

Université de Montréal

**Altération du couplage neurovasculaire par
l'angiotensine II : évaluation du rôle de la signalisation
calcique astrocytaire**

par
Michaël Boily

Département de pharmacologie,
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade
de Maître ès Sciences (M. Sc.) en pharmacologie
option neuropharmacologie

Juillet, 2013

© Michaël Boily, 2013

Université de Montréal
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

**Altération du couplage neurovasculaire par l'angiotensine II :
évaluation du rôle de la signalisation calcique astrocytaire**

Présenté par : Michaël Boily

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jonathan Ledoux
président-rapporteur

Dr Hélène Girouard
directrice de recherche

Dr Arlette Kolta
membre du jury

Résumé en français

Le couplage neurovasculaire (CNV) est un mécanisme d'homéostasie cérébrale régulant le débit sanguin cérébral (CBF) en fonction de l'activité neuronale. La manière dont il est altéré par l'angiotensine II (Ang II), une hormone synthétisée et relâchée dans la circulation systémique ou, alternativement, produite dans le cerveau grâce aux astrocytes, demeure à élucider. Ces cellules expriment le récepteur AT1 (rAT1) et participent à l'orchestration du CNV en relâchant des agents vasoactifs suivant la réponse calcique astrocytaire. Nous avons donc étudié le rôle de cette réponse dans l'altération du CNV induite par l'Ang II. Nous avons trouvé par fluxmétrie par laser Doppler que l'Ang II atténue ($p < 0.05$) la réponse du CBF engendrée par l'activation des récepteurs métabotropes du glutamate du groupe I (mGluRI) du cortex chez la souris C57BL/6. De manière similaire, l'Ang II diminue l'élévation du CBF induite par la stimulation des vibrisses ($p < 0.05$). Sur tranches de cerveaux en aiguë, la polarité de la réponse vasculaire induite par un agoniste mGluRI dans les artérioles parenchymateuses a été significativement renversée par l'Ang II de la vasodilatation vers la vasoconstriction. En parallèle, l'Ang II a augmenté les niveaux de calcium astrocytaire basaux et l'amplitude des réponses calciques ($p < 0.05$). L'altération des réponses vasculaires et calciques maximales a été prévenue par le candesartan, antagoniste des rAT1. Nos résultats suggèrent que l'Ang II potentialise via les rAT1 la réponse calcique qui atteint un seuil favorisant la vasoconstriction par rapport à la vasodilatation, altérant ainsi l'augmentation du CBF en réponse à l'activité neuronale.

Mots clés: Angiotensine II, astrocyte, récepteurs AT1, calcium, récepteurs métabotropes du glutamate, couplage neurovasculaire.

Abstract

Neurovascular coupling (NVC) is an important homeostasis mechanism that regulates cerebral blood flow (CBF) according to neuronal activity. It however remains poorly understood how it is impaired by angiotensin II (Ang II), a hormone synthesized and released in the systemic circulation or produced in the brain partly by astrocytes. Astrocytes possess Ang II AT1 receptors and are involved in the orchestration of NVC by releasing vasoactive agents following their calcium response. We thus sought to investigate the involvement of astrocytic calcium in the impairment of NVC induced by Ang II. Using laser Doppler flowmetry, we found that Ang II attenuates C57BL/6 mice CBF response to activation of group I metabotropic glutamate receptors (mGluRI) by 32 % ($p < 0.05$) in the somatosensory cortex. Similarly, Ang II decreased CBF elevations induced by whisker stimulation (-40 %, $p < 0.05$). On acute brain slices, the polarity of the vascular response induced by a mGluRI agonist in parenchymal arteries was significantly shifted by Ang II toward vasoconstriction. In parallel, Ang II increased resting and maximal astrocytic calcium levels to respectively 192 % and 318 % of control levels ($p < 0.05$). Both vascular and maximal calcium responses alterations induced by Ang II were prevented by the AT1 receptor antagonist candesartan. Our results suggest that Ang II via its AT1 receptor potentiates the astrocytic calcium responses to a level that favors vasoconstriction over vasodilation, thus altering CBF increases in response to neuronal activity.

Keywords: Angiotensin II, astrocyte, AT1 receptor, calcium, metabotropic glutamate receptor, neurovascular coupling.

I. Introduction.....	1
1. Couplage neurovasculaire.....	2
1. Le débit sanguin cérébral, essentiel au maintien de l'activité et de la survie neuronale.....	2
2. Historique/Définition.....	3
3. CNV et imagerie fonctionnelle.....	4
4. Découplage neurovasculaire.....	6
5. État des connaissances sur le CNV.....	7
6. Vascularisation du cortex et CNV.....	10
7. Barrière hémato-encéphalique.....	11
8. Astrocytes.....	12
9. Innervation corticale et CNV.....	15
10. CNV et astrocytes.....	19
11. Défaillance pathologique du CNV.....	22
12. Conclusion de section.....	23
2. Système rénine-angiotensine.....	24
1. L'angiotensine II.....	24
2. RAS tissulaires.....	25
3. L'origine cellulaire de la synthèse de l'Ang II cérébrale.....	27
4. Récepteur AT ₁	31
5. Récepteur AT ₂	33
6. Autres composantes du RAS.....	34
7. Fonctions connues du RAS cérébral.....	35
8. RAS et pathologies cérébrales.....	35
9. Ang II et CNV.....	36
10. Conclusion de section.....	37
3. Ca ²⁺ astrocytaire.....	39
1. Types de réponses calciques.....	39
2. Ca ²⁺ astrocytaire et CNV.....	42
3. Ca ²⁺ astrocytaire et maladies.....	44
4. Ang II et calcium astrocytaire.....	45
5. Conclusion de section.....	46
4. But du mémoire.....	48
1. Hypothèse et objectifs.....	48
II. ARTICLE.....	50
1. ABSTRACT (ARTICLE).....	52
2. INTRODUCTION (ARTICLE).....	53
3. MATERIALS AND METHOD.....	56
4. RESULTS.....	63
5. DISCUSSION (ARTICLE).....	67
6. CONCLUSION (ARTICLE).....	74
7. REFERENCES.....	76
8. TITLES AND LEGENDS TO FIGURES.....	80
9. FIGURES (ARTICLE).....	83
III. Discussion.....	89
1. Sommaire des résultats.....	90

2. Implication des récepteurs AT ₁	91
3. Comment l'angiotensine peut-elle affecter la réponse calcique ?	92
1. Effet additif ou potentialisateur du t-ACPD et de l'ANG II sur la [Ca ²⁺] ..	93
2. Voie de l'IP ₃ : soutien d'une réponse calcique plus forte	95
3. Voie des ROS	98
4. Comment la [Ca ²⁺] peut-elle affecter la réponse vasculaire ?	99
1. Canaux BK	100
2. 20-HETE	101
5. D'autres mécanismes peuvent-ils participer à l'effet de l'Ang II sur le CNV ?	
.....	102
1. Voie des ROS	102
2. Disponibilité du NO	105
3. Effet des ROS de l'IP ₃ et du PIP ₂ sur le BK	107
4. Dysfonctions mitochondriales	110
5. PGE ₂	111
6. Autres effets des ROS	112
7. Inhibition des oscillations spontanées	113
6. Conséquences des observations	114
1. Ca ²⁺ et effets pathologiques	115
2. Conséquences de l'effet vasculaire	115
3. L'effet vasculaire est-il dépendant de l'effet calcique ?	117
4. Considérations anatomiques	117
5. Impact sur la pharmacothérapie et la recherche	118
7. Limitations	120
8. Expérimentations futures	122
9. Conclusion	124
IV. Bibliographie	126

Liste des tableaux

Tableau I. Effet de la diminution ou de la hausse des concentrations des molécules affectant la probabilité d'ouverture des IP₃Rs.

Liste des figures

Figure 1. Anatomie générale du système artériel parenchymateux du cortex somatosensoriel et représentation agrandie de l'induction d'une réponse calcique astrocytaire par l'activité neuronale.	9
Figure 2. Mécanisme du K^+ et concentration calcique dans les pieds astrocytaires.	18
Figure 3. Voies intracérébrales de synthèse et de dégradation de l'Ang II et représentation de certains de ses récepteurs et des effets associés à leur activation.	26
Figure 4. (Figure 1 ARTICLE) L'Ang II diminue l'augmentation du CBF dans le cortex somatosensoriel indépendamment de l'activité neuronale.	83
Figure 5. (Figure 2 ARTICLE) L'Ang II transforme les vasodilatations des artères parenchymateuses obtenues en réponse au <i>t</i> -ACPD en vasoconstrictions dans les tranches de cerveau en aigu.	84
Figure 6. (Figure 3 ARTICLE) L'Ang II augmente la $[Ca^{2+}]$ et l'augmentation de Ca^{2+} dans les pieds astrocytaires en réponse au <i>t</i> -ACPD.	85
Figure 7. (Figure 4 ARTICLE) L'Ang II potentialise l'augmentation de Ca^{2+} dans les pieds astrocytaires tout en convertissant la réponse vasculaire au <i>t</i> -ACPD de vasodilatation en vasoconstriction dans les tranches de cerveau.	86
Figure 8. (Figure 5 ARTICLE) L'Ang II potentialise la réponse calcique au <i>t</i> -ACPD dans une culture d'astrocytes isolé.	87
Figure 9. (Figure 6 ARTICLE) L'Ang II inhibe l'activité calcique spontanée dans les astrocytes en culture.	88
Figure 10. Modulations réciproques entre les voies du Ca^{2+} et des ROS.	97
Figure 11. Inhibition de l'effet tampon calcique mitochondrial par l'Ang II.	109

Liste des abréviations

AA	Acide arachidonique
AVC	Accident vasculaire cérébral
AD	Maladie d'Alzheimer (de l'anglais : <i>Alzheimer's Disease</i>)
AGT	Angiotensinogène
Ang I	Angiotensine I
Ang II	Angiotensine II
APA	Aminopeptidase A
APN	Aminopeptidase N
ARA	Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II
ARNm	ARN messenger
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BK	Canaux potassiques calcium-dépendants de grande conductance
Ca ²⁺	Calcium
CBF	Débit sanguin cérébral (de l'anglais : <i>Cerebral Blood Flow</i>)
CNV	Couplage neurovasculaire
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
EETs	Acides époxyéicosatriénoïques
FLD	Fluxmétrie laser Doppler
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GFAP	Protéine acide fibrillaire gliale (de l'anglais : <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
HA	Hypertension artérielle

xiv

IP ₃	Inositol triphosphate
IP ₃ Rs	Récepteurs de l'inositol triphosphate (de l'anglais : <i>Inositol Triphosphate Receptors</i>)
IRMf	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
K _{ATP}	Canal potassique mitochondrial sensible à l'ATP
LCR	Liquide céphalo-rachidien
mGluR	Récepteur métabotrope du glutamate (de l'anglais : <i>metabotropic glutamate receptors</i>)
NA	Noradrénaline
Na ⁺	Sodium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	Monoxyde d'azote (de l'anglais : <i>Nitric Oxide</i>)
NPV	Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
NTS	Noyau du tractus solitaire
OCV	Organes circumventriculaires
OSF	Organe subfornical
OVL	<i>Organum vasculosum</i> de la <i>lamina terminalis</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
P _o	Probabilité d'ouverture
RD	Rétinopathie diabétique
RE	Réticulum endoplasmique

ROS	Espèces réactives de l'oxygène (de l'anglais : <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SNC	Système nerveux central
SP	Sclérose en plaques
<i>t</i> -ACPD	(±)-1Aminocyclopentane- <i>trans</i> -1,3-dicarboxylique
TEP	Tomographie par émission de positon
5-HT	Sérotonine
[Ca ²⁺]	Concentration calcique
[Ca ²⁺] _c	Concentration calcique cytosolique
[Ca ²⁺] _{lum}	Concentration calcique luminale dans le réticulum endoplasmique
[K ⁺]	Concentration potassique
[K ⁺] _p	Concentration potassique dans l'espace périvasculaire
Aβ	Bêta-amyloïde

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier la docteure Hélène Girouard pour avoir rendu possible ce projet par son soutien financier, technique et moral et surtout pour son optimisme débordant. Hélène a une énorme confiance dans les membres de son équipe et les considère toujours à son égal. Elle est à l'écoute des nouvelles idées et suggestions des membres du laboratoire. Je tiens aussi à remercier le docteur Louis-Éric Trudeau pour son soutien lors de l'absence de ma directrice de recherche pour congé de maternité. Je lui suis aussi reconnaissant pour son aide et ses conseils qui furent très souvent utiles, notamment lors de la mise au point des procédures et l'installation des équipements de microscopie. De plus, son expérience et sa rigueur de travail furent une grande source d'inspiration. Je veux aussi remercier Marie-Josée Bourque de l'équipe du Dr Trudeau pour toute son aide. Tous ceux qui la connaissent reconnaîtront que son savoir-faire est bien plus aiguisé que la plus fine des lames de rasoir et n'a d'égal que sa gentillesse et sa générosité. Il faut aussi que je remercie les baristas du café St-Henri du Quartier Latin pour avoir gentiment torréfié, moulu et extrait le stimulant neuronal nécessaire à l'écriture de ce mémoire. Enfin, et non pas les moindres, les divers membres de mon laboratoire et autres collègues qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet. Sonia, Mélissa, Ada, Nataliya, Julia, Ellie-Anna, non pas parce que vos noms riment, mais pour votre amitié et votre complicité dans les joies et les peines. Anne-Marie ta joie de vivre nous a contaminés. Sans oublier Karim, Julie, Valérie, Diane, Rong, David, Zi-Wei et les autres membres du département de pharmacologie de même que les membres de mon jury. Merci.

« Les passions sont les vents qui enflent les voiles du navire ; elles le submergent quelquefois, mais sans elles il ne pourrait voguer »

- Voltaire

I. Introduction

1. Couplage neurovasculaire

1.1 Le débit sanguin cérébral, essentiel au maintien de l'activité et de la survie neuronale

Le cerveau humain consomme une grande part, soit environ 25 %, de l'énergie totale produite par le corps humain. Ce chiffre est considérable lorsque comparé avec sa masse qui correspond à seulement 2 % du poids d'un homme. L'organe reçoit de plus, 15 % du débit cardiaque total (Lassen, 1959; Iadecola et Nedergaard, 2007; Magistretti, 2008). Le débit sanguin cérébral (CBF) chez l'homme a par ailleurs été évalué à environ 54 mL par 100 g de cerveau par minute (Kety et Schmidt, 1948). Son obstruction complète provoque en quelques secondes l'arrêt de toute activité physiologique neuronale et en quelques minutes des dommages cellulaires irréparables (Astrup et coll., 1981). Ensemble, ces caractéristiques démontrent que le maintien du CBF est d'une importance cruciale pour soutenir cette demande en énergie imposée par le complexe réseau neuronal dont dépend le cerveau humain, véritable chef-d'oeuvre de l'évolution animale. Cette importance se reflète en effet dans le nombre, mais surtout dans la complexité des mécanismes présents afin d'assurer une irrigation constante des structures cérébrales et ainsi l'apport en énergie nécessaire à l'activité des cellules qui les composent. Une structure vasculaire cérébrale unique, le cercle de Willis, rapportée par le Dr. Thomas Willis en 1664, permet d'illustrer ces propos (Kramer, 1912). Le cerveau est en effet irrigué par 2 paires d'artères majeures qui se rejoignent pour former une structure circulaire, sorte de réseau d'anastomoses permettant de pallier l'altération

ou l'obstruction d'une artère cérébrale sans pénaliser l'ensemble du réseau artériel cérébral (Dickinson, 1961). Toutefois, cette structure ne permet pas un contrôle actif ou précis du CBF. Cela est plutôt effectué par deux grands mécanismes régulateurs. Le premier, l'autorégulation cérébrovasculaire, permet de maintenir la perfusion sanguine relativement constante malgré des variations de la pression artérielle à l'intérieur des 60 à 150 mm Hg environ. Cette fonction se traduit en général par une adaptation de la résistance artérielle (Lassen, 1959; Paulson et coll., 1990; Iadecola, 2004). Le second mécanisme effectuant un contrôle du CBF, soit le plus précis et localisé, le couplage neurovasculaire (CNV), sera décrit dans les sections suivantes puisqu'il occupe une place centrale dans les investigations rapportées dans ce mémoire.

1.2 Historique/Définition

La mesure des changements du CBF est utilisée depuis fort longtemps déjà, afin de mesurer les variations de l'activité cérébrale. Vers la fin du 19^e siècle, Angelo Mosso, fut le premier à tester l'effet de stimuli émotifs et de tâches cognitives, qui évoquent on le sait aujourd'hui l'activation de divers circuits neuronaux, sur le CBF humain. Il mit à profit la fracture du crâne de son patient pour avoir accès au cortex cérébral et réaliser son expérience la plus célèbre au cours de laquelle il mesura le changement de pression intracrânienne lorsqu'il soumettait son patient à divers stimuli émotifs (Mosso, 1880). Toutefois, ce furent Roy et Sherrington qui un peu plus tard furent les premiers à proposer l'idée qu'un changement local dans la perfusion du cerveau se produise avec une forte corrélation temporelle avec la hausse de l'activité fonctionnelle. De plus, ils avancèrent l'hypothèse que les métabolites relâchés à proximité des vaisseaux sanguins

et découlant de cette activité puissent être la cause de ces changements de CBF (Roy et Sherrington, 1890). La poursuite de telles études perdit toutefois de son intérêt au début du 20^e siècle dû notamment aux limitations matérielles et à l'opposition d'éminents chercheurs au concept de contrôle actif du CBF. Ce furent donc vraisemblablement ces premières expériences qui inspirèrent l'émergence du concept actuel qui décrit un couplage étroit autant temporel que spatial (Zago et coll., 2012) entre l'activité neuronale et le CBF appelé CNV (pour couplage neurovasculaire) ou hyperémie fonctionnelle.

1.3 CNV et imagerie fonctionnelle

Non seulement le CNV est-il, comme mentionné précédemment, un mécanisme important pour la protection du système nerveux central (SNC), mais la compréhension de ce processus est fondamentale à l'interprétation des données obtenues avec les techniques les plus avancées et couramment utilisées d'imagerie fonctionnelle du cerveau. C'est le cas pour la tomographie par émission de positon (TEP) et l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf). Dans les années 1940-50, Kety après avoir mis au point une méthode de mesure du CBF « total » chez l'homme non anesthésié qui comprend l'inhalation de faible dose de monoxyde d'azote (NO) (Kety et Schmidt, 1948), se lança avec plusieurs collègues dans l'élaboration d'une technique utilisant l'injection de traceurs radioactifs dans les vaisseaux cérébraux et l'autoradiographie (sur tranches de cerveau) chez l'animal afin de mesurer le CBF local dans certaines structures prédéterminées du cerveau. En combinant cette technique avec des détecteurs de scintillation, il fut possible dans les années 60 de comparer chez

l'humain le CBF entre 256 régions superficielles du cerveau en mesurant la clairance d'isotopes radioactifs, tels le ^{85}Kr ou le ^{133}Xe , et de créer les premières cartes fonctionnelles du cortex cérébral suite à l'activation mentale. En remplaçant ces isotopes par des traceurs émettant des positons et pouvant s'incorporer dans des molécules organiques telles le ^{18}F fluorodeoxyglucose et l'autoradiographie chez l'animal par une caméra à TEP, on créa une technique permettant de mesurer l'utilisation neuronale de glucose chez l'homme, donc indirectement leur consommation énergétique (Zago et coll., 2012). En effet, il est en général accepté que l'activité neuronale régionale soit directement couplée avec le CBF régional et l'utilisation du glucose (Sokoloff, 1981), et ce, que le cerveau soit à son niveau d'activité basal ou qu'il ait été stimulé. Bien que l'utilisation du glucose soit majoritairement associée à l'activité présynaptique neuronale (Jueptner et Weiller, 1995), il faut mentionner qu'une partie non négligeable de cette énergie transite par les astrocytes pour y être utilisée ou transférée aux neurones (Jolivet et coll., 2009). On débuta aussi par la suite l'utilisation du $^{15}\text{H}_2\text{O}$ pour la mesure directe du CBF. La TEP qui fut utilisée dès le milieu des années 1970 à des fins cliniques a, depuis ses débuts, l'avantage de mesurer rapidement le CBF, mais possède toutefois certains inconvénients, dont une faible résolution spatiale (Zago et coll., 2012) et une exposition des patients à une dose significative de radioactivité (Brix et coll., 2005). L'arrivée de l'IRMf allait atténuer considérablement ces contraintes et ainsi devenir la technique la plus répandue. (Zago et coll., 2012). C'est en utilisant les capacités de la résonance magnétique nucléaire afin de produire des images de coupes transversales que Lauterbur assit les bases de l'IRM en 1973. Par la suite, grâce aux connaissances antérieures sur les propriétés magnétiques de l'hémoglobine, Ogawa et

coll. révélèrent l'effet BOLD (de l'anglais : Blood Oxygen Level Dependent) qui s'appuie sur la différence de concentration dans le sang veineux entre la déoxyhémoglobine qui est paramagnétique et celle l'oxyhémoglobine qui ne présente pas cette propriété. Un changement dans la concentration de déoxyhémoglobine se reflète par une augmentation du contraste BOLD (Ogawa et coll., 1993). La concentration de cette dernière diminue en effet dans le sang des veinules postcapillaires suite à une augmentation de l'activité neuronale. L'IRMf-BOLD est devenu la technique la plus utilisée pour l'étude de la fonction cérébrale (Kessler, 2003; Zago et coll., 2012) en majeure partie grâce à son innocuité chez l'humain, sa haute résolution temporelle et spatiale et de la possibilité de répéter une procédure plusieurs fois dans un même protocole (Kessler, 2003). Toutefois, la technique repose sur une prémisse voulant que l'utilisation d'oxygène reflète l'activité neuronale, mais aussi qu'elle soit couplée directement avec le CBF, toutefois cette relation ne semble pas toujours existante.

1.4 Découplage neurovasculaire

Il est connu qu'il existe un découplage entre le signal BOLD et les potentiels de champs locaux chez l'individu sain. Ce phénomène est pour l'instant expliqué par les propriétés anatomiques et/ou de codage spécifiques aux différentes régions cérébrales. Les potentiels de champs locaux constituent la mesure électrophysiologique de l'activité neuronale qui présente la meilleure corrélation avec le signal BOLD (Logothetis et coll., 2001). Ce découplage peut notamment être observé dans l'hippocampe, à l'opposé du néocortex dans laquelle région cette relation est bien établie (Ekstrom, 2010). Puisque la communication neurone-astrocyte-système vasculaire semble être la clé du couplage

entre l'activité neuronale et la réponse hémodynamique, l'étude des bases fonctionnelles du CNV, de même que des circuits neuronaux impliqués dans chacune des régions cérébrales où l'activité cérébrale est soutenue par ce mécanisme sont donc nécessaires à la bonne compréhension et surtout à l'interprétation juste des signaux BOLD. Il faut ajouter à ceci qu'il a été suggéré qu'autant l'activation astrocytaire dépendante de la signalisation neuronale, que celle qui en est indépendante, puissent contribuer aux signaux de neuroimagerie. Cependant, ces possibilités restent à clarifier (Moreno et coll., 2013).

1.5 État des connaissances sur le CNV

Malgré les nombreuses avancées technologiques ayant permis la mise en place de méthodes efficaces et fiables pour la mesure de l'activité neuronale, l'interprétation des données recueillies grâce à celles-ci repose grandement sur la compréhension du CNV. Alors que la TEP et l'IRMf sont employées depuis une quarantaine et une vingtaine d'années respectivement (Zago et coll., 2012), les connaissances sur les bases cellulaires et les mécanismes qui sous-tendent le CNV sont demeurées fragmentaires et basées sur des hypothèses non vérifiées. Toutefois, le fait que ces questions soient récemment l'objet de recherches intensives peut s'expliquer en partie par l'arrivée de puissantes technologies permettant l'étude du CNV de manière très localisée, et ce en combinaison avec des méthodes pharmacologiques et/ou génétiques. La fluxmétrie par laser Doppler (FLD), utilisée au niveau cérébral dès 1980, mais validée en 1988 (Dirnagl et coll., 1989) de même que la microscopie multiphoton sont des techniques largement utilisées présentement. La FLD permet entre autres de mesurer les changements de CBF en

réponse à divers stimuli. La microscopie multiphoton quant à elle, est d'abord et surtout employée pour mesurer la réponse calcique neuronale ou astrocytaire ou combinée à l'imagerie infrarouge pour mesurer la réponse vasculaire, peut aussi être utilisée pour mesurer directement le CBF *in vivo* (Kleinfeld et coll., 1998). Ainsi, nombre de découvertes majeures ont marqué les dix dernières années. Malgré tout, la complexité de ce mécanisme explique sans doute pourquoi il demeure à ce jour mal compris (Iadecola, 2004; Logothetis et Wandell, 2004). On connaît l'existence d'une variété d'afférences neuronales pouvant stimuler ou inhiber une même région cérébrale. Ceci engage la participation de divers types de cellules situées davantage en périphérie des vaisseaux sanguins qui peuvent, elles, présenter différents phénotypes. De plus, ces dernières peuvent relâcher une myriade d'agents vasoactifs agissant sur plusieurs classes de récepteurs. Cela illustre la taille du défi posé par l'étude du CNV. Cette complexité sera effleurée dans les prochaines sous-sections où les connaissances actuelles sur le CNV seront expliquées brièvement. D'abord, une description de l'anatomie particulière du système vasculaire cortical sera faite. Le lecteur pourra ainsi comprendre les raisons de l'étude de cette région cérébrale, et ce en lien avec la technologie qui est actuellement disponible pour l'investigation du CNV. Par la suite, les différentes cellules importantes pour ce processus seront décrites, en portant une attention particulière à l'astrocyte.

