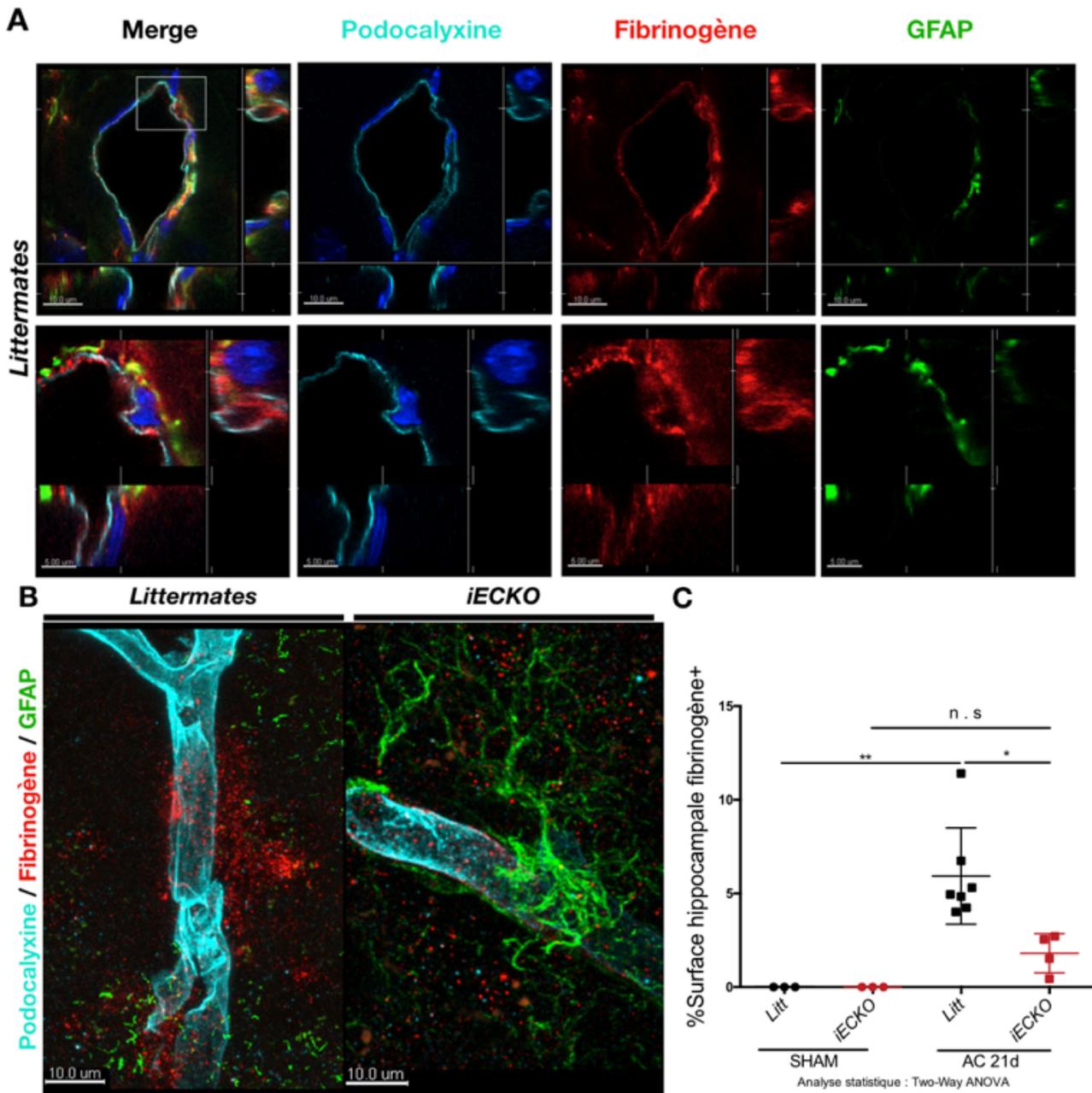


Figure n°35 : La délétion de *Pdzrn3* dans l'endothélium diminue la perméabilité vasculaire hippocampale au fibrinogène :

(A) Image confocale représentative de cerveau de souris littermates 21 jours après la pose de constricteurs immunomarqué pour la podocalyxine (cyan), le fibrinogène (rouge), la GFAP (vert) montrant l'ouverture de barrière laissant diffuser le fibrinogène sans disruption du vaisseau et en présence d'astrocytes activés. Barre d'échelle = 10 μ m (haut) 5 μ m (bas)(B) Image confocale représentative de cerveau de souris littermate et *Pdzrn3* iECKO 21 jours après la pose de constricteurs montrant la diffusion du fibrinogène chez les littermates et l'absence de diffusion du fibrinogène sur une artère hippocampale équivalente de souris *Pdzrn3* iECKO. Barre d'échelle = 10 μ m. (C) Quantification de la surface hippocampale de diffusion du fibrinogène 21 jours après la pose de constricteurs (n= 3/groupe SHAM, n= 7 littermates vs 4 *Pdzrn3* iECKO AC). Analyse statistique : Two-Way ANOVA et Test de multiple comparaison de Tuckey. * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; n . s = non significatif.

Nous avons ensuite voulu évaluer la perméabilité vasculaire dans l'hippocampe grâce à l'immunomarquage de l'un des composants du sang, le fibrinogène. Un faisceau d'argument récent et croissant tend à montrer que l'accumulation de fibrinogène dans le

parenchyme cérébral est délétère pour les neurones (Merlini et al., 2019). Les résultats que nous avons obtenus ici montrent tout d'abord que la diffusion du fibrinogène n'est pas détectable dans l'hippocampe des souris SHAM (Fig n°35). De plus la pose de constricteurs sur les souris induit la diffusion du fibrinogène hors de l'endothélium cérébral, et ce dans les deux conditions, bien que les souris *Pdzrn3 iECKO* ne montrent pas d'induction significative de la surface de diffusion du fibrinogène dans l'hippocampe. Enfin la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique au fibrinogène est significativement réduite chez les souris *Pdzrn3 iECKO* vis-à-vis des contrôles 21 jours après la pose de constricteurs. Il est cependant à noter que les artères laissant diffuser le fibrinogène sont en général des artères de calibres médian, sur lesquelles le marquage GFAP est peu présent voire absent dans le cas des souris *Pdzrn3 iECKO*, alors que les artères laissant diffuser le fibrinogène chez les souris littermates sont des artères présentant un marquage GFAP présent. Enfin la diffusion du fibrinogène ne nécessite pas d'ouverture physique du tube endothélial pour se faire (Fig n°35).

	<i>Contrôle</i>	<i>Pdzrn3 IECKO</i>
Perte Neuronale	++	+
Ischémies	++	+
Activation Astrocytaire	++	+
Diffusion du fibrinogène	++	+
Micro-saignements	++	++

Figure n°36 : Tableau récapitulatif, comparatif des évènements détectés chez les souris sur lesquelles ont été posés des constricteurs :

Les résultats obtenus sur les souris *Pdzrn3 iECKO* sur lesquelles ont été posés des constricteurs montrent une diminution significative de la perméabilité vasculaire au fibrinogène dans l'hippocampe, ainsi qu'une réduction significative de la perte neuronale de la zone CA1, une réduction significative du nombre d'ischémies dans l'encéphale mais ne montrent pas de différences dans la surface et/ou la quantités des micro-hémorragies vis-à-vis des littermates 21 jours après la pose de constricteurs (Fig n°36).

III) Impact moléculaire de la délétion endothéliale de *Pdzn3* dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :

Nous avons ensuite pensé qu'une interaction fonctionnelle était requise entre les cellules endothéliales, les cellules pericytaires ainsi que les astrocytes de la barrière (aussi appelée unité gliovasculaire) dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. Nous avons alors réalisé des préparations de vaisseaux cérébraux intacts à partir de parenchyme cérébral de souris pour préserver l'intégrité structurale ainsi que les propriétés moléculaires de la barrière hémato-encéphalique. Les transcrits de l'entièreté de cette préparation « gliovasculaire » ont ensuite été analysés par RTq-PCR. Après 7 et 14 jours d'hypoperfusion chronique, nous rapportons une augmentation transcriptionnelle et protéique de PVLAP (pour Plasmalemma Vesicle-Associated Protein), un marqueur d'état de haute perméabilité de la cellule endothéliale, et ce sans modifications des marqueurs endothéliaux tels que le CD31 ou la claudine-5 dans les vaisseaux des souris *Pdzn3* *iEKO* ou littermates. Dans le système nerveux central, la voie de signalisation Wnt est impliquée dans les cellules endothéliales pour le maintien de la barrière via les ligands Wnt7a et b (Daneman et al., 2009; Liebner et al., 2008a; Stenman et al., 2008). Nous avons ensuite regardé l'expression de ces ligands Wnt et nous rapportons que l'état d'hypoperfusion chronique induit une réduction significative de Wnt7b à l'état transcriptionnel mais n'induit pas de changements des niveaux de Wnt7a. Cette réduction de Wnt7b pouvant contribuer à la déstabilisation de la barrière hémato-encéphalique (Fig n°37).

En effet les souris *Pdzrn3* *iECKO* ne montrent pas de différence de survie, ni de différence dans le flux sanguin cérébral vis-à-vis de leurs contrôles mais présentent des dommages cérébraux réduits.

IV) Surexpression endothéliale de *Pdzrn3* et démence d'origine vasculaire :

Nous avons ensuite voulu valider les résultats obtenus avec les souris délétées pour *Pdzrn3* dans ce modèle de constricteur améroïdes, et ce grâce à une lignée de souris surexprimant PDZRN3 de manière inductible dans l'endothélium (*Pdzrn3* *iECO*E).

Les travaux précédents du laboratoire d'accueil ont montré que la surexpression de *Pdzrn3* dans l'endothélium chez l'embryon entraîne une mort intra-utérine. Les embryons présentent soit un non-développement complet, soit des hémorragies notamment au niveau de l'encéphale. L'étude des photos de microscopie électronique des vaisseaux des souris surexprimant *Pdzrn3* montre l'absence de jonctions inter-endothéliales fonctionnelles entraînant l'ouverture du tube endothélial et donc la diffusion des composés du sang comme les globules rouges, hors de ce dernier (Sewduth et al., 2017).

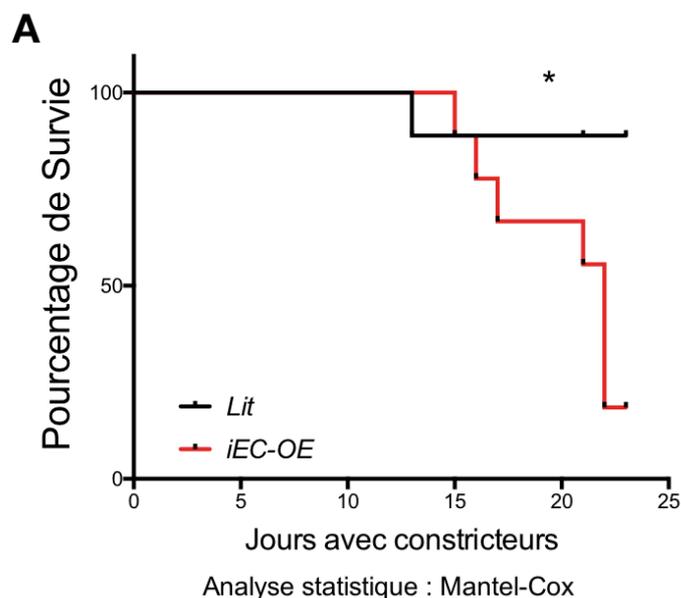


Figure n°38 : Survie des souris *Pdzrn3 iECOE* vs contrôles

La pose de constricteurs sur les souris *Pdzrn3 iECOE* entraîne une mortalité significativement augmentée comparée à celle obtenue chez les souris contrôles à 21 jours (n= 9/groupe). Analyse Statistiques : Mantel-Cox. *= p<0,05

Une cinétique de mortalité a été réalisée sur les souris surexprimant *Pdzrn3* spécifiquement dans l'endothélium après pose de constricteurs (Fig n°38).

Les souris *Pdzrn3 iECOE* montrent une diminution significative de la survie après la pose de constricteurs améroïdes, à 21 jours, seul 25% des souris *Pdzrn3 iECOE* sont toujours en vie. Contrairement aux contrôles qui ne montrent que 10% de mortalité à 21 jours.

Après euthanasie les cerveaux des souris ont été récupérés, fixés, inclus, coupés et marqués ou colorés de la même manière que précédemment (cf II).

Les zones ischémiques cérébrales des souris *Pdzrn3 iECOE* ainsi que leurs contrôles ont été quantifiées de la même manière que celles des souris *Pdzrn3 iECKO* sur lesquelles sont été posés des constricteurs, à savoir 4 coupes /100 µm sur l'entièreté d'un hémisphère cérébral/souris. De façon cohérente les souris présentent des signes d'ischémies, et ce dans les mêmes territoires que précédemment à savoir : dans le caudo-putamen, le corps calleux, le thalamus, l'hypothalamus, l'hippocampe, ainsi que le cortex. Les souris *Pdzrn3*

IECOE présentent une augmentation significative du nombre de plages d'ischémies comparée à leurs contrôles 21 jours après la pose de constricteurs (Fig n°39).

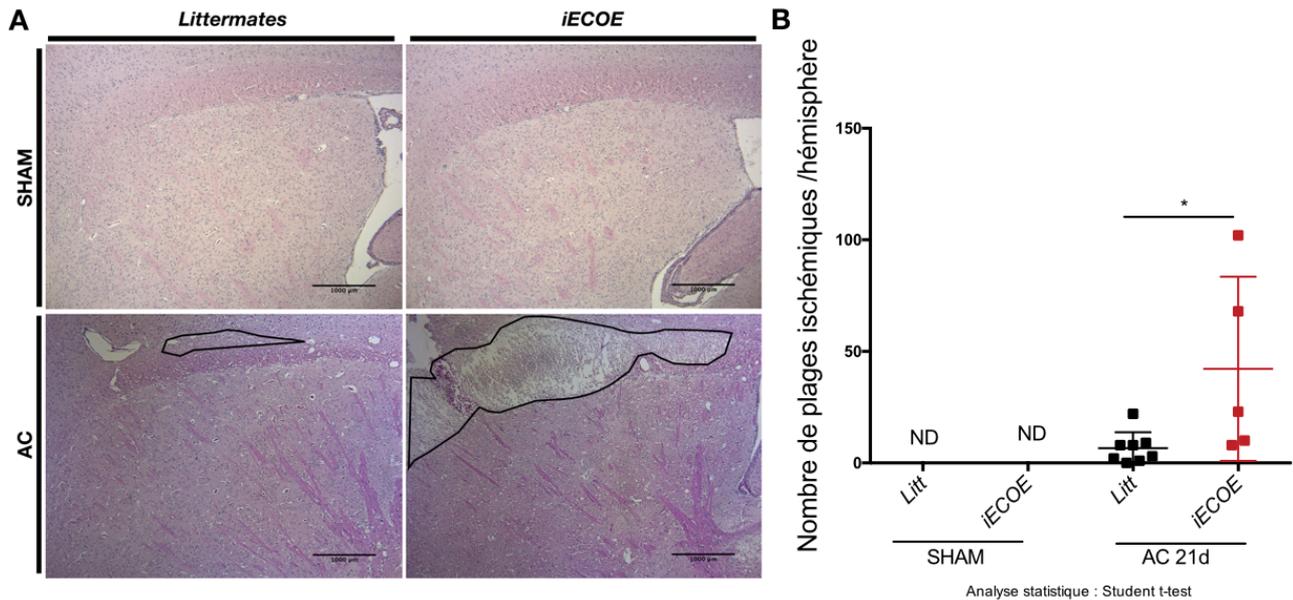


Figure n°39 : La surexpression de *Pdzn3* dans l'endothélium augmente le nombre de plages d'ischémie dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :

(A) Images représentatives des cerveaux des souris SHAM et AC *Pdzn3* *iECOIE* et littermates coloré en Hémalun & Éosine. Les zones détournées en noir correspondent à des zones d'ischémies, ici dans le corps calleux. Barre d'échelle = 1 mm. (B) Quantification du nombre d'ischémies par hémisphère dans les différentes conditions. (n =3/groupe SHAM, n= 5 *Pdzn3* *IECOIE* vs 9 littermates AC) Analyse statistique: Student t-test * = p<0,05.

Le modèle de pose de constricteurs induit l'apparition de saignements dans l'encéphale des souris *Pdzn3* *IECOIE* ainsi que chez les contrôles. Les événements de saignements ont été quantifiés à l'aide de la coloration de Perl's dans l'entièreté d'un hémisphère sur des coupes espacées de 100 μ m. Les résultats de la quantification de ces derniers montrent une augmentation significative du nombre d'évènements de saignements d'une surface supérieure à 300 μ m. Les souris *Pdzn3* *IECOIE* sur lesquelles ont été posé des constricteurs ont donc tendance à saigner plus que leurs contrôles (Fig n°40).

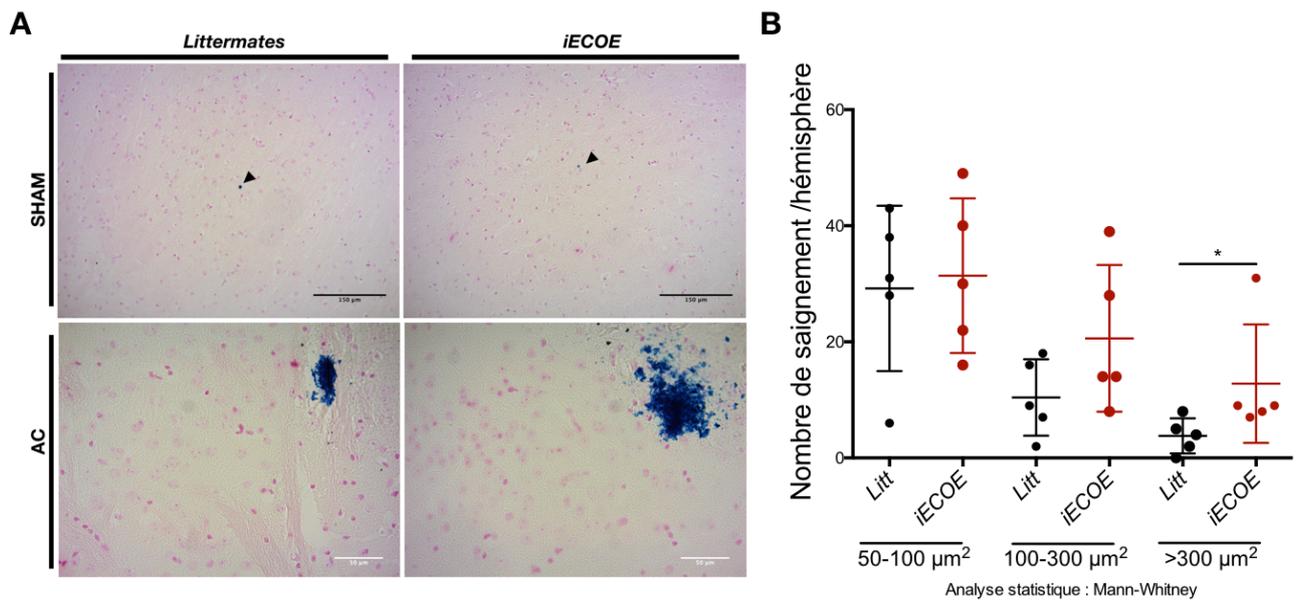


Figure n°40 : La surexpression de Pdzn3 dans l'endothélium entraîne une augmentation des évènements de saignements de gros calibre dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :

(A) Images représentatives de coupes de cerveaux de souris colorées avec la coloration de Perl's montrant les saignements résorbés dans l'encéphale après la pose de constricteurs chez les souris *Pdzn3 iECO* vs littermates pendant 21 jours. Les pointes de flèches indiquent des « faux-positifs ». Barres d'échelles = 150 µm (Haut) ; 50 µm (Bas). (B) Quantification du nombre d'évènements de saignements gradés en trois catégories en fonction de leur surface. (n=3/groupe SHAM, n = 5/groupe AC) Analyse statistique : Mann-Whitney * = p<0,05.

Nous avons aussi évalué la perte neuronale de la zone CA1 de l'hippocampe des souris *Pdzn3 iECO* en immunofluorescence, et ce, 21 jours après la pose de constricteurs. Les résultats montrent une induction de la perte neuronale dans la zone CA1 de l'hippocampe induite par la pose de constricteurs. Les souris *Pdzn3 iECO* montrent une perte neuronale hippocampale significativement augmentée par rapport à leurs contrôles littermates. Les souris *Pdzn3 iECO* présentent une perte neuronale moyenne de 53% comparé à 47% pour les souris littermates (Fig n°41).

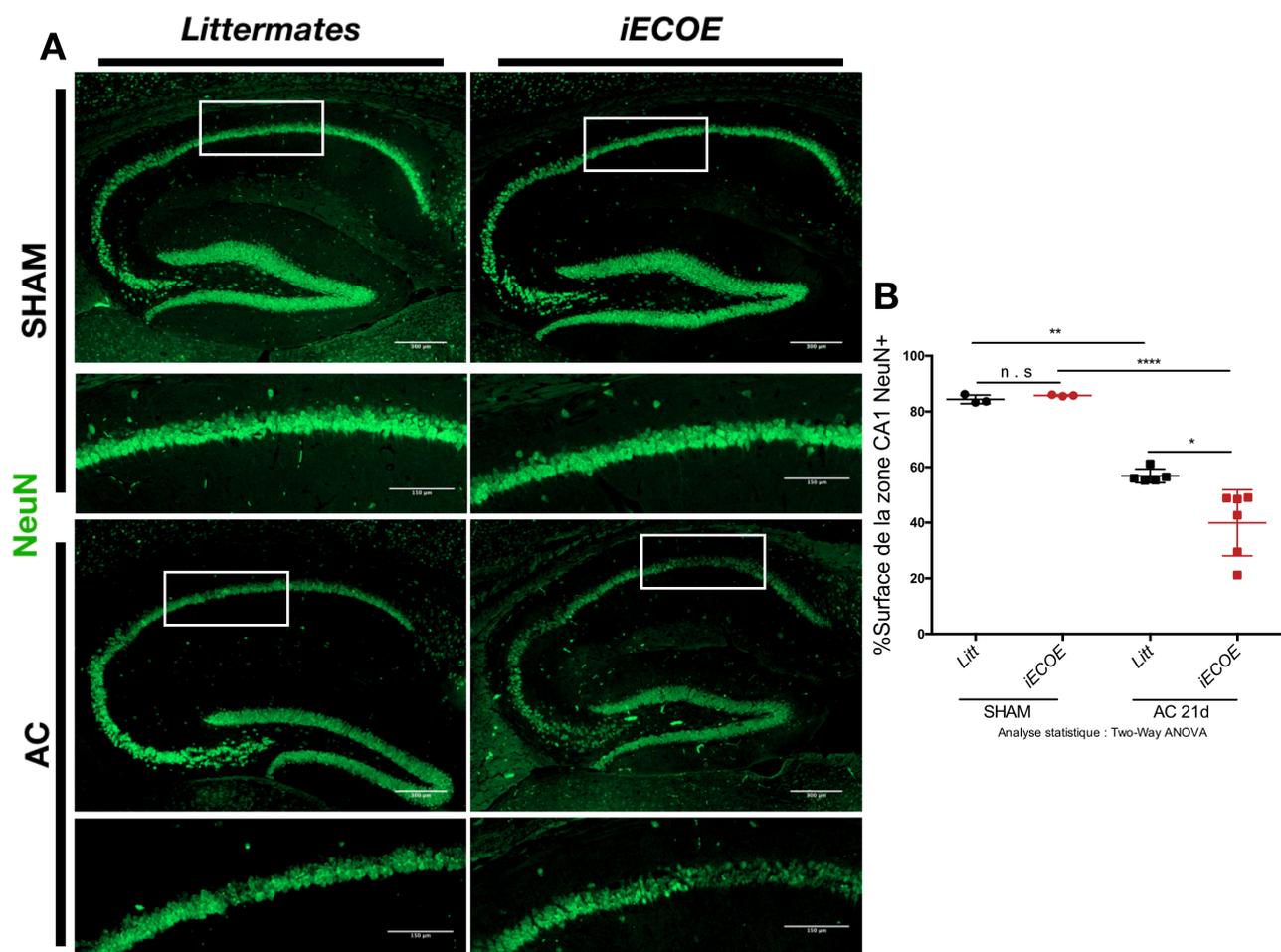


Figure n°41 : La surexpression de *Pdzn3* dans l'endothélium entraîne une augmentation de la perte neuronale hippocampale de la zone CA1 dans un modèle d'hyperfusion cérébrale :

(A) Images de coupe de cerveaux de souris littermates et *Pdzn3 iECOE* SHAM ou AC immunomarquées pour le marqueur de viabilité neuronale : NeuN. Barres d'échelle = 300µm. (Dessous) Aggrandissement des zones encadrées. Barres d'échelles = 150 µm. (B) Quantification de la surface de la zone CA1 del'hippocampe marquée en NeuN. (n=3/groupe SHAM, n=5 littermates vs 6 *Pdzn3 iECOE* AC) Analyse statistique: Two-Way ANOVA et Test de multiple comparaison de Tuckey. ****= $p < 0,001$, **= $p < 0,01$, *= $p < 0,05$.