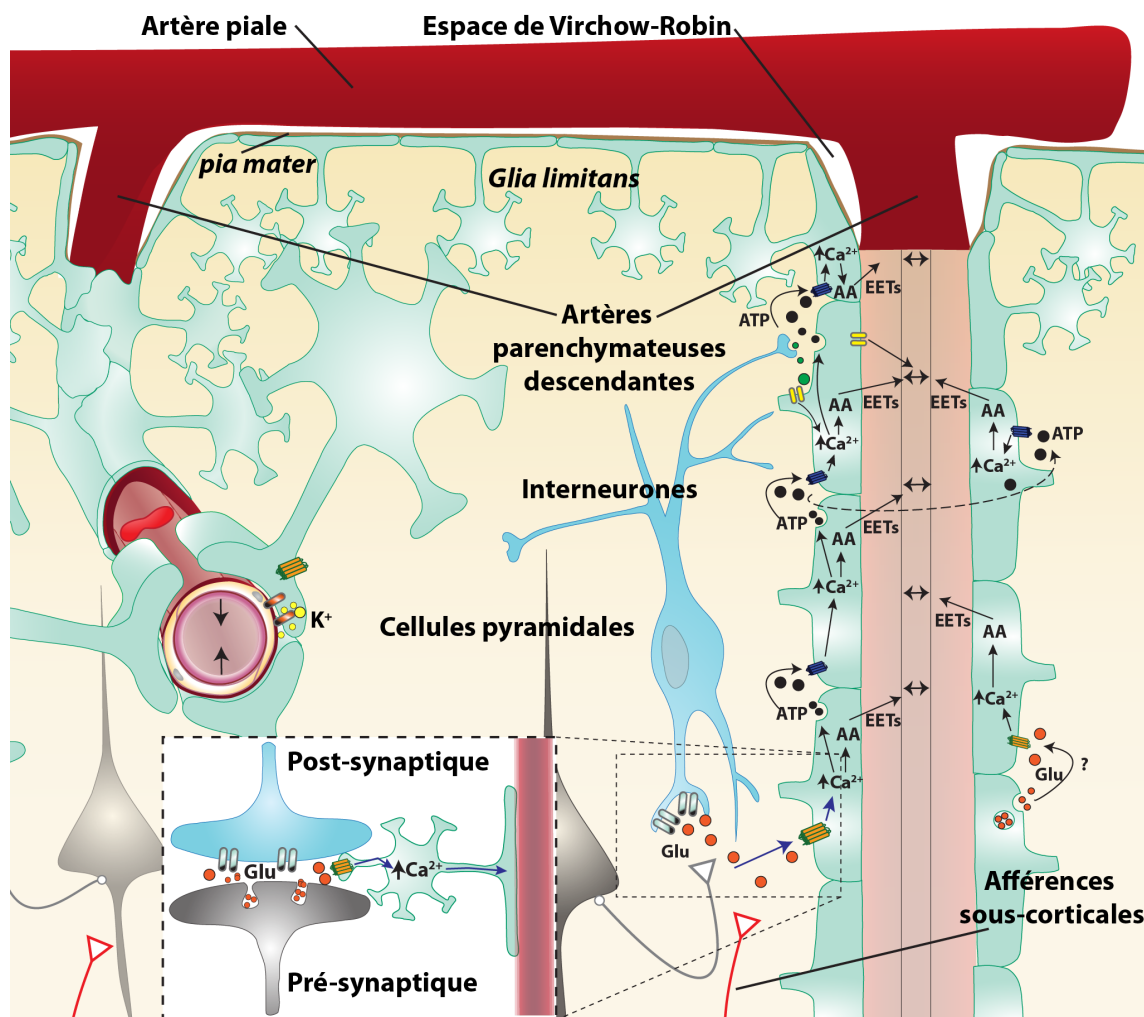


Figure 1. Anatomie générale du système artériel parenchymateux du cortex somatosensoriel et représentation agrandie de l'induction d'une réponse calcique astrocytaire par l'activité neuronale. La libération de glutamate (cercles orangés) par les afférences neuronales active les récepteurs métabotropes (représentés en orangé) du glutamate de type 5 (mGluR₅) des astrocytes (cellules vertes) ce qui induit une réponse calcique qui se propage jusqu'aux pieds astrocytaires. Cette réponse calcique astrocytaire stimule la production d'acide arachidonique (AA) et d'agents vasodilatateurs comme les EETs. Le mécanisme du K⁺ (cercles jaunes) peut aussi être stimulé par l'ouverture des canaux BK astrocytaires (à gauche représentés par deux barres parallèles orangées). De plus, l'ATP peut contribuer via les récepteurs purinergiques à transmettre les signaux calciques entre astrocytes sous forme de vagues calciques. Les neurones locaux comme les interneurones GABAergiques et les cellules pyramidales peuvent participer à la stimulation de réponses calciques astrocytaires ou libérer directement des agents vasoactifs (illustrés par des cercles verts) ayant des récepteurs sur les cellules vasculaires (illustrés en jaune). AA : acide arachidonique; ATP : adénosine triphosphate; EETs : acides époxyicosatriénoïques; Glu: glutamate; K⁺: potassium.

1.6 Vascularisation du cortex et CNV

Le cortex est une des premières régions où le CNV fut étudié, et ce dès les premières expériences de Mossi. La structure demeure d'un intérêt particulier dû à sa position anatomique très accessible, notamment lors d'études *in vivo* chez le rongeur. Par exemple, une première technique qui sera décrite ici, la FLD, permet la mesure du CBF régional sur une étendue d'environ 1 mm³ à la surface du cortex somatosensoriel (Dirnagl et coll., 1989). La FLD possède une grande résolution temporelle et est peu invasive (Detre et coll., 1998) puisqu'elle ne requiert en général qu'une chirurgie mineure qui permet d'exposer la surface crânienne au détecteur de l'appareil. Une bonne compréhension de l'anatomie vasculaire corticale est toutefois nécessaire à la mesure adéquate du CNV par la FLD et son interprétation.

Les quatre artères cérébrales majeures fusionnent, comme mentionné plus tôt, dans le cercle de Willis. Certaines des artères qui émergent de cette structure vont parcourir la surface du cortex et donner naissance aux artères piales. À ce niveau, les artères reposent sur une dense couche d'astrocytes, appelée « *glia limitans* » comme illustré à la figure 1. De ces artères superficielles émergent les artérioles parenchymateuses, aussi nommées artérioles pénétrantes, qui plongent perpendiculairement dans le parenchyme et sont séparées de la *glia limitans* par l'espace de Virchow-Robin (Edvinsson et Krause, 2002). Ces artérioles forment une sorte de goulot qui contrôle le CBF cortical et permettent l'irrigation d'une région pouvant être très importante, soit jusqu'à 350 µm de rayon par artère (Nishimura et coll., 2007). Les premiers micromètres pénétrants de

lame basale des artérioles parenchymateuses sont aussi, à l'instar des artères piales, séparés de la glie par un espace périvasculaire, et ce par l'espace occupé par la *pia mater* qui s'atténue graduellement pour laisser place à un contact direct entre l'enveloppe formée de prolongements astrocytaires et le muscle lisse vasculaire. Lorsque ces artérioles deviennent capillaires, il ne subsiste pratiquement aucune séparation entre péricytes — cellules contractiles entourant l'endothélium capillaire — et astrocytes (Jones, 1970). L'astrocyte et ses structures spécialisées seront décrits avec plus de détails à la section suivante.

1.7 Barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est formée par la couche de cellules endothéliales vasculaires qui s'alignent à l'intérieur des petits vaisseaux sanguins cérébraux. Ces dernières sont jointes entre elles de manière extrêmement rapprochée grâce à des jonctions serrées. La BHE contribue à protéger le cerveau des fluctuations qui surviennent dans la composition de la circulation systémique. Elle le protège de même des xénobiotiques et des neurotransmetteurs, qui peuvent affecter ou compromettre la fonction cérébrale. Elle joue de plus un rôle de transport sélectif des constituants et nutriments essentiels (Abbott, 2002). Certaines régions du cerveau sont toutefois situées à l'extérieur de la BHE, c'est-à-dire que leur endothélium est perméable. Celles-ci sont donc a priori exposées aux éléments plasmatiques. On réfère à ces dernières comme étant les organes circumventriculaires (OCV). Les OCV comprennent entre autres, l'organe subfornical (OSF), l'*organum vasculosum* de la *lamina terminalis* (OVLTL), l'éminence médiane et l'hypophyse postérieure

(neurohypophyse). D'autres régions, dont la glande pinéale et l'antéhypophyse possèdent aussi un emplacement extra-BHE mais ces dernières ont une origine embryologique différente du cerveau et sont des glandes endocrines. Enfin, l'organe subcommissural possède une couche endothéliale moins perméable que les OCV, mais est associé étroitement à la pinéale (Ganong, 2005). Le cortex somatosensoriel, région d'intérêt dans les recherches décrites dans ce mémoire, se trouve à l'intérieur de la BHE.

1.8 Astrocytes

Les astrocytes forment avec les oligodendrocytes et la microglie, une famille de cellules cérébrales appelée la glie. Découverts par Virchow en 1846, ils furent longtemps considérés comme des cellules jouant un rôle de second plan. En effet, classiquement, on leur reconnut au mieux la fonction de support de l'activité neuronale, ce qu'ils effectueraient en régularisant l'environnement extraneuronal (Nedergaard et coll., 2003). Toutefois, les années 1950 apportèrent un constat surprenant provenant du fait que les astrocytes furent rapportés en surnombre par rapport aux neurones dans le cortex humain (8 astrocytes:5 neurones). De plus, on a observé que ce ratio présente une corrélation positive avec la complexité du cerveau des différentes espèces animales (Bass et coll., 1971). La taille et la complexité morphologique des astrocytes semblent aussi augmenter pareillement (Oberheim et coll., 2006). En additionnant ces observations aux récentes découvertes de leurs multiples rôles dans la modulation de l'activité synaptique (Kang et coll., 1998), la gliotransmission (Pasti et coll., 1997;Kang et coll., 1998), la recapture de glutamate et un rôle essentiel dans sa synthèse (Rothstein et coll., 1996;Bergles et coll., 1999;Hertz et coll., 1999), le maintien de la BHE (Abbott, 2002),

le CNV (voir sections suivantes) et nombre d'autres, on arrive à saisir à quel point ces cellules gliales contribuent activement à maintenir l'intégrité et le fonctionnement cérébral.

Comme leur nom l'indique, ces cellules possèdent plusieurs prolongements cytoplasmiques qui leurs donnent une allure étoilée lorsque soumises à certains marquages (Simard et coll., 2003). Selon un classement morphologique, on retrouve au moins deux et quatre types d'astrocytes chez le rongeur et le primate, respectivement. Alors qu'un premier type, les astrocytes fibreux, siègent dans la matière blanche, les astrocytes protoplasmiques, eux, sont les plus abondants et on les retrouve dans les couches II à VI du cortex (Miller et Raff, 1984; Oberheim et coll., 2006). Ces derniers possèdent deux types de prolongements. Les premiers sont fins et dirigés vers les synapses neuronales, où ils exercent une partie des fonctions énumérées plus tôt, participant à la formation d'une synapse dite « tripartite » avec les neurones pré et postsynaptiques. Les seconds s'élancent vers les vaisseaux sanguins avoisinants, façonnant ainsi les pieds astrocytaires, larges structures spécialisées qui recouvrent la presque totalité de la vasculature parenchymateuse cérébrale et qui participent au CNV. Le feuillet astrocytaire ainsi formé par ces prolongements, qui se chevauchent par endroits, arrive à couvrir virtuellement 100 % de la surface vasculaire. Son épaisseur varie grandement toutefois, oscillant entre 300 nm et moins de 20 nm (Nedergaard et coll., 2003; Simard et coll., 2003; Iadecola et Nedergaard, 2007; Mathiisen et coll., 2010). Ces pieds astrocytaires se retrouvent ainsi situés très près des cellules contractiles des vaisseaux parenchymateux, c'est-à-dire soit des cellules musculaires lisses des

artérioles, soit des péricytes des capillaires (Iadecola, 2004). Il est aussi notable que la membrane des pieds astrocytaires présente une expression particulièrement importante de canaux potassiques calcium-dépendants de grande conductance (BK) (Price et coll., 2002), de canaux hydriques à l'aquaporine-4 (AQP4) et de récepteurs purinergiques (Simard et coll., 2003). Cette caractéristique peut être associée avec certaines propriétés des astrocytes, dont leur participation au CNV et leur activité calcique (voir la section 3 portant sur le calcium astrocytaire).

Les astrocytes furent d'abord identifiés par des marquages métalliques comme le marquage avec la méthode « *gold sublimated* » de Cajal (Miller et Raff, 1984), mais le sont à l'heure actuelle plus communément grâce à leur expression spécifique de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP, de l'anglais : *Glial Fibrillary Acidic Protein*). Marquant une protéine du cytosquelette, l'immunohistochimie à la GFAP ne permet néanmoins de visualiser qu'une partie superficielle du volume de ces cellules et, de surcroît, ne marque pas la totalité des prolongements. C'est donc par une combinaison d'autres marqueurs de protéines exprimées par ces derniers ou par l'injection intracellulaire de colorant qu'il fut démontré que ces cellules occupent des domaines anatomiques distincts et enveloppent en quasi totalité la vascularisation parenchymateuse cérébrale (Bushong et coll., 2002; Simard et coll., 2003). Par ailleurs, afin d'observer les astrocytes corticaux *in vivo* ou sur tranches aigües de cerveau, une méthode très accessible et simple, la coloration à la sulfurodamine 101 (SR-101) a été décrite récemment et marque une proportion supérieure de ces cellules comparativement aux modèles de souris transgéniques GFAP-Green Fluorescent Protein (GFP). La

technique GFAP-GFP néglige en effet 40 % des astrocytes SR-101 positifs. De plus, l'expression de GFAP détectée dans le cortex est particulièrement faible. La coloration à la SR-101 permet de surcroît une visualisation en trois dimensions de l'astrocyte et des pieds astrocytaires, tout en étant particulièrement adaptée à la microscopie multiphoton et à l'imagerie calcique (Nimmerjahn et coll., 2004; Houades et coll., 2008; Appaix et coll., 2012).

1.9 Innervation corticale et CNV

Deux types d'innervations

Deux grands types d'innervations sont en mesure de participer au contrôle de la circulation sanguine cérébrale. D'abord l'innervation extrinsèque affecte les vaisseaux extracérébraux de surface telles que les artères piales, mais elle peut atteindre, dans certaines régions, les vaisseaux intracérébraux. Cette dernière comprend l'innervation sympathique qui joue un rôle dans l'autorégulation de même que parasympathique (Edvinsson et Krause, 2002; Baeres et Moller, 2004).

En contraste, l'innervation intrinsèque affecte, elle, les vaisseaux parenchymateux et participe de manière importante au CNV cortical. Elle fait référence aux « afférences » neuronales provenant des régions sous-corticales, intracérébrales, qui sont en contact avec les neurones corticaux locaux, tout comme ils le sont dans plusieurs cas directement avec la microvasculature et les astrocytes (Hamel, 2006). Ces neurones locaux peuvent être classifiés en deux types : pyramidaux ou non pyramidaux. La majorité de ces derniers sont des interneurons GABAergiques (McCormick, 1992).

Lorsque stimulés directement, il fut observé que ces interneurons peuvent exercer un contrôle direct sur le tonus vasculaire (Cauli et coll., 2004). Les neurones pyramidaux joueraient eux aussi un rôle dans le CNV du cortex somatosensoriel, formant un relais pour l'information sensorielle arrivant des régions sous-corticales qu'ils transmettent ensuite aux cellules périvasculaires, dont les astrocytes, qui en retour, modulent le tonus des artérioles (Lecrux et coll., 2011).

Le CNV cortical peut être actionné suite à la stimulation de plusieurs voies afférentes. Les voies du *locus coeruleus* (projections noradrénergiques), du noyau du raphé (projections sérotoninergiques) et les voies thalamo-corticales (projections glutamatergiques) ont été abondamment étudiées (Hamel, 2006; Lecrux et coll., 2011). La participation des astrocytes à la réponse neurovasculaire qui découle de la stimulation des afférences sérotoninergiques (contenant la sérotonine; 5-HT) n'a pas encore été démontrée, mais on sait toutefois qu'une partie de ces prolongements a été rapportée comme étant en contact avec le feuillet astrocytaire qui entoure les vaisseaux et que ces cellules gliales possèdent des récepteurs pour la 5-HT (Cohen et coll., 1995; Edvinsson et Krause, 2002). Cela suggère donc que les astrocytes joueraient un rôle d'intégrateur, voire effecteur, des signaux affectant le CNV activé par ces afférences, ceci restant toutefois à être vérifié. Cette participation gliale est toutefois beaucoup plus claire dans le cas des afférences contenant la noradrénaline (NA). Ces neurones projettent aussi directement sur les pieds astrocytaires (Cohen et coll., 1997), qui sont eux capables d'engendrer une réponse vasculaire lorsque stimulés par la NA (Mulligan et MacVicar, 2004). De plus, il fut démontré que l'augmentation de CBF

causée par la stimulation de ces afférences, est attribuable dans une proportion d'au moins 35 % à ces cellules gliales, comme démontré grâce à l'inhibition du métabolisme astrocytaire et d'au moins 60 % à la synthèse des acides époxyéicosatriénoïques (EETs) (Toussay et coll., 2013) qui sont considérés d'origine astrocytaire (voir la sous-section suivante). Il en va de même pour les réponses induites par les projections thalamiques qui le sont, elles, à au moins 40 % (Lecrux et coll., 2011). Le stockage d'agents vasoactifs dans les cellules gliales pourrait même cacher une sous-estimation de la participation gliale associée à l'activité métabolique (Toussay et coll., 2013). En effet, l'inhibition des enzymes métabolisant ces agents n'élimine pas ces stocks. En somme, en vertu de toutes ces observations, malgré la variété des afférences neuronales participants à l'augmentation du CBF et incidemment au CNV, de même qu'à la diversité de cellules pouvant moduler cette réponse, il en ressort que l'astrocyte demeure un centre névralgique de la structure du mécanisme. Sa participation au CNV sera ainsi donc expliquée de manière détaillée dans la sous-section suivante « CNV et astrocytes ».

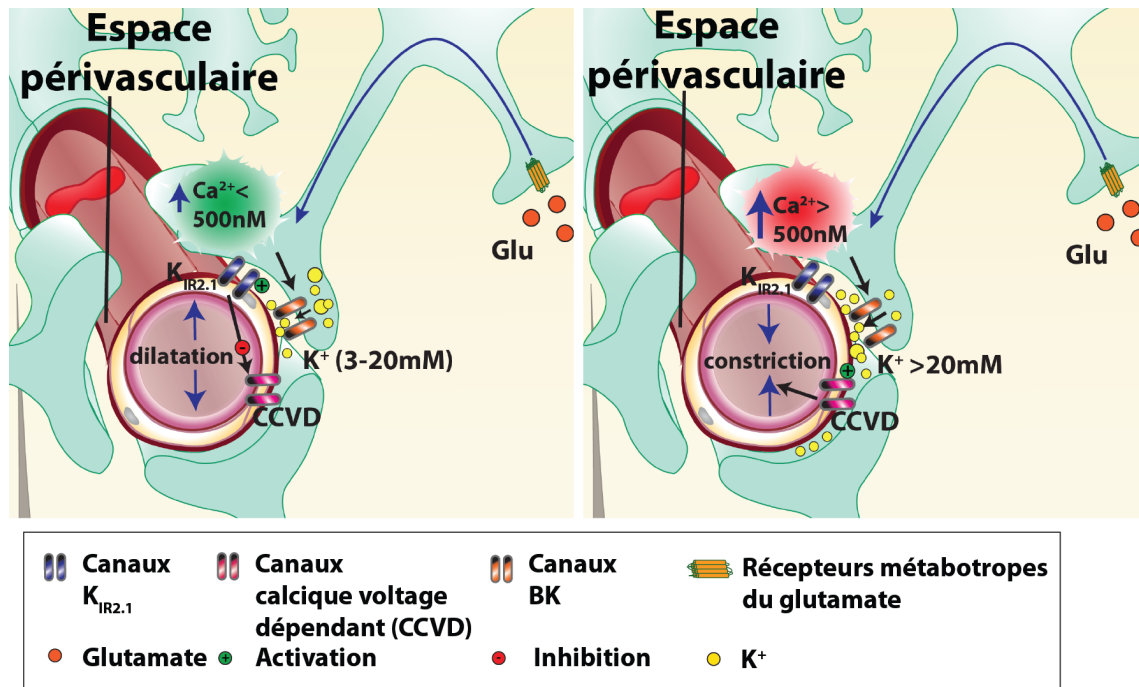


Figure 2. Mécanisme du K^+ et concentration calcique dans les pieds astrocytaires. La réponse calcique dans les pieds astrocytaires est aussi associée à l'activation du mécanisme du K^+ . Alors que la concentration calcique s'élève dans les pieds astrocytaires, par exemple suite à l'excitation des mGluR, les canaux BK (couleur orange) s'ouvrent et laissent passer du K^+ des astrocytes vers l'espace périvasculaire. Les réponses calciques qui atteignent un niveau inférieur à 500 nM de Ca^{2+} sont associées à une concentration maximale de K^+ périvasculaire entre 3 à 20 mM ce qui permet l'activation des canaux potassiques rectifiants entrants de type 2.1 ($K_{ir2.1}$; couleur bleue) des muscles lisses artériolaires. Il s'ensuit une hyperpolarisation du potentiel membranaire du muscle, ce qui diminue la probabilité d'ouverture des canaux calciques voltage dépendant (CCVD; couleur rouge) et cause une vasodilatation (partie gauche de la figure). Dans le cas opposé, si la concentration calcique atteint plus de 500 nM de Ca^{2+} , l'ouverture des canaux BK entraîne une forte augmentation (>20 mM) de la concentration en K^+ dans l'espace périvasculaire. Le changement de potentiel membranaire engage l'ouverture des CCVD, ce qui cause une entrée de Ca^{2+} et une dépolarisation dans le muscle lisse et la vasoconstriction de l'artérole.

1.10 CNV et astrocytes

Les dix dernières années ont amené la découverte d'une fonction importante des astrocytes. Celle-ci redéfinit les théories qui jusqu'alors étaient centrées sur le concept d'un couplage direct entre l'activité neuronale et les ajustements hémodynamiques subséquents permettant de supporter cette activité. En effet, les astrocytes périvasculaires expriment une variété de récepteurs capables de percevoir les changements qui surviennent dans l'activité neuronale locale de même que de recevoir différents stimuli des cellules avoisinantes. Une des conséquences fonctionnelles importantes de leur localisation centrale et de leurs capacités sensibles se traduit ainsi dans la modulation précise qu'ils peuvent exercer sur le CNV, et dans certains cas la participation essentielle à ce mécanisme. Plusieurs neurotransmetteurs relâchés par l'activité synaptique locale sont aptes à stimuler ces récepteurs astrocytaires. Dans le cortex, l'activation des récepteurs métabotropes du glutamate (mGluR) de type I par ce neurotransmetteur fut un des premiers systèmes identifiés de communication neuroastrocytaire associés au contrôle de la réponse vasculaire. Autant par la stimulation électrique de neurones situés en périphérie d'artérioles corticales que l'utilisation d'agonistes spécifiques des mGluR de type I, Zonta et coll. ont démontré *in situ* que ces cellules gliales avaient la possibilité d'effectuer un contrôle sur le tonus des artérioles parenchymateuses (Zonta et coll., 2003a).

De manière générale, l'activation de tels récepteurs s'ensuit d'une signalisation calcique intracellulaire au niveau des neurones locaux, tels les interneurons, et/ou des astrocytes

(voir la section 3). Cette voie classique implique la synthèse et la relâche de divers agents vasoactifs. Ainsi, l'activation enzymatique dépendante du calcium qui en découle peut produire des métabolites vasoactifs de l'acide arachidonique (AA) comme les EETs (figure 1), qui sont des métabolites des cytochromes P450 (Alkayed et coll., 1996), le NO (Duchemin et coll., 2012) ou encore des métabolites des cyclooxygénases (COX)-1 et 2 comme la prostaglandine E₂ (PGE₂) (Zonta et coll., 2003b). Il peut aussi s'agir d'adénosine (Ko et coll., 1990) ou d'ions comme le K⁺ (Filosa et coll., 2006; Girouard et coll., 2010) ou d'autres neurotransmetteurs comme le GABA (Lecrux et coll., 2011). Ces agents sont présumés agir ensuite directement ou indirectement sur les mécanismes de constriction ou de relaxation du muscle lisse vasculaire artériolaire. Ainsi, certains d'entre eux agissent davantage comme des modulateurs du CNV et non comme des médiateurs. Il est, de plus, intéressant de souligner que malgré les tentatives d'inhiber totalement le CNV par différents cocktails d'inhibiteurs de ces agents vasoactifs, on n'arrive pas à bloquer entièrement ce mécanisme (Lecrux et coll., 2011; Toussay et coll., 2013). Cela suggère que plusieurs voies alternatives permettent de pallier les déficits de l'une ou l'autre de celles-ci.