Après obtention des résultats précédents nous nous sommes demandés si comme chez l'Homme, l'hyperfusion cérébrale pouvait entraîner une infiltration des macrophages dans l'hippocampe et si cette dernière était différente entre les souris contrôles et *Pdzn3 iECOE*. Les résultats montrent une augmentation significative du nombre de cellules CD45+ dans l'hippocampe des souris *Pdzn3 iECOE* après la pose de constricteurs vis-à-vis de leurs contrôles à 21 jours. La pose de constricteurs permet donc une augmentation de la perméabilité vasculaire corrélée avec l'infiltration de cellules immunitaires dans le

parenchyme cérébral, et cet évènement est significativement majoré chez les souris *Pdzn3 iECO*E (Fig n°42).

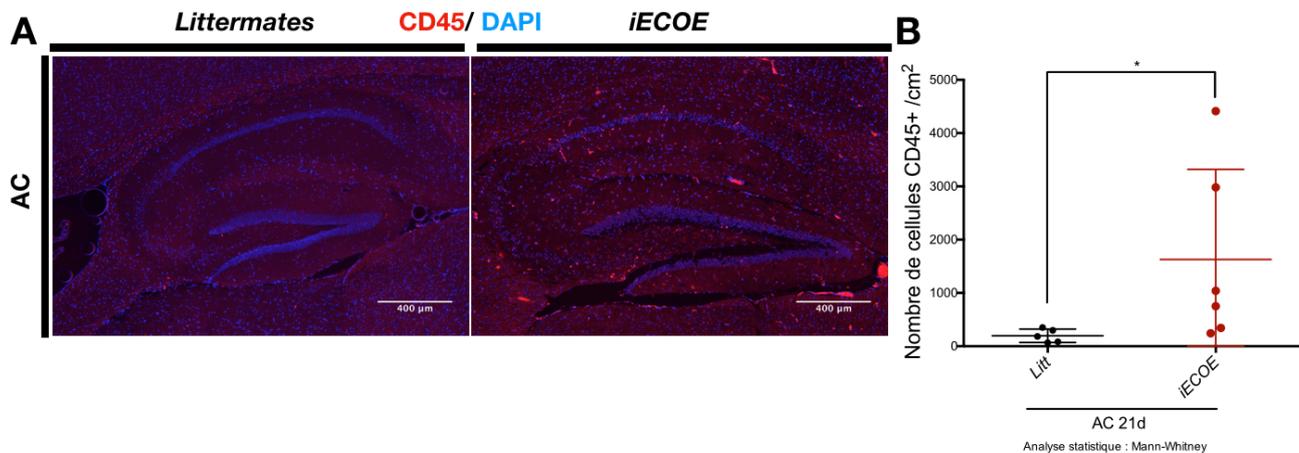


Figure n°42 : La surexpression de *Pdzn3* dans l'endothélium entraîne une augmentation de l'infiltration des macrophages dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :

(A) Images représentatives de coupes de cerveaux *Pdzn3 iECO*E et littermates immunomarquées pour le marqueur de la lignée macrophagique CD45 (rouge), et dont les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu). Barres d'échelle = 400µm. (B) Quantification du nombre de cellules CD45+ dans l'hippocampe (n= 5 littermates vs 6 *Pdzn3 iECO*E AC). Analyse statistique : Mann-Whitney *= p<0,05.

Pour les expériences d'immunofluorescence suivante, une autre cohorte de souris *Pdzn3 iECO*E a été utilisée, cette dernière a été opérée et traitée de la même manière que la précédente, à la différence que les souris ont été euthanasiées 14 jours après la pose de constricteurs. Le protocole a été réduit d'une semaine pour permettre d'éviter une mortalité trop importante pour les souris *Pdzn3 iECO*E.

14 jours après la pose de constricteurs, une augmentation significative de l'activation astrocytaire est visible chez les souris *Pdzn3 iECO*E. En conditions basales (SHAM) il n'y a pas de différences significatives d'activation astrocytaire entre les souris littermates et *Pdzn3 iECO*E. La surexpression de *Pdzn3* dans l'endothélium entraîne donc une augmentation significative de l'activation des astrocytes (Fig n°43). Il est à noter que comme pour la cohorte *Pdzn3 iECKO* l'hippocampe n'est pas la seule région de l'encéphale dont l'activation astrocytaire est détectable, toutes les zones de substances

blanches sont elles aussi fortement marquées. Un fort marquage est détectable dans l'entièreté du corps calleux ainsi que le caudoputamen. Enfin les bulbes olfactifs ainsi que nerf visuel sont, eux, aussi très marqués sur les immunofluorescences de la GFAP réalisées 14 après la pose de constricteurs.

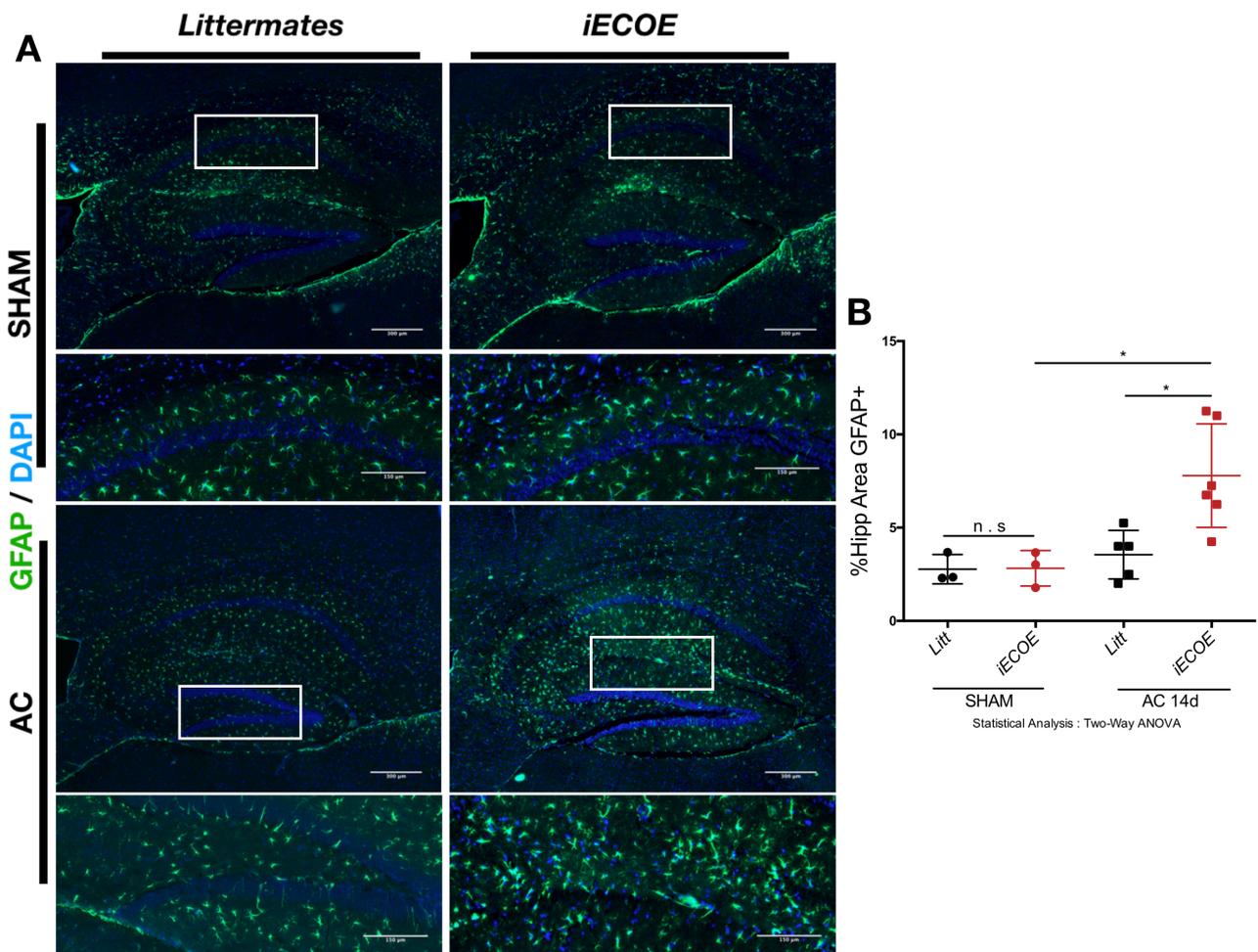
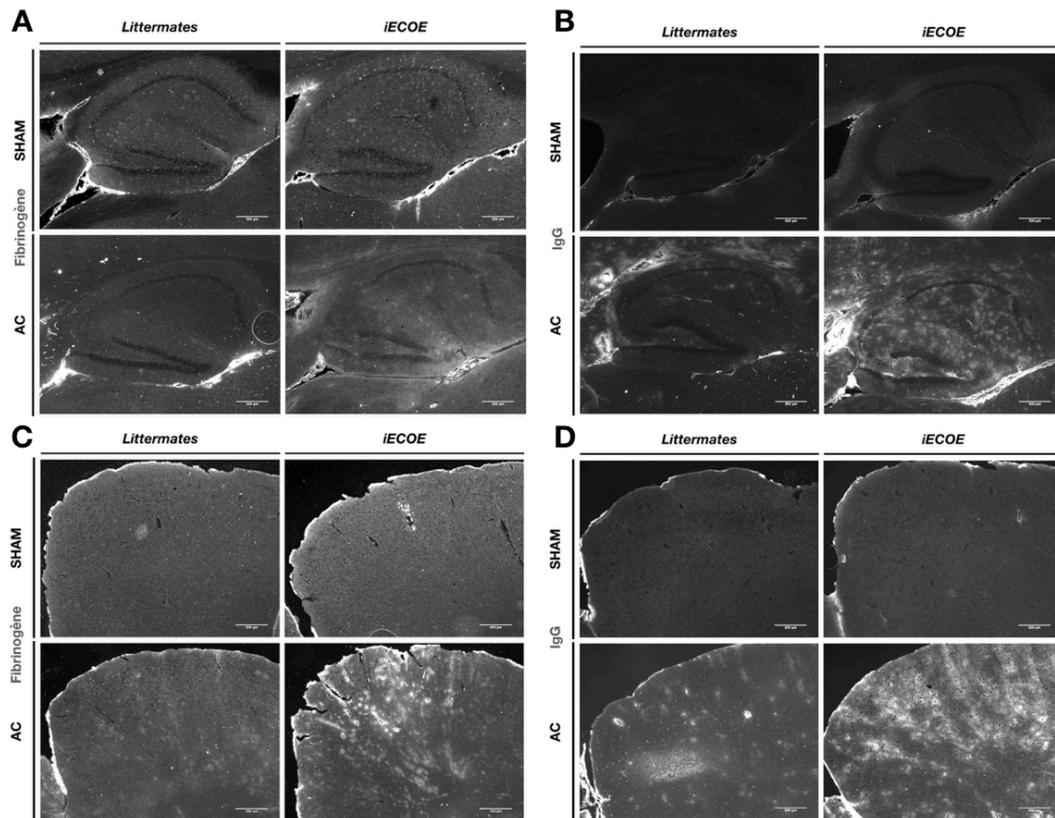


Figure n°43 : La surexpression de *Pdzn3* dans l'endothélium entraîne une augmentation de l'activation astrocytaire hippocampale dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :

(A) Images représentatives de coupes de cerveaux de souris *Pdzn3 iECOE* et littermates montrant l'activation astrocytaire visualisée par l'immunomarquage de la GFAP (vert) ainsi que les noyaux cellulaires (DAPI, bleu). Barres d'échelle = 300µm. (Dessous) Aggrandissement de l'hippocampe. Barres d'échelle = 150 µm. (B) Quantification de la surface hippocampale marquée en GFAP (n=3/groupe SHAM, n=5 littermates vs 5 *Pdzn3 iECOE* AC). Analyse statistique : Two-Way ANOVA et Test de multiple comparaison de Tuckey. * = $p < 0,05$; n.s = non significatif.

Comme pour la cohorte *Pdzn3 iECKO*, nous avons ensuite voulu évaluer la perméabilité vasculaire cérébrale grâce aux marquages du fibrinogène et des IgG. Les résultats que nous avons obtenus ici montrent que la pose de constricteurs sur les souris entraîne une

ouverture de barrière permettant au fibrinogène ainsi qu'aux IgG de diffuser hors de l'endothélium cérébral. Les souris *Pdzn3 iECOE* montrent à 14 jours une induction significative de la quantité de fibrinogène et des IgG diffusant hors de l'endothélium vis-à-vis de leurs contrôles dans l'hippocampe et dans le Cortex (Fig n°44).



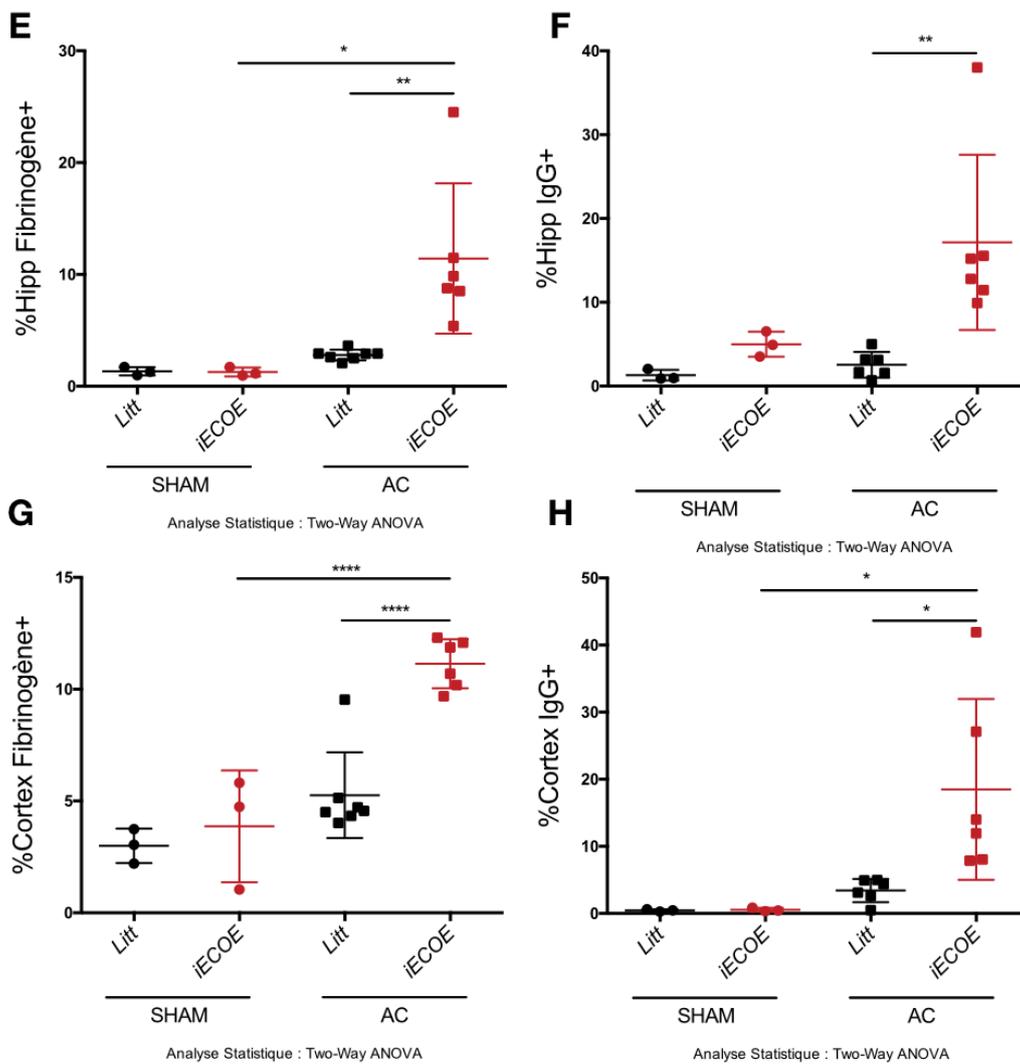


Figure n°44 : La surrexpression de *Pdzn3* dans l'endothélium entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire au fibrinogène ou IgG (blanc) dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale :

(A) Images représentatives de coupes de cerveaux de souris immunomarquées pour le fibrinogène montrant la diffusion vasculaire hippocampale du fibrinogène. Barres d'échelle = 400µm. (B) Images représentatives de coupes de cerveaux de souris immunomarquées pour les IgG de souris montrant la diffusion vasculaire hippocampale des IgG. Barres d'échelle = 400µm. (C) Images représentatives de coupes de cerveaux de souris immunomarquées montrant la diffusion vasculaire corticale du fibrinogène. Barres d'échelle = 400µm. (D) Images représentatives de coupes de cerveaux de souris immunomarquées montrant la diffusion vasculaire corticale des IgG. Barres d'échelle = 400µm. (E) Quantification de la surface hippocampale marquée en Fibrinogène (n=3/groupe SHAM, n=7 littermates vs 6 *Pdzn3* iECOE). (F) Quantification de la surface hippocampale marquée en IgG (n=3/groupe SHAM, n=7 littermates vs 6 *Pdzn3* iECOE). (G) Quantification de la surface corticale marquée en Fibrinogène (n=3/groupe SHAM, n=7 littermates vs 6 *Pdzn3* iECOE). (H) Quantification de la surface corticale marquée en IgG (n=3/groupe SHAM, n=7 littermates vs 6 *Pdzn3* iECOE). Analyse statistique : Two-Way ANOVA et Test de multiple comparaison de Tuckey. ****=p<0,001 ; ***=p<0,005 ; **=p<0,01 ; *=p<0,05.

	<i>Littermates</i>	<i>Pdzrn3 iECOE</i>
Perte neuronale	++	+++
Ischemies	++	++
Activation astrocytaire	++	+++
Diffusion du fibrinogène	++	+++
Micro-hémorragies	++	+++
Inflammation	+	+++

Figure n°45 : Tableau récapitulatif, comparatif des évènements détectés chez les souris *Pdzrn3 iECOE* et littermates sur lesquelles ont été posés des constricteurs :

Les résultats obtenus montrent une augmentation significative de la mortalité, ainsi qu'une augmentation significative du nombre d'ischémies, du nombre de saignements de gros calibre, de la perte neuronale de la zone CA1 de l'hippocampe, ainsi qu'une augmentation significative de l'infiltration macrophagique dans l'hippocampe chez les souris *Pdzrn3 iECOE* vis-à-vis des littermates 21 jours après la pose de constricteurs. De plus les souris *Pdzrn3 iECOE* montrent aussi une augmentation significative de l'activation astrocytaire, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité vasculaire au fibrinogène et aux IgG 14 jours après la pose de constricteurs. Ces résultats obtenus sur les souris surexprimant *Pdzrn3* dans l'endothélium, sont les résultats opposés à ceux obtenus avec les souris délétées pour *Pdzrn3* dans l'endothélium. Les résultats sont donc en adéquation les uns avec les autres. La modulation de perméabilité vasculaire cérébrale permet donc de moduler les dommages cérébraux induits par l'hypoperfusion cérébrale dans ce modèle de constricteurs carotidiens à constriction graduelle (Fig n°45).

V) Etude de la vascularisation cérébrale des souris *Pdzrn3 iECKO* et *Pdzrn3 iECO*

Les résultats obtenus précédemment ont montré que les souris *Pdzrn3 iECKO* et *iECO* présentaient des différences significatives vis-à-vis de leurs contrôles respectifs dans l'apparition des dommages cérébraux et de la perméabilité vasculaire cérébrale dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale.

Nous avons voulu vérifier que ces différences n'étaient pas dues à une différence de vascularisation du parenchyme cérébral entre ces différentes lignées murines.

Les cerveaux des souris *Pdzrn3 iECKO*, *Pdzrn3 iECO* ainsi que leurs contrôles respectifs ont été transparisés pour nous permettre d'obtenir des images de la vascularisation totale d'un hémisphère et de pouvoir ainsi les comparer et vérifier des potentielles disparités de ce volume vasculaire cérébral.

Pour ce faire les souris ont été injectées avec une lectine de tomate (*Lycopersicum Esculentum*) permettant le marquage de l'endothélium. En suivant les souris ont été euthanasiées, leur cerveau a été récupéré, fixé puis transparisé avant d'être imagé à l'aide d'un microscope à feuille de lumière. La vascularisation de 4 champs de cortex a été « squelletisée » puis quantifiée en utilisant le logiciel Imaris (Fig n°46).

Les résultats ne montrent aucune différence significative dans la vascularisation des souris *Pdzrn3 iECKO* vis-à-vis des littermates, ainsi qu'entre les souris *Pdzrn3 iECO* vis-à-vis des littermates.

Nous en avons conclu que les dommages cérébraux ainsi que la perméabilité vasculaire différentielles entre les différentes souches de souris ne sont pas liés à une différence de vascularisation des souris entre-elles.

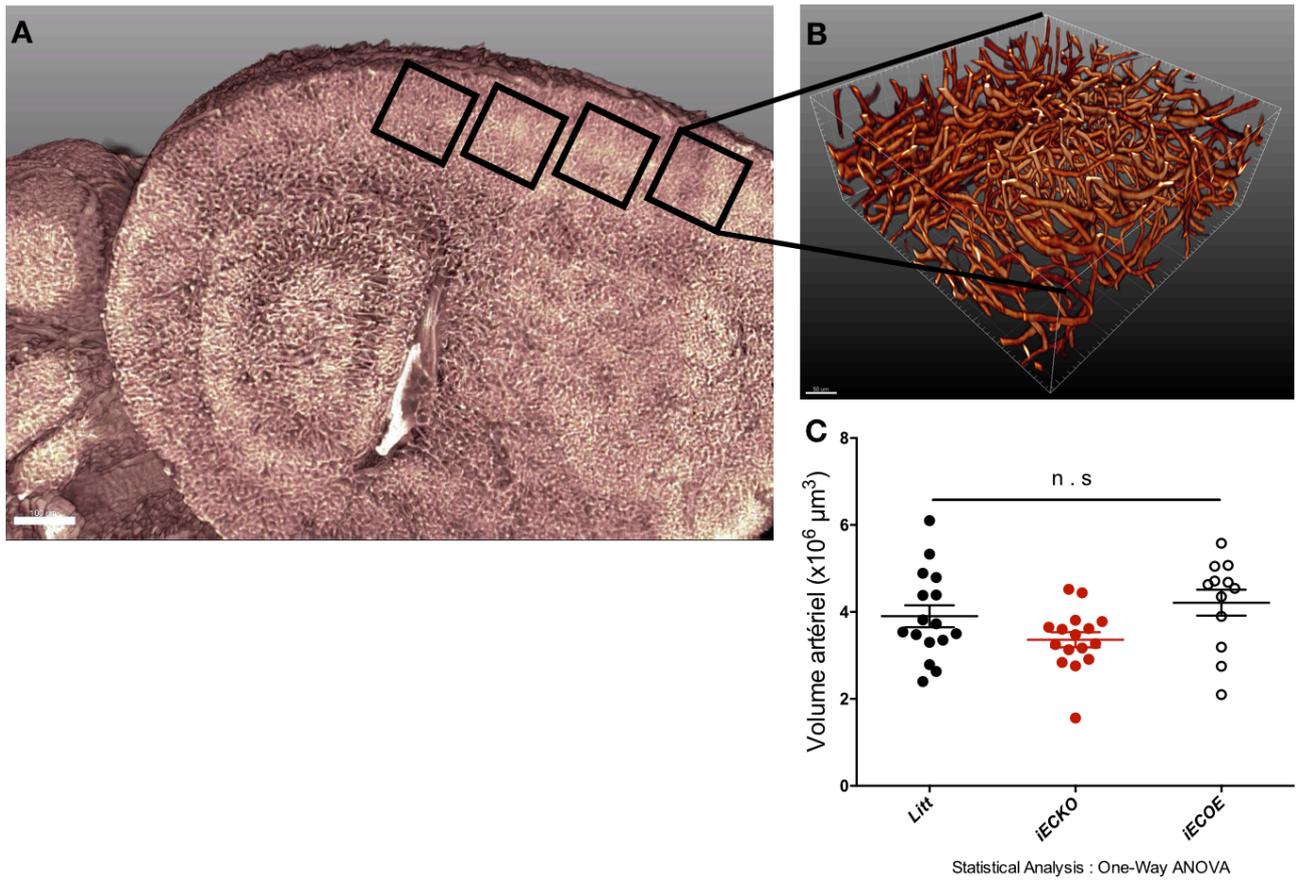


Figure n°46 : Les souris *Pdzrn3 iECKO*, *Pdzrn3 iECOIE* et littermates ne montrent pas de différence significative dans la vascularisation de l'encéphale :

(A) Image de microscopie à feuille de lumière de l'encéphale de souris transparisée. Barre d'échelle = 100 μm . Les carrés noirs représentent les champs étudiés dans les cerveaux de souris transparisées. (B) Pile d'image reconstruite de l'un des champs corticaux étudiés. Barre d'échelle 50 μm . (C) Quantification des surfaces vasculaires des piles d'images reconstruites. (n=4 *Pdzrn3 iECKO*, n=4 littermates, n=3 *Pdzrn3 iECOIE*). Analyse statistique : One-Way ANOVA. n.s= non significatif.

VI) Etude comportementale des souris portant des constricteurs :

Le diagnostic de démence chez l'Homme ne peut être fait sans vérification de l'altération de la cognition du sujet. En effet ce déclin cognitif est la marque primaire de la démence. Il est admis aujourd'hui que ce déclin cognitif retrouvé chez les patients atteints de démence est principalement lié à la perte des dendrites ou des neurones *per se* des différents circuits neuronaux localisés dans l'hippocampe ainsi que le cortex. Pour vérifier un tel déclin cognitif plusieurs questionnaires et/ou exercices ont été mis en place par la communauté des neurologues. Ce genre de questionnaires n'est évidemment pas applicable pour l'étude de la cognition de souris. C'est pourquoi plusieurs tests de comportement ont été mis au point permettant l'évaluation des capacités mnésiques des souris.

Nous avons d'ores et déjà mis en évidence une perte neuronale dans la zone CA1 de l'hippocampe de nos souris. Nous avons donc voulu évaluer leurs capacités mnésiques et ainsi vérifier la validité de ce modèle de démence d'origine vasculaire. Nous avons tout d'abord essayé un test de comportement de reconnaissance d'objets dans un « open-field ». Le protocole que nous avons utilisé est le suivant. Brièvement, après une période d'habituation de l'animal de 3 jours, un test de reconnaissance d'objet est mené le 4^e jour. La souris est mise en présence de deux objets identiques, préalablement testés. La souris est ensuite retirée de l'open-field et un des objets présents est substitué. Les souris étant des animaux curieux de nature, elles sont censées reconnaître cette nouveauté et sont donc attendues à passer plus de temps auprès de cette dernière. De plus ce test permet aussi d'étudier la capacité innée de l'animal à explorer son environnement quand ce dernier vient à changer. Le choix qui est donné à l'animal durant ce test de pouvoir approcher un nouvel objet ainsi que la réactivation de l'exploration après remplacement de ce dernier

reflète particulièrement bien la qualité des processus d'apprentissage ainsi que ceux de reconnaissance mnésique. Nous avons réalisé ce test sur 2 groupes de souris *Pdzn3 iECKO* et contrôles avant et après la pose de constricteurs et avons obtenu les résultats suivants (Fig n°47).

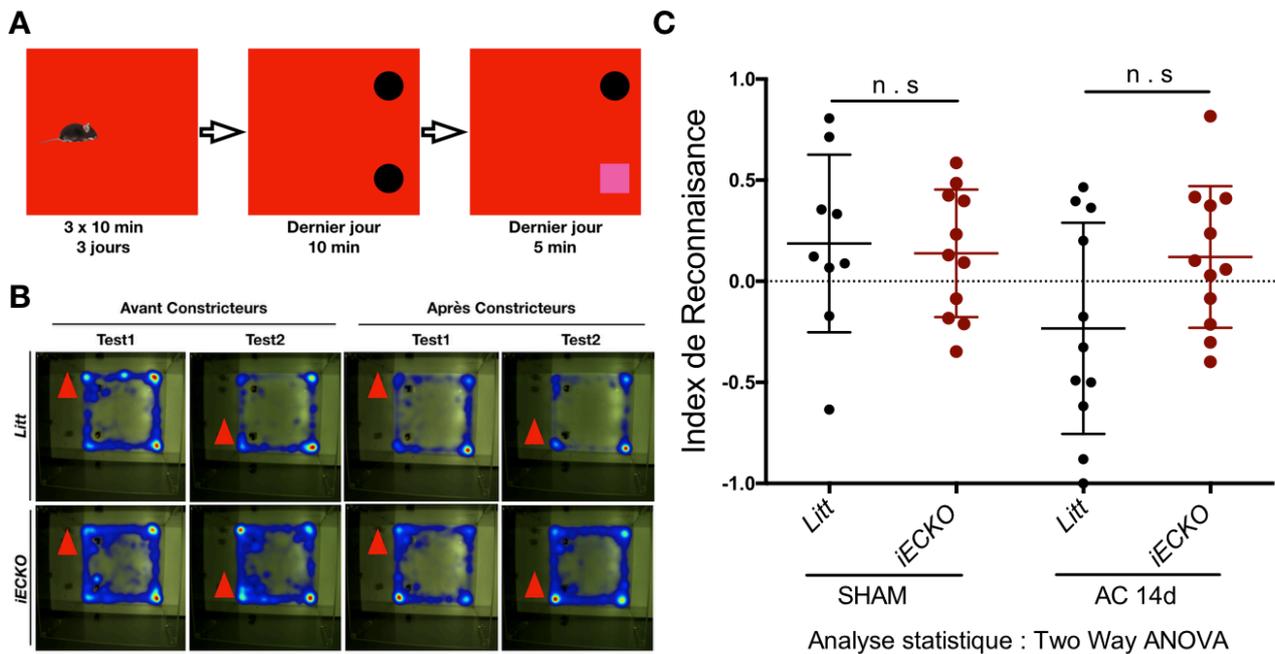


Figure n°47 : Les souris *Pdzn3 iECKO* et littermates ne montrent pas de différences en conditions SHAM ou AC dans le test de reconnaissance du nouvel objet :

(A) Schéma du protocole utilisé pour la réalisation du test. (B) « Heatmaps » des souris *Pdzn3 iECKO* ou contrôles avec ou sans constricteurs en fonction du test réalisé. Les triangles rouges indiquent l'endroit où est placé le nouvel objet. (C) Résultats du test de reconnaissance de nouvel objet (n=9 littermates SHAM, 11 *Pdzn3 iECKO* SHAM, n=11 littermates AC, n= 12 *Pdzn3 iECKO* AC). Analyse statistique : Two-Way ANOVA. n.s.= non significatif

Le test réalisé ici, 14 jours après la pose de constricteurs ne permet pas de mettre en évidence une différence dans la cognition des souris sur lesquelles ont été posés des constricteurs avant ou après la pose de ces derniers et ce quel que soit le génotype des souris.

Après les résultats de ce test nous avons décidé de changer de test pour passer à l'utilisation d'un test permettant d'étudier plus précisément la mémoire à court terme des animaux, ici le labyrinthe en Y. En effet la zone CA1 de l'hippocampe particulièrement touchée après la pose de constricteurs est une des zones les plus importantes en ce qui

concerne l'acquisition de nouveaux souvenirs et de consolidation de ces derniers pour les faire passer des circuits neuronaux responsables de la mémoire à court terme vers les circuits neuronaux responsables de la mémoire à long terme consolidée. Lors de ce test l'animal sera placé dans un labyrinthe en Y dont un des bras sera fermé durant la première exploration. L'animal est ensuite retiré du labyrinthe et ramené dans sa cage. Quelques minutes après l'animal est remis dans le labyrinthe dont tous les bras sont ouverts. L'animal est alors censé se rappeler des bras explorés préalablement et ainsi passer plus de temps dans le bras considéré comme « nouveau » qui a été ouvert.

Ce test du labyrinthe en Y a été réalisé sur les souris *Pdzn3 iECKO* et *iECOE* avec et sans constricteurs ainsi qu'avec leurs contrôles respectifs et ce à plusieurs temps (Fig n°48). Les résultats des différents tests réalisés sur les souris *Pdzn3 iECKO* montrent que les souris sont en moyenne à une valeur de 0,5 d'index de reconnaissance en l'absence de constricteurs. Nous avons alors passé les souris 10 jours après la pose de constricteurs et les résultats montrent une réduction de la capacité des souris contrôles à réaliser le test. En effet la moyenne des souris contrôles passe de 0,5 à quasiment -0,25 d'index de reconnaissance 10 jours après la pose de constricteurs. Les souris *Pdzn3 iECKO* montrent donc une protection liée à la délétion du gène *Pdzn3* dans l'endothélium vis-à-vis de leurs contrôles. Conformément, les résultats du test de « Nesting » des animaux *Pdzn3 iECKO* ainsi que leurs littermates montrent que les souris *Pdzn3 iECKO* conservent une capacité significativement différente à nidifier vis-à-vis de leurs contrôles, et ce jusque 14 jours après la pose de constricteurs. Enfin l'étude des vitesses moyennes des souris lors du test ne présentant pas de différence, il n'est pas possible d'imputer les différences de performances à une différence de locomotion. Conformément le test de la falaise (Fig n°48 J) ne permet pas d'imputer les différences de performance à un potentiel défaut de vision,

les souris ne présentant pas de différences significatives dans le temps passé sur la plateforme anxiogène, même à J0, permettant de dire que la pose de constricteur n'entraîne pas de défaut de vision chez les souris utilisées. La performance des souris *Pdzrn3 iECKO* au test du labyrinthe en Y est en totale adéquation avec les résultats obtenus lors de la quantification de la perte neuronale hippocampale des neurones de la zone CA1. Nous avons ensuite réalisé cette expérience de labyrinthe en Y sur les souris *Pdzrn3 iECO*E. Nous avons vu précédemment que les souris surexprimant *Pdzrn3* dans l'endothélium présentaient une perte neuronale dans la zone CA1 de l'hippocampe exacerbée comparées à leurs contrôles. Nous avons donc avancé le test sur ces souris à 7 au lieu de 10 jours après la pose de constricteurs, dans le but de pouvoir comparer les souris *Pdzrn3 iECO*E à un temps où les souris contrôles ne montrent pas encore de réduction de leurs capacités mnésiques. Les résultats de cette expérience montrent qu'effectivement les souris *Pdzrn3 iECO*E subissent déjà une réduction de leurs capacités cognitives dès le 7^e jour après la pose de constricteurs. Ce résultat est en adéquation totale avec ceux obtenus préalablement en histologie sur les souris surexprimant *Pdzrn3*. Et est aussi en adéquation avec les résultats obtenus sur les souris *Pdzrn3 iECKO*.

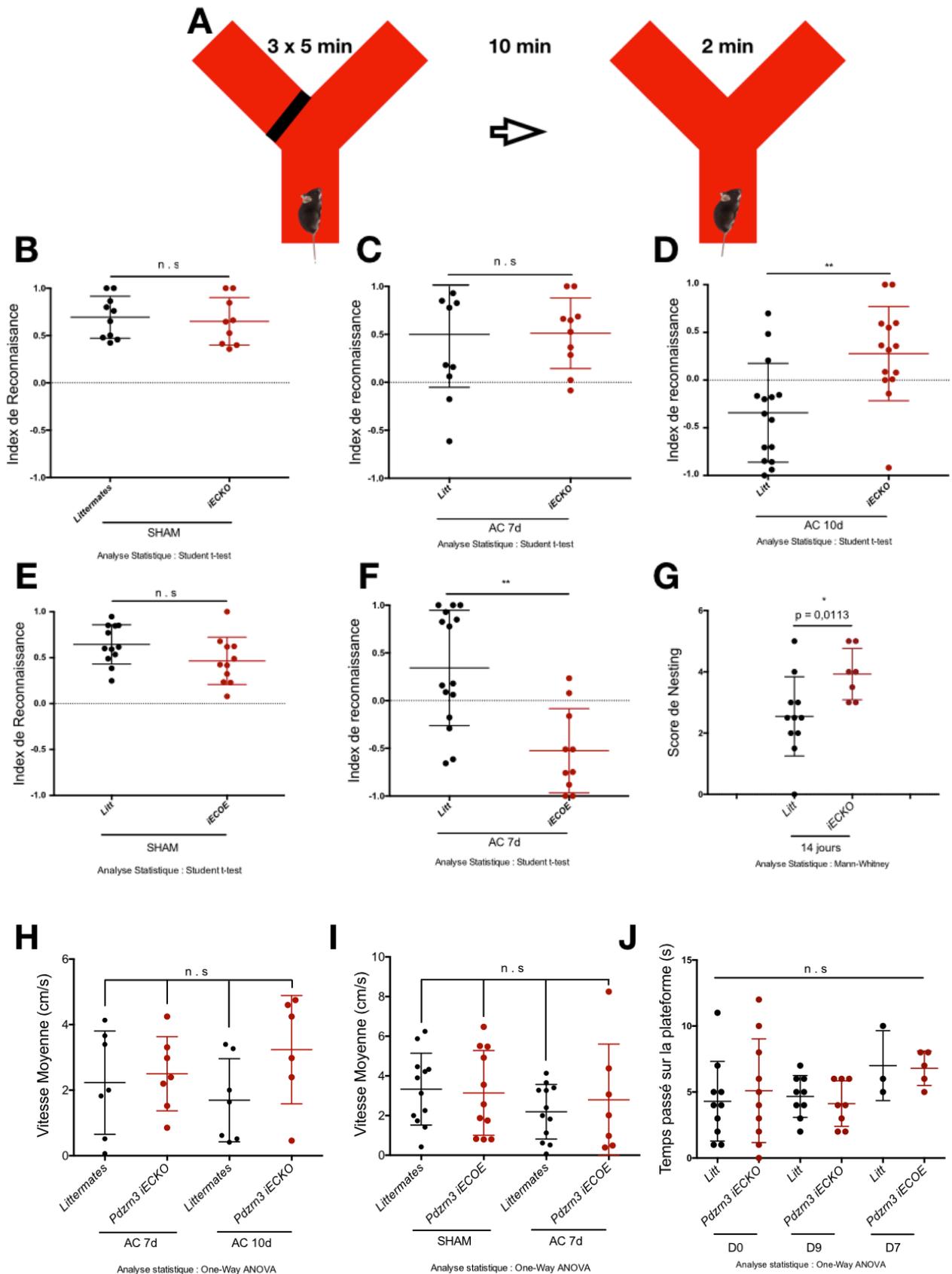


Figure n°48 : La capacité à réaliser le test du labyrinthe en Y est impactée par la surexpression ou la délétion de *Pdzrn3* dans l'endothélium :

(A) Schéma du protocole utilisé pour la réalisation du test. (B) Résultats des tests des souris *Pdzrn3 iECKO* et Littermates avant la pose de constricteurs (SHAMs). (n= 10 vs 9 Littermates vs *Pdzrn3 iECKO*). (C) Résultats des tests des souris

Pdzrn3 iECKO 7 jours après la pose de constricteurs (n= 9 vs 10 Littermates vs *Pdzrn3 iECKO*). (D) Résultats des tests des souris *Pdzrn3 iECKO* 10 jours après la pose des constricteurs (n= 16 vs 14 Littermates vs *Pdzrn3 iECKO*). (E) Résultats des tests des souris *Pdzrn3 iECO*E avant la pose de constricteurs (n= 12 vs 11 Littermates vs *Pdzrn3 iECO*E). (F) Résultats des tests des souris *Pdzrn3 iECO*E 7 jours après la pose des constricteurs (n= 15 vs 11 Littermates vs *Pdzrn3 iECO*E). (G) Résultats du test de « Nesting » des souris *Pdzrn3 iECKO* 14 jours après la pose de constricteurs (n= 11 vs 7 Littermates vs *Pdzrn3 iECKO*). (H)&(I) Vitesse de course moyenne des souris durant le test de comportement du labyrinthe en Y (n=6/groupe (H) ; n= 12 vs 11 Littermates vs *Pdzrn3 iECO*E (I)). (J) Résultats du test de la falaise à D0 et D10 pour les souris *Pdzrn3 iECKO* et littermates à D7 pour les souris *Pdzrn3 iECO*E. (n=10/groupe à D0, n=8/groupe à D10, n=3-5/groupe à J7). Analyses Statistiques : Student t-test : n.s = non significatif, * = p<0,05, ** = p< 0,01. One-Way ANOVA : n.s = non significatif.

Nous avons donc mis au point un modèle de constricteurs carotidiens induisant l'apparition de dommages cérébraux phénotypant les dommages détectés chez les patients atteints de démence d'origine vasculaire. Les expériences réalisées sur les souris *Pdzrn3 iECKO*, *Pdzrn3 iECO*E et contrôles respectifs nous ont permis de mettre en évidence que la perméabilité vasculaire cérébrale est corrélée à la mise en place de ces dommages. En effet les souris *Pdzrn3 iECKO* ont une perméabilité réduite et montrent moins d'ischémies, de saignements, de perte neuronale, de diffusion des composés du sang. De plus il est impossible de mettre en évidence une invasion macrophagique sur ces souris vis-à-vis des littermates. Enfin elles montrent aussi une capacité mnésique conservée à 10 jours après la pose de constricteurs à l'instar des littermates. Ces résultats mis ensemble montre un réel effet de la perméabilité vasculaire sur l'avancement de la maladie ainsi que la rapidité de la mise en place de cette dernière.

Le fait que la perméabilité vasculaire puisse moduler la mise en place de la démence d'origine vasculaire ainsi que le fait que fait que la perméabilité vasculaire accrue et l'hypoperfusion cérébrales soient elles aussi des caractéristiques des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, nous permet de poser l'hypothèse suivante :

Dans un modèle de maladie d'Alzheimer, la délétion de *Pdzrn3* spécifiquement dans l'endothélium serait-elle capable de réduire les dommages cérébraux ou de ralentir la progression de la maladie ?

Nous avons alors croisé les souris *Pdzrn3 iECKO* avec les souris modèle de la maladie d'Alzheimer *APP/PS1* pour obtenir la lignée mutante de souris *APP/PS1 ; Pdzrn3 iECKO* (Fig n°48). Nous avons ensuite étudié les mêmes dommages que ceux observés chez les souris sur lesquelles ont été posés des constricteurs, ainsi que certains marqueurs spécifiques de la maladie d'Alzheimer.

Impact de la réduction de la perméabilité vasculaire cérébrale sur la mise en place de la maladie d'Alzheimer :

l) Histologie des cerveaux du modèle de souris de la maladie d'Alzheimer :

Nous avons tout d'abord commencé par étudier le flux moyen cortical des souris engendrées par le croisement *APP/PS1* et *Pdzn3 iECKO* et ce en fonction de l'âge des souris. En effet la littérature fait mention d'une baisse du flux sanguin cérébral chez les patients atteints de la Maladie d'Alzheimer (Leijenaar et al., 2017). Les résultats montrent que le génotype *APP/PS1* entraîne une baisse du flux sanguin cérébral avec l'âge, sans effet de la délétion de *Pdzn3* (Fig n°49). Nous avons ensuite étudié l'arrivée et l'accumulation du peptide β -amyloïde sous forme de plaque séniles dans le cortex des souris *APP/PS1* et *APP/PS1 ; Pdzn3 iECKO*. Pour ce faire les souris ont été euthanasiées, les cerveaux ont été récupérés, fixés, inclus, coupés et marqués par le biais d'un anticorps, le 6E10 permettant de mettre en évidence les dépôts de protéines β -amyloïde sous forme de plaque séniles. Nous avons ensuite quantifié ces dépôts sur plusieurs coupes de cortex des animaux et calculés une surface corticale 6E10+. Le marquage et la quantification de l'accumulation des peptides β -amyloïdes a été réalisée 6 et 12 mois après la naissance des souris. En effet la littérature admet que ce modèle de souris Alzheimer commence à accumuler le peptide β -amyloïde à ce moment dans le cortex, il est décrit que les souris *APP/PS1* peuvent aussi présenter des plaques hippocampales à partir de 9 mois d'âge.