Par contre, l'origine cellulaire exacte de la synthèse de ces agents et leur mécanisme d'action demeurent à ce jour largement spéculatifs. Il est connu toutefois, que les EETs, métabolites vasodilatateurs de l'AA sont produits et relâchés par les astrocytes (Alkayed et coll., 1996). Une hypothèse récente fait même participer les EETs dans l'activation des canaux BK (Farr et David, 2011). En fait, le rôle des canaux BK astrocytaires dans le CNV dépendant des ces cellules gliales a lui aussi déjà été démontré (figure 2). Ils

permettent la sortie de K^+ dans l'espace périvasculaire séparant pieds astrocytaires et muscles vasculaires lisses des artérioles suivant la réponse calcique gliale. Cela entraîne, notamment, la relaxation du muscle lisse vasculaire via l'activation des canaux potassiques rectifiants entrants de type 2.1 ($K_{ir2.1}$) (Filosa et coll., 2006; Girouard et coll., 2010). La particularité des astrocytes à n'exprimer en situation physiologique que la COX-1 et non la COX-2 (Hurley et coll., 2002), pourrait dans certains cas être mise à profit afin d'estimer l'origine cellulaire d'une réponse causée par les prostaglandines. Dans le cortex somatosensoriel, la COX-2 est, quant à elle, exprimée dans certaines populations de neurones et on a déjà démontré sa participation au CNV (Niwa et coll., 2000). En somme, malgré que l'origine cellulaire de la synthèse et de la relâche des agents vasoactifs participants au CNV demeure incertaine, plusieurs de ces acteurs semblent avoir une origine astrocytaire.

Diverses expériences ont été réalisées dans la dernière décennie notamment *in situ*, c'est-à-dire sur des préparations aiguës de tranches de cerveau, ou encore *in vivo* sur les rongeurs afin de caractériser le CNV dépendant des astrocytes. Alors que le rôle de la réponse calcique astrocytaire fait l'unanimité (voir la section 3), il naquit un certain débat sur le type de réponse vasculaire engendré par ces cellules gliales au niveau des artérioles parenchymateuses. Alors que plusieurs ont décrit la vasodilatation comme dominante ou exclusive *in situ* (Zonta et coll., 2003a; Filosa et coll., 2006) et *in vivo* (Takano et coll., 2006), d'autres ont au contraire rapporté l'observation de vasoconstrictions (Mulligan et MacVicar, 2004). Plusieurs propositions unifiant les observations discordantes ont été émises suite aux résultats obtenus dans certaines

expériences subséquentes. D'abord, l'équipe du laboratoire de Jessica Filosa a démontré que la précontriction des vaisseaux grâce à des agents vasoconstricteurs comme le U46619 permet l'obtention de vasodilatations lors d'expériences sur tranches aiguës, en restaurant le tonus vasculaire perdu dans de telles préparations (Blanco et coll., 2008). Ensuite, les expériences du laboratoire de Brian A. MacVicar les ont amenés à proposer que la concentration d'oxygène au niveau des tranches de cerveau puisse influencer la polarité de la réponse vasculaire (Gordon et coll., 2008). Enfin, Girouard et coll. ont observé que l'intensité de la réponse calcique dans les pieds astrocytaires pouvait dicter cette polarité de la réponse vasculaire. Une réponse calcique modérée a été associée à la vasodilatation et une calcique plus forte, à la vasoconstriction (Girouard et coll., 2010).

1.11 Défaillance pathologique du CNV

Plusieurs pathologies complexes sont associées à une diminution du CBF régional au repos ou à des perturbations du CNV. C'est le cas de la maladie d'Alzheimer (AD) (Tachibana et coll., 1984), de la sclérose en plaques (SP) (Law et coll., 2004), de l'accident vasculaire cérébral (AVC) (Pineiro et coll., 2002; Krainik et coll., 2005), de l'hypertension artérielle (HA) (Jennings et coll., 2005; Beason-Held et coll., 2007) et de la rétinopathie diabétique (RD) (Qian et Ripps, 2011). Il est donc d'une grande importance d'identifier les mécanismes du CNV étant affectés dans de telles situations pathologiques. Un constat intéressant semble relier toutes ces maladies complexes. En effet, dans toutes ces pathologies, certains des symptômes sont atténués par un traitement avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) ou des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA). On retrouve ainsi,

notamment, une amélioration du CNV et de la cognition dans l'AD (Takeda et coll., 2009;Li et coll., 2010), de l'état immunitaire dans la SP (Platten et coll., 2009), du CBF et une diminution des dommages neurovasculaires dans l'AVC (Ito et coll., 2002;Fagan et coll., 2006), une amélioration du CNV indépendante de la pression artérielle dans l'HA induite par l'Ang II (Kazama et coll., 2004) de même qu'une réduction de l'incidence et de la sévérité de la RD (Wright et Dodson, 2010).

1.12 Conclusion de section

En somme, on reconnaît aujourd'hui à l'astrocyte, cellule gliale dont la contribution au fonctionnement du SNC a été longuement considérée comme passive, une participation essentielle au CNV. L'étude des interactions neuroastrocytaire et astrocyto-vasculaires est cruciale dans le but d'accroître la compréhension de ce processus vital à l'homéostasie cérébrale. Cela est d'autant plus important du fait que le CNV est le mécanisme central au cœur du fonctionnement des techniques d'imagerie cérébrale les plus utiles à la médecine moderne. De plus, ce processus est affecté dans plusieurs pathologies cérébrales majeures. Enfin, l'Ang II semble jouer un rôle délétère dans ces mêmes pathologies, souvent en affectant directement le CNV. L'étude des interactions de ce peptide avec les processus du CNV sera donc au cœur des recherches ici décrites. La prochaine section introduit les rôles et l'importance de l'Ang II dans le SNC et apporte des arguments, avec la dernière section « calcium astrocytaire » qui supportent l'intérêt particulier que nous portons à l'astrocyte dans cette étude sur l'altération du CNV par l'Ang II.

2. Système rénine-angiotensine

2.1 L'angiotensine II

L'angiotensine II (Ang II) est un octapeptide qui est connu classiquement pour son rôle central joué dans le maintien de la pression artérielle et de l'équilibre hydrominéral. Ceci se fait notamment par son action sur la sécrétion de vasopressine (ou hormone antidiurétique) et d'aldostérone qui favorise la rétention d'H₂O et de sodium (Na⁺) par les reins ainsi qu'en exerçant une action vasoconstrictrice sur le système artériel périphérique, et ce, sans compromettre la fonction rénale (Weir et Dzau, 1999).

La synthèse de ce puissant vasoconstricteur a pour première étape la transformation de l'angiotensinogène (AGT), qui est produit notamment par le foie (Matsusaka et coll., 2012) et sécrété dans le plasma sanguin, en angiotensine I (Ang I). Ceci est possible grâce à l'effet de la rénine, une enzyme d'abord identifiée et nommée, car étant produite par les cellules juxtaglomérulaires des reins. Cette dernière est après quoi sécrétée dans la circulation systémique (Hackenthal et coll., 1990; Sakai et Sigmund, 2005). On accorde à l'Ang I ainsi produite, un champ d'action et une activité très réduite à concentration physiologique lorsque comparée à l'Ang II. C'est ainsi que l'Ang I doit être clivée en Ang II par l'ECA. Cela s'effectue directement au niveau des cellules endothéliales de divers tissus, mais entre autres de manière fonctionnelle et importante, dans les poumons (Peach, 1977).

2.2 RAS tissulaires

Plus récemment, en plus du système rénine-angiotensine (RAS) classique, aussi appelé RAS systémique ou circulant, qui permet le maintien de l'intégrité hémodynamique de l'ensemble du corps, d'autres RAS indépendants permettant une production locale d'Ang II dans certains tissus, ont été mis en évidence. Parmi ces RAS tissulaires, les plus connus sont : le RAS cardiaque (De Mello et Danser, 2000), le RAS rénal (Kobori et coll., 2007) et le RAS cérébral. Ce dernier constitue un modèle important pour l'étude des RAS tissulaires puisque l'Ang II et la rénine circulante ne peuvent pénétrer dans la plupart des régions du cerveau, ce qui en fait donc un système relativement isolé du RAS systémique. En effet, ces régions sont protégées de différents éléments présents dans la circulation systémique par la BHE.

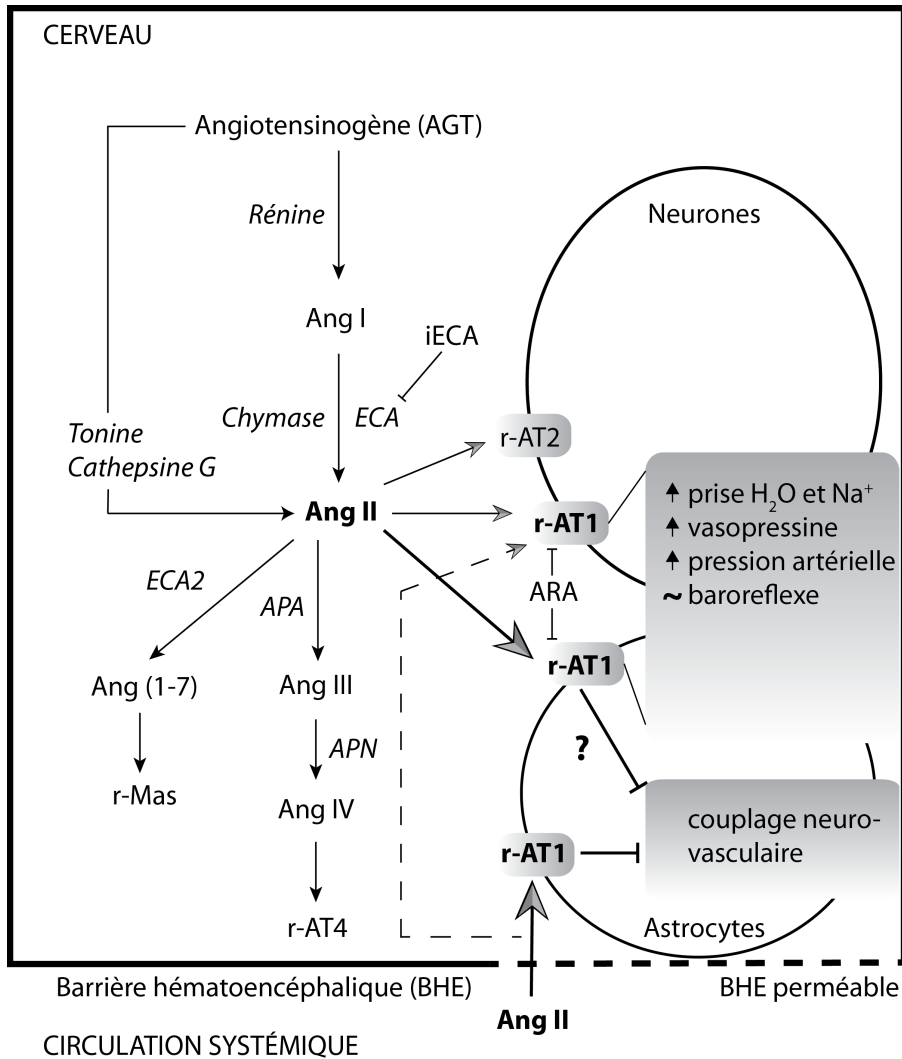


Figure 3. Voies intracérébrales de synthèse et de dégradation de l'Ang II et représentation de certains de ses récepteurs et des effets associés à leur activation. L'Ang II intracérébrale pourrait être synthétisée par des voies alternatives à celle de la voie de la rénine et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. L'Ang II engendre la majorité des effets qui lui sont classiquement associés par son activation des récepteurs AT₁ neuronaux. Les astrocytes possèdent des récepteurs AT₁ fonctionnels. Ces récepteurs pourraient être activés par l'Ang II synthétisée à l'intérieur du cerveau ou alternativement et ce davantage dans les régions où la barrière hémato-encéphalique est perméable, par l'Ang II de la circulation systémique. L'hypothèse de l'altération du couplage neurovasculaire par l'activation des récepteurs AT₁ intracérébraux est aussi illustrée. Ang : angiotensine; APA : aminopeptidase A; APN: aminopeptidase N; ARA: antagonistes des récepteurs AT₁ de l'angiotensine II; ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine; iECA : inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine; R-AT₁ : récepteur AT₁; r-AT₂ : récepteur AT₂; r-AT₄ : récepteur AT₄; r-Mas : récepteur MAS.

2.3 L'origine cellulaire de la synthèse de l'Ang II cérébrale

L'étude du type cellulaire impliqué dans la synthèse des constituants du RAS cérébral de même que de la localisation de ces derniers à l'intérieur du SNC revêt une importance capitale afin de parvenir à mieux comprendre les nombreux rôles et interactions de ce système. L'accent sera davantage mis sur la relation existante entre ces composants et les astrocytes du cortex.

(i) L'Angiotensinogène

Les astrocytes produisent une grande partie de l'AGT du cerveau dans la plupart des régions incluant le cortex cérébral (Stornetta et coll., 1988; Milsted et coll., 1990; Yang et coll., 1999). L'AGT est aussi retrouvé dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Ito et coll., 1980). Le rat TGR (ASrAOGEN) est un modèle génétique présentant une ablation spécifique de l'AGT synthétisé par les astrocytes. Il fut démontré dans ce modèle, qui présente une diminution de 90 % des niveaux d'AGT cérébral, une régulation à la hausse des récepteurs AT₁ dans les régions à l'intérieur de la BHE (Monti et coll., 2001) de même qu'une réduction de la pression artérielle systémique, le tout vraisemblablement associé à une diminution du taux d'Ang II dans le cerveau (Schinke et coll., 1999). Similairement, chez des patients présentant une maladie associée à la présence d'anticorps anti-AQP4, protéine particulièrement exprimée à l'interface glio-vasculaire, le niveau d'Ang II semble abaissé par la destruction des astrocytes (Matsushita et coll., 2010).

L'AGT constituant un élément clé du système RAS systémique pour la production

d'angiotensine, l'ensemble de ces observations démontrent a priori l'importance des astrocytes dans le fonctionnement du RAS cérébral. La possibilité qu'il y ait synthèse d'AGT par les neurones est, quant à elle, moins claire et serait limitée à quelques structures comme l'OSF, le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (NPV) et le cervelet (Yang et coll., 1999) et serait dans tous les cas, bien moins importante quantitativement que celle effectuée par les astrocytes (Ganong, 1993).

(ii) La rénine

La synthèse de rénine cérébrale est moins bien définie à ce jour que celle de l'AGT. Une des explications existantes est que les taux de rénine dans le cerveau se trouvent bien en deçà des limites de détection des techniques standards (Morimoto et coll., 2002). L'expression de la protéine a été localisée autant dans les neurones que les cellules gliales (Hermann et coll., 1987), observations basées sur des cultures cellulaires. Une faible expression de rénine serait retrouvée dans la plupart des tissus, incluant le cortex cérébral (Morimoto et coll., 2002). En contraste, une forte concentration de rénine semble se trouver en colocalisation avec des populations neuronales dans les régions cérébrales impliquées dans le contrôle des fonctions cardiovasculaires (dont l'OSF et plusieurs parties du bulbe rachidien incluant la formation réticulée, mais excluant le NTS) situées pour la plupart à la limite de la BHE, mais aussi dans plusieurs parties de l'hippocampe (Lavoie et coll., 2004).

(iii) L'enzyme de conversion de l'angiotensine

L'ECA a été retrouvé en forte concentration dans l'OSF et d'autres structures appartenant aux OCV, de même que dans les vaisseaux sanguins. Le cortex cérébral présenterait quant à lui une expression qualifiable de faible en comparaison avec celles retrouvées dans les régions mentionnées ci-haut (Strittmatter et coll., 1984; Paul et coll., 2006). Un deuxième type d'ECA, l'ECA2 est aussi présent dans le cerveau et a pour rôle la dégradation de l'Ang II en Ang (1-7). Cette dernière, avec son action sur le récepteur Mas, présente beaucoup d'effets opposés à ceux de l'Ang II sur le récepteur AT₁. La voie de l'ECA2 apparaît pour l'instant comme une sorte de mécanisme de contrôle du RAS cérébral (Xia et Lazartigues, 2008). L'ECA2 est exprimée dans diverses régions cérébrales, dont le cortex. Son expression est pour l'instant rapportée comme étant neuronale (Doobay et coll., 2007).

(iv) Voies de synthèse alternatives

Les faibles taux d'ECA dans certaines régions du cerveau, dont le cortex cérébral, amènent a priori à conclure à une faible importance du RAS, plus particulièrement de l'Ang II, à ces endroits. Suivant cette prémisse, la production d'AGT ou d'Ang I locale pourrait avoir pour objectif une action de type neurohormonale sur une région distante ou sur les vaisseaux sanguins avoisinants. Toutefois, des enzymes ayant la capacité de court-circuiter la synthèse d'Ang II classique, sont présentes dans le cerveau et pourraient intervenir afin de remplacer la rénine et l'ECA dans ces régions. En effet, la tonine et la cathepsine G peuvent synthétiser l'Ang II directement à partir de l'AGT (Phillips et de Oliveira, 2008), alors que la chymase peut transformer l'Ang I en Ang II

(figure 3).

Dans le cortex, environ 50 % de l'activité de formation d'Ang II serait inhibée par un inhibiteur de l'ECA, le delapril, ce qui porte à croire que la synthèse corticale de l'octapeptide engage d'autres enzymes que celles du RAS classique. Par contre, la même étude rapporte que seulement 8 % de cette activité corticale serait imputable aux chymases (Baltatu et coll., 1997). Toutefois, les résultats obtenus par Baltatu et coll. montrent que l'activité totale de formation d'Ang II dans le cortex correspond à seulement 9 % de celle retrouvée dans la glande pituitaire et 2 % de celle de la glande pinéale. Cela n'est pas surprenant considérant le rôle de ces dernières régions dans la modulation du système cardiovasculaire. Cela suggère toutefois qu'en conditions physiologiques l'Ang II pourrait jouer un rôle moindre dans le cortex en comparaison avec ces régions.

(v) Dégradation de l'Ang II

Les aminopeptidases A et N (APA, APN) qui sont connues pour dégrader l'Ang II en Ang III et IV respectivement (Chauvel et coll., 1994) ont été retrouvées dans les astrocytes périvasculaires du parenchyme cérébral (Alliot et coll., 1999). De plus, les niveaux d'ECA-1 et 2 sont eux aussi abaissés chez les patients présentant une autoimmunité contre l'AQP4 (Matsushita et coll., 2010). Cela suggère que la dégradation de l'Ang II peut être effectuée par les astrocytes.

Enfin, il est important de mentionner l'existence d'une hypothèse voulant qu'il y ait une

ségrégation des composantes du RAS de telle sorte qu'un type cellulaire puisse produire et sécréter l'Ang I (par exemple l'astrocyte), et l'autre (par exemple le neurone), la dégrader en l'Ang II (Phillips et Summers, 1998).

2.4 Récepteur AT₁

L'expression des différents récepteurs de l'Ang II, notamment des récepteurs AT₁ et AT₂ varie significativement entre les différentes régions cérébrales et entre types cellulaires. Il semble évident que ces composantes, associées à des effets souvent opposés, jouent un rôle dans la diversification des effets des métabolites actifs du RAS cérébral et participent à la complexité du système.

(i) Récepteur AT₁ : deux isoformes

Classiquement, deux récepteurs ont été associés avec le large éventail d'effets de l'Ang II sur les différents systèmes du corps humain. Il s'agit des récepteurs AT₁ et AT₂ de l'angiotensine. L'Ang II exerce la majorité de ses actions les plus notoires via son récepteur AT₁. Pour ajouter à la complexité de ce système, deux différents récepteurs AT₁ ont été isolés chez les rongeurs : les récepteurs AT_{1A} et AT_{1B}. Ces derniers présentent une expression différente à travers les différents tissus et sont régulés de manière tout aussi distincte (Kitami et coll., 1992). Basée sur les données obtenues avec des animaux déficients en ces récepteurs, une hypothèse veut que les récepteurs AT_{1A} soient responsables des effets centraux de l'Ang II sur la pression artérielle, alors que les récepteurs AT_{1B}, eux, agiraient sur la réponse de soif (Davisson et coll., 2000). Ceci semble en accord a priori avec les résultats de Kitami et coll. qui montrent une

expression des récepteurs AT_{1B} exclusivement au niveau de la glande pituitaire, alors que les AT_{1A} sont retrouvés dans les autres structures cérébrales (Kitami et coll., 1992). Une autre étude a cependant démontré que le récepteur AT_{1B} est aussi exprimé dans le cortex cingulaire. Le récepteur AT_{1A} est lui aussi exprimé dans ces régions, et ce, en plus grande quantité (Johren et Saavedra, 1996). Toutefois, puisqu'une seule étude amène des preuves de l'existence d'une telle dualité des récepteurs AT₁ chez l'humain (Konishi et coll., 1994), et que ces résultats n'ont jamais été reproduits avec succès (Audoly et coll., 2000), l'importance de ces deux formes de récepteurs chez l'humain demeure spéculative. Une telle ségrégation fonctionnelle des récepteurs retrouvée chez les rongeurs aide néanmoins à mieux expliquer la spécificité du RAS cérébral. Cela a d'autant d'importance sachant que le RAS est un système hautement conservé entre les différentes espèces ayant même probablement une origine très primitive (Salzet et coll., 2001). L'absence de récepteurs AT_{1B} chez l'être humain suggère toutefois que certains récepteurs non classiques de l'Ang ou le récepteur AT₂ puissent prendre en charge les fonctions associées à ce récepteur chez le rongeur.

(ii) Récepteur AT₁ : localisation et type cellulaire

Conformément à la distribution des autres composantes du RAS et tout comme chez les autres espèces étudiées, la plus grande densité de récepteurs AT₁ dans le prosencéphale est retrouvée chez l'humain dans les OCV (OSF, OVLT, etc.) (McKinley et coll., 1987; MacGregor et coll., 1995). Au niveau du cortex, on a rapporté chez le rat une expression d'ARN messager (ARNm) dans le cortex pariétal, frontal et cingulaire (expression faible) de même que dans le cortex piriforme (très forte expression) (Lenkei

et coll., 1995;Lenkei et coll., 1997). L'emplacement rapporté de cette expression est en accord, du moins pour le cortex piriforme, avec les résultats de tests de liaison effectués sur les récepteurs AT₁ (Song et coll., 1992).

Le récepteur AT₁ de l'angiotensine a été retrouvé *in vitro* dans une variété de types cellulaires du cerveau, dont les neurones (Raizada et coll., 1984;Sumners et coll., 1991), les astrocytes (Sumners et coll., 1991;Li et coll., 2005) et la microglie (Rodriguez-Pallares et coll., 2008). Alliot et coll. ont identifié chez la souris, grâce à des marquages immunohistochimiques, la présence de récepteurs AT₁, d'ANG I et II et des enzymes de dégradations APA et APN en périphérie de la plupart des vaisseaux sanguins du parenchyme cérébral qu'ils ont observés. Les cellules identifiées étaient des astrocytes comme il a été confirmé par leur expression de la GFAP. Ces auteurs rapportent aussi avoir rassemblé des résultats suggérant une telle localisation chez le singe de même que chez l'homme (Alliot et coll., 1999). Ces derniers résultats obtenus par microscopie électronique pourraient corroborer ceux de Li et coll. qui ont localisé de fortes concentrations de récepteurs AT₁ dans les astrocytes périvasculaires corticaux (régions énumérées ci-haut) et striataux par immunofluorescence, une technique moins précise pour affirmer une colocalisation dans un espace cellulaire si restreint (Li et coll., 2005).

2.5 Récepteur AT₂

L'expression du récepteur AT₂ semble être plus importante que celle de l'AT₁ tout au long du développement foetal et postnatal tel que démontré chez le rat. Ainsi, plusieurs structures cérébrales présentent une expression élevée transitoire de type AT₂ durant les

stades précoces de développement (Millan et coll., 1991; Tsutsumi et coll., 1993). Chez l'adulte, plusieurs noyaux impliqués dans le contrôle de la pression artérielle dont l'OSF, l'OVLt et le NTS sont dénués de récepteurs AT₂. Une expression importante est à l'opposé retrouvée dans le cortex cérébral (cortex enthorinal, insulaire et cingulaire), le bulbe rachidien, de même que dans plusieurs structures thalamiques (Lenkei et coll., 1997).

Dans le cortex frontal, l'expression d'AT₂ serait exclusivement neuronale, les astrocytes exprimant surtout des récepteurs AT₁ (Li et coll., 2005). Toutefois des résultats obtenus sur des cultures d'astrocytes cancéreux du cortex suggèrent la présence de récepteurs AT₂ dans ces cellules chez l'humain (Jaiswal et coll., 1991).

2.6 Autres composantes du RAS

De nouvelles composantes du RAS cérébral caractérisées récemment doivent maintenant être incluses dans l'équation déjà complexe qui caractérise ce système alors qu'une multitude de découvertes démontrant leur importance émergent. Bien qu'elles ne soient pas étudiées dans les expérimentations rapportées dans ce mémoire, il est important de les mentionner, ne serait-ce que dû à la grandissante reconnaissance de leurs rôles. Celles-ci incluent des métabolites de l'Ang I et II comme l'Ang III, l'Ang IV et l'Ang (1-7) et leurs récepteurs comme le Mas et l'AT₄. Ces composantes demeurent toutefois beaucoup moins caractérisées que celles du RAS classique, et ce, à l'instar de leurs interactions avec le système sanguin et les astrocytes. Ces composantes sont néanmoins présentes dans les régions associées au contrôle du système cardiovasculaire et ont ainsi

vraisemblablement une importance dans ce système (Phillips et de Oliveira, 2008). Toutefois, les rôles des composantes comme celles de l'Ang IV/récepteur AT₄ dans le maintien du CBF ont été soulevés et ces voies pourraient constituer un mécanisme opposé à celui de l'Ang II (Kramar et coll., 1997).

2.7 Fonctions connues du RAS cérébral

Les fonctions du RAS cérébral ont été découvertes au cours des 20 dernières années. Elles seront abordées sommairement afin de situer globalement les connaissances actuelles sur le rôle de ce système. L'Ang II cérébrale peut agir sur diverses voies neuronales dans le SNC notamment via son action sur les récepteurs AT₁ qui entraîne, via la modulation de différents courants et canaux ioniques, des changements dans la fréquence de décharge neuronale. Les fonctions majeures mettant en cause le peptide sont l'augmentation de la prise d'eau et de Na²⁺, la sécrétion de vasopressine, l'augmentation de la pression artérielle et la modulation du baroréflexe. Celles-ci sont en partie sous-tendues par un effet modulateur exercé sur les voies glutamatergiques et noradrénergiques, de même que sur celle de la substance P. La plupart des effets énumérés impliquent l'activation des récepteurs AT₁ de neurones situés dans l'hypothalamus ou le tronc cérébral (Sumners et coll., 2002). Dans ces régions, ce récepteur participe aussi à la synthèse et la relâche de NA (Gelband et coll., 1998).

2.8 RAS et pathologies cérébrales

Tel que mentionné plus tôt, le RAS semble participer à un grand nombre de pathologies cérébrales majeures tel que démontré par l'amélioration des fonctions cérébrales

atteintes grâce à l'utilisation de la pharmacothérapie ciblant les composantes du RAS. De plus, des indications de l'implication du RAS cérébral dans ces maladies émergent. En effet, l'administration d'ARA pouvant traverser la BHE améliore certaines fonctions neuronales dans l'AD (Tsukuda et coll., 2009; Danielyan et coll., 2010), l'AVC (Horiuchi et Mogi, 2011) et l'HA (Kazama et coll., 2004).

Enfin, une preuve plus directe consiste à comparer la supériorité des ARA et inhibiteurs de l'ECA qui traversent la BHE par rapport à ceux qui ne la traversent pas. Une telle preuve fut rapportée concernant les inhibiteurs de l'ECA en ce qui a trait à l'amélioration des symptômes de la démence (Sink et coll., 2009). De plus, la supériorité des ARA sur les inhibiteurs de l'ECA concernant l'amélioration du CBF parenchymateux dans l'HA (Muller et coll., 2012) et de la démence (Li et coll., 2010) a été démontrée. Il est à noter que cette étude controversée de Li et coll. rapporte elle aussi une supériorité des ARA pénétrant la BHE. Ensemble, cela suggère que l'effet délétère de l'Ang II est davantage lié aux récepteurs AT₁ cérébraux qu'à la concentration d'Ang II circulante et que cet effet pourrait être, en partie du moins, lié à l'Ang II d'origine cérébrale. La possibilité que les ARA, en bloquant le récepteur AT₁, laissent place à une réponse de type AT₂ ou à celle d'un autre récepteur n'est néanmoins pas à exclure.

2.9 Ang II et CNV

Il a été démontré chez le rongeur, qu'une perfusion systémique et aiguë à l'Ang II provoquait une baisse de la réponse hyperémique dans le cortex somatosensoriel induite par la stimulation sensorielle (des vibrisses) tel que démontré avec la FLD. Cet effet est

indépendant de l'augmentation de la pression artérielle causée par le peptide. Une altération similaire du CNV est aussi retrouvée lorsque l'Ang II est superfusée directement sur le cortex. Il a de plus été vérifié qu'aux concentrations utilisées, le peptide n'affecte ni l'activité neuronale, ni la réactivité vasculaire (Kazama et coll., 2003; Girouard et coll., 2007). Cela suggère l'implication de cellules d'un autre type. En l'occurrence, la cellule de l'unité neurovasculaire restante est l'astrocyte. Par ailleurs, une première explication proposée par Capone et coll. dans le cas de l'Ang II systémique implique la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par le complexe enzymatique de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase dans le cortex somatosensoriel. De manière intéressante, une tendance à l'augmentation des taux de ROS dans les astrocytes a aussi été retrouvée (Capone et coll., 2011). Sachant que dans ces conditions, l'Ang II n'est pas connue pour traverser la BHE (Kazama et coll., 2003), tout porte à croire que les mécanismes en cause sont différents concernant l'effet délétère induit localement par le peptide.

Lorsque pris en association avec les effets de l'hypertension sur le CNV de même que ceux des ARA sur le rétablissement des fonctions cérébrales présentés dans la sous-section précédente « Défaillance pathologique du CNV », il apparaît que l'Ang II participe grandement à ces dysfonctions, du moins en ce qui a trait à l'hyperémie fonctionnelle.

2.10 Conclusion de section

En résumé, la place fondamentale qu'occupe l'astrocyte dans la synthèse des constituants du RAS cérébral, de même que son expression des récepteurs AT₁ de l'Ang démontrent l'importance de cette cellule pour ce système, dont les fonctions commencent à peine à être comprises. L'Ang II, métabolite actif ayant un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie systémique présentant de nombreux rôles démontrés sur le contrôle du système cardiovasculaire du cerveau, semble être en mesure d'affecter localement le bon fonctionnement du CNV, ce qui pourrait expliquer son rôle délétère dans nombre de pathologies majeures du SNC. Il est donc important de comprendre quelles cellules et quels mécanismes sont impliqués dans ce processus pathologique. L'astrocyte étant une pierre angulaire autant du CNV (voir la section 1) que du RAS cérébral, il constitue selon la logique décrite précédemment le premier lieu où le rôle de l'Ang II dans l'altération du CNV doit être investigué. La réponse calcique astrocytaire servant de second messager à tous les processus d'activations astrocytaires connus menant à l'induction d'une réponse vasculaire, la section suivante est consacrée à la description des connaissances sur les réponses calciques astrocytaires et les effets de l'Ang II sur ces réponses.

3. Ca²⁺ astrocytaire

3.1 Types de réponses calciques

Un certain regain d'intérêt pour les astrocytes a été nourri par la découverte de leur expression d'une variété de récepteurs membranaires, notamment pour les acides aminés excitateurs comme le glutamate (Bowman et Kimelberg, 1984), mais aussi de divers canaux ioniques (MacVicar, 1984). Toutefois, à l'opposé des cellules neuronales, les astrocytes sont très peu électriquement excitables (Kang et coll., 1998). Ceci explique, en partie, pourquoi les techniques traditionnelles d'électrophysiologie se sont révélées peu efficaces pour démontrer l'excitabilité de ces cellules et leur participation à la transmission de signaux dans le SNC (Nedergaard et coll., 2003). Cependant, au début des années 1990, Cornell-Bell et coll. ont apporté une des premières preuves tangibles de la participation active des astrocytes à une telle forme de communication. C'est en visualisant le Ca²⁺ intracellulaire libre des astrocytes, avec l'aide d'un indicateur calcique, qu'ils ont pu observer une réponse au glutamate pouvant se transmettre aux cellules adjacentes. Le mécanisme impliquait notamment la relâche de Ca²⁺ des stocks intracellulaires (Cornell-Bell et coll., 1990). On sait depuis qu'une variété d'autres neurotransmetteurs, de même que les stimulations mécaniques (Dani et Smith, 1995; Parri et coll., 2001) ou optiques (Choi et coll., 2011) peuvent tous induire de telles réponses. Deux grands types d'évènements calciques ont ainsi été rapportés. Le premier souvent qualifié d'oscillation calcique se décrit comme une augmentation répétitive de

la concentration de Ca^{2+} intracellulaire libre à l'intérieur du cytoplasme d'un même astrocyte. Le second, la vague calcique, est un événement calcique qui se propage à l'intérieur de la cellule d'origine, dans quel cas on parle de vague intracellulaire. Alternativement, on parle de vague extracellulaire lorsqu'un tel phénomène se propage aux astrocytes et/ou neurones avoisinants (Boitano et coll., 1992; Nedergaard et coll., 2003; Scemes et Giaume, 2006).

(i) Oscillations calciques

Des oscillations calciques induites, mais aussi spontanées ont été décrites dans les astrocytes. Les oscillations spontanées astrocytaires sont considérées comme indépendantes de l'activité neuronale, car elles se produisent même en présence de neurotoxines diverses qui bloquent cette activité. Cependant, il semble que les neurones assurent une certaine synchronicité de l'activité calcique spontanée astrocytaire (Aguado et coll., 2002). Ces oscillations spontanées ont été rapportées dans une variété de régions cérébrales *in vitro* (Fatatis et Russell, 1992) et *in situ* (Parri et coll., 2001; Nett et coll., 2002). Elles ont par la suite été retrouvées *in vivo* dans des régions incluant le cortex cérébral (Hirase et coll., 2004; Takano et coll., 2007).

En contraste, l'amorce d'une réponse calcique induite nécessite généralement l'activation de récepteurs couplés aux protéines G, puis celle de la phospholipase C (PLC) et la production d'inositol triphosphate (IP_3). Par la suite, l'activation des récepteurs à l' IP_3 (IP_3Rs) enclenche la libération de Ca^{2+} dans le cytoplasme à partir des réserves du réticulum endoplasmique (RE) (Pearce et coll., 1986; Sheppard et coll.,

1997; Golovina et Blaustein, 2000). Ceci entraîne l'initiation de microévénements calciques élémentaires très localisés comme les bouffées de Ca^{2+} qui sont aussi générées de manière spontanée (en anglais : calcium puffs) (Parker et Yao, 1991). Le signal calcique peut par la suite être transmis au reste de la cellule par un processus d'amplification mettant en jeu quatre mécanismes de rétrocontrôle, deux positifs et deux négatifs (Scemes et Giaume, 2006). Les conditions sine qua non à l'obtention d'une oscillation à partir d'une bouffée de Ca^{2+} donnée demeurent nébuleuses. On sait toutefois d'abord qu'un effet coagoniste du Ca^{2+} sur les IP3Rs ayant un effet maximal à une concentration de 500 nM facilite l'activation de tels récepteurs situés à proximité (Bezprozvanny et Ehrlich, 1995). Le deuxième mécanisme de rétrocontrôle positif est la génération supplémentaire d'IP3 par l'activation dépendante du Ca^{2+} de la PLC. De plus, afin d'empêcher une inhibition des IP3Rs par excès de Ca^{2+} , les mitochondries des microdomaines des IP3Rs exercent un pouvoir tampon local. Enfin, divers tampons endogènes de faible affinité pour le Ca^{2+} : les protéines fixatrices de Ca^{2+} interviennent afin de limiter la diffusion de l'ion à l'intérieur d'une même cellule (Scemes et Giaume, 2006).

(ii) Vagues calciques

Lors de leur étude pionnière, Cornell-Bell et coll. ont aussi décrit une propagation se produisant dans certains cas des oscillations calciques vers les cellules adjacentes (Cornell-Bell et coll., 1990). On a d'abord cru que les jonctions communicantes (jonctions de type « gap »), qui relient les astrocytes entre eux dans un même syncytium, étaient entièrement responsables de ces vagues calciques extracellulaires (Boitano et

coll., 1992;Scemes et Spray, 2009). Toutefois, un ensemble de données, dont le blocage de telles vagues par des antagonistes des récepteurs purinergiques et l'observation voulant que la vitesse de ces vagues corresponde à celle de la diffusion de l'ATP a mené à l'élaboration du modèle actuel sur la propagation des vagues de Ca^{2+} dans le cortex (Guthrie et coll., 1999;Koizumi et coll., 2003). Selon ce dernier, la relâche initiale d'ATP par l'astrocyte stimulé est responsable, par la diffusion de la purine depuis cette source d'origine, de l'étendue du phénomène, c'est-à-dire du nombre de cellules engagées dans la propagation d'une vague. Les vagues calciques du striatum, contrairement à celles du cortex qui présentent un mécanisme extracellulaire en accord avec le modèle, semblent toutefois dépendre des jonctions communicantes (Guthrie et coll., 1999). De plus, puisque les récepteurs purinergiques se retrouvent plus concentrés dans les pieds astrocytaires, tout comme le sont les protéines des jonctions communicantes, il apparaît que cette structure cellulaire est particulièrement susceptible de participer à la propagation de signaux intercellulaires comme les vagues calciques (Simard et coll., 2003).

3.2 Ca^{2+} astrocytaire et CNV

La réponse calcique des astrocytes a été identifiée comme un élément fondamental du mécanisme par lequel ces cellules participent à l'hyperémie fonctionnelle, et ce dès la découverte de cette importante fonction astrocytaire (voir la sous-section sur le CNV et les astrocytes). Ainsi, Zonta et coll. ont démontré *in situ* que les antagonistes des mGluR₅, tout en bloquant la réponse calcique dans les pieds astrocytaires, réduisent grandement la vasodilatation induite par la stimulation de neurones afférents, sans

modifier les propriétés des réponses calciques neuronales. De plus, ils ont observé grâce à la FLD et toujours avec les mêmes inhibiteurs, une altération marquée du CNV en réponse à la stimulation sensorielle (des vibrisses) sans que les potentiels évoqués somesthésiques soient affectés (Zonta et coll., 2003a). Ce qui supporte l'hypothèse que cet effet est dû à l'inhibition des mGluR₅ astrocytaires. Toutefois, bien que la présence de tels récepteurs et leur capacité d'engendrer une réponse calcique aient été confirmées *in vivo* et *in situ* par de nombreuses équipes (Wang et coll., 2006; D'Ascenzo et coll., 2007; Ding et coll., 2007; Tanaka et coll., 2013), Sun et coll. ont récemment échoué à obtenir une telle réponse. Ils ont plutôt soutenu une hypothèse voulant l'implication de mécanismes externes aux mGluR dans l'activation calcique astrocytaire ayant également mis en évidence la faible expression, proportionnellement parlant, de l'ARNm des mGluR₅ dans les astrocytes comparativement au niveau retrouvé dans les neurones chez la souris adulte, mais aussi à celle retrouvée chez la jeune souris (Sun et coll., 2013). La forte expression de ce récepteur durant le développement chez le rongeur s'explique par le rôle des mGluR₅ dans ce processus (Romano et coll., 1995). Toutefois, il serait important d'évaluer quelle proportion de l'ARNm mGluR₅ retrouvé dans les astrocytes, qui correspond à 5 % du total de l'ARNm mGluR₅ (Sun et coll., 2013), représente des récepteurs actifs. En effet, Condorelli et coll. ont démontré qu'il n'y a aucune corrélation entre les niveaux d'ARN messenger des mGluR et l'hydrolyse d'inositol phosphate causée par l'acide (±)-1-Aminocyclopentane-*trans*-1,3-dicarboxylique (*t*-ACPD), agoniste des mGluR₁ et mGluR₅ (Condorelli et coll., 1992). De surcroît, l'activation des mGluR₅ astrocytaires engendre une hydrolyse massive d'inositol phosphate malgré leur faible densité et cause une désensibilisation des récepteurs très lente en comparaison

avec ce que l'on retrouve au niveau des mGluR neuronaux (Balazs et coll., 1997). Enfin, aucun mécanisme alternatif à la voie du glutamate-mGluR₅ n'a, à ce jour, été démontré en ce qui a trait au CNV cortical dépendant des astrocytes. Dans l'attente d'une réponse ferme et définitive à cette controverse naissante, il demeure que le rôle du Ca²⁺ astrocytaire en tant que second messenger est bien établi. Les résultats de Girouard et coll. qui démontrent l'importance de la magnitude de la réponse calcique astrocytaire dans la détermination de la polarité de la réponse vasculaire (Girouard et coll., 2010) suggèrent même un rôle beaucoup plus important que celui d'un simple transmetteur de signal. La sous-section suivante introduit les changements calciques observés dans l'astrocyte durant certaines pathologies. Il est à remarquer que ces dernières sont souvent aussi associées à des dysfonctions du CNV. Cela forme de surcroît une indication indirecte supplémentaire de l'importance du Ca²⁺ glial dans ce processus.

3.3 Ca²⁺ astrocytaire et maladies

L'importance de l'homéostasie calcique astrocytaire a été mise en lumière par la découverte d'anomalies diverses prenant place dans différents modèles de pathologies cérébrales. D'abord en ce qui concerne l'AD, dans certains, mais pas tous les modèles murins de la pathologie, la fréquence des oscillations spontanées calciques astrocytaire est augmentée. De plus, les niveaux de Ca²⁺ basaux y sont élevés. Cela est associé soit avec des réponses vasodilatatrices anormales et non soutenues, soit avec des vasodilatations absentes ou diminuées dans le cortex somatosensoriel suite à la stimulation sensorielle (Takano et coll., 2007;Kuchibhotla et coll., 2009). En outre, en examinant le transcriptome astrocytaire de patients atteints de l'AD, Simpson et coll. ont

observé diverses anomalies des gènes de la signalisation calcique, par exemple ceux de différentes CAM-kinases et calmodulines (Simpson et coll., 2011).

Koide et coll. ont aussi observé, dans un modèle d'hémorragie subarachnoïde, que l'amplitude des oscillations calciques spontanées astrocytaire est augmentée, le tout associé avec une vasoconstriction induite lors d'une stimulation des astrocytes. Ils ont mis en cause une suractivation des canaux BK_{Ca} entraînant une large élévation de la concentration potassique ($[K^+]$) dans l'espace périvasculaire ($[K^+]_p$) pour expliquer le changement de polarité de vasodilatation en vasoconstrictions (Koide et coll., 2012), observation compatible avec les résultats de Girouard et coll. (Girouard et coll., 2010).

En somme, diverses dysfonctions affectant les caractéristiques physiologiques des oscillations spontanées ou alternativement les niveaux calciques astrocytaires semblent présentes dans certaines pathologies cérébrales. Celles-ci sont associées à des anomalies du CNV. Il reste toutefois à clarifier lesquelles d'entre elles affectent le système vasculaire cérébral de manière délétère et à quel type de changement de réponse vasculaire cela est associé au niveau de ses différentes structures (c.-à-d. : artères, artérioles, capillaires, veinules).

3.4 Ang II et calcium astrocytaire

L'information disponible sur l'activation des récepteurs de l'Ang par l'Ang II provient majoritairement d'expériences menées sur des cultures cellulaires. Dans une culture mixte obtenue à partir d'un cerveau complet de rat néonatal, Sumners et coll. ont

d'abord observé une activation exclusive du récepteur AT₁ chez l'astrocyte provoquant l'hydrolyse de phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP₂) en IP₃ (Sumners et coll., 1991). Leurs résultats suggèrent une prédominance de récepteurs AT₁ dans les astrocytes, ce qui contraste avec les résultats obtenus sur des cellules humaines par Jaiswal et coll. qui démontrent la présence du récepteur AT₂ (Jaiswal et coll., 1991). Semblablement, dans des cultures cellulaires mixtes et isolées de l'hypothalamus et du tronc cérébral, l'Ang II donne lieu à une réponse calcique dans les astrocytes qui est médiée par les stocks intracellulaires de Ca²⁺ (Wang et coll., 1996; Gebke et coll., 1998). En contraste, Tallant et coll. n'ont pas réussi à obtenir de résultats concordants ni dans l'hypothalamus, ni dans le cortex, mais par contre leurs cultures astrocytaires du cervelet et du tronc cérébral libéraient de l'inositol phosphate (Tallant et Higson, 1997). Toutefois, la même équipe avait déjà démontré une réponse calcique à l'Ang II (100 nM) dans une culture de cellules astrocytaires cancéreuses humaines du cortex (Tallant et coll., 1991). Certaines possibilités évidentes permettant d'expliquer les divergences de ces observations reposent dans la différence d'âge des tissus d'où proviennent les différents isolats (prénatal, postnatal, adulte), dans la condition des cellules (saines, cancéreuses) et bien entendu dans les différences interspèces dans par exemple l'expression des récepteurs (Tallant et Higson, 1997).

3.5 Conclusion de section

En somme, la signalisation calcique astrocytaire occupe une place importante dans le CNV en situation physiologique et son altération participe aux pathologies du SNC. L'Ang II qui altère le CNV est en mesure d'interagir grâce à ses récepteurs avec cette

signalisation. La signalisation calcique astrocytaire apparaît ainsi comme une voie importante à étudier pour la compréhension des pathologies affectant le CNV et pour la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de celles-ci.

4. But du mémoire

4.1 Hypothèse et objectifs

L'astrocyte occupe une place prépondérante dans le CNV. Cette cellule est essentielle à la production de l'Ang II cérébrale et exprime des récepteurs AT₁. Puisqu'il est fort probable que l'Ang II affecte la réponse calcique astrocytaire nous avons émis l'hypothèse qu'elle altère le CNV par ce moyen. Le but des expérimentations présentées dans ce mémoire est de définir le rôle de l'astrocyte dans l'altération du CNV par l'Ang II dans le cortex somatosensoriel. Afin de reproduire *in vivo* ce processus pathologique et de l'étudier, la FLD sera employée. Grâce à cette technique, l'effet de l'Ang II sur la réponse d'augmentation locale du CBF causée par la stimulation des vibrisses (qui active des afférences projetant vers une région spécifique du cortex somatosensoriel) sera vérifiée chez la souris. Un premier objectif visant la vérification de l'implication de la réponse astrocytaire sera réalisé grâce à la FLD. Pour ce faire la stimulation des récepteurs mGluR astrocytaires sera réalisée avec des agonistes mGluR en combinaison avec une toxine neuronale. Cette procédure permet d'induire une élévation du CBF dépendante de la réponse astrocytaire tout en éliminant la plupart des interférences qui pourraient provenir de l'activité synaptique. Par la suite, l'unité « astrocytovasculaire » sera mise en exergue afin d'étudier de manière plus précise les mécanismes en cause. La microscopie multiphoton sur tranches de cerveau se prête particulièrement bien à cette manoeuvre. D'abord la réponse calcique induite par l'activation des mGluR sera

mesurée grâce à l'indicateur calcique Fluo-4 à l'intérieur d'un pied astrocytaire en présence d'Ang II, d'Ang II combinée à un ARA ou du véhicule. Simultanément, la réponse vasculaire de l'artériole parenchymateuse sur laquelle est apposée cette structure astrocytaire sera aussi mesurée. Enfin, des expérimentations *in vitro* sur une culture cellulaire d'astrocytes corticaux isolés permettront de circonscrire davantage cette cellule afin d'y étudier et confirmer les mécanismes proposés. Avec les résultats obtenus et présentés dans ce mémoire, nous devrions être en mesure de mieux comprendre comment l'Ang II module le CNV. De plus, les connaissances sur ce mécanisme cérébral important s'en trouveront grandies. Cela pourrait avoir de surcroît un impact sur la compréhension de nombreuses pathologies où le CNV est altéré et participer à éclairer le choix de la pharmacothérapie à employer pour les traiter.

II. ARTICLE

Titre de l'article : Angiotensin II reverses vascular reactivity polarity and potentiates astrocytic calcium increases

Auteurs : Michaël Boily, Louis-Éric Trudeau, Hélène Girouard

Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Montréal

L'article a été soumis à Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism le 26 mai 2013 et une révision a été soumise en octobre 2013. De l'information sur ce journal scientifique révisé par des pairs est disponible au :

<http://www.nature.com/jcbfm/>

Angiotensin II reverses vascular reactivity polarity and potentiates astrocytic calcium increases

First author's surname and short title: Boily, Angiotensin II and astrocytes in neurovascular coupling

¹Michaël Boily MSc, ¹Louis-Éric Trudeau PhD and ^{1,2}Hélène Girouard PhD

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec,

Canada; Neuroscience Research Group, Faculty of medicine, Université de Montréal, Québec, Montréal, Canada; ²Centre de Recherche de l'Institut de Gériatrie de Montréal

Corresponding author:

Hélène Girouard, PhD

Professor, Department of pharmacology, Faculty of medicine

Université de Montréal, Pavillon Roger-Gaudry, 2900 Édouard-Montpetit, Montréal (Québec) H3T 1J4

Tel: +1 514 343-6111 ext:

Fax: +1 514 343-2291

E-mail:

Sources of funding

This study was supported by the Heart and Stroke Foundation, Fonds de la Recherche en santé du Québec, the Canada Foundation for Innovation and the Canadian Institutes of Health Research. Hélène Girouard was also the holder of a new investigator award from the FRSQ and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC).

1. ABSTRACT (ARTICLE)

Neurovascular coupling (NVC) is impaired by angiotensin II (Ang II), a hormone synthesized and released in the systemic circulation or produced in the brain partly by astrocytes. Astrocytes also possess Ang II AT1 receptors and are involved in the orchestration of NVC. We sought to investigate the involvement of astrocytic Ca^{2+} in the impairment of NVC induced by Ang II. Using laser Doppler flowmetry, we found that Ang II attenuates C57BL/6 mice cerebral blood flow (CBF) response to activation of group I metabotropic glutamate receptors (mGluRI) by 32 % ($p < 0.05$). Similarly, Ang II decreased CBF elevations induced by whisker stimulation (-40 %, $p < 0.05$). On acute brain slices, the polarity of the vascular response induced by a mGluRI agonist in parenchymal arteries was significantly shifted by Ang II toward vasoconstriction. In parallel, Ang II increased resting and maximal astrocytic Ca^{2+} levels to respectively 192 % and 318 % of control levels ($p < 0.05$). Both vascular and maximal Ca^{2+} response alterations induced by Ang II were reversed by the AT1 receptor antagonist candesartan. Our results suggest that Ang II via its AT1 receptor potentiates the astrocytic Ca^{2+} responses to a level that favors vasoconstriction over vasodilation, thus altering CBF increases in response to neuronal activity.