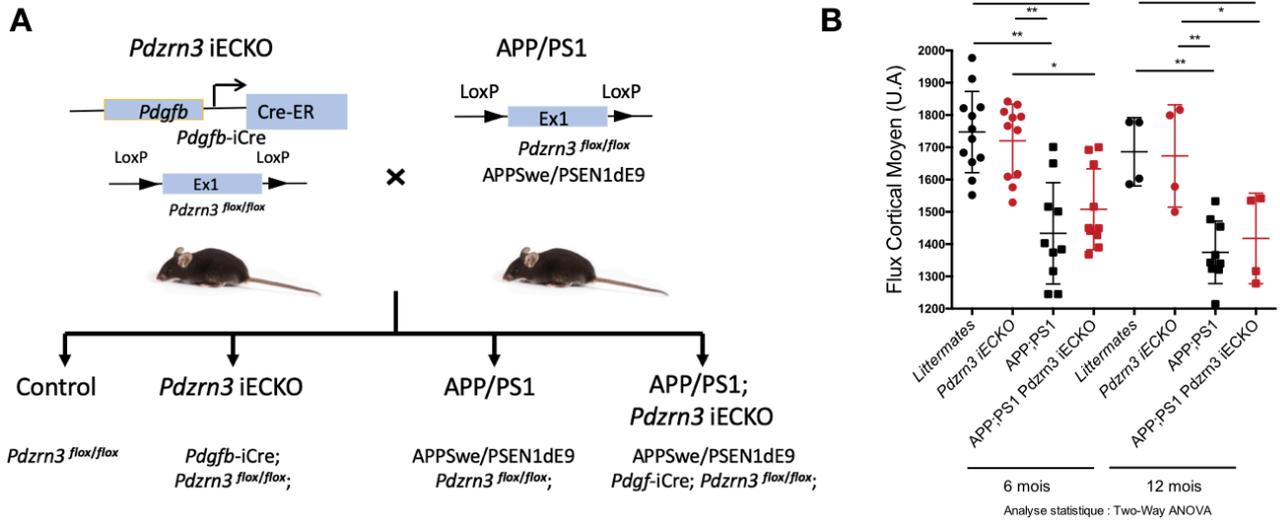


Figure 49 : Le croisement des souris *APP/PS1* et *APP/PS1 ; Pdzrn3 iECKO* entraîne une baisse du flux sanguin cérébral cortical avec l'âge :

(A) Construction génétique des souris *APP/PS1 ; Pdzrn3 iECKO* réalisée en croisant des souris *APP/PS1 ; Pdzrn3^{F/F}* et des souris *APP/PS1 ; Pdzrn3^{F/F} Pdgfb-iCre*. La délétion de *Pdzrn3* dans l'endothélium est obtenue par injection de Tamoxifène. (B) Résultats du doppler transcranien des 4 génotypes de souris donnés par le croisement *Pdzrn3 iECKO* et *APP/PS1*, en fonction de l'âge. (n = 4-12/groupe). Analyse statistique : Two-Way ANOVA. * = p < 0,05 ; ** = p < 0,01.

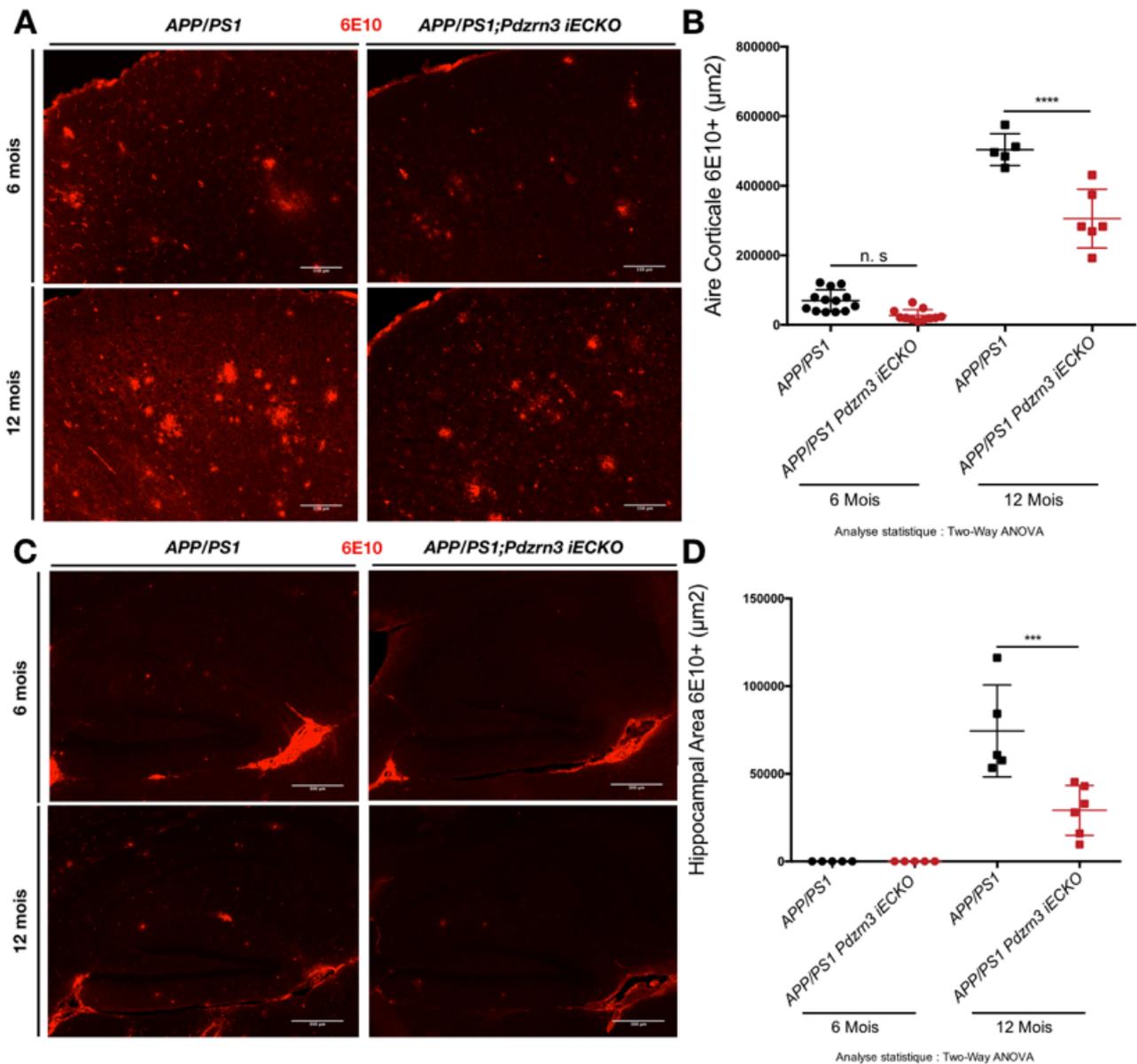


Figure n°50 : La délétion de *Pdzrn3* dans l'endothélium réduit la quantité de peptide β-amyloïde accumulé dans le cortex et l'hippocampe de souris *APP/PS1* à 12 mois :

(A) Images représentatives de Cortex de souris montrant une accumulation de plaque d'Aβ (6E10, rouge) à 6 et 12 mois. Barres d'échelles = 150 μm (B) Quantification de la surface corticale des souris marquées par le 6E10 (n=13 *APP/PS1* vs 10 *APP/PS1 ;Pdzrn3 iECKO* à 6mois et n=5 *APP/PS1* vs 6 *APP/PS1 ;Pdzrn3 iECKO* à 12mois) Analyses statistiques : Two-Way ANOVA avec Multiples comparaisons de Tukey. (C) Images représentatives des Hippocampes de souris montrant une accumulation de plaques d'Aβ à 12 mois. Barres d'échelles = 300 μm (D) Quantification de la surface hippocampale des souris marquées par le 6E10 (n=5 *APP/PS1* vs 5 *APP/PS1 ;Pdzrn3 iECKO* à 6mois et n=5 *APP/PS1* vs 6 *APP/PS1 ;Pdzrn3 iECKO* à 12mois). Analyses statistiques : Two-Way ANOVA avec Multiples comparaisons de Tukey.

Les plaques sont détectables dans le cortex des souris dès 6 mois d'âge et continuent à s'accumuler jusqu'à 12 mois. L'apparition de plaques dans l'hippocampe se fait aux

alentours de 9 mois d'âge dans ce modèle de souris Alzheimer. Elles sont de fait facilement détectables à 12 mois. Les plaques s'accumulent dans l'entièreté du Cortex des souris. Les cerveaux des souris présentent une concentration décroissante de la quantité de plaques suivant l'axe antéro-postérieur du cerveau. Des plaques peuvent être retrouvées dans la substance blanche, particulièrement dans le corps calleux et le caudoputamen, comme dans la substance grise, avec un léger tropisme pour cette dernière notamment en cortical. Les noyaux gris centraux ne sont pas épargnés, en effet des plaques peuvent être retrouvées dans le Thalamus ainsi que l'Hypothalamus (Whitesell et al., 2018). Les résultats montrent une réduction significative de la surface couverte par les plaques β -amyloïdes dans le cortex ainsi que dans l'hippocampe des souris *APP/PS1 ; Pdzn3 iECKO* vis-à-vis de leurs contrôles *APP/PS1* à 12 mois (Fig n°50).

Nous avons ensuite voulu étudier la perte neuronale ainsi que l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique dans le cortex des souris *APP/PS1* et *APP/PS1 ; Pdzn3 iECKO*. Pour ce faire nous avons réalisé des immuno-fluorescence pour le marqueur de viabilité neuronale NeuN d'une part ainsi que les IgG des souris diffusant hors de la barrière sur les coupes de cerveaux de souris d'autre part (Fig n°51).

La première caractéristique de ces immuno-marquages est que la perte neuronale montrée par la disparition du marquage NeuN se fait par plages dans les cerveaux des souris *APP/PS1*. En effet les zones où le marquage est absent sont facilement délimitables, montrant que la perte neuronale chez ces souris est focale et étendue. De plus ces plages étendues de perte neuronales sont absentes des cortex de souris *APP/PS1 ; Pdzn3 iECKO*, en effet les souris présentent effectivement une perte neuronale mais celle-ci ne semble pas se faire sous forme de plages entières mais plutôt en petits foci disséminés

dans la surface du cortex. Ensuite il semble que les plages de perte neuronale mises en évidence dans les cortex de souris *APP/PS1* colocalisent avec les zones d'ouverture de barrière d'où diffuse les IgG ou le fibrinogène en suivant les contours des plages de perte neuronale. Les résultats obtenus ici montrent que la délétion endothéliale de *Pdzn3* dans ces souris entraîne une diminution significative de la perméabilité vasculaire cérébrale, à 6 et 12 mois d'âge des souris comparée aux contrôles *APP/PS1* ainsi qu'une diminution significative de la perte neuronale corticale chez ces souris. Il est à noter que peu voire aucune artère corticale des souris *APP/PS1 ; Pdzn3 iECKO* ne laissent diffuser le fibrinogène hors de la BHE à l'instar des souris *APP/PS1*. Les souris contrôles présentent du fibrinogène diffusant hors de la barrière sans distinction évidente du calibre des artérioles. (Fig n°51).

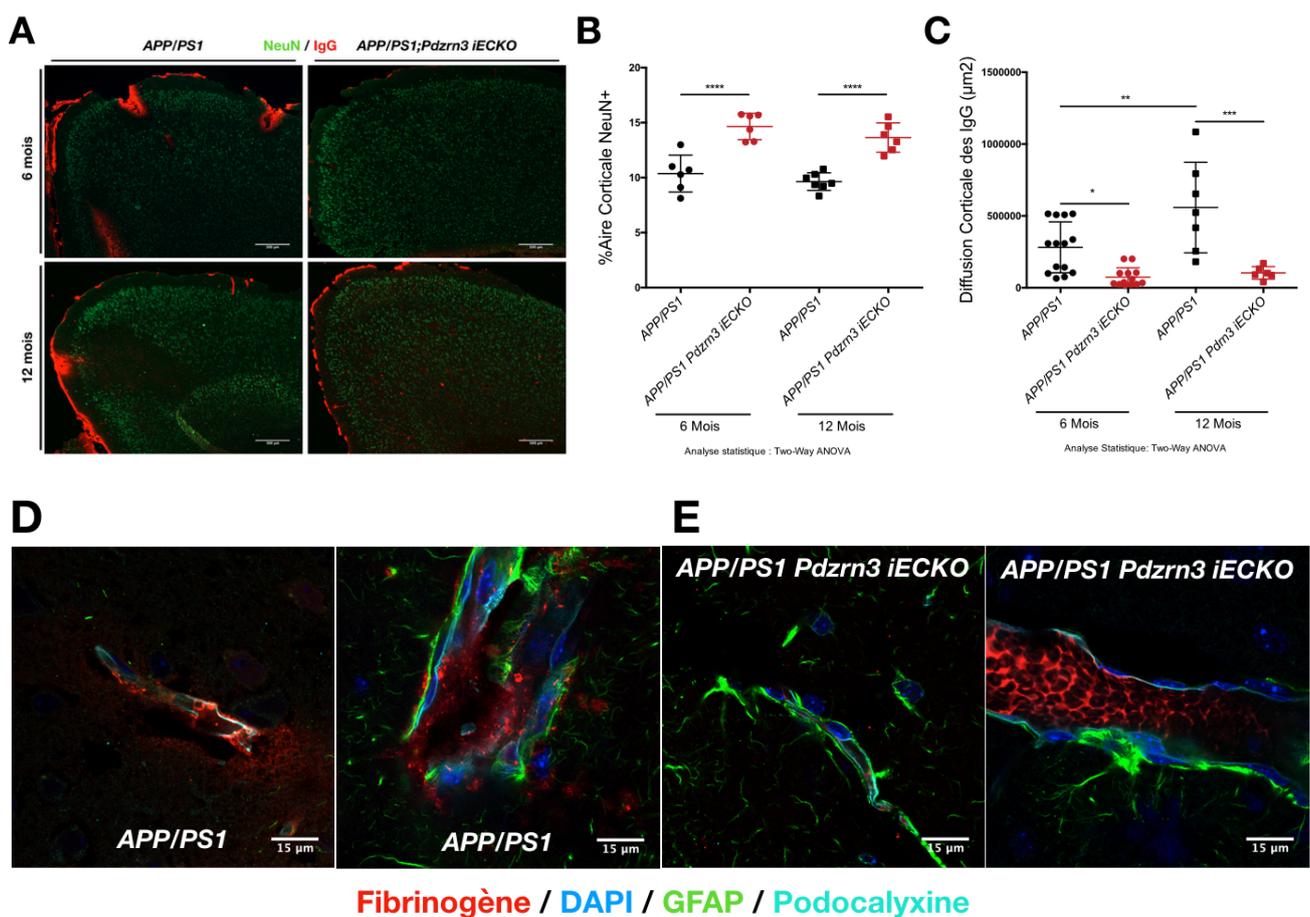


Figure n°51 : La délétion endothéliale de *Pdzn3* réduit la perméabilité de la barrière aux IgG et au fibrinogène ainsi que la perte neuronale corticale dans un modèle de maladie d'Alzheimer :

(A) Images représentatives de Cortex de souris montrant une perte neuronale (NeuN, vert) dans les zones de diffusion des IgG (rouge). Barres d'échelles = 300 μm (B) Quantification de la perte neuronale corticale des différentes conditions

(n=6/groupe à 6mois et 7 *APP/PS1* vs 6 *APP/PS1 ;Pdzrn3 iECKO* à 12 mois). Analyses statistiques : Two-Way ANOVA avec Multiples comparaisons de Tukey. (C) Quantification de la surface de diffusion des IgG dans le cortex dans les différentes conditions (n= 14/groupe à 6mois et 7 *APP/PS1* vs 6 *APP/PS1 ;Pdzrn3 iECKO* à 12mois). Analyses statistiques : Two-Way ANOVA avec Multiples comparaisons de Tukey. (D) Images représentatives des marquages du fibrinogène (rouge), podocalyxine (cyan), GFAP (vert), et DAPI (bleu), montrant une diffusion du fibrinogène hors de la BHE chez les souris *APP/PS1*. Barres d'échelles : 15 µm. (E) Images représentatives des marquages du fibrinogène (rouge), podocalyxine (cyan), GFAP (vert), et DAPI (bleu) ne montrant pas de diffusion du fibrinogène dans les artères des souris *APP/PS1 ; Pdzrn3 iECKO*. Barres d'échelles : 15 µm.

Après avoir étudié la perte neuronale et la perméabilité des souris *APP/PS1* et *APP/PS1 ; Pdzrn3 iECKO* nous avons voulu étudier l'impact de la délétion de *Pdzrn3* sur l'activité astrocytaire en marquant la GFAP d'une part, et nous avons voulu regarder l'impact de la délétion de *Pdzrn3* sur l'activation de la microglie via l'utilisation du marqueur Iba-1, marqueur de l'activation de la microglie (Fig n°52).

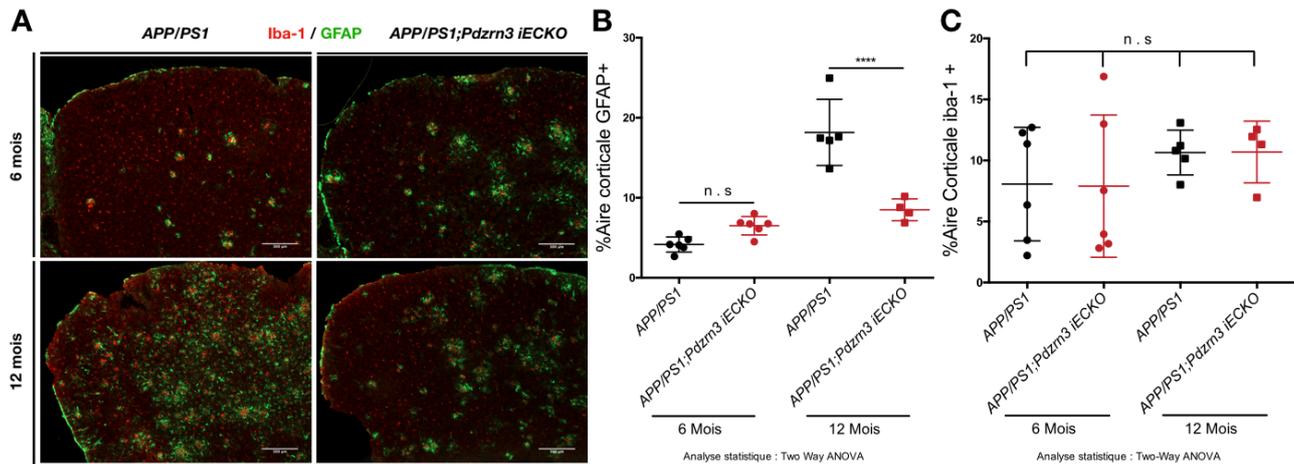


Figure n°52 : La délétion endothéliale de *Pdzrn3* réduit l'activation astrocytaire mais n'a aucun effet sur l'activation de la microglie dans le cortex des souris modèle de maladie d'Alzheimer :

(A) Images représentatives de Cortex de souris marquées pour la GFAP (vert) ou Iba-1 (rouge). Barres d'échelles = 300 µm. (B) Quantification de l'activation astrocytaire dans le cortex des souris (n= 6/groupe à 6mois et 5 *APP/PS1* vs 4 *APP/PS1 ;Pdzrn3 iECKO* à 12mois). Analyse Statistique : Two-Way ANOVA avec multiple comparaisons de Tukey. (C) Quantification de l'activation de la microglie dans le cortex des souris (n= 6/groupe à 6mois et 5 *APP/PS1* vs 4 *APP/PS1 ;Pdzrn3 iECKO* à 12mois). Analyse statistique : Two-Way ANOVA avec multiples comparaisons de Tukey.

Les résultats de ces expérimentations montrent tout d'abord que dans la pathologie Alzheimer, l'activation de la GFAP croît avec le temps. Néanmoins les résultats obtenus ici ne montre pas d'induction d'activation de la microglie à mesure que les animaux vieillissent. Il est cependant à noter que l'activation astrocytaire et microgliale se fait sous

forme focale autour des plaques séniles dans le cortex ainsi que dans l'hippocampe des souris, sans distinction du génotype.

Les résultats obtenus confirment cependant les résultats obtenus dans le modèle de démence d'origine vasculaire. La délétion de *Pdzn3* dans l'endothélium des souris *APP/PS1* entraîne une diminution significative de l'activation de la GFAP vis-à-vis des contrôles.

La littérature fait mention de la perte du recouvrement pericytaire de la micro-circulation cérébrale dans le modèle de souris *APP/PS1* et ce avec l'âge. Nous avons donc voulu étudier ce paramètre dans notre modèle. Ici les souris ont été étudiées à 6 mois d'âge, date d'apparition des premières plaques séniles dans le cortex des animaux.

Les résultats obtenus montrent une perte significative du recouvrement pericytaire lié au génotype *APP/PS1*. En effet au même âge les souris contrôles, les souris *Pdzn3 iECKO*, ainsi que les souris *APP/PS1 ; Pdzn3 iECKO* ne montrent pas de différences dans leur recouvrement pericytaire cortical entres-elles. Néanmoins la délétion endothéliale de *Pdzn3* dans les souris *APP/PS1* sauve ce phénotype. Ces souris ne présentent pas de différence dans le recouvrement pericytaire cortical comparées aux cerveaux des souris contrôles *APP/PS1* négatives issues de la même portée. La délétion de *Pdzn3* dans l'endothélium, permet de maintenir à 6mois un recouvrement pericytaire cortical dans un modèle de démence de type Alzheimer. Ces résultats sont cohérents avec les autres résultats obtenus dans cette étude des souris modèle de la maladie d'Alzheimer (Fig n°53).

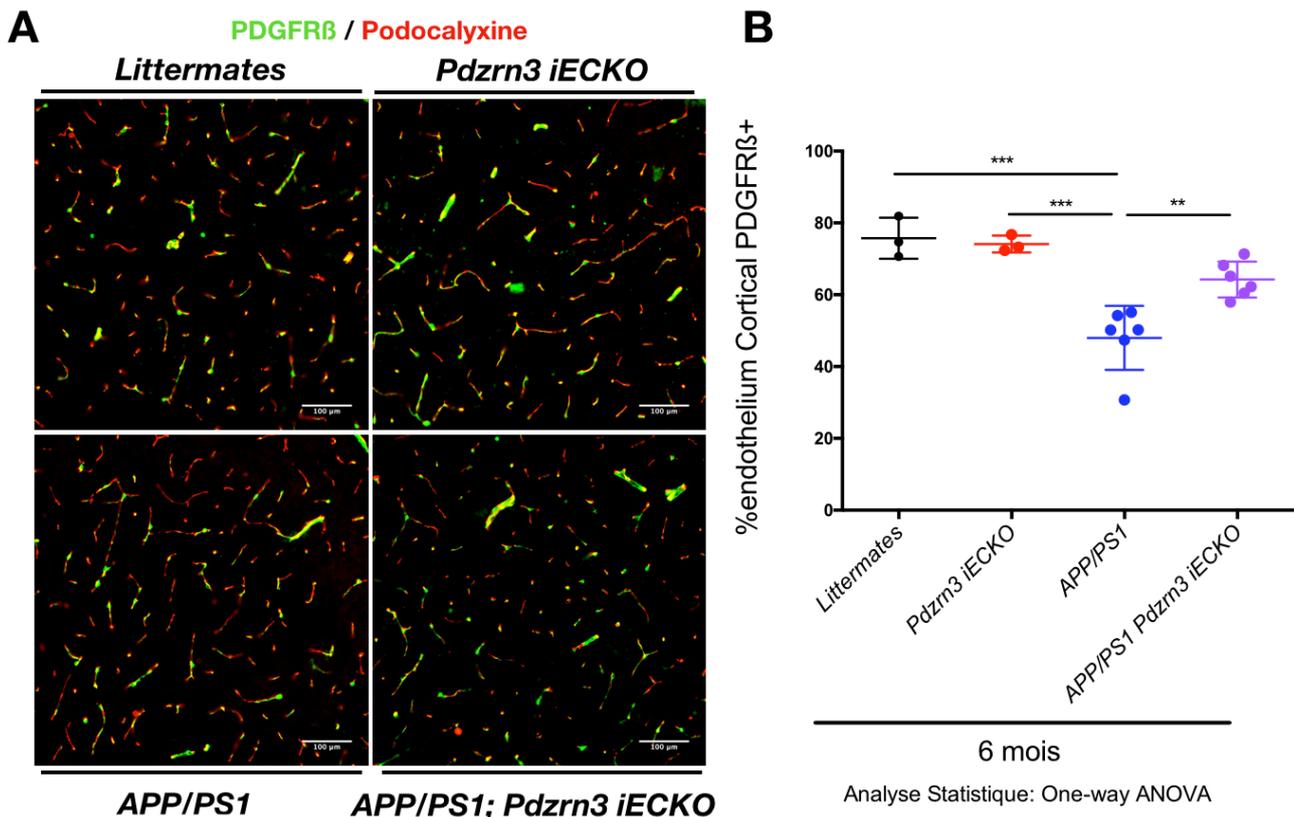


Figure n°53 : La délétion endothéliale de *Pdzn3* réduit la perte pericytaire corticale dans un modèle de démence Alzheimer :

(A) Images représentatives des cortex des souris immunomarquées pour le PDGFR β (Vert) et la Podocalyxine (Rouge) pour les différentes conditions. Barres d'échelles = 100 μ m. (B) Quantification du recouvrement pericytaire cortical (n= 3 pour les littermates et *Pdzn3* iECKO. n=6 pour les APP/PS1 vs APP/PS1 ;*Pdzn3* iECKO). Analyse statistique : One-Way ANOVA avec multiples comparaisons de Tuckey.