Keywords: Angiotensin II, astrocyte, AT1 receptor, calcium, metabotropic glutamate receptor, neurovascular coupling.

2. INTRODUCTION (ARTICLE)

Activation of neuronal networks in the brain induces subsequent adjustments in the nearby microvasculature diameter. This regulation of cerebral blood flow (CBF) termed neurovascular coupling (NVC) is altered in several pathologies such as hypertension, Alzheimer's disease (AD) and stroke.¹ Impaired NVC may participate in the pathogenesis of these diseases by restricting the delivery of substrates to active brain cells as well as by removing potentially deleterious by-products of cerebral metabolism. Angiotensin (Ang) II, an octapeptide involved in the development of hypertension and neurodegenerative diseases, alters NVC.^{2,3} Ang II is known to be synthesized in the lung and secreted into the blood or produced locally in several organs including the brain. Both circulating and locally superfused Ang II impair NVC.^{3,4} Interestingly, Ang II AT1 receptor blockers (ARB) that can cross the blood-brain barrier (BBB) show beneficial effects on NVC and on neuronal functions in AD,^{5,6} hypertension² and stroke models.⁷ Although many mechanisms have been proposed to explain the effects of circulating Ang II on NVC, the pathways mediating the effects of parenchymal Ang II on NVC remain unknown. However it is known that Ang II at low concentrations does not acutely affect neuronal excitability or smooth muscle cell reactivity,⁴ suggesting that the remaining cell type involved in NVC, namely astrocytes, are probably the first ones to be affected by Ang II originating from brain tissue.

Astrocytes, which participate in the production of intra-cerebral Ang II and possess AT1 receptors, are key elements in the control of NVC. Anatomically, astrocytes surround

most of the arteriolar and capillary abluminal surface with their endfeet and are uniquely positioned between synapses and blood vessels. Functionally, activity-induced Ca^{2+} transients in astrocytes modulate cerebrovascular tone. Indeed, a temporal link between the increase in Ca^{2+} in the astrocyte endfeet and the subsequent vasodilation of neighbouring arterioles has been demonstrated in brain slices.^{8,9} In the cortex, astrocytes perceive neuronal activity by responding to neurotransmitters such as glutamate, which has been shown to activate astrocytic receptors, notably the metabotropic glutamate type 5 receptor (mGluR5). This initiates a second messenger Ca^{2+} cascade implicating inositol triphosphate (IP3) receptors and leading to intracellular Ca^{2+} elevation.¹¹ While the exact nature of the physiological vascular response remains a matter of debate, it has recently been shown that astrocytic Ca^{2+} elevations of strong amplitude cause constriction instead of dilation.⁹ Interestingly, Ang II has been shown to modulate Ca^{2+} levels in astrocytes. In cultured astrocytes from the hypothalamus, circumventricular organs and brainstem, Ang II triggers AT1 receptor-dependent intracellular Ca^{2+} elevations caused by both Ca^{2+} influx and internal Ca^{2+} mobilization.^{10,11} We therefore hypothesized that Ang II impairs NVC through its action on astrocytic intracellular Ca^{2+} mobilization, consequently modifying the arterial vascular response. Using approaches including *in vivo* laser Doppler flowmetry and *in vitro* two-photon microscopy on acute brain slices and astrocyte cultures, we tackle this question from the local vascular network to the isolated cell.

We report here that Ang II elevates resting Ca^{2+} levels and mGluR5 agonist induced Ca^{2+} responses in astrocyte endfeet. This is associated with a switch of the vascular response from dilatation to constriction or an amplification of previous vasoconstriction, an effect

reversed by the ARB candesartan.

3. MATERIALS AND METHOD

1.1 Animal procedures

Experiments were performed *in vivo* and in tissues from wild-type 8-12 weeks old C56BL6 male mice weighing between 22 and 27 g (Charles River, St-Constant, Canada) or for *in vitro* experiments from primary cultures prepared from P0-P1 C56BL6 pups. Animals were fed *ad libitum* and housed in individual cages. All animal procedures were performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care's *Guide to the care and use of experimental animals 2nd Ed.* and with the approval of the *Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux* (CDEA; #10-150) of the Université de Montréal.

1.2 *In vivo* studies

CBF measurement procedures were carried out as described before.⁹ Briefly, mice were anaesthetized with isoflurane and anaesthesia was maintained with urethane (750 mg/kg ip) and chloralose (50 mg/kg ip), a method of anaesthesia that does not affect cerebrovascular reactivity. The depth of anaesthesia was verified by testing corneal reflexes and motor response to tail pinch. The femoral artery was cannulated for recording of arterial pressure and blood sampling for gas measurements. Mice were artificially ventilated (Harvard Apparatus, Montreal, Canada) with an oxygen-nitrogen mixture adjusted to provide an arterial pO₂ of 120-140 mm Hg and rectal temperature was maintained at 37°C using a thermostatically controlled heating device (Harvard

Apparatus, Montreal, Canada). A 2x2 mm craniotomy was practiced and the dura removed, exposing the somatosensory cortex. Artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (37°C; pH7.3-7.4) was continuously superfused over the somatosensory cortex where CBF was monitored using a Doppler laser probe (ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA) connected to a computerized data acquisition system (Powerlab with Labchart Pro; ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA). To study the increase in CBF produced by neural activity, the somatosensory cortex was activated by gently stroking the contralateral whiskers with a cotton-tipped applicator for 60 s. CBF was expressed as percent increase relative to resting level.

1.3 Experimental protocol for *in vivo* studies

The exposed cortex was continuously superfused with aCSF and all drugs were dissolved in this buffer. Whisker stimulations consisted of three repetitions of a one minute length stimulation, with a resting time of two minutes between each stimulation. Perfusions of (\pm)-1-Aminocyclopentane-*trans*-1,3-dicarboxylic acid (*t*-ACPD; 25 μ M; Tocris Bioscience, Bristol, UK) of 5 min length were performed in the presence or absence of the sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX; 3 μ M; topical superfusion; Alomone labs, Israel), employed to block neuronal activity⁴. Responses to whisker stimulations (5 animals/group) or *t*-ACPD (6 animals/group) were compared before and after a 30 min superfusion with Ang II (50 nM) or its vehicle (saline). Animals were randomly and alternatively assigned to each group.

1.4 Brain slice studies

Mice (Charles River, St-Constant, Canada) were euthanized with an overdose of isoflurane and immediately decapitated. Their brains were removed and placed into 4°C aCSF (125 mM NaCl, 3 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 4 mM glucose, and 400 μM L-ascorbic acid) equilibrated at a pH of 7.4 with a 95%O₂/5%CO₂ gas mixture. Coronal slices (175 μM thick) were cut at the level of the somatosensory cortex using a vibratome (VT1000S; Leika, Wetzlar, Germany) and stored in the previous solution at room temperature until loading with fluorescent indicators. Cortical brain slices were incubated at 28°C under constant agitation for 1 hour in oxygenated aCSF containing L-ascorbic acid, the Ca²⁺ indicator Fluo-4 AM (10 μM; Invitrogen, Burlington, Canada), the astrocyte specific marker Sulforhodamine 101 (SR-101; 82 nM; Sigma, Oakville, Canada), Cremophor EL (0.005% (v/v); Sigma, Oakville, Canada), and pluronic acid F-127 (0.025% (w/v); EMD Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA). Under these conditions, Fluo-4-AM preferentially loads into astrocytes as verified with the specific astrocyte marker SR-101. After incubation, slices were transferred in oxygenated aCSF at room temperature.

Before each experiment, a slice was transferred to the imaging chamber, secured with a slice anchor and constantly perfused with 35°C oxygenated (5%CO₂/95%O₂, pH~7.4; oxygen level ~ 35% as measured in the slice chamber) aCSF containing the thromboxane-A₂ receptor agonist, U46619 (Cayman Chemicals, 150 nM; Ann Arbor, MI, USA), for at least 20 minutes preceding the first stimulation. This concentration of U46619 ensures pre-constriction of the vessels to a tone that allows both vasodilation and vasoconstriction, thus mimicking the physiological vascular tone (~20-30% of the

unconstricted baseline diameter).

Imaging was performed with a multiphoton laser scanning upright microscope (BX61WI; Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a Ti:Sapphire laser (MaiTai HP DeepSee; Spectra Physics, Santa Clara, CA, USA) and equipped with a 40x water immersion objective (digital zoom factor of 3.5). Time-lapse images were acquired using the FV10-ASW software (version 3.0; Olympus, Tokyo, Japan) and displayed simultaneously the arteriole diameter/morphology as visualized by infrared differential interference contrast (IR-DIC) imaging, simultaneously with the free intracellular Ca^{2+} in astrocyte endfeet and an astrocyte counterstain as visualized with the fluorophores Fluo-4 AM and SR-101, respectively (supplemental Fig. 3). Both dyes were excited at 800 nm by the Ti:sapphire laser (100-fs pulses, 10 W) laser and fluorescence emission was collected using a 575/150-nm bandpass filter. IR-DIC allowed the evaluation of brain slice integrity through the visualization of dead neurons which was an exclusion criteria.

For every experiment, a descending arteriole branching from a pial artery was selected in the somatosensory cortex layer 2-5. Morphological criteria were used to distinguish between arterioles, venules and capillaries as described earlier.⁹ Only arterioles situated at more than 50 μm (range 50-125 μm) below the cut surface were selected. The low standard deviation of calculated $[\text{Ca}^{2+}]$ suggest that our results were very consistent despite the fact that experiments were performed at different depths. An astrocyte endfoot adjacent to the vessel was then selected at the same focal plane displaying the largest arteriolar lumen diameter and the highest Fluo-4 fluorescence. The images were

processed with Image J software (v.1.45r for Mac OS; The National Institutes of Health, MD, Bethesda, USA) and the internal diameter (lumen) of the vessel was measured adjacently to the selected endfoot on each image as the distance between two points forming a line perpendicular to the lumen. The baseline was measured as the average diameter of 20 successive images preceding a stimulation.

1.5 Experimental protocol for brain slice studies

Perfusions with the vehicle alone (aCSF and U46619 only) or in the presence of *t*-ACPD (0187, 50 μ M; Tocris Bioscience, Bristol, UK) were performed at a speed of 2 mL/min. Stimulations with *t*-ACPD were performed before and after 20 min perfusion with the vehicle or Ang II with or without candesartan (100 nM). Candesartan was added to the medium 5 minutes before Ang II and did not change the resting diameter.

1.6 Endfeet Ca^{2+} quantification

Intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ was estimated in the selected astrocyte endfoot at the end of each experiment as described earlier.⁹ To summarize, ionomycin (407950, 10 μ M; EMD Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA) and 20 mM Ca^{2+} were added to the bath while imaging. The F_{MAX} value was chosen for every experiment as the maximum Fluo-4 fluorescence displayed in a 1.8 x 1.8 μm region of interest (ROI) in the endfoot. Using this value and the experimental parameters, the estimated $[\text{Ca}^{2+}]$ was calculated for each selected endfoot ROI using Maravall's formula as previously described.⁹ Estimations of $[\text{Ca}^{2+}]$ were only performed for the stimulations immediately preceding (*i.e.* after incubation with Ang II) the addition of ionomycin as they were shown to give more

reproducible estimates.

1.7 Astrocyte cultures & imaging

Isolated astrocytes monolayer cultures were prepared as described in detail previously¹² with a few modifications. Cortices of postnatal day P0-P3 wild type mice were used for cell cultures. Most experiments were performed 7-10 days after cell plating. Cells were loaded for 30 min with Fluo-4-AM (8 μ M) diluted in an HEPES buffered solution (10 mM HEPES, 4.2 mM NaHCO₃, 10 mM glucose, 1.18 mM MgSO₄•2H₂O, 1.18 mM KH₂PO₄, 4.69 mM KCl, 118 mM NaCl and 1.29 mM CaCl₂; pH 7.3) containing pluronic acid (0.025% (w/v)), washed twice and perfused with buffer for 20 minutes before the beginning of imaging. Imaging was performed as for brain slices but at room temperature (22-23°C). Perfusion (1 mL/min) and drug dilutions were performed in HEPES buffer. Cells responding to ATP (positive control; 100 nM) were selected with circular ROIs for analysis. The basal fluorescence (F₀) was calculated as the average fluorescence of the 20 images preceding the *t*-ACPD perfusion and results presented as the ratio of fluorescence (F₁) divided by F₀ (F₁/F₀).

1.8 Statistical analysis

All results are presented as mean \pm SD. ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test were performed to compare differences among groups. The appropriate Student's *t*-test was performed for comparison between two-groups. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. To respect the 3 'Rs' of the Canadian Council on Animal care, research and testing studies should be designed to provide a statistically

62

significant result with a minimum number of animals.

4. RESULTS

Ang II reduces CBF increases induced by group I mGluR stimulations

To evaluate the effect of Ang II on NVC in the somatosensory barrel cortex *in vivo*, we used laser Doppler flowmetry. This semi-quantitative technique allows the measurement of CBF changes in response to different stimulations. We evaluated the response to whisker stimulation or *t*-ACPD superfusion response before and after Ang II superfusion over the somatosensory cortex in a cranial window. Ang II did not have any effect on resting CBF. Ang II attenuated the CBF increase to whisker stimulation by 60% ($p < 0.05$, $n = 5/\text{group}$) from $22.5 \pm 2.4\%$ to $9.1 \pm 2.8\%$ (Fig. 1). In order to verify the involvement of the astrocytic group I mGluR pathway in this impairment, we also measured the CBF response to *t*-ACPD (50 μM). First, the importance of this pathway in NVC was verified by testing the CBF response to whisker stimulation in the presence of the mGluR5 antagonist, (2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride (MPEP; supplemental Fig. 2) and showed a 55% inhibition ($p < 0.05$, $n = 3/\text{group}$). Then, experiments with *t*-ACPD were performed in the presence of TTX in order to test the effect of Ang II on CBF responses to group I mGluR activation in the absence of neuronal activity. The effect of Ang II is a little bit stronger in the absence of TTX (supplemental Fig. 1) suggesting a small effect on neuronal activity. Similarly to whisker stimulation, Ang II reduced by 66% the CBF response to *t*-ACPD from $20.4 \pm 1.3\%$ to $7.0 \pm 2.1\%$ ($p < 0.05$, $n = 6/\text{group}$) (Fig. 1).

Ang II fosters vasoconstriction in response to group I mGluR activation

In order to investigate the effects of Ang II at the arteriolar and cellular level, we used two-photon microscopy to image parenchymal arteries from the somatosensory cortex in mouse acute brain slices. First, we performed time control experiments to verify that vascular responses to the mGluR group I agonist, *t*-ACPD (50 μ M), do not vary with time as measured before and after the incubation of 20 min with the vehicle (difference of $0.5 \pm 1.8\%$) (Fig. 2A). Incubation with Ang II (100 nM, 20 min), did not change the resting vascular diameter (Fig. 2D) but significantly reversed the polarity of the responses, inducing a vasoconstrictive response to *t*-ACPD instead of a vasodilation (Fig. 2B) or alternatively enhanced previously observed vasoconstrictions ($-17.2 \pm 4.4\%$ change in luminal diameter, $p < 0.05$) (Fig. 2C). Ang II had the same effects on vascular responses to glutamate in the presence or absence of TTX (supplemental Fig. 1). The ARB candesartan prevented the effect of Ang II on the vascular response ($p < 0.05$; $n = 3-4$ /group). Vascular responses to *t*-ACPD in the presence of candesartan and Ang II have the same profile as in the control experiments.

Ang II increases basal and *t*-ACPD-induced $[Ca^{2+}]$ rise in astrocyte endfeet

The stimulation of group I mGluR causes a Ca^{2+} increase in astrocyte endfeet and serves as a second messenger that drives astrocytic control over the microvasculature.⁹ We thus investigated whether the effect of Ang II on NVC involves the mGluR induced Ca^{2+} response. To do so we simultaneously imaged the Ca^{2+} level in an astrocytic endfoot abutting an arteriole (Fig. 3) as well as the arteriole's lumen diameter (Fig. 4). Intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]$) was evaluated after incubation of the slices with

Ang II or the vehicle for 20 min. In each group, $[Ca^{2+}]$ was evaluated before (resting concentration) and during the perfusion with *t*-ACPD (50 μ M). After incubation with Ang II, resting $[Ca^{2+}]$ in the astrocytic endfeet was about twice the level found in the control experiments with the vehicle (aCSF) (Fig. 3A) ($p < 0.05$; $n = 4/\text{group}$). Ang II significantly increased the amplitude of spontaneous $[Ca^{2+}]$ oscillations (Fig. 3D and E; $p < 0.05$, $n = 4/\text{group}$) expressed as the coefficient of variation. The maximal $[Ca^{2+}]$ reached during the *t*-ACPD perfusion was also 3 times greater after the incubation with Ang II ($p < 0.05$; $n = 4/\text{group}$). The addition of candesartan prevented the Ang II-dependent maximal $[Ca^{2+}]$ increase to a level comparable with the vehicle (Ctrl) ($p < 0.05$; $n = 4/\text{group}$). When observing the average Ca^{2+} level trace of time-lapse experiments, responses after Ang II incubation appeared to be much prolonged compared to the vehicle group (Fig. 3B). Compatible with this observation, the area under the curve (AUC) in the Ang II group was greatly increased, a phenomenon also reversed by candesartan (Fig. 3C; $p < 0.001$; $n = 4/\text{group}$).

The vascular response polarity changes caused by Ang II are associated with larger $[Ca^{2+}]$ increases in astrocytic endfeet

When imaging simultaneously the vascular and Ca^{2+} responses to *t*-ACPD in the nearby astrocyte endfeet, it appeared clearly that the higher magnitude of Ca^{2+} response found with Ang II was associated with the switch of vascular response polarity induced by the peptide. While vehicle treatment failed to change the polarity of the response of a vessel that first responded by a vasodilation associated with a moderate Ca^{2+} increase in the astrocyte endfoot (Fig. 4A), for vessels exposed to Ang II, the vasodilation previously

achieved was converted to a vasoconstriction associated with a much stronger Ca^{2+} response in astrocyte endfeet (Fig. 4B).

Responses to *t*-ACPD are potentiated by Ang II in isolated astrocytes

We tested the effects of Ang II on the Ca^{2+} responses to *t*-ACPD in isolated cultured astrocyte. As in brain slices, the amplitude of the Ca^{2+} response to *t*-ACPD was greater after incubation with Ang II (Fig. 5) compared with its vehicle (Hepes buffer) ($p < 0.01$; $n = 80$ cells/group).

Ang II inhibits spontaneous activity in cultured astrocytes

Astrocytes exhibit spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]$ oscillations and such activity was present in $56 \pm 6\%$ of analyzed cells *in vitro*. While we didn't observe a rapid transient Ca^{2+} increase induced by Ang II as found with *t*-ACPD or ATP, the spontaneous Ca^{2+} activity was inhibited in a large portion of the cells following perfusion with the octapeptide (Fig. 6A; $p < 0.05$, 80 cells). The spontaneous activity reappeared as Ang II was washed out from the perfusion bath and the frequency or amplitude of these Ca^{2+} oscillations were not different from those previously observed (Fig. 6D). Astrocytes responding this way to Ang II (Fig. 6B) were still responsive to ATP and this was used as a viability criterion for selecting cells. Cells presenting spontaneous activity during vehicle, but not Ang II perfusion as visualized with Fluo-4 fluorescence, were numerous (Fig. 6C).

5. DISCUSSION (ARTICLE)

In this study, we provide evidence that: 1) Ang II increases resting cytosolic $[Ca^{2+}]$ and potentiates the astrocytic Ca^{2+} increase in response to activation of mGluRI; 2) This effect is accompanied by a strong constriction in brain slices or a decrease in CBF elevation induced in response to mGluRI activation; 3) Both effects of Ang II on vascular and astrocytic Ca^{2+} responses following mGluRI stimulation were found to be dependent on the AT1 receptor.

Ang II alters NVC through the group I mGluR pathway

To our knowledge, these findings represent the first indication that Ang II could impair NVC by affecting the modulation of arteriolar tone by astrocytes. Indeed, at a concentration that does not directly elicit a vasoconstriction ($\leq 100 \mu M$), Ang II attenuates the CBF increase *in vivo* and fosters vasoconstriction over vasodilation *in vitro* in response to mGluRI activation. These results support a growing body of evidence that Ang II is detrimental to NVC.

Classically, Ang II has been considered a circulating hormone but we now know that it can be produced in many tissues including the brain. *In vivo*, intravenous injection or direct application of Ang II over the somatosensory cortex alters the CBF increase induced by whisker stimulation thus mimicking the effects of circulating and tissular Ang II, respectively.^{3,4} The experimental conditions of the present study correspond to a tissular effect of Ang II. This aspect is of considerable importance since brain

dysfunctions associated with age and neurodegenerative diseases are improved with ARBs that cross the BBB¹³ suggesting a role of tissular Ang II in these pathologies. The coupling between neuronal activity and the ensuing vascular response is crucial for the maintenance of brain homeostasis and impairment of this mechanism can thus increase brain vulnerability to stroke and neurodegenerative diseases. It is therefore crucial to understand how tissular Ang II alters NVC.

Ang II potentiates the Ca²⁺ response to astrocytic glutamate receptor activation.

mGluR group I receptor stimulation is known to activate Ca²⁺ signalling in astrocytes, which in turn controls and modulates the vascular response. In the present study, Ang II shifts the polarity of the vascular response to *t*-ACPD toward a more constrictive response in cortical parenchymal arterioles. In previous studies, astrocytic Ca²⁺ elevations have resulted in vasodilation as well as vasoconstriction.^{9,14,15} Four mechanisms have been proposed to explain this controversy. Vasoconstriction had been explained by a lack of tone or precontraction,¹⁶ a change in the level of pO₂,¹⁴ high concentrations of nitric oxide (NO)¹⁵ and levels of Ca²⁺ increases and the ensuing Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channel activation.⁹ In the present study, arteries were precontracted and the level of pO₂ constant. We examined whether Ang II potentiates Ca²⁺ responses to mGluR activation to a level that had been associated with constriction.⁹ Indeed, it was shown that when higher magnitude of Ca²⁺ transients occur in astrocyte endfeet, the polarity of induced vascular responses shifts towards vasoconstriction independently of the mean by which [Ca²⁺] is elevated.⁹ In the presence of Ang II, [Ca²⁺] following *t*-ACPD administration reached 730 nM which is significantly higher than the turning

point concentration of cytosolic Ca^{2+} of about 500 nM found by Girouard *et al.*¹⁹

Candidate pathways that may be involved in the astrocytic Ca^{2+} -induced vasoconstriction are BK channels,⁹ COX-1/PGE2¹⁷ or the CYP hydroxylase/20-HETE pathway.¹⁸ There is also a possibility that elevations in astrocytic Ca^{2+} lead to the formation of NO. Indeed, Ca^{2+} /calmodulin increases NO synthase activity and this enzyme had been observed in astrocytes.¹⁹ In acute mammalian retina, high doses of the NO donor SNAP (100 μM) blocks light-evoked vasodilations or transforms vasodilations into vasoconstrictions.¹⁵ The capacity of NO to mobilize astrocytic Ca^{2+} and to increase BK channel opening probability may explain how NO could transform vasodilation into vasoconstriction¹⁵ and support the idea of a modulating role of NO in NVC. However, additional experiments will be necessary to determine whether NO produced in astrocytes is involved in NVC and in Ang II-induced alteration of NVC.

The involvement of mGluRI receptors in astrocytic Ca^{2+} increases induced by glutamate in adult rodents had been challenged recently.²⁰ Although we can conclude from that study that astrocytic Ca^{2+} increases following mGluR stimulation arises from an interaction between post-synaptic signalling and astrocytes, we consider that this idea has to be further explored. Indeed, Condorelli *et al.*²¹ demonstrated that there is no correlation between levels of mGluR mRNA and stimulation of polyphosphoinositide hydrolysis by the specific mGluRI agonist, *t*-ACPD, suggesting that the level of active receptors should be evaluated instead of the absolute quantity as done by Sun *et al.*²³ In addition, Sun *et al.*²⁰ could not reproduce Ca^{2+} increases in adult mice observed by several groups including theirs.^{22,23} Finally, in NVC, the activation of mGluRI mostly involve astrocytes since neither whiskers-evoked potential nor vascular reactivity of

isolated vessels are influenced by class I mGluR agonists or antagonists.^{24,25}

Ang II alters cytosolic resting Ca^{2+} concentration

We reported that Ang II increases basal level of Ca^{2+} in the astrocytic endfeet as well as the amplitude of spontaneous Ca^{2+} oscillations. Gebke *et al.*¹⁰ have observed a rapid increase and decrease of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (9%), a rapid increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ followed by a slow decrease at elevated plateau of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (87%) or an increased in spontaneous Ca^{2+} oscillations (4%) caused by Ang II in astrocytes isolated from the circumventricular organs¹⁰. In the present study, all cortical astrocytes in brain slices showed an increased amplitude of spontaneous Ca^{2+} oscillations in the presence of Ang II. We also found that Ang II inhibits spontaneous rhythmic Ca^{2+} oscillations in cultured astrocytes. Spontaneous Ca^{2+} elevations in astrocytes have already been widely reported *in vitro*²⁶ as well as *in situ* and have been shown to disappear following brain damage.²⁷ Evidence of *in vivo* spontaneous transient has also been reported.²⁸ Furthermore, a large-scale synchronized spontaneous Ca^{2+} elevation pattern among astrocyte has been described and correlates with CBF changes at the capillary level.²⁹ The discrepancy between the effect of Ang II on resting Ca^{2+} levels obtained in our cultured astrocytes compared to the effect obtained in brain slices or in astrocytes in culture from other studies^{10,11} could be explained by a possible interaction with other cell types. Indeed, our cell culture was composed of >90% astrocytes while, in the other studies, astrocytes represented about 50% of cells. In pure astrocyte cultures, spontaneous Ca^{2+} waves depend mostly on ATP and its receptors³⁰ while, in the presence of neurons, spontaneous glutamate release from both neurons and astrocytes may become predominant. Indeed, Ang II is known to

inhibit P2X1 receptor dependent Ca^{2+} waves in vascular smooth muscle cells,³¹ a receptor also present in astrocytes³² and the present study shows an amplification of the mGluR pathway in the presence of Ang II.