Les résultats obtenus au cours de l'étude histologique des cerveaux *APP/PS1* et *APP/PS1* ; *Pdzn3* iECKO semblent cohérents entre eux et avec les résultats obtenus au cours de l'étude du modèle d'hypoperfusion cérébrale. En effet nous avons trouvé ici une réduction de la perméabilité vasculaire chez les souris délétées pour *Pdzn3* dans l'endothélium, nous avons aussi trouvé une diminution significative de la perte neuronale, ainsi que de l'accumulation sous la forme de plaque séniles de l'A β . Nous avons aussi retrouvé une diminution de l'activation astrocytaire dans le cortex des souris. De plus nous avons mis en évidence que la délétion endothéliale de *Pdzn3* permet de significativement réduire la perte pericytaire détectée chez les souris *APP/PS1* à 6 mois. Néanmoins nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de différence dans l'activation de la microglie.

Ces résultats laissent entendre que la fonction impactée, ici la perméabilité vasculaire cérébrale joue un rôle crucial dans la mise en place de la pathologie de démence d'origine vasculaire d'une part ainsi que dans la mise en place de la maladie d'Alzheimer d'autre part. En modulant la perméabilité vasculaire cérébrale il est possible de retarder les altérations cérébrales liées à l'apparition de la maladie.

II) Analyse moléculaire de la BHE dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer :

Il a été proposé dans la littérature que les niveaux protéiques des composants des jonctions endothéliales décroît ou est relocalisé dans le cas de la dysfonction de la barrière hémato-encéphalique associée aux maladies cérébro-vasculaires (Liu et al., 2012). PDZRN3 a été montré comme étant impliqué dans la localisation polarisée ainsi que le maintien des protéines jonctionnelles dans les cellules endothéliales cérébrales (Sewduth et al., 2017). En effet un faisceau d'argument pointe en direction d'une corrélation entre la dysfonction de la barrière hémato-encéphalique et l'altération de l'intégrité des jonctions serrées inter-endothéliales. Nous avons alors posé l'hypothèse selon laquelle, la délétion endothéliale de *Pdzrn3* régule l'expression des protéines spécifique de la barrière dans le contexte de la maladie d'Alzheimer.

Dans nos préparations de vaisseaux cérébraux intacts, la caractérisation des marqueurs de vasculature cérébrales des souris *APP/PS1* a montré une expression réduite de *Wnt7b*, comme retrouvé dans le modèle d'hypoperfusion cérébrale chronique. Nous avons ensuite trouvé que la délétion endothéliale de *Pdzrn3* pouvait sauver les effets du génotype *APP/PS1* et induire *Wnt7b* dans cette unité glio-vasculaire (Fig n°54). De plus, une expression altérée de la claudine-5 a été liée à une réduction de la signalisation Wnt dite canonique (de la β -caténine) dans le système nerveux central. Nous avons alors

regardé l'expression des protéines jonctionnelles endothéliales. Nous avons observé que la délétion endothéliale de *Pdzn3* induit un fort enrichissement en ARNm et en protéine claudine-5 dans les souris APP/PS1 comparées aux souris contrôles. Néanmoins les autres marqueurs des jonctions inter-endothéliales de la barrière hémato-encéphalique tels que ZO-1 ou l'occludine ne montrent pas de variations significatives (Fig n°54).

Nous avons ensuite utilisé l'imagerie microscopique confocale ainsi que l'immunofluorescence pour caractériser les motifs d'expression de la claudine-5 au niveau des jonctions inter-endothéliales de la barrière et ce sur des capillaires SMA-négatifs (pour Smooth Muscle Actine, Actine Musculaire Lisse). Les résultats obtenus sont en adéquation avec nos résultats précédents. En effet, nos résultats montrent que l'intensité de l'immunomarquage de la claudine-5 décroît chez les souris *APP/PS1* comparées aux souris contrôles de même âge. De plus la claudine-5 est plus abondante aux sites de contacts endothéliaux dans les microvaisseaux des souris *APP/PS1 ; Pdzn3 iECKO*, vis-à-vis des souris *APP/PS1* contrôles (Fig n°53). La distribution de la VE-cadhérine n'apparaît pas comme étant modifiée dans nos préparations de vaisseaux. Cette dernière est détectée à des niveaux équivalents dans les capillaires des souris *APP/PS1*, littermates, et *APP/PS1 ; Pdzn3 iECKO*. Ces résultats mis ensemble suggèrent que la signalisation liée à PDZRN3 entraîne une augmentation des fibres formant les jonctions serrées induisant une subséquente réduction de la perméabilité vasculaire.

Ces résultats supportent le modèle selon lequel la maladie d'Alzheimer entraîne une déstabilisation de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique dépendant de la voie de signalisation Wnt. De plus nos résultats suggèrent que la délétion endothéliale de *Pdzn3* permet de sauver ce phénotype *via* un maintien des jonctions et donc de la perméabilité

vasculaire entraînant *in fine* un maintien de la barrière hémato-encéphalique dans une conformation « saine ».

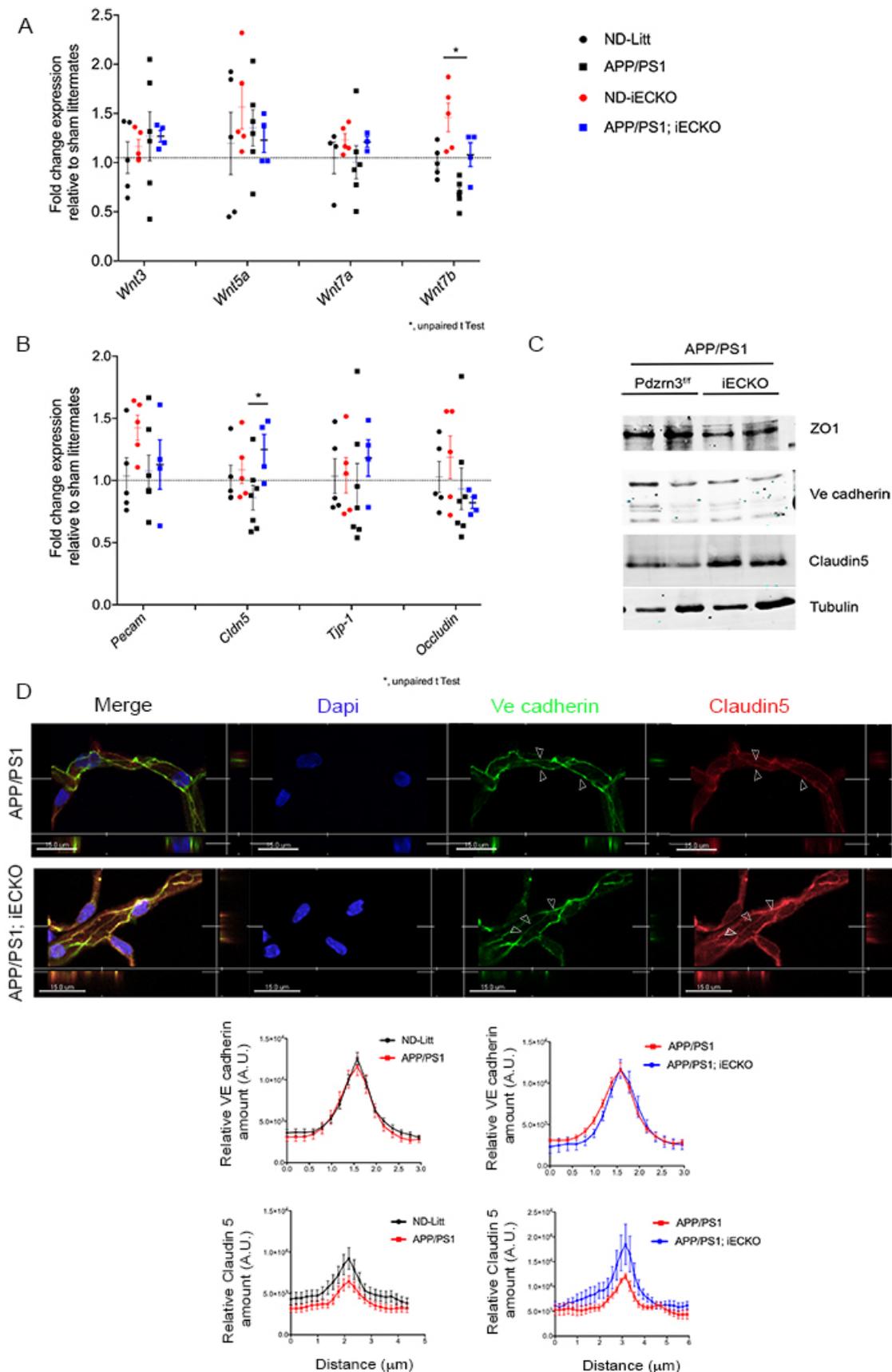


Figure n°54 : *Pdzn3* régule l'expression des gènes de claudine-5 ainsi que *Wnt7b* spécifiques au maintien de la barrière dans la microcirculation cérébrale :

(A) RTq-PCR des ligands *Wnt* des unités glio-vasculaires de souris montrant une réduction de *Wnt 7b* chez les souris *APP/PS1*. (B) RTq-PCR marqueurs endothéliaux des unités glio-vasculaires de souris montrant une réduction de la claudine-5 chez les souris *APP/PS1* (n= 4-6 animaux /condition). (C) Western Blot confirmant un sauvetage de la quantité de transcrits de la claudine-5 chez les souris *APP/PS1 ;Pdzn3 iECKO* vis-à-vis des souris *APP/PS1*. (D) Photographies confocales représentatives des immunomarquages de la VE-cadhérine et de la Claudine-5 sur vaisseaux isolés. Barres d'échelles = 15 μ m. Quantification de la quantité relative (A.U) de la VE-cadhérine ainsi que de la Claudine-5 au niveau des jonctions inter-endothéliales obtenue par reconstruction 3D des images de microscopie confocale (n=3 animaux/condition). Analyses statistiques : Student t-test. *= $p < 0,05$.

III) Analyse comportementale des souris *APP; PS1* et *APP/PS1 ;Pdzn3 iECKO* :

Nous avons ensuite voulu vérifier la possibilité que la délétion endothéliale de *Pdzn3* protégeait les souris *APP/PS1* des déficit mnésiques induits par les mutations. Pour se faire le test du labyrinthe en Y a été utilisé à 6, 8 et 10 mois d'âge des souris (Fig n°55).

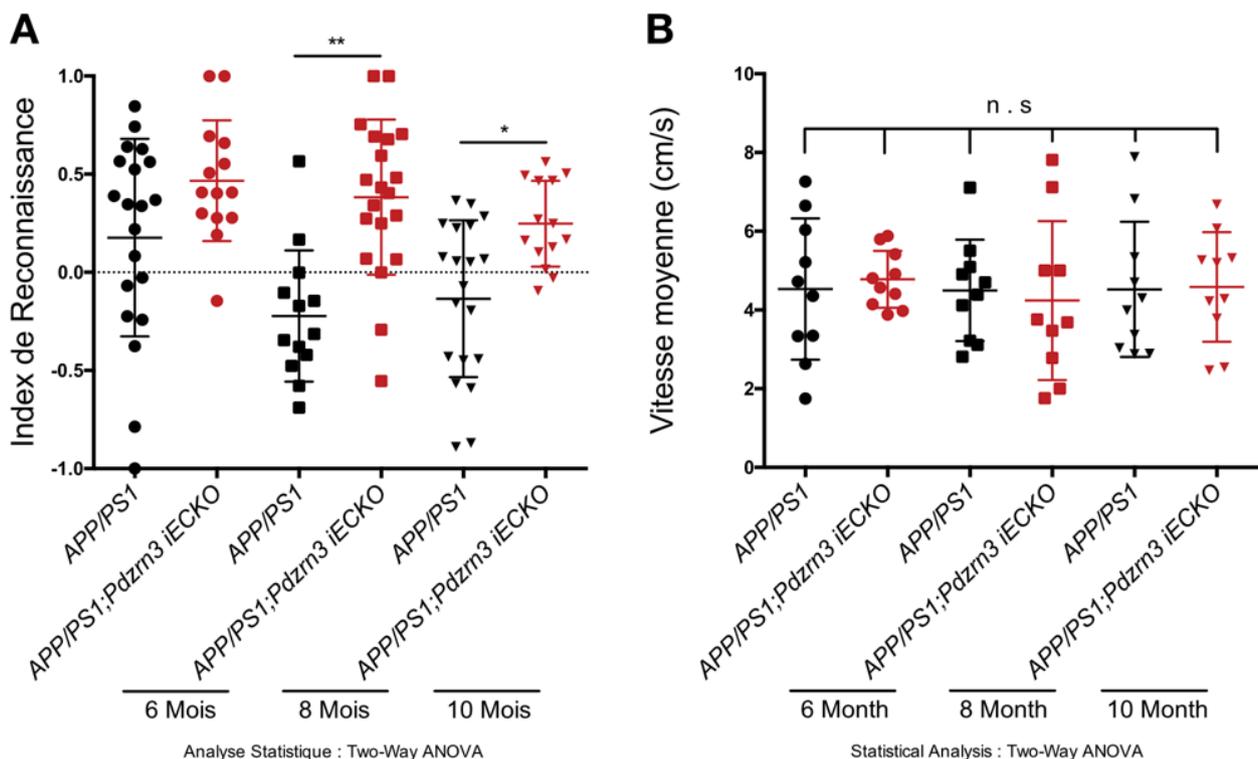


Figure n°55 : Test du labyrinthe en Y des souris modèle de démence de type Alzheimer :

(A) Résultats du test de comportement labyrinthe en Y (n= 20 vs 14 *APP/PS1* vs *APP/PS1 ;Pdzn3 iECKO* à 6mois, n= 13 vs 20 *APP/PS1* vs *APP/PS1 ;Pdzn3 iECKO* à 8mois, n= 20 vs 14 *APP/PS1* vs *APP/PS1 ;Pdzn3 iECKO* à 10mois). (B) Vérification de la vitesse de déplacement moyenne des souris *APP/PS1* vs *APP/PS1 ;Pdzn3 iECKO* (n=10/groupe) Analyses statistiques : Two-Way ANOVA avec multiple comparaison de Tuckey. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$

Les résultats obtenus avec le test de comportement des souris « modèle d'Alzheimer » nous permettent d'obtenir plusieurs informations importantes, tout d'abord les capacités

mnésiques des souris *APP/PS1* sont diminuées, et ce en fonction de leur âge à partir de 8 et 10 mois d'âge. Ce qui corrèle avec l'accumulation des plaques dans le cortex et l'hippocampe, la perte neuronale dans le cortex, ainsi que l'ouverture de barrière hémato-encéphalique dans le cortex et l'hippocampe de ces souris. De plus il a été vérifié que la performance des souris au test n'était pas strictement due à une perte de capacité de locomotion pour les souris *APP/PS1* avec l'âge. Les souris ne présentent pas de différences de vitesse moyenne de déplacement, ni en fonction de l'âge, ni en fonction du génotype. Enfin ce test permet de mettre en évidence une conservation de la capacité à réaliser correctement le test, et donc des capacités mnésiques des souris *APP/PS1 ; Pdzn3 iECKO* à 8 et 10 mois d'âge. Il est cependant à noter que la délétion de *Pdzn3* dans l'endothélium n'empêche pas complètement les capacités mnésiques de se dégrader : En effet à 10 mois les souris *APP/PS1 ; Pdzn3 iECKO* présentent une fonction mnésique dégradée.

Discussion :

Les résultats obtenus au cours de ce travail démontrent un impact de l'augmentation de la perméabilité vasculaire sur l'intégrité cérébrale en utilisant deux modèles murins expérimentaux : des souris soumises à une hypoperfusion cérébrale chronique (modèles de démence d'origine vasculaire) d'une part, ainsi que des souris mutantes *APP/PS1* (modèles de Maladie d'Alzheimer).

Tout d'abord pour ce qui est du modèle de démence d'origine vasculaire, nos résultats montrent que la réduction du flux sanguin cérébral, par l'insertion bilatérale de constricteurs améroïdes sur les carotides communes est suffisant pour induire une ouverture de barrière en 1 à 3 semaines, des microhémorragies, des ischémies ainsi qu'une perte neuronale dans des territoires cruciaux de l'encéphale régissant notamment les capacités mnésiques des souris.

De plus nos résultats montrent que cette modulation de l'expression génique de *Pdzrn3*, est à elle seule capable de moduler la perméabilité de la barrière. En effet, le gène *Pdzrn3* code pour une protéine E3-ubiquitine ligase impliquée dans la voie de Polarité Cellulaire de la voie Wnt et dont la fonction semble être l'inhibition de la voie canonique de la voie Wnt dite de la β -caténine, capable d'entraîner une modulation de la stabilité des jonctions inter-endothéliales et une subséquente modulation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Nous avons alors utilisé différentes lignées de souris dans lesquelles *Pdzrn3* est soit délété, soit surexprimé de façon inductible et ce uniquement dans l'endothélium pour étudier l'impact de cette modulation de la perméabilité vasculaire sur les dommages cérébraux cités précédemment.

Nos résultats semblent en adéquation avec la littérature actuelle, en effet de nombreuses études tendent à montrer qu'une perméabilité accrue de la barrière et donc que la diffusion des composés sanguins est nocive pour les neurones proches de ces zones d'ouverture de barrière (Chen et al., 2010; Merlini et al., 2019), notamment pour les neurones les plus « fragiles » tels que les neurones des circuits neuronaux mnésiques principalement localisés dans la Cornu Ammonis de l'Hippocampe ou dans le Cortex (Anand and Dhikav, 2012) permettant d'expliquer le tropisme de la perte neuronale retrouvée dans notre étude, ainsi que les symptômes de dégradation mnésique subie par les patients atteints de ce type de démences.

De plus les tests comportementaux réalisés au laboratoire sur ces mêmes lignées de souris soumises à la pose de constricteurs tendent à valider la nocivité de la diffusion hors de la barrière de ces composés sanguins, en effet les souris présentant une « hyperperméabilité » de la barrière hémato-encéphalique (*i.e.* les souris *Pdzrn3 iECO*) montrent une mise en place des dommages cérébraux (*i.e.* micro-saignements, ischémies, activation astrocytaire, inflammation et perte neuronale) induits par la pose de constricteurs plus rapides et plus importantes que leurs contrôles « normo-perméables » ou « hypoperméables » (*i.e.* *Littermates* et *Pdzrn3 iECKO* respectivement). De plus les plages de diffusions de ces marqueurs de l'ouverture de barrière semblent corrélérer spatialement avec les zones présentant des neurones apoptotiques notamment dans l'hippocampe et plus spécifiquement dans la zone Cornu Ammonis 1.

Les résultats obtenus et les dégâts mis en évidence avec le modèle de constricteurs sont concordants avec la littérature actuelle. En effet la pose de constricteurs améroïdes à constriction graduelle d'un diamètre interne de 0,5 mm entraîne l'apparition de dommages

cérébraux phénocopiants ceux vus chez les patients atteints de démence d'origine vasculaire. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus par Hattori et al., (2015) à la différence qu'ils sont présents dans l'entièreté des cohortes de souris, cette différence provient vraisemblablement du diamètre interne plus faible des constricteurs utilisés au cours de notre étude, entraînant une hypoperfusion plus grande et donc une augmentation des dégâts cérébraux. Ces dégâts correspondent à une version atténuée de ceux rencontrés dans les modèles chirurgicaux d'hypoperfusion aigüe tels que les modèles d'occlusion de vaisseaux 2, 3 et 4-VO (pour Vessel Obstruction), dans lesquels les artères carotides communes sont ligaturées (2-VO), ou le modèle 3-VO où l'artère subclavière est ligaturée ainsi que les carotides communes, ou encore le 4-VO où en plus des artères carotides communes les artères vertébrales sont aussi ligaturées. En effet plus les artères sont ligaturées, et ce, durant une longue période de temps, plus les dégâts cérébraux sont drastiques. Néanmoins ces modèles ne sont que transitoires et ne permettent pas d'étudier la mise en place de la pathologie au long cours et ne permettent de mettre en évidence que de forts dégâts liés à une ischémie aigüe. Néanmoins ces modèles décrivent eux aussi des lésions de la substance blanche, moins vascularisée et donc plus sensible à l'ischémie, ainsi que des micro-infarctions du tissu neural, enfin ces modèles présentent aussi une perte neuronale ainsi qu'une perte des capacités des rats à réaliser les tests comportementaux (Gooch and Wilcock, 2016; Neto et al., 2005).

Ces différents modèles trop aigus ne permettent cependant pas de mettre en évidence d'ouverture de barrière hémato-encéphalique. D'autres modèles comme les BCAS (Bilateral Carotid Artery Stenosis) achevés par la pose de micro-ressort ou autres dispositifs ou ligatures incomplètes sur les carotides présentent eux cette ouverture de barrière (Bink et al., 2013) en plus des dommages cérébraux cités précédemment et correspondent plus aux phénotypes des souris soumises à la pose de constricteurs que nous rapportons. Dans

ces modèles seront aussi retrouvées une perte neuronale une induction de l'activation astrocytaire visualisée par le marquage de la GFAP, ainsi qu'une induction de l'inflammation visualisée par les marquages iba-1 (Gooch and Wilcock, 2016; Mansour et al., 2018). Cette ouverture de barrière ne semble pas être présente dans les modèles aigus car ces expérimentations sont réalisées sur des temps courts alors que les expériences de BCAS tendent à être menées *a minima* sur plusieurs semaines.