The AT1 receptor is responsible for Ang II effects on astrocytic Ca^{2+} levels and vascular responses

Ang II potentiates the Ca^{2+} increase induced by *t*-ACPD, an effect reversed by an ARB, candesartan. This result is in accordance with the presence of AT1 receptors in mouse astrocytes. As in a variety of other tissues, the AT1 receptor IP_3 -dependent release of Ca^{2+} has been described in brain cells. However, in isolated astrocytes from the rat cortex, Ang II has no effect on the production of IP_3 .³³ Ang II at 100 nM can also stimulate the production of reactive oxygen species (ROS) mainly through the activation of AT1 receptors and NADPH oxidase.³⁴ Interestingly, it is known that systemic injections of Ang II alter NVC through type 2 NADPH oxidase (NOX2)-dependent ROS/peroxynitrite production in the somatosensory cortex.^{2,3} In mice cerebral cortex, NOX-2 and AT1 receptors are both localized in endothelial cells and the adventitia. Colocalization of NOX2 and AT1 receptors had not been detected in other cell types of this region² and remains to be established. Most of ROS possess a very short half-life limiting their diffusion to neighbouring cells. However, peroxynitrite possesses a half-life of 1.9 sec at pH 7,⁴³⁵ which leaves sufficient time for peroxynitrite to diffuse to perivascular astrocytes. It is thus possible that brain Ang II modulates astrocytic Ca^{2+} levels through peroxynitrite derived from NOX2 of the adventitia.

ROS can induce IP_3 -dependent Ca^{2+} transients in astrocytes.³⁶ However, whether locally

produced Ang II affects NVC through one of these mechanisms remains to be verified. In accordance with both possibilities, higher $[IP_3]$ increases the probability of opening of the IP_3 receptor and allows higher $[Ca^{2+}]$ at these sites. Thus, it is thought to promote the coordination of the global release of Ca^{2+} from internal stores. In sum, it appears that Ang II induces changes in key elements that control the generation of Ca^{2+} transients, promoting high magnitude Ca^{2+} responses to mGluRI stimulation in astrocytes. This in turn, tilts the balance between vasodilatory and vasoconstrictive signals in favour of the latter.

Astrocytes are central in the Ang II effects on NVC

Each neurovascular unit comprises neurons, astrocytes and vascular cells. There is indirect evidence that astrocytes are involved in Ang II-induced NVC impairment. The acute effects of Ang II on functional hyperemia are not significantly associated with decreased neuronal activity as Ang II administration is not accompanied by attenuation of field potentials evoked by whisker stimulation.⁴ In brain slices, Ang II fosters vasoconstriction over vasodilation, even in the presence of the neuronal activity blocker, TTX. Thus, the very similar response obtained after blocking neurotransmission with TTX during our experiments support the involvement of non-neuronal cells in the acute effect of Ang II on NVC. In addition, smooth muscle cells do not seem to be involved in the Ang II effects on NVC since intravenous injection or topical superfusion of Ang II does not affect the vascular reactivity to the NO donor S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamine (SNAP) or adenosine³⁷. It should be noted here that although Ang II attenuates endothelium-dependent vasodilatation,³⁷ given the mechanism as presently

understood, there is no participation of the endothelium in the coupling of vascular tone in response to neuronal activation. These results suggest that astrocytes play a central role in the Ang II effects on NVC.

Does Ang II effects on astrocytes correspond to a pathological situation?

Ang II is a hormone that exerts many physiological functions but that can also have pathological effects at higher concentrations. Indeed, Ang II-associated pathways have been involved in the pathogenesis of various neurodegenerative diseases such as Parkinson's, AD and multiple sclerosis. In addition, exacerbated astrocytic Ca^{2+} increases in response to mGluR5 activation have also been observed in the presence of beta amyloid³⁸ and of immunoglobulin G from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis³⁹ as well as in the hSOD (human superoxide dismutase)1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.⁴⁰ Overall, these data suggest that Ang II may participate in the pathogenesis of neurodegenerative diseases by inducing aberrant astrocyte Ca^{2+} signalling.

6. CONCLUSION (ARTICLE)

We demonstrated that Ang II affects the astrocytovascular response to the mGluR agonist *t*-ACPD in the somatosensory cortex *in vivo* as well as at the arteriolar level *in situ*. This was associated with a potentiation of the Ca^{2+} increase in the nearby astrocyte endfeet. We also demonstrated this effect of Ang II on isolated astrocytes *in vitro* and showed an inhibitory effect of the peptide on spontaneous Ca^{2+} transients in these cells. Taken together, this suggests that the strength of astrocytic Ca^{2+} responses play a role in the Ang II impairment of NVC. Future treatments regulating the aberrant Ca^{2+} response in astrocytes or its consequences, for example the high increase of extracellular K^{+} levels and the subsequent transformation of vasodilation into constrictions,¹² might help improve NVC in disease involving increased production of Ang II.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge Marie-Josée Bourque, Department of pharmacology, Université de Montréal, for cell culture preparation.

Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

7. REFERENCES

- 1 Girouard H, Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol* 2006; 100(1): 328–35.
- 2 Kazama K, Anrather J, Zhou P, Girouard H, Frys K, Milner TA et al. Angiotensin II impairs neurovascular coupling in neocortex through NADPH oxidase-derived radicals. *Circ Res* 2004; 95(10): 1019–26.
- 3 Girouard H, Park L, Anrather J, Zhou P, Iadecola C. Cerebrovascular nitrosative stress mediates neurovascular and endothelial dysfunction induced by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(2): 303–9.
- 4 Kazama K, Wang G, Frys K, Anrather J, Iadecola C. Angiotensin II attenuates functional hyperemia in the mouse somatosensory cortex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(5): H1890–9.
- 5 Danielyan L, Klein R, Hanson LR, Buadze M, Schwab M, Gleiter CH et al. Protective effects of intranasal losartan in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Rejuvenation Res* 2010; 13(2–3): 195–201.
- 6 Tsukuda K, Mogi M, Iwanami J, Min LJ, Sakata A, Jing F et al. Cognitive deficit in amyloid-beta-injected mice was improved by pretreatment with a low dose of telmisartan partly because of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Hypertension* 2009; 54(4): 782–7.
- 7 Horiuchi M, Mogi M. Role of angiotensin II receptor subtype activation in cognitive function and ischaemic brain damage. *Br J Pharmacol* 2011; 163(6): 1122–30.
- 8 Straub SV, Bonev AD, Wilkerson MK, Nelson MT. Dynamic inositol trisphosphate-mediated calcium signals within astrocytic endfeet underlie vasodilation of cerebral arterioles. *J Gen Physiol* 2006; 128(6): 659–69.
- 9 Girouard H, Bonev AD, Hannah RM, Meredith A, Aldrich RW, Nelson MT. Astrocytic endfoot Ca²⁺ and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(8): 3811–6.
- 10 Gebke E, Müller AR, Jurzak M, Gerstberger R. Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience* 1998; 85(2): 509–20.
- 11 Wang D, Martens JR, Posner P, Sumners C, Gelband CH. Angiotensin II regulation of intracellular calcium in astroglia cultured from rat hypothalamus and brainstem. *J Neurochem* 1996; 67(3): 996–1004.
- 12 Fasano C, Thibault D, Trudeau LE. Culture of postnatal mesencephalic dopamine neurons on an astrocyte monolayer. *Curr Protoc Neurosci* 2008; 44: 3.21.1–

3.21.19.

- 13 Saavedra JM. Angiotensin II AT(1) receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. *Clin Sci (Lond)* 2012; 123(10): 567–90.
- 14 Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis–Davies GC, MacVicar BA. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 2008; 456(7223): 745–9.
- 15 Metea MR, Newman EA. Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J Neurosci* 2006; 26(11): 2862–70.
- 16 Blanco VM, Stern JE, Filosa JA. Tone–dependent vascular responses to astrocyte–derived signals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294(6): H2855–63.
- 17 Dabertrand F, Hannah RM, Pearson JM, Hill–Eubanks DC, Brayden JE, Nelson MT. Prostaglandin E2, a postulated astrocyte–derived neurovascular coupling agent, constricts rather than dilates parenchymal arterioles. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; 33(4): 479–82.
- 18 Imig JD, Simpkins AN, Renic M, Harder DR. Cytochrome P450 eicosanoids and cerebral vascular function. *Expert Rev Mol Med* 2011; 13: e7.
- 19 Garcia A. Regulation of the nitric oxide/cyclic GMP system in astroglial cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1997; 19 Suppl A: 23–4.
- 20 Sun W, McConnell E, Pare JF, Xu Q, Chen M, Peng W et al. Glutamate–dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. *Science* 2013; 339(6116): 197–200.
- 21 Condorelli DF, Dell'Albani P, Amico C, Casabona G, Genazzani AA, Sortino MA et al. Development profile of metabotropic glutamate receptor mRNA in rat brain. *Mol Pharmacol* 1992; 41(4): 660–4.
- 22 Wang X, Lou N, Xu Q, Tian GF, Peng WG, Han X et al. Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat Neurosci* 2006; 9(6): 816–23.
- 23 Tanaka M, Shih PY, Gomi H, Yoshida T, Nakai J, Ando R et al. Astrocytic Ca²⁺ signals are required for the functional integrity of tripartite synapses. *Mol Brain* 2013; 6: 6.
- 24 Ding S, Fellin T, Zhu Y, Lee SY, Auberson YP, Meaney DF, Coulter DA, Carmignoto G, Haydon PG. Enhanced astrocytic Ca²⁺ signals contribute to neuronal excitotoxicity after status epilepticus. *J Neurosci* 2007; 27(40): 10674–84.
- 25 Takayasu M, Dacey RG Jr. Effects of inhibitory and excitatory amino acid neurotransmitters on isolated cerebral parenchymal arterioles. *Brain Res* 1989; 482(2): 393–6.
- 26 Cornell–Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long–range glial signaling. *Science* 1990; 247(4941): 470–3.

- 27 Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, Soriano E. Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J Neurosci* 2002; 22(21): 9430–44.
- 28 Hirase H, Qian L, Bartho P, Buzsaki G. Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biol* 2004; 2(4): E96.
- 29 Kuga N, Sasaki T, Takahara Y, Matsuki N, Ikegaya Y. Large-scale calcium waves traveling through astrocytic networks in vivo. *J Neurosci* 2011; 31(7): 2607–14.
- 30 Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 1999; 19(2): 520–8.
- 31 Zhao X, Cook AK, Field M, Edwards B, Zhang S, Zhang Z et al. Impaired Ca²⁺ signaling attenuates P2X receptor-mediated vasoconstriction of afferent arterioles in angiotensin II hypertension. *Hypertension* 2005; 46(3): 562–8.
- 32 Lalo U, Pankratov Y, Wichert SP, Rossner MJ, North RA, Kirchhoff F et al. P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 2008; 28(21): 5473–80.
- 33 Tallant EA, Higson JT. Angiotensin II activates distinct signal transduction pathways in astrocytes isolated from neonatal rat brain. *Glia* 1997; 19(4): 333–42.
- 34 Liu G, Hosomi N, Hitomi H, Pelisch N, Fu H, Masugata H et al. Angiotensin II induces human astrocyte senescence through reactive oxygen species production. *Hypertens Res* 2011; 34(4): 479–83.
- 35 Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(4): 1620–4.
- 36 Hong JH, Moon SJ, Byun HM, Kim MS, Jo H, Bae YS et al. Critical role of phospholipase C γ 1 in the generation of H₂O₂-evoked [Ca²⁺]_i oscillations in cultured rat cortical astrocytes. *J Biol Chem* 2006; 281(19): 13057–67.
- 37 Girouard H, Park L, Anrather J, Zhou P, Iadecola C. Angiotensin II attenuates endothelium-dependent responses in the cerebral microcirculation through nox-2-derived radicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(4): 826–32.
- 38 Lim D, Iyer A, Ronco V, Grolla AA, Canonico PL, Aronica E et al. Amyloid beta deregulates astroglial mGluR5-mediated calcium signaling via calcineurin and Nf- κ B. *Glia*; e-pub ahead of print 25 April 2013; doi:10.1002/glia.22502.
- 39 Milosevic M, Stenovec M, Kreft M, Petrusic V, Stevic Z, Trkov S et al. Immunoglobulins G from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis affects cytosolic Ca homeostasis in cultured rat astrocytes. *Cell Calcium*; e-pub ahead of print 24 April 2013; doi:10.1016/j.ceca.2013.03.005.
- 40 Martorana F, Brambilla L, Valori CF, Bergamaschi C, Roncoroni C, Aronica E et al.

The BH4 domain of Bcl-X(L) rescues astrocyte degeneration in amyotrophic lateral sclerosis by modulating intracellular calcium signals. *Hum Mol Genet* 2012; 21(4): 826-40.

8. TITLES AND LEGENDS TO FIGURES

Figure 4. (article figure 1) Ang II diminishes the CBF increase in the somatosensory cortex independently of neuronal activity. Thirty min perfusion with Ang II (50 μ M) diminished the whisker stimulation induced CBF increases by about 40 % (* p <0.05). Ang II in the presence of TTX (3 μ M) also diminished *t*-ACPD (25 μ M) induced CBF increases (* p <0.05).

Figure 5. (article figure 2) Ang II converts vasodilations into vasoconstrictions of somatosensory cortex parenchymal arteries in response to *t*-ACPD in acute brain slices. The resting state is represented (left part of each panel) as well as the maximum vascular response to *t*-ACPD (50 μ M) perfusion (right part of each panel). The outer part of the smooth muscle cells is outlined by green dashed lines and the lumen by red lines. For each vessel, stimulations with *t*-ACPD were performed before and after the incubation with drugs. **A**, Resting state and response to *t*-ACPD before and after incubation (20 min) with the vehicle (aCSF) and time-course trace of the luminal diameter (right side) **B**, The vasodilation observed before in this example is converted into a vasoconstriction after a 20 min incubation with Ang II. **C**, Difference in the vascular responses to *t*-ACPD before and after the incubation with the vehicle, Ang II and candesartan (* p <0.05 from control; # p <0.05 from Ang II). **D**, Percentage of change in resting diameter during the 20 minutes of incubation in the presence of the vehicle, Ang II or Ang II with candesartan.

Figure 6. (article figure 3) Ang II increases resting $[Ca^{2+}]$ and Ca^{2+} elevations in

response to *t*-ACPD in astrocytic endfeet from brain slices. $[Ca^{2+}]$ were estimated from the Fluo-4 signal and calculated using Maravall's method. **A**, Estimated $[Ca^{2+}]$ at resting state and during the response to *t*-ACPD in astrocyte endfeet. **B**, Average of the estimated Ca^{2+} levels of all experiments for each time point in response to *t*-ACPD suggesting a potentiated response in the Ang II group as compared with the CTRL group. SD is shown by the lighter tone shade surrounding each curve. **C**, Area under the curve (AUC) of the Ca^{2+} increase in response to *t*-ACPD. (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ from control; # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ from Ang II). **D**, Traces of averaged resting $[Ca^{2+}]$ acquired in the presence of the vehicle (Ctrl) or Ang II in cortical astrocytes. **E** Percentages of the coefficient of variation of spontaneous Ca^{2+} oscillations in the presence of the vehicle (Ctrl) or Ang II in cortical astrocytes (* $p < 0.05$).

Figure 7. (article figure 4) Ang II amplifies astrocytic Ca^{2+} increases in astrocytes endfeet and converts dilation into constriction in response to *t*-ACPD in brain slices. Example of parenchymal arteries change of diameter and astrocyte endfoot Ca^{2+} response to *t*-ACPD (50 μ M) perfusion in acute brain slices after incubation with Ang II or its vehicle (Ctrl). Images of parenchymal arteries obtained with IR-DIC imaging (top part of the panels) as well as the estimation of $[Ca^{2+}]$ (based on Fluo-4 images and the adapted Maravall's method) in an astrocyte endfeet illustrated using pseudocolors (bottom part of the panels) are shown (the pseudocolors legend unit correspond to nM of Ca^{2+}). The approximate location of the astrocyte endfeet preselected before the experiment and for which a $[Ca^{2+}]$ estimation was done is also shown (dashed white line).

Figure 8. (article figure 5) Ang II potentiates the Ca^{2+} response to *t*-ACPD in a mouse

cortical isolated astrocytes culture. **A**) The response to *t*-ACPD (100 μ M) is represented as fluo-4 fluorescence ratio on average resting fluorescence (F1/F0) and was significantly greater in cultured astrocytes previously incubated with Ang II (100 nM) as compared with those incubated with the vehicle (** $p < 0.01$). **B**) Traces of averaged F1/F0 acquired before and during *t*-ACPD perfusion in the presence (Ang II) or absence (vehicle) of Ang II.

Figure 9. (article figure 6) Ang II inhibits spontaneous intracellular Ca^{2+} activity in an astrocyte culture. **A**, An important percentage of cultured astrocytes presented spontaneous and rhythmic intracellular Ca^{2+} increases. Perfusion of Ang II (300 nM) inhibited this activity in the majority of them. This effect was reversible after a wash with the vehicle (* $p < 0.05$ from Ang II). **B**, A trace of the fluo-4 fluorescence ratio relative to resting level (F1/F0) is shown for 12 responding cells showing an Ang II induced inhibition of spontaneous activity. The Ca^{2+} activity inhibition was clearly reversible. Cell viability was verified at the end of experiments with an ATP perfusion. **C**, Some cells did not seem to be affected by Ang II (see cell marked as #1) as their spontaneous Ca^{2+} activity remained similar as illustrated here by the addition of all images obtained during perfusion with the vehicle (8min) compared with those obtained during the Ang II perfusion (8min). Cells labelled with a red asterisk as well as cell labelled as #15 are examples of cells presenting an inhibited activity. **D**, The amplitude of Ca^{2+} transients in cells presenting spontaneous activity during the vehicle perfusion and after the washout of Ang II was comparable.

9. FIGURES (ARTICLE)

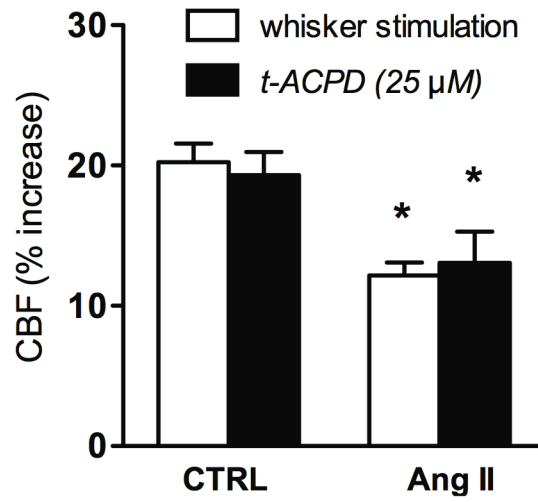


Figure 4. (Figure 1 ARTICLE)

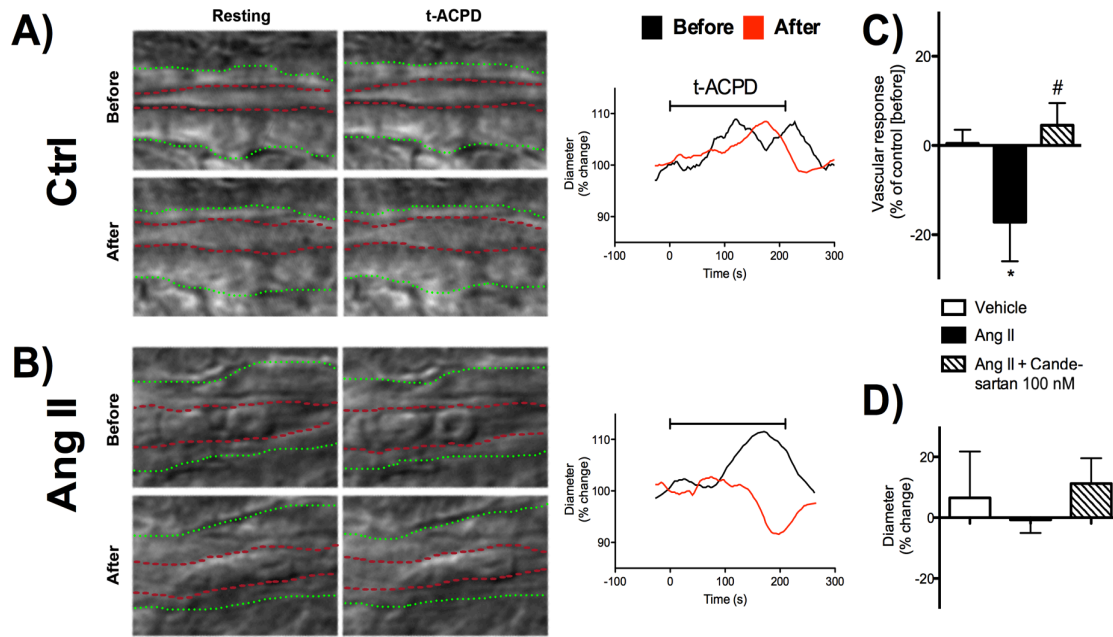


Figure 5. (Figure 2 ARTICLE)

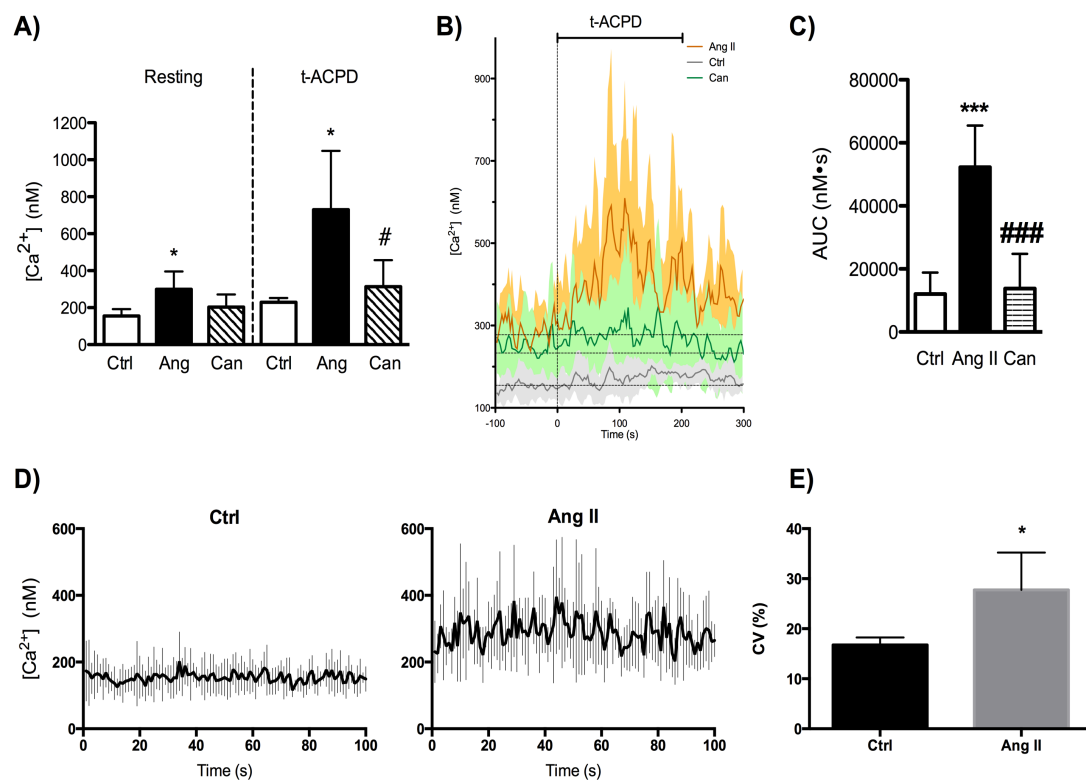


Figure 6. (Figure 3 ARTICLE)

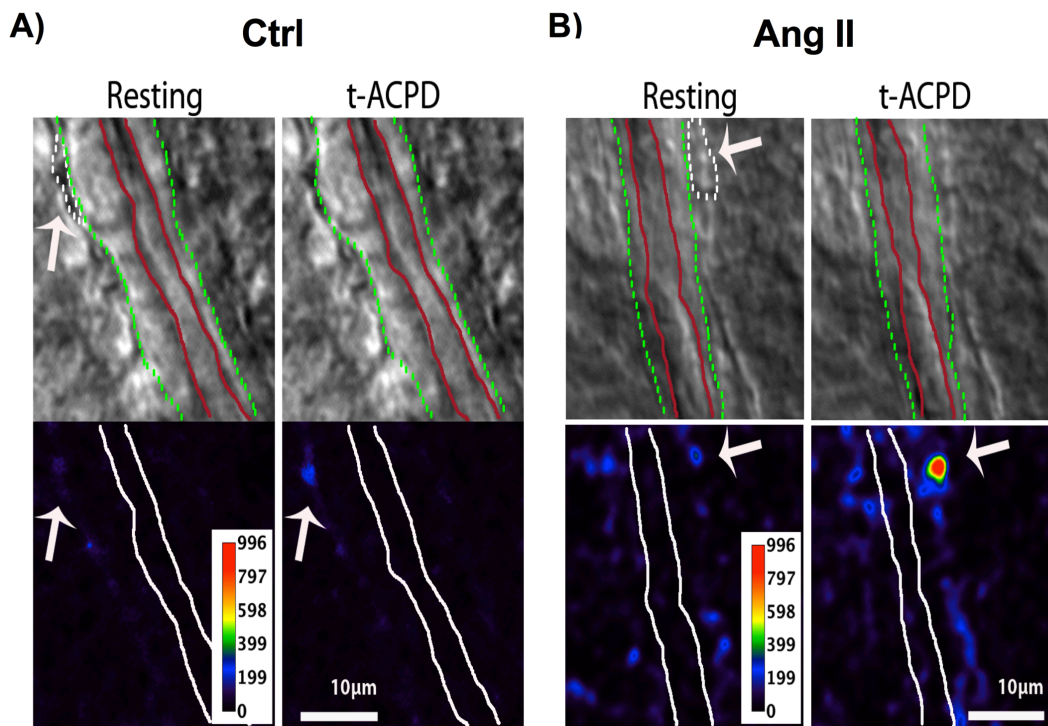


Figure 7. (Figure 4 ARTICLE)

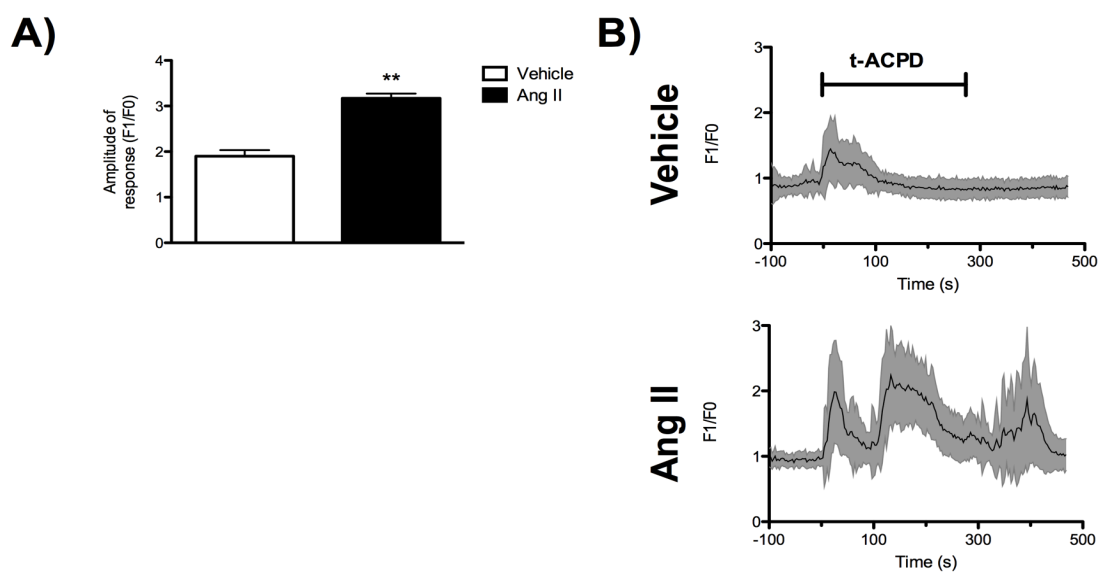


Figure 8. (Figure 5 ARTICLE)

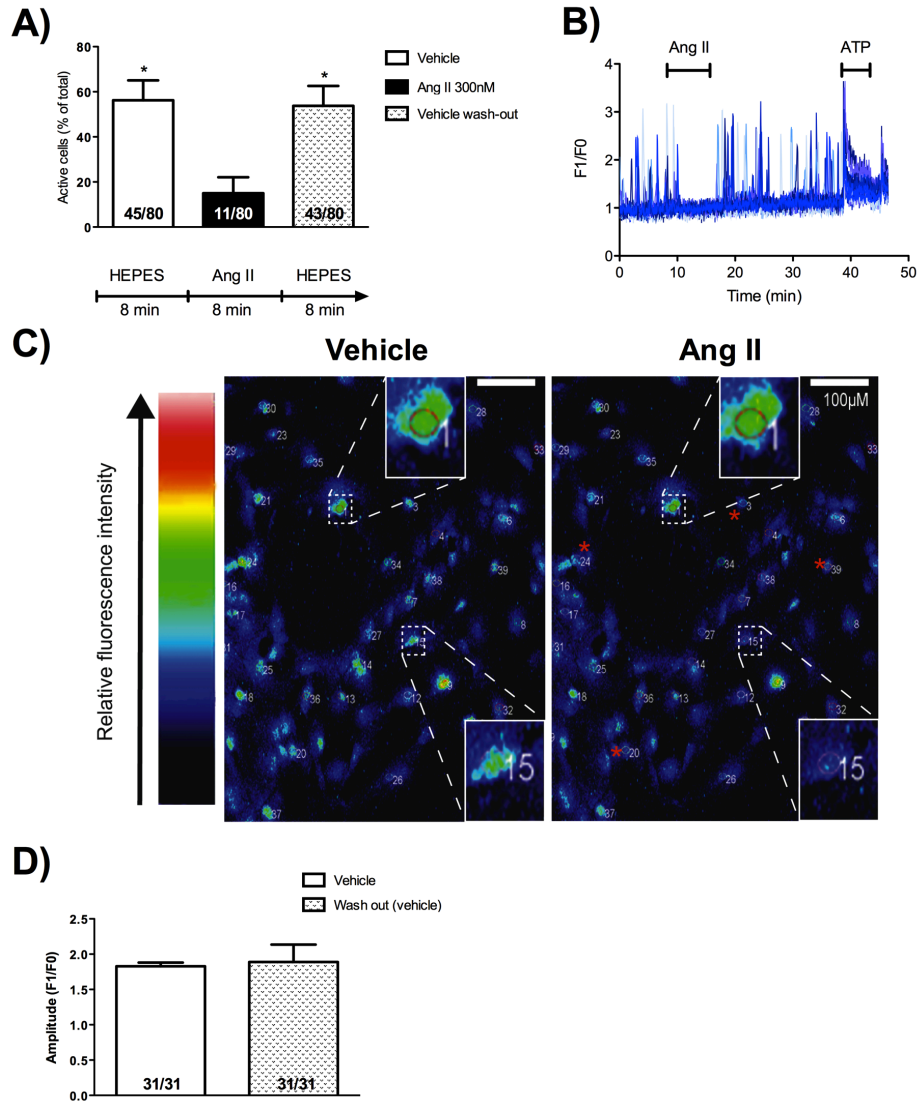


Figure 9. (Figure 6 ARTICLE)

III. Discussion

1. Sommaire des résultats

Avec le phénomène de vieillissement de la population qui prend de l'ampleur au Canada comme au niveau mondial, on doit s'attendre à une augmentation considérable de la morbidité associée avec la plupart des maladies affectant le système nerveux central au cours des prochaines décennies. Pour l'AD seulement, on estime que ce taux devrait tripler d'ici 2050 en Amérique (Hebert et coll., 2013). Un nombre significatif de ces pathologies cérébrales, dont l'AD, mais aussi l'HA, maladie très répandue, sont associées à des anomalies du système vasculaire cérébral et à un déclin cognitif. Le CNV est souvent affecté. Dans cette perspective, nous avons fait de l'étude de l'un des mécanismes pathologiques affectant ce dernier, l'objet de ce mémoire.

La récente découverte de l'importance de la magnitude de la réponse calcique astrocytaire sur la polarité de la réponse vasculaire artérielle induite par l'activité neuronale (Girouard et coll., 2010) a mis en évidence l'importance stratégique de la signalisation calcique dans l'astrocyte pour le CNV. Sachant que l'Ang II, peptide synthétisé au niveau systémique, mais aussi dans le cerveau, altère le CNV et peut moduler la signalisation calcique dans plusieurs types cellulaires dont l'astrocyte, nous avons émis l'hypothèse que celle-ci altère le CNV en amplifiant la réponse calcique astrocytaire.

Utilisant la FLD, nous avons observé que l'Ang II administré de manière topique

diminue l'augmentation du CBF dans le cortex somatosensoriel murin *in vivo* normalement induite par la stimulation des vibrisses ou par la surperfusion locale de *t*-ACPD, un agoniste des mGluR du groupe I. Ces récepteurs astrocytaires sont connus pour leur rôle dans le CNV. Sur des préparations de tranches de cerveau corticales et grâce à la microscopie multiphoton nous avons mesuré simultanément deux types de réponses au *t*-ACPD. D'abord la réponse calcique dans les pieds astrocytaires apposés sur les petites artères parenchymateuses et la réponse vasculaire subséquente ainsi induite dans ces mêmes vaisseaux sanguins. Une potentialisation de la réponse calcique astrocytaire de même qu'une augmentation des concentrations calciques basales fut ainsi observée. Ceci était associé avec un déplacement de la polarité de la réponse vasculaire de la vasodilatation vers la vasoconstriction. Les récepteurs AT₁ apparaissent impliqués dans ces effets sur les réponses calcique et vasculaire, comme nous l'avons démontré avec le candesartan, un ARA. Nous avons de plus observé un effet similaire sur l'amplitude de la réponse calcique dans les astrocytes isolés en culture cellulaire. Enfin, l'Ang II a inhibé les oscillations calciques spontanées astrocytaires retrouvées dans une culture d'astrocytes isolés.

2. Implication des récepteurs AT₁

Puisque l'effet sur la [Ca²⁺] maximale retrouvée lors de la réponse calcique, de même que l'effet de déplacement de l'effet vasculaire ont tous les deux été prévenus par le candesartan, on peut conclure que le récepteur AT₁ de l'Ang II est nécessaire à ceux-ci. Anatomiquement parlant, cela est en accord avec ce que l'on connaît sur l'expression

des récepteurs de l'Ang II par les astrocytes corticaux (Li et coll., 2005). De surcroît, ce récepteur est aussi celui qui a été impliqué dans les effets de l'octapeptide mesurés sur le calcium astrocytaire (Sumners et coll., 1991; Wang et coll., 1996; Gebke et coll., 1998). On peut remarquer toutefois que la polarité de la réponse vasculaire était légèrement déplacée vers la vasodilatation en présence de candesartan par rapport au groupe contrôle, sans que cela ne soit significatif. Cela suggère que cet ARA en inhibant les récepteurs AT₁ laisse place à un effet de l'Ang II sur les récepteurs AT₂ ou autres récepteurs dont les effets seraient opposés à ceux de l'AT₁. L'autre possibilité étant qu'il y ait activation des récepteurs AT₁ en situation contrôle. Enfin, on ne peut toutefois exclure ni l'effet de l'inhibition des récepteurs AT₁ neuronaux, ni celui des récepteurs situés sur les vaisseaux sanguins. On peut toutefois exclure, tel que nous l'avons démontré, un effet dépendant d'une quelconque modulation par les récepteurs AT₁ de la transmission synaptique. Enfin, le candesartan n'a pas prévenu de manière significative l'augmentation de la [Ca²⁺] basale. Un autre récepteur, ou métabolite de l'Ang II pourrait participer à cet effet, alternativement, la puissance statistique pourrait être insuffisante considérant le nombre d'échantillons. En effet, il semble exister une tendance allant dans le sens d'un effet de prévention d'un tel effet de l'Ang II sur le calcium basal.

3. Comment l'angiotensine peut-elle affecter la réponse calcique ?

Une des observations majeures découlant des expérimentations présentées dans ce mémoire repose sur le fait que l'Ang II affecte à la hausse la concentration de Ca²⁺

mesurée pendant la réponse calcique qui suit l'activation des récepteurs mGluR astrocytaires, de même que la concentration retrouvée au niveau basal. Deux questions émergent suite à ces observations. D'abord : par quel mécanisme l'Ang II affecte-t-elle cette réponse calcique? Ensuite: quelles sont les conséquences directes de cette réponse calcique amplifiée, notamment sur les mécanismes affectant le CNV?

3.1 Effet additif ou potentialisateur du *t*-ACPD et de l'ANG II sur la $[Ca^{2+}]$

La $[Ca^{2+}]$ libre dans le cytoplasme semble être au coeur des divers mécanismes d'activation et de rétro-inhibition de la relâche de Ca^{2+} , notamment de ceux qui dépendent de l'activation des IP_3Rs et qui participent à l'initiation des oscillations calciques (Scemes et Giaume, 2006). Selon une expérience réalisée sur des membranes neuronales de réticulum endoplasmique du cervelet, la probabilité d'ouverture (P_O) des IP_3Rs en fonction de la $[Ca^{2+}]$ cytoplasmique se présente sous forme d'une courbe en cloche où les concentrations situées entre 100 et 700 nM sont associées à une P_O supérieure à 60 %. La probabilité maximale se situe quant à elle à ~200-400 nM. Ainsi, une inhibition des IP_3Rs par des $[Ca^{2+}]$ élevées est donc observée (Bezprozvanny et coll., 1991). Cet intervalle est de plus compatible avec la concentration maximale de Ca^{2+} —qui elle a été mesurée à 500 nM— associée à un effet coagoniste sur les IP_3Rs (Bezprozvanny et Ehrlich, 1995). En contraste avec ces observations, Mak et coll. ont décrit cette courbe comme étant beaucoup plus large (300-1000 nM) et conservant cette forme de cloche, mais seulement en situation où la $[IP_3]$ est faible. Ainsi, plus la $[IP_3]$

est importante, plus grande est la tolérance de la P_O pour des hauts niveaux de Ca^{2+} sans qu'il n'y ait d'effet d'inhibition de l'ouverture, mais plus la courbe est déplacée vers une plage de $[Ca^{2+}]$ supérieures (Mak et coll., 1998). Bien que la majorité des expériences qui ont conduit aux observations et modèles sur l'ouverture des IP_3Rs ont été effectuées sur des préparations ou cellules autres que les astrocytes, on peut remarquer que ces valeurs sont compatibles avec celles que nous avons mesurées. De surcroît, elles correspondent aussi à la $[Ca^{2+}]$ qui représente le point pivot observé par Girouard et coll. (~500 nM) à partir duquel, il y a un renversement de la polarité de la réponse vasculaire (Girouard et coll., 2010). Les $[Ca^{2+}]$ initiale et maximale en réponse au t -ACPD que nous avons observées après incubation des tranches corticales avec l'Ang II (299,2 nM±48,4 μM et 730,3 nM±158,9 nM respectivement), sont environ du double au triple des valeurs contrôles. Il semble ainsi que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]$ initiale (basale) causée par l'Ang II puisse amener la P_O des IP_3Rs à un niveau qui potentialise la réponse calcique subséquente engendrée par la stimulation des récepteurs mGluR par le t -ACPD. Enfin, un autre paramètre a été ajouté, et ce dans un modèle récent d'estimation de la P_O des IP_3Rs qui a priori semble réconcilier les observations divergentes précédemment énumérées: la concentration calcique luminale du RE ($[Ca^{2+}]_{lum}$). Selon ce dernier modèle, abaisser la $[Ca^{2+}]_{lum}$ augmente la probabilité P_O du récepteur, tout en augmentant la $[Ca^{2+}]_C$ nécessaire à l'atteinte de cette ouverture (Fraiman et Dawson, 2004).

3.2 Voie de l'IP₃ : soutien d'une réponse calcique plus forte

Il est connu que la liaison de l'Ang II à son récepteur AT₁ entraîne l'activation de diverses protéines G et voies de signalisation. L'activation de la protéine G_q est suivie de celle de la PLC. La production d'IP₃ ainsi engendrée est retrouvée dans nombre de tissus et est responsable de la majorité des effets physiologiques causés par le peptide (de Gasparo et coll., 2000). Cette voie est aussi stimulée dans les astrocytes en culture cellulaire (Sumners et coll., 1991). Il faut toutefois signaler que chez le rat, une autre étude a à l'opposé échoué à démontrer une augmentation significative de la production d'inositol par l'Ang II dans les astrocytes corticaux en culture (Tallant et Higson, 1997). Hypothétiquement, selon les modèles amenés précédemment, une augmentation de la [IP₃] engendrée par l'activation des récepteurs AT₁ de l'Ang II contribuerait à diminuer l'effet inhibiteur sur les IP₃Rs associé à des [Ca²⁺]_C élevées. Augmenter la [IP₃] permet théoriquement la présence de [Ca²⁺]_C plus élevées et ainsi une diffusion plus grande des signaux locaux calciques aux autres sites conduisant à une relâche globale mieux coordonnée de calcium des sites du RE (Mak et coll., 1998). Ainsi, on pourrait s'attendre à un ou plusieurs de ces effets : des réponses calciques atteignant une plus grande [Ca²⁺] maximale, une initiation plus fréquente d'oscillations calciques (induites) causée par l'obtention plus fréquente du niveau critique au niveau du foyer d'initiation ou encore à une initiation plus rapide de ces dernières si le mécanisme d'amplification de la réponse calcique est accéléré à l'intérieur de ces cellules. Enfin, l'effet principal de l'augmentation de la [IP₃] est l'augmentation de la P₀ des IP₃Rs. Cela est compatible avec l'augmentation de la [Ca²⁺]_C observée en présence d'Ang II. Le tableau I résume

l'effet de la $[IP_3]$, de la $[Ca^{2+}]_{lum}$ et de la $[Ca^{2+}]_c$ sur la P_O des IP_3Rs .

Tableau I : Effet de la diminution ou de la hausse des concentrations des molécules affectant la probabilité d'ouverture des IP_3Rs .

	Diminution	Hausse
$[IP_3]$	↓ P_O MAX ↓ $[Ca^{2+}]_c$ à P_O MAX	↑ P_O MAX ↑ $[Ca^{2+}]_c$ à P_O MAX
$[Ca^{2+}]_{lum}$	↑ P_O MAX ↑ $[Ca^{2+}]_c$ à P_O MAX	↓ P_O MAX ↓ $[Ca^{2+}]_c$ à P_O MAX
$[Ca^{2+}]_c$	↓ P_O MAX (si $[Ca^{2+}]_c$ <300 nM	↑ P_O MAX (si $[Ca^{2+}]_c$ <300 ou >1000 nM)

En somme, considérant les résultats obtenus dans les présentes expérimentations, on peut poser l'hypothèse que la $[IP_3]$, en supposant qu'elle soit augmentée en présence d'Ang II, est en partie responsable des $[Ca^{2+}]_c$ plus élevées retrouvées lors de stimulations par le *t*-ACPD. De plus le déplacement de la courbe de la P_O des IP_3Rs vers des concentrations plus élevées impliquerait que les $[Ca^{2+}]_c$ basales assez élevées (299,2 nM) d'après ces modèles pour augmenter la P_O auraient des conséquences moindres qu'en présence d'une $[IP_3]$ plus basse. Ce qui pourrait expliquer pourquoi la cellule demeure en mesure de répondre à la stimulation par des agonistes comme le *t*-ACPD. L'effet de l'Ang II sur la $[IP_3]$ est donc à vérifier dans notre modèle. Enfin, il faut prendre en considération que les propriétés des IP_3Rs peuvent varier entre les différents isoformes de ces récepteurs (Patel et coll., 1999), le type 2 étant essentiellement responsable des réponses calciques astrocytaires chez la souris (Nizar et coll., 2013).

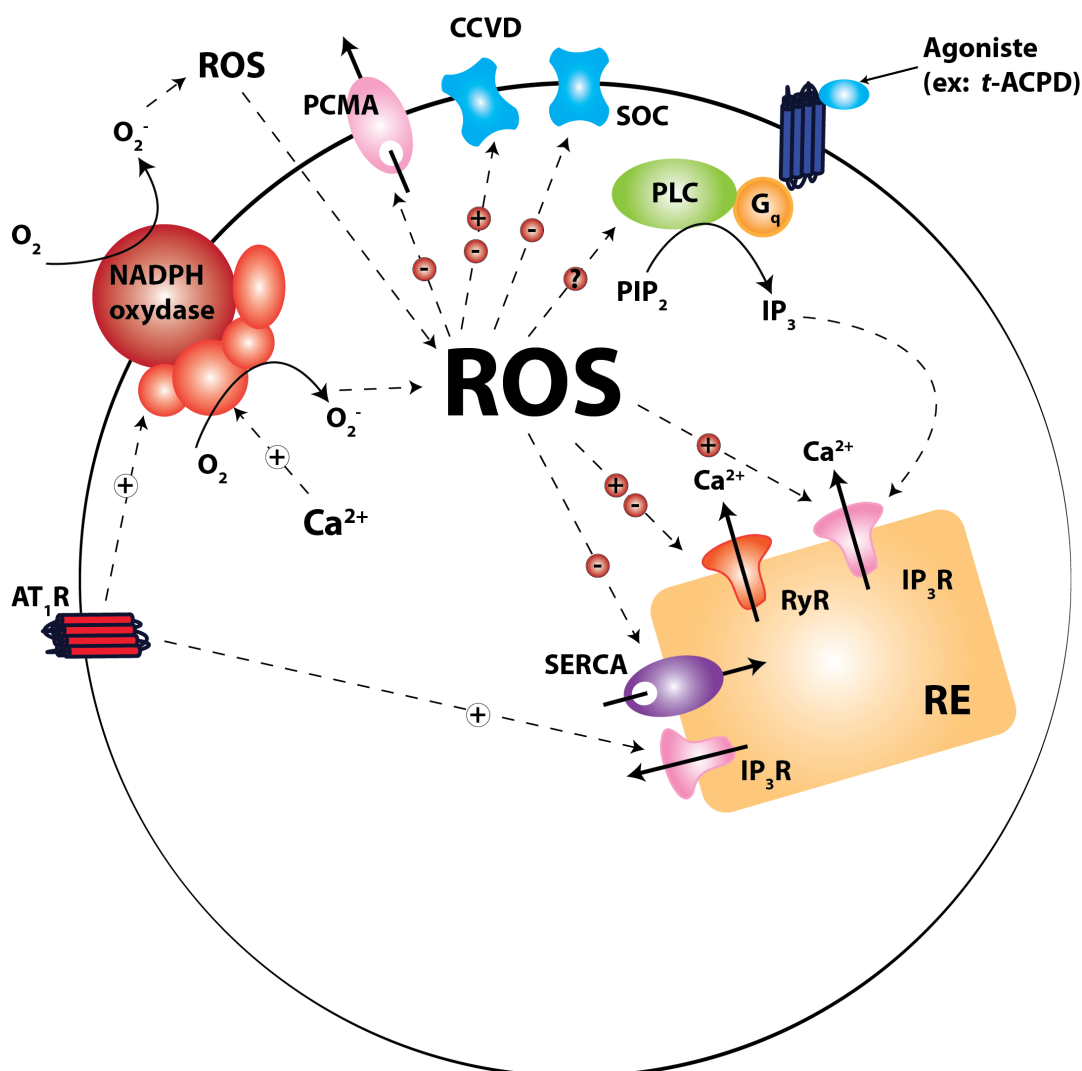


Figure 10. Modulations réciproques entre les voies du Ca^{2+} et des ROS. Le Ca^{2+} module la production de ROS. Pendant ce temps, les ROS modulent différentes composantes de la signalisation calcique ce qui peut altérer la signalisation calcique locale et globale en contexte physiologique et/ou pathologique. Figure adaptée partiellement avec l'autorisation de Macmillan Publishers Ltd [Acta Pharmacol Sin] (Yan et coll., 2006) et dessinée de nouveau. CCVD : canaux calciques voltage dépendant; PCMA : Ca^{2+} ATP-ase de la membrane plasmique; RyR : récepteurs à la ryanodine; SERCA: Ca^{2+} ATP-ase du réticulum endoplasmique; SOC : canaux calciques opérés par les stocks.

3.3 Voie des ROS

La voie des ROS est connue pour participer à l'HA induite par l'Ang II et de manière générale à l'hypertension neurogénique (Zimmerman et coll., 2002; Lee et Griendling, 2008). Dans divers tissus, on sait que l'Ang II peut activer la NADPH oxydase et ainsi induire la production de ROS comme l'ion superoxyde (O_2^-). Dans cette sous-section, sera évaluée la possibilité que les ROS ainsi produites participent directement à l'élévation observée de la $[Ca^{2+}]_C$.