La modulation des dommages cérébraux peut être retrouvée dans la littérature dans le cas de la dysfonction de chacun des composants de cette barrière. En effet des preuves expérimentales d'ouverture de barrière hémato-encéphalique ont déjà été obtenues dans le cas de la dysfonction d'un seul des composants de cette dernière. C'est le cas dans le cadre d'études s'intéressant aux péricytes (Liu et al., 2019; Montagne et al., 2018) ou encore des astrocytes (Olivera-Bravo et al., 2014; Peng et al., 2019) en plus des cellules endothéliales (Chen et al., 2010). En effet, les différents composants de cette barrière interagissant en permanence les uns avec les autres et permettent de réguler la perméabilité *via* leurs effets sur les jonctions intercellulaires endothéliales, le flux sanguin *via* la modulation du calibre des artérioles et capillaires, ou encore *via* la modulation des systèmes de transport de composés de part et d'autre de la barrière (Cai et al., 2017).

Nos données suggèrent que l'augmentation de la perméabilité de la BHE induite par l'hypoperfusion après pose des constricteurs et chez les souris *APP/PS1* serait induite par un changement de phénotype de la cellule endothéliale cérébrale, faisant passer la cellule endothéliale d'un phénotype dit « hypoperméable » caractéristique de la BHE à un phénotype « perméable » avec une réduction de l'expression de la Claudine-5. Ce changement de perméabilité serait régulé par l'activation de la signalisation induite par

PDZRN3 dans les cellules endothéliales et corrélé à la répression de l'expression du ligand Wnt7b par les cellules gliales de la BHE.

Les données du laboratoire avaient montré que la signalisation dépendante de PDZRN3 inhibait la voie canonique Wnt/ β caténine (Sewduth et al., 2017). La voie Wnt/ β caténine dans les cellules endothéliales est une des voies majeures nécessaire pour l'intégrité et le maintien des propriétés de la BHE (Engelhardt and Liebner, 2014; Liebner et al., 2008a). L'expression de la Claudine-5, une des protéines majeures des jonctions serrées de la BHE est régulée *in vivo* par la voie Wnt/ β caténine de façon opposée à la protéine Pivap (permeability associated protein plasmalemma vesicle-associated protein ou Meca32). La délétion du gène *Cldn5* chez la souris augmente en post-natal la perméabilité paracellulaire de la BHE à de petites molécules (Nitta et al., 2003) mais n'entraîne pas de rupture des jonctions. Chez la souris adulte, la délétion de *Cldn5* entraîne des problèmes de convulsions et *in fine* à la mort (Greene et al., 2018). L'expression d'autres membres des claudines (notamment Claudines 11, 12 et 25) permettraient le maintien des structures jointives (Berndt et al., 2019). Cette régulation de l'expression de la Claudin 5 par la β -caténine serait dépendante du contexte cellulaire. Les travaux de Corada et al., ont permis de montrer que l'activation par le VEGF du facteur de transcription FOXO-1 inhibait en présence de la β caténine l'induction du gène *Cldn5* (Liebner et al., 2008b). De récents travaux montrent l'importance de la voie Wnt dans la plasticité des CE. Les plexus choroïdes sont des tissus épithéliaux hautement vascularisés responsables de la production de la majorité du liquide céphalo-rachidien qui circule dans tout le système ventriculaire du cerveau. Les capillaires du plexus choroïde n'ont pas de propriétés BHE ; ils sont fenestrés et perméables avec une expression réduite de la Claudine 5. Le groupe de J. Nathans et S Liebner ont montré que la voie Wnt canonique est peu active dans ces structures et que l'activation de la voie Wnt canonique dans les cellules endothéliales

présentes dans les choroides permettrait de reverser leur phénotype et d'acquérir les propriétés de BHE avec une augmentation de l'expression de la Claudine 5 et une réduction de l'expression de la Plvap. (Benz et al., 2019; Wang et al., 2019).

La voie canonique dans les CE est médiée par les récepteurs Frizzled après liaison des ligands Wnt7a et 7b. Les études utilisant des mutants murins ont permis d'identifier les ligands Wnt7a et 7b (synthétisés par les cellules gliales) comme des acteurs majeurs dans l'acquisition et le maintien des propriétés de barrière de la BHE. (Wang et al., 2018b). Nos expérimentations réalisées sur les cerveaux des souris sur lesquelles ont été posés des constricteurs montrent une réduction significative de l'expression des transcrits *Wnt7b* dans les souris contrôles et délétées pour *Pdzrn3*, dès 7 jours post-chirurgie. Cette répression de l'expression de *Wnt7b* laisse suggérer que l'ouverture de barrière et l'augmentation de la perméabilité de la BHE pourraient être liées à une baisse d'activation de la voie Wnt canonique dans les cellules endothéliales. Cette hypothèse est cohérente avec l'augmentation de la quantité de transcrits de *Pvlap*. La perméabilité réduite des souris *Pdzrn3* *iECKO* peut alors être expliquée par l'absence de PDZRN3 déjà décrit comme inhibiteur de la voie Wnt canonique (Sewduth et al., 2017). Chez des mutants APP/PS1, nous avons mis en évidence une réduction de la quantité de transcrits *Wnt7b* corrélés à une réduction de la quantité de transcrits *Cldn5*. Ce phénotype est réversé chez les souris APP/PS1 délétées pour *Pdzrn3*.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la délétion de la voie PDZRN3 dépendante dans les CE pourrait entraîner une déstabilisation des liaisons intercellulaires au niveau de l'Unité Neuro-Vasculaire *via* une diminution de l'activation de la voie Wnt canonique. Il nous reste néanmoins encore à décrypter précisément la cible moléculaire *via* laquelle PDZRN3 est capable d'inhiber la voie Wnt canonique dans les CE.

Dans un second temps nous avons étudié l'impact de la variation de la perméabilité vasculaire cérébrale sur la mise en place de la démence de type Alzheimer. En effet la démence d'origine vasculaire et la maladie d'Alzheimer présentent toutes deux des caractéristiques communes telles qu'une hypoperfusion observée chez les patients atteints de l'une ou l'autre de la maladie, la présence de dommages cérébraux comparables entre les deux pathologies à l'exception de l'accumulation de la protéine β -amyloïde et la phosphorylation de la protéine tau, quasi-exclusivement retrouvées dans le cas de la maladie d'Alzheimer ou enfin la présence d'une dysfonction de la barrière hémato-encéphalique permettant la diffusion des composés sanguins nocifs dans le tissu neural, retrouvée dans ces deux pathologies cérébrales, enfin l'existence chez l'Homme de pathologies définies comme étant mixtes et empruntant des caractéristiques à l'une et l'autre de ces pathologies est un argument de plus en faveur de potentiels évènements et dysfonctions communes entraînant la mise en place précoce de ces pathologies.

Nos résultats obtenus sur le modèle de maladie d'Alzheimer (souris *APP/PS1*) suggèrent effectivement un rôle prépondérant et précoce de la perméabilité vasculaire cérébrale dans la mise en place de cette maladie neurodégénérative. La diminution de la perméabilité vasculaire par délétion du gène *Pdzrn3* spécifiquement dans l'endothélium entraîne un ralentissement de la cinétique d'accumulation de la protéine β -amyloïde ainsi que des autres dommages cérébraux retrouvés chez les souris *APP/PS1*. La délétion de *Pdzrn3* entraîne entre-autre une baisse la quantité de protéine β -amyloïde accumulée dans le cortex et l'hippocampe, une réduction de la perte du recouvrement pericytaire, enfin elle réduit aussi l'inflammation ainsi que le phénomène d'astrogliose à 12 mois d'âge. Dans les tests de comportements les souris *APP/PS1 ; Pdzrn3 iECKO* réussissent même à maintenir

leur performances durant 2 mois supplémentaires comparées aux tests réalisés chez les souris *APP/PS1*.

Nous avons choisi d'utiliser les souris double transgénique *APP/PS1* exprimant la mutation suédoise de l'*APP* et une mutation du gène codant pour la prénésiline 1 (*PS1*) comme modèle de la MA. Ces souris *APP/PS1* sont très utilisées dans la communauté scientifique; ce modèle possède ainsi un phénotype amyloïde avec des altérations cognitives bien caractérisées (Radde et al., 2006). Ce modèle de MA est toute fois imparfait, ne récapitulant pas l'ensemble des signes histo-pathologique de la MA ; ce modèle est essentiellement un modèle de pathologie amyloïde (Duyckaerts et al., 2008) ne développant pas ou peu d'autres éléments de la pathologie humaine tel que la dégénérescence neurofibrillaire. Neanmoins, nous avons retrouvé une perte neuronale chez les souris âgées de 12 mois, qui est un élément important dans la pathologie humaine. Dans ce travail nous avons souhaité analyser le phénotype amyloïde et le comportement des souris transgéniques *APP/PS1* avec un déficit en *Pdzn3* comparées à leurs contrôles *APP/PS1*. Nos données montrent que la perméabilité vasculaire cérébrale est un acteur clé de la mise en place de cette maladie. La réduction de la perméabilité vasculaire quantifiée chez les souris triple mutante *APP/PS1 ; Pdzn3 iECKO* a été corrélée à une diminution des lésions retrouvées dans les cerveaux de ces souris. Ces résultats obtenus chez les souris *APP/PS1*, montrent que ce modèle serait adéquat pour tester l'importance de l'atteinte de la BHE dans le développement de la pathologie amyloïde et des troubles de comportement associées.

Les mécanismes précis régissant la mise en place de la démence d'origine vasculaire ainsi que la maladie d'Alzheimer ne sont à l'heure actuelle toujours pas entièrement décryptés. Et il devient critique de comprendre les évènements et modifications permettant la mise en

place précoce de ces pathologies. En effet il est difficile de discriminer les caractéristiques propres aux maladies entraînant la démence car ces dernières sont aussi des maladies dites « du vieillissement ». Les modèles murins utilisés dans l'étude de ces pathologies sont souvent des animaux âgés.

L'utilisation des outils que représentent les souris *Pdzn3* *iECKO* nous permet néanmoins de mettre en évidence l'importance cruciale de la perméabilité vasculaire sur la mise en place précoce de ces deux pathologies majeures entraînant la démence chez l'Homme et un intérêt tout particulier devrait être gardé vis-à-vis de ces souris. En effet, l'unique déplétion endothéliale de *Pdzn3* protège les animaux vis-à-vis des dommages cérébraux et leurs permettent de maintenir une performance plus longtemps que leurs contrôles dans différents modèles de démences représentant 65 à 70% des cas totaux de démences.

Ces résultats suggèrent que maintenir l'intégrité de la BHE apparaît comme un des axes de recherche de choix pour la compréhension des maladies neurodégénératives.

Bibliographie:

- Alarcon-Martinez, L., Yilmaz-Ozcan, S., Yemisci, M., Schallek, J., Kılıc, K., Can, A., Polo, A.D., and Dalkara, T. Capillary pericytes express α -smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *17*.
- Anand, K.S., and Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann. Indian Acad. Neurol.* *15*, 239–246.
- Ando, Y., Okada, H., Takemura, G., Suzuki, K., Takada, C., Tomita, H., Zaikokuji, R., Hotta, Y., Miyazaki, N., Yano, H., et al. (2018). Brain-Specific Ultrastructure of Capillary Endothelial Glycocalyx and Its Possible Contribution for Blood Brain Barrier. *Sci. Rep.* *8*.
- Andreone, B.J., Chow, B.W., Tata, A., Lacoste, B., Ben-Zvi, A., Bullock, K., Deik, A.A., Ginty, D.D., Clish, C.B., and Gu, C. (2017). Blood-Brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis. *Neuron* *94*, 581-594.e5.
- Anna, C.H., Iida, M., Sills, R.C., and Devereux, T.R. (2003). Expression of potential β -catenin targets, cyclin D1, c-Jun, c-Myc, E-cadherin, and EGFR in chemically induced hepatocellular neoplasms from B6C3F1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *190*, 135–145.
- Apaydin, H., Ahlskog, J.E., Parisi, J.E., Boeve, B.F., and Dickson, D.W. (2002). Parkinson Disease Neuropathology: Later-Developing Dementia and Loss of the Levodopa Response. *Arch. Neurol.* *59*, 102.
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M.H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., et al. (2010). Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature* *468*, 557–561.
- Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., MacVicar, B.A., and Newman, E.A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* *468*, 232–243.
- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C.N., O’Farrell, F.M., and Dalkara, T. (2016). What is a pericyte? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *36*, 451–455.
- Balestrini, S., Perozzi, C., Altamura, C., Vernieri, F., Luzzi, S., Bartolini, M., Provinciali, L., and Silvestrini, M. (2013). Severe carotid stenosis and impaired cerebral hemodynamics can influence cognitive deterioration. *Neurology* *80*, 2145–2150.
- Barar, J., Rafi, M.A., Pourseif, M.M., and Omidi, Y. (2016). Blood-brain barrier transport machineries and targeted therapy of brain diseases. *BioImpacts* *6*, 225–248.
- Barone, F.C., Knudsen, D.J., Nelson, A.H., Feuerstein, G.Z., and Willette, R.N. (1993). Mouse Strain Differences in Susceptibility to Cerebral Ischemia are Related to Cerebral Vascular Anatomy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *13*, 683–692.
- Bartsch, T., Schonfeld, R., Muller, F.J., Alfke, K., Leplow, B., Aldenhoff, J., Deuschl, G., and Koch, J.M. (2010). Focal Lesions of Human Hippocampal CA1 Neurons in Transient Global Amnesia Impair Place Memory. *Science* *328*, 1412–1415.
- Beach, T.G., Monsell, S.E., Phillips, L.E., and Kukull, W. (2012). Accuracy of the Clinical Diagnosis of Alzheimer Disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005–2010. *J.*

Neuropathol. Exp. Neurol. *71*, 266–273.

Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P.J. (2011). Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metab.* *14*, 724–738.

Bell, R.D., Winkler, E.A., Sagare, A.P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., and Zlokovic, B.V. (2010). Pericytes Control Key Neurovascular Functions and Neuronal Phenotype in the Adult Brain and during Brain Aging. *Neuron* *68*, 409–427.

Benz, F., Wichitnaowarat, V., Lehmann, M., Germano, R.F., Mihova, D., Macas, J., Adams, R.H., Taketo, M.M., Plate, K.-H., Guérit, S., et al. (2019). Low wnt/ β -catenin signaling determines leaky vessels in the subfornical organ and affects water homeostasis in mice. *ELife* *8*.

Berndt, P., Winkler, L., Cording, J., Breitzkreuz-Korff, O., Rex, A., Dithmer, S., Rausch, V., Blasig, R., Richter, M., Sporbert, A., et al. (2019). Tight junction proteins at the blood–brain barrier: far more than claudin-5. *Cell. Mol. Life Sci.* *76*, 1987–2002.

Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., and Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* *382*, 225–230.

Bink, D.I., Ritz, K., Aronica, E., van der Weerd, L., and Daemen, M.J. (2013). Mouse models to study the effect of cardiovascular risk factors on brain structure and cognition. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *33*, 1666–1684.

Breteler, M.M.B. (2000). Vascular risk factors for Alzheimer's disease: An epidemiologic perspective. *Neurobiol. Aging* *8*.

Brown, R.C., Morris, A.P., and O'Neil, R.G. (2007). Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res.* *1130*, 17–30.

Buschmann, M.M., Shen, L., Rajapakse, H., Raleigh, D.R., Wang, Y., Wang, Y., Lingaraju, A., Zha, J., Abbott, E., McAuley, E.M., et al. (2013). Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. *Mol. Biol. Cell* *24*, 3056–3068.

Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., et al. (2008). A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. *J. Neurosci.* *28*, 264–278.

Cai, W., Zhang, K., Li, P., Zhu, L., Xu, J., Yang, B., Hu, X., Lu, Z., and Chen, J. (2017). Dysfunction of the neurovascular unit in ischemic stroke and neurodegenerative diseases: An aging effect. *Ageing Res. Rev.* *34*, 77–87.

Cait, J., Hughes, M.R., Zeglinski, M.R., Chan, A.W., Osterhof, S., Scott, R.W., Canals Hernaez, D., Cait, A., Vogl, A.W., Bernatchez, P., et al. (2019). Podocalyxin is required for maintaining blood–brain barrier function during acute inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *116*, 4518–4527.

Caja, S., and Enríquez, J.A. (2017). Mitochondria in endothelial cells: Sensors and integrators of environmental cues. *Redox Biol.* *12*, 821–827.

- Calvin, B. (1944). The Mutant of *Drosophila melanogaster*.
- Chang, J., Mancuso, M.R., Maier, C., Liang, X., Yuki, K., Yang, L., Kwong, J.W., Wang, J., Rao, V., Vallon, M., et al. (2017). Gpr124 is essential for blood-brain barrier integrity in central nervous system disease. *Nat. Med.* *23*, 450–460.
- Chen, B., Cheng, Q., Yang, K., and Lyden, P.D. (2010). Thrombin mediates severe neurovascular injury during ischemia. *Stroke* *41*, 2348–2352.
- Chen, F.-Q., Li, Q., Pan, C.-S., Liu, Y.-Y., Yan, L., Sun, K., Mao, X.-W., Mu, H.-N., Wang, M.-X., Wang, C.-S., et al. (2016). Kudiezi Injection[®] Alleviates Blood-Brain Barrier Disruption After Ischemia-Reperfusion in Rats. *Microcirculation* *23*, 426–437.
- Cheng, H.-L., Lin, C.-J., Soong, B.-W., Wang, P.-N., Chang, F.-C., Wu, Y.-T., Chou, K.-H., Lin, C.-P., Tu, P.-C., and Lee, I.-H. (2012). Impairments in Cognitive Function and Brain Connectivity in Severe Asymptomatic Carotid Stenosis. *Stroke* *43*, 2567–2573.
- Cho, C., Wang, Y., Smallwood, P.M., Williams, J., and Nathans, J. (2019). Dlg1 activates beta-catenin signaling to regulate retinal angiogenesis and the blood-retina and blood-brain barriers. *ELife* *8*, e45542.
- Chow, B.W., and Gu, C. (2015). The Molecular Constituents of the Blood–Brain Barrier. *Trends Neurosci.* *38*, 598–608.
- Christensen, R., Petersen, A., and Perrier, J.-F. (2013). How do Glial Cells Contribute to Motor Control? *Curr. Pharm. Des.* *19*, 4385–4399.
- Cipriani, G., Dolciotti, C., Picchi, L., and Bonuccelli, U. (2011). Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol. Sci.* *32*, 275–279.
- Clough, G., and Michel, C.C. (1988). Quantitative comparisons of hydraulic permeability and endothelial intercellular cleft dimensions in single frog capillaries. *J. Physiol.* *405*, 563–576.
- Cong, F., Schweizer, L., and Varmus, H. (2004). Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 5103–5115.
- Corrada, M.M., Brookmeyer, R., Paganini-Hill, A., Berlau, D., and Kawas, C.H. (2010). Dementia incidence continues to increase with age in the oldest old: The 90+ study. *Ann. Neurol.* *67*, 114–121.
- Damisah, E.C., Hill, R.A., Tong, L., Murray, K.N., and Grutzendler, J. (2017). A fluoro-Nissl dye identifies pericytes as distinct vascular mural cells during in vivo brain imaging. *Nat. Neurosci.* *20*, 1023–1032.
- Daneman, R., Agalliu, D., Zhou, L., Kuhnert, F., Kuo, C.J., and Barres, B.A. (2009). Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 641–646.
- Daneman, R., Zhou, L., Agalliu, D., Cahoy, J.D., Kaushal, A., and Barres, B.A. (2010). The Mouse Blood-Brain Barrier Transcriptome: A New Resource for Understanding the Development and Function of Brain Endothelial Cells. *PLoS ONE* *5*, e13741.
- De Lange, E.C.M., vd Berg, D.J., Bellanti, F., Voskuyl, R.A., and Syvänen, S. (2018). P-glycoprotein

protein expression versus functionality at the blood-brain barrier using immunohistochemistry, microdialysis and mathematical modeling. *Eur. J. Pharm. Sci.* *124*, 61–70.

De Reuck, J., Deramecourt, V., Cordonnier, C., Leys, D., Pasquier, F., and Maurage, C.-A. (2013). Prevalence of cerebrovascular lesions in patients with Lewy body dementia: A neuropathological study. *Clin. Neurol. Neurosurg.* *115*, 1094–1097.

Deacon, R.M. (2006). Assessing nest building in mice. *Nat. Protoc.* *1*, 1117–1119.

Dejana, E. (2010). The Role of Wnt Signaling in Physiological and Pathological Angiogenesis. *Circ. Res.* *107*, 943–952.

Dejana, E., Orsenigo, F., and Lampugnani, M.G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell Sci.* *121*, 2115–2122.

Del Maschio, A., De Luigi, A., Martin-Padura, I., Brockhaus, M., Bartfai, T., Fruscella, P., Adorini, L., Martino, G., Furlan, R., De Simoni, M.G., et al. (1999). Leukocyte Recruitment in the Cerebrospinal Fluid of Mice with Experimental Meningitis Is Inhibited by an Antibody to Junctional Adhesion Molecule (Jam). *J. Exp. Med.* *190*, 1351–1356.

Descamps, B., Sewduth, R., Ferreira Tojais, N., Jaspard, B., Reynaud, A., Sohet, F., Lacolley, P., Allières, C., Lamazière, J.-M.D., Moreau, C., et al. (2012). Frizzled 4 Regulates Arterial Network Organization Through Noncanonical Wnt/Planar Cell Polarity Signaling. *Circ. Res.* *110*, 47–58.

Di Marco, L.Y., Venneri, A., Farkas, E., Evans, P.C., Marzo, A., and Frangi, A.F. (2015). Vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease — A review of endothelium-mediated mechanisms and ensuing vicious circles. *Neurobiol. Dis.* *82*, 593–606.

Duyckaerts, C., Potier, M.-C., and Delatour, B. (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *115*, 5–38.

Ebnet, K. (2003). The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J. Cell Sci.* *116*, 3879–3891.

Eliceiri, B.P., Gonzalez, A.M., and Baird, A. (2011). Zebrafish Model of the Blood-Brain Barrier: Morphological and Permeability Studies. In *The Blood-Brain and Other Neural Barriers*, S. Nag, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 371–378.

Engelhardt, B., and Liebner, S. (2014). Novel insights into the development and maintenance of the blood–brain barrier. *Cell Tissue Res.* *355*, 687–699.

Engelhardt, B., and Ransohoff, R.M. (2012). Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood–brain barriers. *Trends Immunol.* *33*, 579–589.

Engelhardt, B., and Wolburg, H. (2004). Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur. J. Immunol.* *34*, 2955–2963.

Engelhardt, E., Tocquer, C., André, C., Moreira, D.M., Okamoto, I.H., and Cavalcanti, J.L. de S. (2011). Vascular dementia: Diagnostic criteria and supplementary exams: Recommendations of the Scientific Department of Cognitive Neurology and Aging of the Brazilian Academy of Neurology. Part I. *Dement. Neuropsychol.* *5*, 251–263.

F. Lichtenthaler, S. (2012). Alpha-Secretase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein: Proteolysis

- Regulated by Signaling Pathways and Protein Trafficking. *Curr. Alzheimer Res.* 9, 165–177.
- Fanto, M., and McNeill, H. (2004). Planar polarity from flies to vertebrates. *J. Cell Sci.* 117, 527–533.
- Feng, T., Yamashita, T., Zhai, Y., Shang, J., Nakano, Y., Morihara, R., Fukui, Y., Hishikawa, N., Ohta, Y., and Abe, K. (2018). Chronic cerebral hypoperfusion accelerates Alzheimer's disease pathology with the change of mitochondrial fission and fusion proteins expression in a novel mouse model. *Brain Res.* 1696, 63–70.
- Filali, M., Cheng, N., Abbott, D., Leontiev, V., and Engelhardt, J.F. (2002). Wnt-3A/beta-catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *J. Biol. Chem.* 277, 33398–33410.
- Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S.C., Kirchhausen, T., and Walz, T. (2004). Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* 432, 573–579.
- Fox, M.W. (1965). The visual cliff test for the study of visual depth perception in the mouse. *Anim. Behav.* 13, 232-IN3.
- Gelber, R.P., Ross, G.W., Petrovitch, H., Masaki, K.H., Launer, L.J., and White, L.R. (2013). Antihypertensive medication use and risk of cognitive impairment: The Honolulu-Asia Aging Study. *Neurology* 81, 888–895.
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., and Ávila-Flores, A. (2000). MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 315–324.
- Gooch, J., and Wilcock, D.M. (2016). Animal Models of Vascular Cognitive Impairment and Dementia (VCID). *Cell. Mol. Neurobiol.* 36, 233–239.
- Gorelick, P.B., Furie, K.L., Iadecola, C., Smith, E.E., Waddy, S.P., Lloyd-Jones, D.M., Bae, H.-J., Bauman, M.A., Dichgans, M., Duncan, P.W., et al. (2017). Defining Optimal Brain Health in Adults: A Presidential Advisory From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 48.
- Gratton, J.-P., Fontana, J., O'Connor, D.S., García-Cardena, G., McCabe, T.J., and Sessa, W.C. (2000). Reconstitution of an Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS), hsp90, and Caveolin-1 Complex *in Vitro*: EVIDENCE THAT hsp90 FACILITATES CALMODULIN STIMULATED DISPLACEMENT OF eNOS FROM CAVEOLIN-1. *J. Biol. Chem.* 275, 22268–22272.
- Gratton, J.-P., Bernatchez, P., and Sessa, W.C. (2004). Caveolae and Caveolins in the Cardiovascular System. *Circ. Res.* 94, 1408–1417.
- Greene, C., Kealy, J., Humphries, M.M., Gong, Y., Hou, J., Hudson, N., Cassidy, L.M., Martiniano, R., Shashi, V., Hooper, S.R., et al. (2018). Dose-dependent expression of claudin-5 is a modifying factor in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 23, 2156–2166.
- Greene, C., Hanley, N., and Campbell, M. (2019). Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids Barriers CNS* 16.
- Gubb, D., and García-Bellido, A. (1982). A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 68, 37–57.

- Guo, N., Hawkins, C., and Nathans, J. (2004). Frizzled6 controls hair patterning in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9277–9281.
- van de Haar, H.J., Burgmans, S., Jansen, J.F.A., van Osch, M.J.P., van Buchem, M.A., Muller, M., Hofman, P.A.M., Verhey, F.R.J., and Backes, W.H. (2016). Blood-Brain Barrier Leakage in Patients with Early Alzheimer Disease. *Radiology* *281*, 527–535.
- Hattori, Y., Kitamura, A., Nagatsuka, K., and Ihara, M. (2014). A novel mouse model of ischemic carotid artery disease. *PloS One* *9*, e100257.
- Hattori, Y., Enmi, J. -i., Kitamura, A., Yamamoto, Y., Saito, S., Takahashi, Y., Iguchi, S., Tsuji, M., Yamahara, K., Nagatsuka, K., et al. (2015). A Novel Mouse Model of Subcortical Infarcts with Dementia. *J. Neurosci.* *35*, 3915–3928.
- He, C.-W., Liao, C.-P., and Pan, C.-L. (2018). Wnt signalling in the development of axon, dendrites and synapses. *Open Biol.* *8*.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* *281*, 1509–1512.
- Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution: The Glia/Neuron Ratio. *Glia* *62*, 1377–1391.
- Hervé, F., Ghinea, N., and Scherrmann, J.-M. (2008). CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis. *AAPS J.* *10*, 455–472.
- Hilliard, M.A., and Bargmann, C.I. (2006). Wnt signals and frizzled activity orient anterior-posterior axon outgrowth in *C. elegans*. *Dev. Cell* *10*, 379–390.
- Hinoi, T., Yamamoto, H., Kishida, M., Takada, S., Kishida, S., and Kikuchi, A. (2000). Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and axin facilitates glycogen synthase kinase-3 beta-dependent phosphorylation of beta-catenin and down-regulates beta-catenin. *J. Biol. Chem.* *275*, 34399–34406.
- van Hinsbergh, V.W.M. (2012). Endothelium—role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin. Immunopathol.* *34*, 93–106.
- Hirst-Jensen, B.J., Sahoo, P., Kieken, F., Delmar, M., and Sorgen, P.L. (2007). Characterization of the pH-dependent Interaction between the Gap Junction Protein Connexin43 Carboxyl Terminus and Cytoplasmic Loop Domains. *J. Biol. Chem.* *282*, 5801–5813.
- Hoffman, L.B., Schmeidler, J., Lesser, G.T., Beerli, M.S., Purohit, D.P., Grossman, H.T., and Haroutunian, V. (2009). Less Alzheimer disease neuropathology in medicated hypertensive than nonhypertensive persons. *Neurology* *72*, 1720–1726.
- Honda, T., Yamamoto, H., Ishii, A., and Inui, M. (2010). PDZRN3 Negatively Regulates BMP-2-induced Osteoblast Differentiation through Inhibition of Wnt Signaling. *Mol. Biol. Cell* *21*, 3269–3277.
- Hornig, S., Therattil, A., Moyon, S., Gordon, A., Kim, K., Argaw, A.T., Hara, Y., Mariani, J.N.,

- Sawai, S., Flodby, P., et al. (2017). Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis. *J. Clin. Invest.* *127*, 3136–3151.
- Howarth, C. (2014). The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow. *Front. Neurosci.* *8*.
- Iadecola, C. (2013). The Pathobiology of Vascular Dementia. *Neuron* *80*, 844–866.
- Iadecola, C., and Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat. Neurosci.* *10*, 1369–1376.
- Irudayanathan, F.J., Wang, N., Wang, X., and Nangia, S. (2017). Architecture of the paracellular channels formed by claudins of the blood-brain barrier tight junctions: Blood-brain barrier tight junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1405*, 131–146.
- Iseki, E., Matsushita, M., Kosaka, K., Kondo, H., Ishii, T., and Amano, N. (1989). Distribution and morphology of brain stem plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *78*, 131–136.
- Janelidze, S., Hertze, J., Nägga, K., Nilsson, K., Nilsson, C., Wennström, M., van Westen, D., Blennow, K., Zetterberg, H., and Hansson, O. (2017). Increased blood-brain barrier permeability is associated with dementia and diabetes but not amyloid pathology or APOE genotype. *Neurobiol. Aging* *51*, 104–112.
- Jansson, D., Rustenhoven, J., Feng, S., Hurley, D., Oldfield, R.L., Bergin, P.S., Mee, E.W., Faull, R.L., and Dragunow, M. (2014). A role for human brain pericytes in neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* *11*, 104.
- Jho, E., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N., and Costantini, F. (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 1172–1183.
- Johnston, S.C., O'Meara, E.S., Manolio, T.A., Lefkowitz, D., O'Leary, D.H., Goldstein, S., Carlson, M.C., Fried, L.P., and Jr, W.T.L. Cognitive Impairment and Decline Are Associated with Carotid Artery Disease in Patients without Clinically Evident Cerebrovascular Disease. *12*.
- Kalaria, R.N. (2016). Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *131*, 659–685.
- Kamphuis, W., Middeldorp, J., Kooijman, L., Sluijs, J.A., Kooi, E.-J., Moeton, M., Freriks, M., Mizee, M.R., and Hol, E.M. (2014). Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *35*, 492–510.
- Kilinc, M., Gürsoy-Özdemir, Y., Güner, G., Erdener, S.E., Erdemli, E., Can, A., and Dalkara, T. (2010). Lysosomal rupture, necroapoptotic interactions and potential crosstalk between cysteine proteases in neurons shortly after focal ischemia. *Neurobiol. Dis.* *40*, 293–302.
- Kimelman, D., and Xu, W. (2006). beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* *25*, 7482–7491.
- Ko, J.-A., Kimura, Y., Matsuura, K., Yamamoto, H., Gondo, T., and Inui, M. (2006). PDZRN3 (LNX3, SEMCAP3) is required for the differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes. *J. Cell Sci.* *119*, 5106–5113.

- Krasnow, R.E., Wong, L.L., and Adler, P.N. (1995). Dishevelled is a component of the frizzled signaling pathway in *Drosophila*. *Development* *121*, 4095–4102.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S.L., Haseloff, R.F., Piontek, J., and Blasig, I.E. (2008). Structure and function of claudins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1778*, 631–645.
- Lajtha, A., Berl, S., and Waelsch, H. (1959). AMINO ACID AND PROTEIN METABOLISM OF THE BRAIN?IV.: THE METABOLISM OF GLUTAMIC ACID. *J. Neurochem.* *3*, 322–332.
- Lambert, C., Zeestraten, E., Williams, O., Benjamin, P., Lawrence, A.J., Morris, R.G., Mackinnon, A.D., Barrick, T.R., and Markus, H.S. (2018). Identifying preclinical vascular dementia in symptomatic small vessel disease using MRI. *NeuroImage Clin.* *19*, 925–938.
- Leclair, H.M., André-Grégoire, G., Treps, L., Azzi, S., Bidère, N., and Gavard, J. (2016). The E3 ubiquitin ligase MARCH3 controls the endothelial barrier. *FEBS Lett.* *590*, 3660–3668.
- Lee, J.S., Yu, Q., Shin, J.T., Sebzda, E., Bertozzi, C., Chen, M., Mericko, P., Stadtfeld, M., Zhou, D., Cheng, L., et al. (2006). Klf2 Is an Essential Regulator of Vascular Hemodynamic Forces In Vivo. *Dev. Cell* *11*, 845–857.
- Leijenaar, J.F., van Maurik, I.S., Kuijter, J.P.A., van der Flier, W.M., Scheltens, P., Barkhof, F., and Prins, N.D. (2017). Lower cerebral blood flow in subjects with Alzheimer's dementia, mild cognitive impairment, and subjective cognitive decline using two-dimensional phase-contrast magnetic resonance imaging. *Alzheimers Dement. Diagn. Assess. Dis. Monit.* *9*, 76–83.
- Li, Y., Fanning, A.S., Anderson, J.M., and Lavie, A. (2005). Structure of the Conserved Cytoplasmic C-terminal Domain of Occludin: Identification of the ZO-1 Binding Surface. *J. Mol. Biol.* *352*, 151–164.
- Liebner, S., Corada, M., Bangsow, T., Babbage, J., Taddei, A., Czupalla, C.J., Reis, M., Felici, A., Wolburg, H., Fruttiger, M., et al. (2008a). Wnt/ β -catenin signaling controls development of the blood–brain barrier. *J. Cell Biol.* *183*, 409–417.
- Liebner, S., Corada, M., Bangsow, T., Babbage, J., Taddei, A., Czupalla, C.J., Reis, M., Felici, A., Wolburg, H., Fruttiger, M., et al. (2008b). Wnt/ β -catenin signaling controls development of the blood–brain barrier. *J. Cell Biol.* *183*, 409–417.
- Liebner, S., Dijkhuizen, R.M., Reiss, Y., Plate, K.H., Agalliu, D., and Constantin, G. (2018). Functional morphology of the blood–brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *135*, 311–336.
- Liem, R.K.H., and Messing, A. (2009). Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease. *J. Clin. Invest.* *119*, 1814–1824.
- Liu, C.-Y., Yang, Y., Ju, W.-N., Wang, X., and Zhang, H.-L. (2018). Emerging Roles of Astrocytes in Neuro-Vascular Unit and the Tripartite Synapse With Emphasis on Reactive Gliosis in the Context of Alzheimer's Disease. *Front. Cell. Neurosci.* *12*.
- Liu, J., Jin, X., Liu, K.J., and Liu, W. (2012). Matrix Metalloproteinase-2-Mediated Occludin Degradation and Caveolin-1-Mediated Claudin-5 Redistribution Contribute to Blood–Brain Barrier Damage in Early Ischemic Stroke Stage. *J. Neurosci.* *32*, 3044–3057.

- Liu, Q., Radwanski, R., Babadjouni, R., Patel, A., Hodis, D.M., Baumbacher, P., Zhao, Z., Zlokovic, B., and Mack, W.J. (2019). Experimental chronic cerebral hypoperfusion results in decreased pericyte coverage and increased blood–brain barrier permeability in the corpus callosum. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *39*, 240–250.
- Liu, S., Grigoryan, M.M., Vasilevko, V., Sumbria, R.K., Paganini-Hill, A., Cribbs, D.H., and Fisher, M.J. (2014). Comparative Analysis of H&E and Prussian Blue Staining in a Mouse Model of Cerebral Microbleeds. *J. Histochem. Cytochem.* *62*, 767–773.
- Love, S. (2005). Neuropathological investigation of dementia: a guide for neurologists. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *76*, v8–v14.
- Lu, W., Yamamoto, V., Ortega, B., and Baltimore, D. (2004a). Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* *119*, 97–108.
- Lu, X., Borchers, A.G.M., Jolicoeur, C., Rayburn, H., Baker, J.C., and Tessier-Lavigne, M. (2004b). PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature* *430*, 93–98.
- MacVicar, B.A., and Newman, E.A. (2015). Astrocyte Regulation of Blood Flow in the Brain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*, a020388.
- Magistretti, P.J. (2009). Low-Cost Travel in Neurons. *Science* *325*, 1349–1351.
- Majolée, J., Kovačević, I., and Hordijk, P.L. (2019). Ubiquitin-based modifications in endothelial cell-cell contact and inflammation. *J. Cell Sci.* *132*.
- Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M.L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W.F., Moyer, M.P., Riecken, E.O., Buhr, H.J., et al. (1999). Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 1603–1608.
- Mansour, A., Niizuma, K., Rashad, S., Sumiyoshi, A., Ryoike, R., Endo, H., Endo, T., Sato, K., Kawashima, R., and Tominaga, T. (2018). A refined model of chronic cerebral hypoperfusion resulting in cognitive impairment and a low mortality rate in rats. *J. Neurosurg.* 1–11.
- Marshall, R.S., Festa, J.R., Cheung, Y.K., Chen, R., Pavol, M.A., Derdeyn, C.P., Clarke, W.R., Videen, T.O., Grubb, R.L., Adams, H.P., et al. (2012). Cerebral hemodynamics and cognitive impairment: Baseline data from the RECON trial. *Neurology* *78*, 250–255.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., et al. (1998). Junctional Adhesion Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily That Distributes at Intercellular Junctions and Modulates Monocyte Transmigration. *J. Cell Biol.* *142*, 117–127.
- Mathiisen, T.M., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., and Ottersen, O.P. (2010). The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* *58*, 1094–1103.
- Mayor, S., and Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 603–612.
- Mazzoni, J., Smith, J.R., Shahriar, S., Cutforth, T., Ceja, B., and Agalliu, D. (2017). The Wnt Inhibitor *Apcdd1* Coordinates Vascular Remodeling and Barrier Maturation of Retinal Blood Vessels. *Neuron* *96*, 1055-1069.e6.

- Mehra, A., Ali, C., Parcq, J., Vivien, D., and Docagne, F. (2016). The plasminogen activation system in neuroinflammation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1862, 395–402.
- Merlini, M., Rafalski, V.A., Rios Coronado, P.E., Gill, T.M., Ellisman, M., Muthukumar, G., Subramanian, K.S., Ryu, J.K., Syme, C.A., Davalos, D., et al. (2019). Fibrinogen Induces Microglia-Mediated Spine Elimination and Cognitive Impairment in an Alzheimer's Disease Model. *Neuron* 101, 1099-1108.e6.
- Middeldorp, J., and Hol, E.M. (2011). GFAP in health and disease. *Prog. Neurobiol.* 93, 421–443.
- Montagne, A., Nikolakopoulou, A.M., Zhao, Z., Sagare, A.P., Si, G., Lazic, D., Barnes, S.R., Daianu, M., Ramanathan, A., Go, A., et al. (2018). Pericyte degeneration causes white matter dysfunction in the mouse central nervous system. *Nat. Med.* 24, 326–337.
- Montcouquiol, M., Rachel, R.A., Lanford, P.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Kelley, M.W. (2003). Identification of *Vangl2* and *Scrb1* as planar polarity genes in mammals. *Nature* 423, 173–177.
- Morgan, T.E., Rozovsky, I., Goldsmith, S.K., Stone, D.J., Yoshida, T., and Finch, C.E. (1997). Increased Transcription of the Astrocyte Gene GFAP During Middle-Age is Attenuated by Food Restriction: Implications for the Role of Oxidative Stress. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 524–528.
- Müller, G.J., Stadelmann, C., Bastholm, L., Elling, F., Lassmann, H., and Johansen, F.F. (2006). Ischemia Leads to Apoptosis-and Necrosis-like Neuron Death in the Ischemic Rat Hippocampus. *Brain Pathol.* 14, 415–424.
- Nahirney, P.C., Reeson, P., and Brown, C.E. (2016). Ultrastructural analysis of blood–brain barrier breakdown in the peri-infarct zone in young adult and aged mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 36, 413–425.
- Nakagomi, T., Kubo, S., Nakano-Doi, A., Sakuma, R., Lu, S., Narita, A., Kawahara, M., Taguchi, A., and Matsuyama, T. (2015). Brain Vascular Pericytes Following Ischemia Have Multipotential Stem Cell Activity to Differentiate Into Neural and Vascular Lineage Cells: Brain Vascular Pericytes and Neurovasculogenesis. *STEM CELLS* 33, 1962–1974.
- Nanes, B.A., Grimsley-Myers, C.M., Cadwell, C.M., Robinson, B.S., Lowery, A.M., Vincent, P.A., Mosunjac, M., Früh, K., and Kowalczyk, A.P. (2017). p120-catenin regulates VE-cadherin endocytosis and degradation induced by the Kaposi sarcoma–associated ubiquitin ligase K5. *Mol. Biol. Cell* 28, 30–40.
- Nasdala, I., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Kuhn, A., Ebnet, K., Brachtendorf, G., Samulowitz, U., Kuster, B., Engelhardt, B., Vestweber, D., et al. (2002). A Transmembrane Tight Junction Protein Selectively Expressed on Endothelial Cells and Platelets. *J. Biol. Chem.* 277, 16294–16303.
- Nelson, W.J., and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483–1487.
- Nelson, A.R., Sweeney, M.D., Sagare, A.P., and Zlokovic, B.V. (2016). Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1862, 887–900.
- Neto, C.J.B.F., Paganelli, R.A., Benetoli, A., Lima, K.C.M., and Milani, H. (2005). Permanent, 3-stage, 4-vessel occlusion as a model of chronic and progressive brain hypoperfusion in rats: a

neurohistological and behavioral analysis. *Behav. Brain Res.* 160, 312–322.

Nicole, O., Hadzibegovic, S., Gajda, J., Bontempi, B., Bem, T., and Meyrand, P. (2016). Soluble amyloid beta oligomers block the learning-induced increase in hippocampal sharp wave-ripple rate and impair spatial memory formation. *Sci. Rep.* 6.

Nielsen, S., Arnulf Nagelhus, E., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., and Petter Ottersen, O. (1997). Specialized Membrane Domains for Water Transport in Glial Cells: High-Resolution Immunogold Cytochemistry of Aquaporin-4 in Rat Brain. *J. Neurosci.* 17, 171–180.

Nishita, M., Yoo, S.K., Nomachi, A., Kani, S., Sougawa, N., Ohta, Y., Takada, S., Kikuchi, A., and Minami, Y. (2006). Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *J. Cell Biol.* 175, 555–562.

Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* 161, 653–660.

Nunan, J., and Small, D.H. (2000). Regulation of APP cleavage by α -, β - and γ -secretases. *FEBS Lett.* 483, 6–10.

Nusrat, A., Brown, G.T., Tom, J., Drake, A., Bui, T.T.T., Quan, C., and Mrsny, R.J. (2005). Multiple Protein Interactions Involving Proposed Extracellular Loop Domains of the Tight Junction Protein Occludin. *Mol. Biol. Cell* 16, 1725–1734.

Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S., and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci.* 29, 547–553.

Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H.C., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., et al. (2009). Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *J. Neurosci.* 29, 3276–3287.

Oberheim, N.A., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. In *Astrocytes*, R. Milner, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 23–45.

O'Brien, J.T., and Thomas, A. (2015). Vascular dementia. *The Lancet* 386, 1698–1706.

Olivera-Bravo, S., Isasi, E., Fernández, A., Rosillo, J.C., Jiménez, M., Casanova, G., Sarlabós, M.N., and Barbeito, L. (2014). White matter injury induced by perinatal exposure to glutaric acid. *Neurotox. Res.* 25, 381–391.

Orset, C., Macrez, R., Young, A.R., Panthou, D., Angles-Cano, E., Maubert, E., Agin, V., and Vivien, D. (2007). Mouse Model of In Situ Thromboembolic Stroke and Reperfusion. *Stroke* 38, 2771–2778.

Outeiro, T.F., Koss, D.J., Erskine, D., Walker, L., Kurzawa-Akanbi, M., Burn, D., Donaghy, P., Morris, C., Taylor, J.-P., Thomas, A., et al. (2019). Dementia with Lewy bodies: an update and outlook. *Mol. Neurodegener.* 14.

Özen, I., Deierborg, T., Miharada, K., Padel, T., Englund, E., Genové, G., and Paul, G. (2014). Brain pericytes acquire a microglial phenotype after stroke. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 128, 381–396.

Pan, W., Choi, S.-C., Wang, H., Qin, Y., Volpicelli-Daley, L., Swan, L., Lucast, L., Khoo, C., Zhang, X., Li, L., et al. (2008). Wnt3a-mediated formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

regulates LRP6 phosphorylation. *Science* 321, 1350–1353.

Pardridge, W.M. (2005). The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development. 2, 12.
Parkar, N.S., Akpa, B.S., Nitsche, L.C., Wedgewood, L.E., Place, A.T., Sverdllov, M.S., Chaga, O., and Minshall, R.D. (2009). Vesicle Formation and Endocytosis: Function, Machinery, Mechanisms, and Modeling. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1301–1312.

Peng, L., Zhao, Y., Li, Y., Zhou, Y., Li, L., Lei, S., Yu, S., and Zhao, Y. (2019). Effect of DJ-1 on the neuroprotection of astrocytes subjected to cerebral ischemia/reperfusion injury. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 97, 189–199.

Perl, D.P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt. Sinai J. Med. J. Transl. Pers. Med.* 77, 32–42.

Prasad, B.C. (2006). Wnt signaling establishes anteroposterior neuronal polarity and requires retromer in *C. elegans*. *Development* 133, 1757–1766.

Preston, J.E., Joan Abbott, N., and Begley, D.J. (2014). Transcytosis of Macromolecules at the Blood–Brain Barrier. In *Advances in Pharmacology*, (Elsevier), pp. 147–163.

Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., and Ferri, C.P. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.* 9, 63-75.e2.

Privratsky, J.R., and Newman, P.J. (2014). PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. *Cell Tissue Res.* 355, 607–619.

Pulgar, V.M. (2019). Transcytosis to Cross the Blood Brain Barrier, New Advancements and Challenges. *Front. Neurosci.* 12.

Qian, B., Rudy, R.F., Cai, T., and Du, R. (2018). Cerebral Artery Diameter in Inbred Mice Varies as a Function of Strain. *Front. Neuroanat.* 12.

Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S.A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., Calhoun, M.E., Jäggi, F., Wolburg, H., Gengler, S., et al. (2006). Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* 7, 940–946.

Radu, M., and Chernoff, J. (2013). An in vivo Assay to Test Blood Vessel Permeability. *J. Vis. Exp.*

Rape, M. (2018). Ubiquitylation at the crossroads of development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 59–70.

Reichenbach, A., Derouiche, A., and Kirchhoff, F. (2010). Morphology and dynamics of perisynaptic glia. *Brain Res. Rev.* 63, 11–25.

Rijsewijk, F., Wagenaar, E., Parren, P., and Weigel, D. The Drosophila Homolog of the Mouse Mammary Oncogene int-1 Is Identical to the Segment Polarity Gene wingless. 9.

Robertson, R.T., Levine, S.T., Haynes, S.M., Gutierrez, P., Baratta, J.L., Tan, Z., and Longmuir, K.J. (2015). Use of labeled tomato lectin for imaging vasculature structures. *Histochem. Cell Biol.* 143, 225–234.

Roman, G.C., Tatemichi, T.K., Erkinjuntti, T., Cummings, J.L., Masdeu, J.C., Garcia, J.H., Amaducci, L., Orgogozo, J.-M., Brun, A., Hofman, A., et al. (1993). Vascular dementia: Diagnostic criteria for research studies: Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology* 43,

- Rosenberg, P.B., Mielke, M.M., Tschanz, J., Cook, L., Corcoran, C., Hayden, K.M., Norton, M., Rabins, P.V., Green, R.C., Welsh-Bohmer, K.A., et al. (2008). Effects of Cardiovascular Medications on Rate of Functional Decline in Alzheimer Disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 16, 883–892.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Muller, O., Chamberlain, S.H., Masiarz, F.R., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262, 1731–1734.
- Sagare, A.P., Bell, R.D., Zhao, Z., Ma, Q., Winkler, E.A., Ramanathan, A., and Zlokovic, B.V. (2013). Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. *Nat. Commun.* 4.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.-D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands. *Mol. Biol. Cell* 11, 4131–4142.
- Santos, C.Y., Snyder, P.J., Wu, W.-C., Zhang, M., Echeverria, A., and Alber, J. (2017). Pathophysiologic relationship between Alzheimer’s disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. *Alzheimers Dement. Diagn. Assess. Dis. Monit.* 7, 69–87.
- Sasai, N., Nakazawa, Y., Haraguchi, T., and Sasai, Y. (2004). The neurotrophin-receptor-related protein NRH1 is essential for convergent extension movements. *Nat. Cell Biol.* 6, 741–748.
- Sattler, R., and Rothstein, J.D. (2006). Regulation and Dysregulation of Glutamate Transporters. In *Neurotransmitter Transporters*, H.H. Sitte, and M. Freissmuth, eds. (Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 277–303.
- Schuff, N., Matsumoto, S., Kmiecik, J., Studholme, C., Du, A., Ezekiel, F., Miller, B.L., Kramer, J.H., Jagust, W.J., Chui, H.C., et al. (2009). Cerebral blood flow in ischemic vascular dementia and Alzheimer’s disease, measured by arterial spin-labeling magnetic resonance imaging. *Alzheimers Dement.* 5, 454–462.
- Seifert, J.R.K., and Mlodzik, M. (2007). Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat. Rev. Genet.* 8, 126–138.
- Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* 8, 595–608.
- Sewduth, R.N., Jaspard-Vinassa, B., Peghaire, C., Guillabert, A., Franzl, N., Larrieu-Lahargue, F., Moreau, C., Fruttiger, M., Dufourcq, P., Couffinhal, T., et al. (2014a). The ubiquitin ligase PDZRN3 is required for vascular morphogenesis through Wnt/planar cell polarity signalling. *Nat. Commun.* 5, 4832.
- Sewduth, R.N., Jaspard-Vinassa, B., Peghaire, C., Guillabert, A., Franzl, N., Larrieu-Lahargue, F., Moreau, C., Fruttiger, M., Dufourcq, P., Couffinhal, T., et al. (2014b). The ubiquitin ligase PDZRN3 is required for vascular morphogenesis through Wnt/planar cell polarity signalling. *Nat. Commun.* 5.
- Sewduth, R.N., Kovacic, H., Jaspard-Vinassa, B., Jecko, V., Wavasseur, T., Fritsch, N., Pernot, M., Jeaningros, S., Roux, E., Dufourcq, P., et al. (2017). PDZRN3 destabilizes endothelial cell-cell junctions through a PKCz-containing polarity complex to increase vascular permeability. *Sci. Signal.* 12.

- Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638–647.
- Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 7–35.
- Sohal, R.S., and Weindruch, R. (1996). Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *Science* 273, 59–63.
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., and Goedert, M. (1998). α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 6469–6473.
- Stamatovic, S., Keep, R., and Andjelkovic, A. (2008). Brain Endothelial Cell-Cell Junctions: How to Open the Blood Brain Barrier. *Curr. Neuropharmacol.* 6, 179–192.
- Stamatovic, S.M., Johnson, A.M., Keep, R.F., and Andjelkovic, A.V. (2016). Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. *Tissue Barriers* 4, e1154641.
- Stenman, J.M., Rajagopal, J., Carroll, T.J., Ishibashi, M., McMahon, J., and McMahon, A.P. (2008). Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature. *Science* 322, 1247–1250.
- Sweeney, M.D., Ayyadurai, S., and Zlokovic, B.V. (2016). Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat. Neurosci.* 19, 771–783.
- Sweeney, M.D., Sagare, A.P., and Zlokovic, B.V. (2018). Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 133–150.
- Taheri, S., Gasparovic, C., Huisa, B.N., Adair, J.C., Edmonds, E., Prestopnik, J., Grossetete, M., Shah, N.J., Wills, J., Qualls, C., et al. (2011). Blood–Brain Barrier Permeability Abnormalities in Vascular Cognitive Impairment. *Stroke* 42, 2158–2163.
- Takeshita, Y., and Ransohoff, R.M. (2012). Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models: Leukocyte migration and in vitro BBB model. *Immunol. Rev.* 248, 228–239.
- The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Iturria-Medina, Y., Sotero, R.C., Toussaint, P.J., Mateos-Pérez, J.M., and Evans, A.C. (2016). Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nat. Commun.* 7.
- Theodoulou, F.L., and Kerr, I.D. (2015). ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochem. Soc. Trans.* 43, 1033–1040.
- Tkachenko, E., Gutierrez, E., Saikin, S.K., Fogelstrand, P., Kim, C., Groisman, A., and Ginsberg, M.H. (2013). The nucleus of endothelial cell as a sensor of blood flow direction. *Biol. Open* 2, 1007–1012.
- Toledo, J.B., Arnold, S.E., Raible, K., Brettschneider, J., Xie, S.X., Grossman, M., Monsell, S.E., Kukull, W.A., and Trojanowski, J.Q. (2013). Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre. *Brain*

Tomassoni, D., Avola, R., Di Tullio, M.A., Sabbatini, M., Vitaioli, L., and Amenta, F. (2004). Increased Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein in the Brain of Spontaneously Hypertensive Rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 26, 335–350.

Tornavaca, O., Chia, M., Dufton, N., Almagro, L.O., Conway, D.E., Randi, A.M., Schwartz, M.A., Matter, K., and Balda, M.S. (2015). ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell–cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J. Cell Biol.* 208, 821–838.

Tran, K.A., Zhang, X., Predescu, D., Huang, X., Machado, R.F., Göthert, J.R., Malik, A.B., Valyi-Nagy, T., and Zhao, Y.-Y. (2016). Endothelial β -Catenin Signaling Is Required for Maintaining Adult Blood-Brain Barrier Integrity and Central Nervous System Homeostasis. *Circulation* 133, 177–186.

Tsuboi, Y., and Dickson, D.W. (2005). Dementia with Lewy bodies and Parkinson’s disease with dementia: Are they different? *Parkinsonism Relat. Disord.* 11, S47–S51.

Van Itallie, C.M., Tietgens, A.J., Krystofiak, E., Kachar, B., and Anderson, J.M. (2015). A complex of ZO-1 and the BAR-domain protein TOCA-1 regulates actin assembly at the tight junction. *Mol. Biol. Cell* 26, 2769–2787.

Venkat, P., Chopp, M., and Chen, J. (2015). Models and mechanisms of vascular dementia. *Exp. Neurol.* 272, 97–108.

Villaseñor, R., Lampe, J., Schwaninger, M., and Collin, L. (2019). Intracellular transport and regulation of transcytosis across the blood–brain barrier. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 1081–1092.

Villegas, J.C., and Broadwell, R.D. (1993). Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. II. Adsorptive transcytosis of WGA-HRP and the blood-brain and brain-blood barriers. *J. Neurocytol.* 22, 67–80.

Vinson, C.R., and Adler, P.N. (1987). Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of *Drosophila*. *Nature* 329, 549–551.

Vischer, U.M. (2006). von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *J. Thromb. Haemost.* 4, 1186–1193.

Volpicelli-Daley, L.A., Gamble, K.L., Schultheiss, C.E., Riddle, D.M., West, A.B., and Lee, V.M.-Y. (2014). Formation of α -synuclein Lewy neurite-like aggregates in axons impedes the transport of distinct endosomes. *Mol. Biol. Cell* 25, 4010–4023.

Wallin, A., Kapaki, E., Boban, M., Engelborghs, S., Hermann, D.M., Huisa, B., Jonsson, M., Kramberger, M.G., Lossi, L., Malojcic, B., et al. (2017a). Biochemical markers in vascular cognitive impairment associated with subcortical small vessel disease - A consensus report. *BMC Neurol.* 17.

Wallin, A., Kapaki, E., Boban, M., Engelborghs, S., Hermann, D.M., Huisa, B., Jonsson, M., Kramberger, M.G., Lossi, L., Malojcic, B., et al. (2017b). Biochemical markers in vascular cognitive impairment associated with subcortical small vessel disease - A consensus report. *BMC Neurol.* 17.

Wallingford, J.B., and Habas, R. (2005). The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Dev. Camb. Engl.* 132, 4421–4436.

- Wang, J., and Shackleford, G.M. (1996). Murine Wnt10a and Wnt10b: cloning and expression in developing limbs, face and skin of embryos and in adults. *Oncogene* *13*, 1537–1544.
- Wang, Y., and Nathans, J. (2007). Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development* *134*, 647–658.
- Wang, Y., and Tajkhorshid, E. (2009). Nitric oxide conduction by the brain aquaporin AQP4. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* NA-NA.
- Wang, F., Cao, Y., Ma, L., Pei, H., Rausch, W.D., and Li, H. (2018a). Dysfunction of Cerebrovascular Endothelial Cells: Prelude to Vascular Dementia. *Front. Aging Neurosci.* *10*.
- Wang, Y., Rattner, A., Zhou, Y., Williams, J., Smallwood, P.M., and Nathans, J. (2012). Norrin/Frizzled4 signaling in retinal vascular development and blood brain barrier plasticity. *Cell* *151*, 1332–1344.
- Wang, Y., Liu, G., Hong, D., Chen, F., Ji, X., and Cao, G. (2016). White matter injury in ischemic stroke. *Prog. Neurobiol.* *141*, 45–60.
- Wang, Y., Cho, C., Williams, J., Smallwood, P.M., Zhang, C., Junge, H.J., and Nathans, J. (2018b). Interplay of the Norrin and Wnt7a/Wnt7b signaling systems in blood–brain barrier and blood–retina barrier development and maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E11827–E11836.
- Wang, Y., Sabbagh, M.F., Gu, X., Rattner, A., Williams, J., and Nathans, J. (2019). Beta-catenin signaling regulates barrier-specific gene expression in circumventricular organ and ocular vasculatures. *ELife* *8*.
- Whitesell, J.D., Buckley, A.R., Knox, J.E., Kuan, L., Graddis, N., Pelos, A., Mukora, A., Wakeman, W., Bohn, P., Ho, A., et al. (2018). Whole brain imaging reveals distinct spatial patterns of amyloid beta deposition in three mouse models of Alzheimer’s disease. *BioRxiv* 395236.
- Willis, C.L., Nolan, C.C., Reith, S.N., Lister, T., Prior, M.J.W., Guerin, C.J., Mavroudis, G., and Ray, D.E. (2004). Focal astrocyte loss is followed by microvascular damage, with subsequent repair of the blood-brain barrier in the apparent absence of direct astrocytic contact. *Glia* *45*, 325–337.
- Winger, R.C., Koblinski, J.E., Kanda, T., Ransohoff, R.M., and Muller, W.A. (2014). Rapid Remodeling of Tight Junctions during Paracellular Diapedesis in a Human Model of the Blood–Brain Barrier. *J. Immunol.* *193*, 2427–2437.
- Winkler, E.A., Sagare, A.P., and Zlokovic, B.V. (2014). The Pericyte: A Forgotten Cell Type with Important Implications for Alzheimer’s Disease?: Pericytes in Alzheimer’s Disease. *Brain Pathol.* *24*, 371–386.
- Winkler, E.A., Nishida, Y., Sagare, A.P., Rege, S.V., Bell, R.D., Perlmutter, D., Sengillo, J.D., Hillman, S., Kong, P., Nelson, A.R., et al. (2015). GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer’s disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nat. Neurosci.* *18*, 521–530.
- Wolburg, H., and Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood–brain barrier: Development, composition and regulation. *Vascul. Pharmacol.* *15*.
- Wolters, F.J., Zonneveld, H.I., Hofman, A., van der Lugt, A., Koudstaal, P.J., Vernooij, M.W., and Ikram, M.A. (2017). Cerebral Perfusion and the Risk of Dementia: A Population-Based Study.

Circulation *136*, 719–728.

Wong, G.T., Gavin, B.J., and McMahon, A.P. (1994). Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 6278–6286.

Wu, Y.-T., Beiser, A.S., Breteler, M.M.B., Fratiglioni, L., Helmer, C., Hendrie, H.C., Honda, H., Ikram, M.A., Langa, K.M., Lobo, A., et al. (2017). The changing prevalence and incidence of dementia over time — current evidence. *Nat. Rev. Neurol.* *13*, 327–339.

Yamamoto, H., Yoo, S.K., Nishita, M., Kikuchi, A., and Minami, Y. (2007). Wnt5a modulates glycogen synthase kinase 3 to induce phosphorylation of receptor tyrosine kinase Ror2. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *12*, 1215–1223.

Zallen, J.A. (2007). Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell* *129*, 1051–1063.

Zhai, Y., Yamashita, T., Nakano, Y., Sun, Z., Shang, J., Feng, T., Morihara, R., Fukui, Y., Ohta, Y., Hishikawa, N., et al. (2016a). Chronic Cerebral Hypoperfusion Accelerates Alzheimer's Disease Pathology with Cerebrovascular Remodeling in a Novel Mouse Model. *J. Alzheimers Dis.* *53*, 893–905.

Zhai, Y., Yamashita, T., Nakano, Y., Sun, Z., Morihara, R., Fukui, Y., Ohta, Y., Hishikawa, N., and Abe, K. (2016b). Disruption of White Matter Integrity by Chronic Cerebral Hypoperfusion in Alzheimer's Disease Mouse Model. *J. Alzheimers Dis.* *52*, 1311–1319.

Zhang, X., Li, G., Guo, L., Nie, K., Jia, Y., Zhao, L., and Yu, J. (2013). Age-related alteration in cerebral blood flow and energy failure is correlated with cognitive impairment in the senescence-accelerated prone mouse strain 8 (SAMP8). *Neurol. Sci.* *34*, 1917–1924.

Zhang, Y., Tomann, P., Andl, T., Gallant, N.M., Huelsken, J., Jerchow, B., Birchmeier, W., Paus, R., Piccolo, S., Mikkola, M.L., et al. (2009). Reciprocal requirements for Eda/Edar/NF- κ B and Wnt/ β -catenin signaling pathways in hair follicle induction. *Dev. Cell* *17*, 49–61.

Zhang, Z., Ma, Z., Zou, W., Guo, H., Liu, M., Ma, Y., and Zhang, L. (2019). The Appropriate Marker for Astrocytes: Comparing the Distribution and Expression of Three Astrocytic Markers in Different Mouse Cerebral Regions. *BioMed Res. Int.* *2019*, 1–15.

Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.-A., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* *6*, 43–50.

Zou, M., Huang, W., Jiang, W., Wu, Y., and Chen, Q. (2019). Role of Cav-1 in HIV-1 Tat-Induced Dysfunction of Tight Junctions and A β -Transferring Proteins. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2019*, 1–8.

Titre : Contribution de la voie Wnt dans la stabilité de la barrière hémato-encéphalique :

Résumé : La démence est caractérisée par une détérioration progressive des capacités mentales qui compromettent l'autonomie des patients. Le vieillissement en est le facteur de risque majeur. La population mondiale vieillissante, l'absence de traitement, ainsi que l'augmentation des individus touchés estimé à 50 millions, permettent d'estimer un coût de santé publique triplé à 4 trillions de \$ d'ici à 2050. Les études récentes tendent à montrer un rôle crucial de la dysfonction vasculaire dans les pathologies de démence. En effet une large étude neuropathologique basée sur l'autopsie des patients a permis de mettre en évidence que 80% des patients diagnostiqués de Maladie d'Alzheimer (MA) présentaient une pathologie vasculaire. Néanmoins, les mécanismes cellulaires et moléculaires entraînant ces dysfonctions vasculaires et altérant l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) dans le cas de la démence en général restent encore aujourd'hui méconnus. Au niveau moléculaire, la voie Wnt est impliquée dans le maintien de l'intégrité de la BHE. Le laboratoire a récemment identifié une E3-ubiquitine-ligase, PDZRN3 qui agit comme un médiateur de la signalisation Wnt non-canonique dans les cellules endothéliales en réprimant la voie Wnt canonique. Cette ubiquitine-ligase est impliquée dans la perméabilité vasculaire, faisant de cette dernière une cible pour réguler l'intégrité de cette barrière.

Nous avons alors posé l'hypothèse suivante : La BHE est déstabilisée dans la mise en place des démences dont la MA ; en maintenant l'intégrité de la BHE en réprimant la signalisation Wnt, permettrait de ralentir la sévérité de la MA et des altérations cognitives associées. Nous avons généré une lignée murine délétée pour *Pdzn3* dans l'endothélium de façon inducible (*iECKO*) et les avons soumises à une hypoperfusion cérébrale graduelle par la pose de constricteurs sur les artères carotides communes. Alors que les performances des souris contrôles sont impactées par l'hypoperfusion, celles des souris *iECKO* sont maintenues. Nos résultats montrent que les souris *iECKO* présentent une réduction significative des lésions cérébrales (micro-infarcts) ainsi qu'une réduction significative de la perte neuronale dans la zone CA1 de l'hippocampe jouant un rôle clé dans les processus mnésiques de reconnaissance spatiale. À l'inverse les souris surexprimant *Pdzn3* dans l'endothélium (*iECOE*) présentent le phénotype opposé à celui des souris *iECKO*, avec une détérioration mnésique plus importante que les contrôles associés à des fuites de la BHE, des lésions cérébrales, une perte neuronale hippocampale et une inflammation exacerbée. Nous avons aussi voulu étudier l'impact de la délétion dans les CE de *Pdzn3* dans le cadre de la MA. Nous avons généré et validé un modèle murin triple mutant en croisant les souris *APP/PS1*, modèle de MA, avec nos souris *iECKO* pour générer une souche *APP/PS1 ; iECKO*. Étonnamment, nos résultats montrent une réduction significative des dépôts amyloïdes à 6 mois dans les souris *APP/PS1 ; Pdzn3 iECKO* comparés à leurs contrôles *APP/PS1*. À 8 mois les souris *APP/PS1* apparaissent comme ayant une fonction cognitive sévèrement touchée dans un test mnésique de reconnaissance spatiale alors que les souris *APP/PS1 ; Pdzn3 iECKO* ont une performance comparable à celle des contrôles de même âge non déments.

Mots clefs : BHE, Perméabilité vasculaire, Maladie d'Alzheimer, Démence Vasculaire, Voie Wnt.

Title : Wnt pathway contribution to blood-brain barrier stability:

Abstract : Dementia is characterized by a progressive deterioration of mental capacity that inevitably compromises independent living. Advancing age is the main risk factor, and due to the aging of the world population and lack of effective treatments, the number of affected individuals, estimated at 50 million worldwide, is anticipated to triple by 2050 at a cost approaching \$4 trillion. Recent studies tend to show a crucial role of vascular dysfunction in dementia pathologies. Indeed, a large autopsy-based neuropathological study has revealed that 80% of patients diagnosed with Alzheimer's disease (AD) exhibit vascular pathology. However, the cellular and molecular mechanisms underlying vascular dysfunction and alteration of the blood brain barrier (BBB) integrity associated with dementia and AD remain to be elucidated. Body of evidences point out the Wnt pathway role in the maintenance of BBB integrity. The laboratory recently identified an E3-ubiquitin-ligase, PDZRN3 acting like Wnt non-canonical pathway modulator in endothelial cells repressing canonical Wnt pathway. This ubiquitin-ligase is involved in vascular permeability, making it a promising modulatory target to act upon alterations of the BBB integrity.

We then hypothesized that: BBB is destabilized in the early onset of dementia & AD, keeping EC in a differentiated "barrier" state through Wnt signaling modulation should modulates early onset of dementia. We have generated *Pdzn3* inducible EC knockout (*iECKO*) mice and submitted them to gradual cerebral hypoperfusion by implanting ameroid constrictors on both common carotid arteries. While memory performance of wild-type littermates is impaired under hypoperfusion, that of *iECKO* mice is preserved. Importantly, our data show that *iECKO* mice exhibit a significant decrease in the number of brain lesions (microinfarctions) as well as reduced neuronal loss in the CA1 hippocampal region known to play a crucial role in spatial recognition memory. Conversely, endothelial PDZRN3 overexpression (*iECOE*) produces phenotypes opposite to those of *Pdzn3*-deleted mice (*iECKO*) with a clear deterioration of memory function associated with increased BBB leakage, brain lesions, hippocampal neuronal loss and inflammation compared to controls. We also wanted to investigate the impact of endothelial deletion of *Pdzn3* in AD. To this end, we have generated and validated a dedicated triple transgenic mouse model by crossing *APP/PS1*, AD mouse model with with *Pdzn3 iECKO* mice to generate *APP/PS1;Pdzn3 iECKO* colonies. Strikingly, our findings point to a significant decrease of A β -deposits at 6 months in *APP/PS1;Pdzn3 iECKO* compared to *APP/PS1* littermate control mice. At 8 months, *APP/PS1* littermate controls appears severely impaired in a spatial recognition memory paradigm whereas *APP/PS1;Pdzn3 iECKO* performed as well as non-demented age-matched *Pdzn3 iECKO* and littermate controls.

Keywords : BBB, Vascular permeability, Alzheimer's disease, Vascular Dementia, Wnt Pathway.

Unité de recherche : Unité Inserm U1034, 1 avenue de Magellan, 33600 Pess