Il semble que les ROS soient en mesure d'affecter la $[Ca^{2+}]_C$ de manière relativement directe. Par exemple, Varrmann et coll. ont démontré que la dopamine induit une augmentation de la $[Ca^{2+}]_C$ astrocytaire dépendante des ROS produites par l'activation de la monoamine-oxydase. De manière intéressante, ils ont constaté que l'activation de la PLC et la libération des stocks intracellulaires étaient en cause (Vaarmann et coll., 2010). Cela suggère donc que les ROS sont en mesure de stimuler l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_C$ astrocytaire par les voies classiques de l' IP_3 . Cette observation est en accord avec les résultats de Hu et coll. qui indiquent que les ROS produites par la NADPH oxydase augmentent la sensibilité des IP_3 Rs (Hu et coll., 2000). À l'opposé, dans l'AD, pathologie associée à un CNV altéré et des anomalies liées au Ca^{2+} astrocytaire, il semble que le peptide bêta-amyloïde ($A\beta$) en augmentant la $[Ca^{2+}]_C$ cause l'activation de la NADPH oxydase et l'augmentation des ROS (Abramov et Duchon, 2005). La NADPH oxydase astrocytaire étant sensible à la $[Ca^{2+}]_C$, il apparaît fort probable que la $[Ca^{2+}]_C$ augmentée par l'Ang II que nous avons retrouvée induise une production

supplémentaire de ROS, quel que soit le mécanisme primaire de cette élévation. Cela a d'autant plus d'importance que cette $[Ca^{2+}]_C$ a été mesurée dans les pieds astrocytaires, c'est-à-dire au même endroit où Kazama et coll. ont observé la présence de constituants de la NADPH oxydase par microscopie électronique (Kazama et coll., 2004). En somme, comme démontré à la figure 10, les ROS sont capables d'affecter divers agents de la signalisation calcique d'une cellule de manière à modifier la $[Ca^{2+}]_C$. En retour, le Ca^{2+} est en mesure de moduler la production de ces ROS (Yan et coll., 2006). De tels mécanismes pourraient participer à l'augmentation par l'Ang II de la $[Ca^{2+}]$ basale dans les pieds astrocytaires. Cette $[Ca^{2+}]$ basale élevée pourrait elle participer en retour à la potentialisation observée en présence d'Ang II de la réponse calcique au *t*-ACPD.

4. Comment la $[Ca^{2+}]$ peut-elle affecter la réponse vasculaire ?

L'induction de la vasoconstriction suite à l'incubation avec l'Ang II représente une observation d'un intérêt particulier d'autant plus que l'effet du peptide sur la signalisation calcique semble en être la cause. Plusieurs agents vasoactifs sont des candidats potentiels pour expliquer l'induction d'une telle réponse vasculaire par le Ca^{2+} astrocytaire. Il s'agit du K^+ relâché dans l'espace périvasculaire par l'activation des canaux BK (Filosa et coll., 2006; Girouard et coll., 2010), du 20-HETE (Mulligan et MacVicar, 2004) et de la PGE_2 (Dabertrand et coll., 2013). Toutefois, de ces mécanismes, seul celui des BK a pour l'instant été démontré comme possédant un effet biphasique en fonction de la $[Ca^{2+}]$ astrocytaire. Il sera toutefois aussi discuté de la

possibilité que la voie du 20-HETE soit affectée par cette $[Ca^{2+}]_C$.

4.1 Canaux BK

Il apparaît très probable que le mécanisme astrocytaire impliquant les canaux BK et le K^+ soit impliqué dans l'altération du CNV par l'Ang II. D'abord, on sait que l'activation des mGluR₅ dans les astrocytes contribue à l'ouverture des canaux BK astrocytaires par des mécanismes dépendants de la PLC et de la production de EETs (Gebremedhin et coll., 2003). De plus, il a été observé qu'une $[Ca^{2+}]_C$ élevée (>500 nM) dans les pieds astrocytaires lors de la réponse calcique astrocytaire est associée à une réponse vasculaire vasoconstrictrice. Comme proposé par Girouard et coll., cela serait imputable à une plus grande P_O des canaux BK astrocytaires entraînant une augmentation de la $[K^+]_P$ à un niveau dépassant le seuil (environ 20 mM) en dessous duquel la vasodilatation est favorisée (figure 2). La réponse vasodilatatrice étant, elle, associée avec des $[Ca^{2+}]_C$ plus faibles (<500 nM) et à une $[K^+]_P$ d'environ 3-20 mM (Girouard et coll., 2010). Une première conclusion pouvant être tirée de ces observations est que la $[Ca^{2+}]_C$ atteinte durant la réponse astrocytaire est en mesure de dicter la polarité de la réponse vasculaire. La $[Ca^{2+}]_C$ que nous avons mesurée en présence d'Ang II (~730 nM) dépasse largement ce seuil, alors que la concentration contrôle se trouve en deçà de celui-ci. La translation de la réponse vasculaire vers la vasoconstriction que nous avons observée est donc en accord avec les résultats de Girouard et coll., ce qui accroît la probabilité que le mécanisme des canaux BK soit impliqué.

4.2 20-HETE

Mulligan et coll. ont été les premiers à rapporter l'implication de la voie du 20-HETE dans la vasoconstriction induite par l'oscillation calcique astrocytaire (Mulligan et MacVicar, 2004). Contrairement aux résultats obtenus concernant l'activation des canaux BK où la $[Ca^{2+}]$ a permis de prédire la polarité de la réponse vasculaire (Girouard et coll., 2010), Mulligan et coll. ont été incapable d'observer une telle relation, malgré l'utilisation de la même technique, soit la photolyse de Ca^{2+} (Mulligan et MacVicar, 2004). Ils ont toutefois observé que la propagation de la réponse calcique dans les astrocytes avoisinants était un facteur associé à une plus forte vasoconstriction. Ainsi, la $[Ca^{2+}]$ relative, représentée par la fluorescence relative ($\Delta F/F_0$) de l'indicateur calcique Fluo-3, n'était pas associée avec une telle potentialisation de la vasoconstriction. Toutefois, à la différence de Girouard et coll., la $[Ca^{2+}]$ n'a pas été estimée avec une méthode quantitative. De plus, n'ayant observé que des vasoconstrictions, il est possible que dans leurs conditions expérimentales, la $[Ca^{2+}]$ fut toujours supérieure au seuil (>500 nM de Ca^{2+}) rapporté par Girouard et coll. (Girouard et coll., 2010). Puisqu'ils ont effectué la photolyse calcique dans le corps cellulaire et non dans le pied astrocytaire comme l'ont fait Girouard et coll., il est aussi possible que des mécanismes de tampon atténue la réponse calcique de manière à ce qu'elle atteigne au final une $[Ca^{2+}]$ d'intensité constante au niveau des pieds astrocytaires qu'importe la force de la stimulation initiale. Il est possible que cette dernière varie selon l'état physiologique du tissu ou de l'astrocyte. Une autre conclusion possible est que la polarité de la réponse induite par la voie du 20-HETE ne dépende pas de la $[Ca^{2+}]$ dans

les pieds astrocytaires. Si cette prémisse est vraie, il faudrait conclure que le 20-HETE ne participe pas à l'altération de la réponse vasculaire par l'Ang II qui, elle, semble associée à la $[Ca^{2+}]$. Bloquer la voie des 20-HETE dans une expérience future permettrait de répondre à cette question.

5. D'autres mécanismes peuvent-ils participer à l'effet de l'Ang II sur le CNV ?

5.1 Voie des ROS

Les données concernant l'effet des ROS dont la synthèse est induite par l'Ang II proviennent essentiellement de modèles d'HA neurogénique. Sachant que l'Ang II circulante induit la production cérébrale de ROS, mais qu'elle ne peut traverser la BHE (Capone et coll., 2011), il naquit une hypothèse voulant que l'Ang II produite par le RAS cérébral participe à la pathologie de l'HA. Il existe nombre d'autres études appuyant cette hypothèse (Zimmerman et coll., 2002; Chan et coll., 2006). Un exemple intéressant est qu'on retrouve une hausse de l'expression des composantes du RAS cérébral chez le rat spontanément hypertendu, modèle dans lequel les niveaux d'Ang II circulants ne sont pas augmentés (Phillips et Summers, 1998).

Les ROS cérébraux dont les niveaux sont augmentés dans des modèles d'HA induite par l'administration chronique d'Ang II à des doses affectant lentement la pression artérielle (pressives lentes) (Capone et coll., 2010) ou non pressives (Capone et coll., 2011),

participent à certains dérèglements du CNV. Ils entraînent entre autres une diminution de l'augmentation du CBF induite par la stimulation des vibrisses (Capone et coll., 2012). Dans les deux modèles, cette production de ROS est dépendante de la NADPH oxydase (Capone et coll., 2011; Capone et coll., 2012). Il y apparaît, de plus, que l'activité neuronale induite et spontanée n'est pas affectée dans le cortex somatosensoriel (Kazama et coll., 2003; Capone et coll., 2011). Capone et coll. ont aussi démontré que l'on retrouve dans le modèle avec doses sous-pressives d'Ang II, une augmentation des ROS dans les cellules de certaines régions situées à l'intérieur de la BHE, comme dans les neurones, les vaisseaux sanguins et possiblement les astrocytes corticaux. L'administration topique sur le cortex d'un ARA, le losartan, a à la fois atténué l'augmentation des ROS et la diminution de l'augmentation du CBF par stimulation des vibrisses. Toujours dans ce modèle, Capone et coll. ont trouvé deux mécanismes distincts affectant de manière indépendante la production de ROS et les dysfonctions du CNV observées. Le premier met en scène l'Ang II et son récepteur AT₁ et l'autre l'endothéline-1 et son récepteur ET-A. De plus, ils ont démontré que les ROS de l'OSF étaient responsables de l'augmentation de la pression artérielle et des dysfonctions cérébrales retrouvées dans le cortex somatosensoriel (Capone et coll., 2012). Puisque dans ce modèle l'HA est induite par l'Ang II, mais que la surperfusion corticale d'un ARA ne bloque que partiellement la dysfonction du CNV, on peut en conclure que les mécanismes primaires en cause sont externes au cortex, une autre possibilité étant que ces derniers incluent des modifications chroniques faisant en sorte que le récepteur AT₁ cérébral ne soit plus indispensable à ces dysfonctions. Par ailleurs, comme Capone et coll. l'ont suggéré, il est possible que l'accroissement des ROS dans l'OSF par

l'administration d'Ang II entraîne une élévation des niveaux d'Ang II cérébrale (Capone et coll., 2011). Une autre possibilité est, sachant que ce peptide altère l'intégrité de la BHE (Fleegal-DeMotta et coll., 2009), qu'une exposition chronique à l'Ang II soit responsable d'une altération directe de l'endothélium entraînant son passage, possiblement par transcytose, au travers de la BHE pour atteindre les cellules de l'unité neurovasculaire. Si la dernière possibilité s'avérait exacte, il serait difficile d'utiliser ce modèle d'HA neurogénique à des fins de comparaison avec la surperfusion d'Ang II topique sur le cortex somatosensoriel que nous avons employé afin de déduire les mécanismes impliqués.

Il semble, de plus, que les mécanismes mis en cause pour des dysfonctions similaires du CNV suivant l'administration systémique en aigu d'une dose « pressive » d'Ang II sont eux indépendants des ROS de l'OSF (Capone et coll., 2012). Ils apparaissent tout de même dépendre des ROS produites par la NADPH oxydase suite à l'activation des récepteurs AT_1 (Kazama et coll., 2004). En somme, dans deux modèles, un impliquant l'administration aiguë et l'autre de manière chronique et possiblement apparentés à deux phases distinctes de la pathologie de l'HA neurogénique, les ROS produites par l'Ang II ont été mise en cause pour expliquer les dysfonctions du CNV. De plus, dans un modèle murin de l'AD, il a de manière similaire été montré que l'omesartan, un ARA, rétablissait le CNV altéré, tout en abaissant le niveau de ROS situé à proximité d'un marqueur de l'endothélium dans les artérioles et capillaires du cortex (Takeda et coll., 2009).

Dans les sous-sections suivantes, nous allons donc d'abord analyser quelles voies importantes pour le CNV pourraient être affectées par les ROS afin de mieux comprendre comment cette voie pourrait expliquer les dysfonctions que nous avons observées.

5.2 Disponibilité du NO

L'Ang II pourrait agir sur la disponibilité du NO. On sait que la production de ROS, notamment de l' O_2^- entraîne la formation de peroxynitrite ($ONOO^-$) en réaction avec le NO intracellulaire. Ceci a pour conséquence d'abaisser la disponibilité du NO. Dans le cortex, le NO sans être un médiateur direct du CNV, joue plutôt envers ce dernier un rôle permissif (Edvinsson et Krause, 2002; Duchemin et coll., 2012). De manière générale, le NO dérivant d'interneurones locaux exprimant la NO synthase est présumé participer à la phase d'initiation de la vasodilatation induite par l'activité neuronale. De plus, il est probable que le NO de diverses sources cellulaires module la réponse astrocytaire (Duchemin et coll., 2012). Les mécanismes pathologiques affectant le NO pourraient altérer le CNV. Par exemple, le peptide $A\beta$, médiateur de l'AD qui altère le CNV par la voie des ROS de la NADPH oxydase n'est pas en mesure d'altérer le CNV lorsque la synthèse de NO a été préalablement inhibée (Park et coll., 2005). Dans un modèle murin de l'AD, le récepteur AT_1 de l'Ang II étant impliqué dans l'altération du CNV et associé à la présence de ROS (Takeda et coll., 2009), il apparaît très probable que la réduction de la disponibilité du NO joue un rôle important.

Une première explication à ceci est celle de l'inhibition par le NO de la synthèse de

l'acide 20-hydroxyeicosatetraenoïque (20-HETE), déjà identifié comme étant le principal métabolite de l'AA responsable de la vasoconstriction dépendante des astrocytes (Mulligan et MacVicar, 2004). Une hypothèse veut que cette restriction effectuée par le NO laisse place aux mécanismes de vasodilatation dépendants des EETs astrocytaires, ceci incluant leur effet activateur sur les canaux BK des cellules musculaires lisses (Liu et coll., 2008). On sait de plus que le NO peut activer les canaux BK directement, comme il a été démontré sur les canaux BK des cellules musculaires lisses et ainsi favoriser la vasodilatation (Mistry et Garland, 1998).

Une baisse de NO produit par les cellules de l'unité neurovasculaire comme les interneurons GABAergiques et les astrocytes (Duchemin et coll., 2012) serait dans ce cas de figure la cause de la vasoconstriction associée à une diminution de la disponibilité du NO. Dans la rétine toutefois, une faible disponibilité du NO, c'est-à-dire <70 nM est associée à des vasodilatations et le contraire à des vasoconstrictions artériolaires induites par la stimulation lumineuse. Ce type de réponse vasculaire apparaît induit par la glie rétinale (Metea et Newman, 2006). On sait qu'il est possible que le NO induise une hausse de la $[Ca^{2+}]_c$ astrocytaire par le mécanisme de la guanosine monophosphate cyclique/protéine kinase G (GMPc/PKG) tel que démontré en culture cellulaire. Ce mécanisme pourrait expliquer les observations associant une concentration élevée de NO à la vasoconstriction. En effet, une élévation de la disponibilité du NO mobilisant le Ca^{2+} astrocytaire favoriserait la vasoconstriction par le mécanisme du K^+ /canaux BK (Duchemin et coll., 2012). De plus, la discordance entre les observations précédentes ayant mené à conclure à un effet soit vasodilatateur, soit vasoconstricteur pourrait être

due au fait de la grande dépendance de la réponse au NO avec l'état physiologique du tissu ou de l'animal lors d'expérimentations *in vivo* (Duchemin et coll., 2012). Puisque dans les expérimentations rapportées ici, nous avons observé une transition de la polarité vers la vasoconstriction, il semble que si la production de ROS induite par l'Ang II est en cause, le mécanisme le plus susceptible d'affecter la réponse vasculaire est le blocage de l'inhibition du NO sur la production du 20-HETE par abaissement de la disponibilité du NO. Cela pourrait être associé au blocage de l'effet activateur du NO sur les canaux BK du muscle lisse. Toutefois, Girouard et coll. ont montré que des capteurs de peroxy-nitrite renversaient les effets de l'Ang II administré par perfusion intraveineuse sur le CBF, ce qui suggère dans ce cas que la disponibilité du NO est moins importante que les effets de cette ROS (Girouard et coll., 2007). Dans tous les cas, il est clair que le NO doit être considéré comme un facteur important pouvant moduler le CNV, notamment en modifiant la polarité de la réponse vasculaire induite.

5.3 Effet des ROS de l'IP₃ et du PIP₂ sur le BK

Le canal BK est composé d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité bêta (β). La sous-unité β 1 forme le BK retrouvé dans les muscles lisses alors que la β 4 est retrouvée au niveau du BK astrocytaire. L'IP₃ participe à l'activation du canal BK- β 1 indépendamment de son effet sur la $[Ca^{2+}]_C$ (Zhao et coll., 2010). Le PIP₂, le substrat, active lui aussi le canal BK- β 1, ce qui au niveau des cellules musculaires lisses favorise la vasorelaxation, mais il n'a pas d'effet sur le BK- β 4 (Vaithianathan et coll., 2008). L'effet de l'IP₃ sur le BK- β 4 n'a pas à ce jour été évalué. Toutefois, s'il était semblable à

celui qu'il exerce sur le BK- β 1, cela constituerait un autre mécanisme, outre son effet de potentialisation la réponse calcique (voir la sous-section « voie de l'IP₃ »), par lequel l'IP₃ pourrait renforcer la réponse vasculaire dépendante des canaux BK.

Enfin, certaines ROS dont le H₂O₂, inhibent la sous-unité alpha des canaux BK en lui enlevant sa capacité de percevoir la [Ca²⁺]_C, ce qui au niveau des muscles lisses devrait en principe se traduire par une importante diminution de la vasodilatation (Tang et coll., 2004). Comme la sous-unité alpha est commune avec le BK astrocytaire et que l'effet inhibiteur est presque total, cela pourrait se refléter par une inhibition totale de la réponse dépendante du K⁺ astrocytaire. Rappelons que le BK astrocytaire induit la vasodilatation en conditions de [Ca²⁺]_C normales (<500 nM). Ceci pourrait avoir comme conséquence de céder la place aux autres mécanismes vasodilatateurs ou vasoconstricteurs. Par exemple, sachant que les ROS abaissent la disponibilité du NO, la vasoconstriction par le 20-HETE représente un mécanisme d'un grand intérêt.

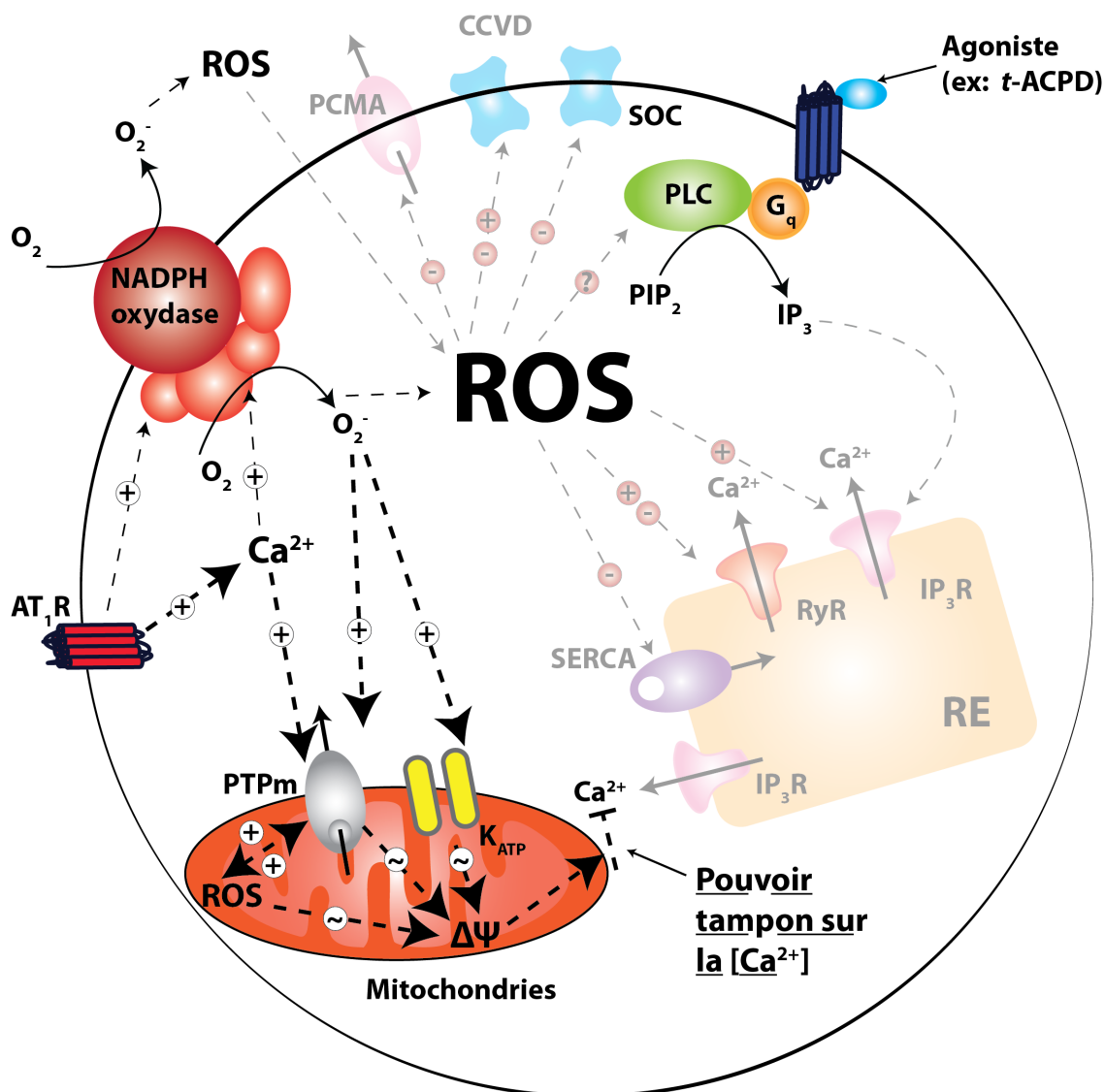


Figure 11. Inhibition de l'effet tampon calcique mitochondrial par l'angiotensine II. Les ROS produites suivant l'activation de la NADPH oxydase par le récepteur AT₁ et l'augmentation de la [Ca²⁺] pourraient participer à l'activation du canal potassique sensible à l'ATP (K_{ATP}) et du pore de transition de la perméabilité mitochondriale (PTPm) ce qui aurait comme conséquence d'hyperpolariser la mitochondrie et entraînerait un changement du potentiel membranaire ($\Delta\Psi$). Des changements de $\Delta\Psi$ sont associés à la perte du pouvoir tampon.

5.4 Dysfonctions mitochondriales

Un autre mécanisme moins connu doit aussi être considéré. L'Ang II peut activer le canal potassique mitochondrial sensible à l'ATP (K_{ATP}). De plus, une $[Ca^{2+}]_C$ élevée, comme nous l'avons retrouvée dans les pieds astrocytaires, de même que l'altération de protéines entraînée par les ROS produites par la NADPH oxydases sont associées avec l'ouverture du pore de transition de la perméabilité mitochondriale comme illustré à la figure 11. Dans ce cas, comme dans celui de l'activation du K_{ATP} , cela peut entraîner une modification du potentiel de membrane mitochondrial, un processus essentiel à la capture du Ca^{2+} (donc à l'abaissement de la $[Ca^{2+}]_C$) par cette organelle durant la réponse calcique, en plus d'entraîner la relâche supplémentaire de ROS par les mitochondries (Friel, 2000; Zhang et coll., 2007). Cela a d'autant d'importance sachant que les pieds astrocytaires semblent posséder une densité plus importante de mitochondries en comparaison avec le corps cellulaire (Ito et coll., 2011). Dans les neurones, une altération du potentiel de membrane mitochondrial entraîne des réponses calciques de plus grande amplitude (Friel, 2000). De telles dysfonctions pourraient toutefois avoir des conséquences opposées au niveau des mitochondries situées près des microdomaines des IP_3Rs du RE, leur rôle étant de garder la $[Ca^{2+}]_C$ locale basse afin d'éviter l'inhibition des IP_3Rs par le Ca^{2+} (Scemes et Giaume, 2006). Toutefois l'importance de cet effet tampon serait moindre dans la mesure où la $[IP_3]$ était élevée, si l'on se base sur les observations de Mak et coll. (Mak et coll., 1998).

5.5 PGE₂

Le troisième et dernier mécanisme astrocytaire connu pouvant induire la vasoconstriction est celui de la PGE₂ (Dabertrand et coll., 2013). Cette prostaglandine a longtemps été considérée comme un agent vasoactif induisant la vasorelaxation directe des muscles lisses des artères corticales (Niwa et coll., 2000; Takano et coll., 2006). Toutefois, très récemment, Dabertrand et coll. ont démontré que l'effet de la PGE₂ sur divers vaisseaux cérébraux est au contraire vasoconstricteur (Dabertrand et coll., 2013). Cela met donc en doute l'hypothèse dominante d'un effet direct de la prostaglandine sur les cellules vasculaires basé notamment sur des expériences sur l'inhibition de l'enzyme COX. L'effet du PGE₂ pourrait donc davantage se manifester par son influence sur d'autres processus cellulaires modulant le CNV. Le récepteur AT₁ a été mis en cause pour la relâche de PGE₂ par les astrocytes (Gallagher et coll., 2006). En accord avec ces observations, Capone et coll. ont observé dans leur modèle d'HA induite avec des doses pressives lentes d'Ang II que l'enzyme COX-1 et le récepteur EP₁ étaient essentiels aux dysfonctions du CNV et à la production de ROS. Ils ont émis l'hypothèse que le récepteur EP₁ vasculaire était responsable de l'activation de la NADPH oxydase par l'Ang II (Capone et coll., 2010). Il faut toutefois souligner que bien qu'ils démontrent à l'aide de l'immunofluorescence que les origines des COX-1 et des récepteurs EP₁ sont microgliale et vasculaire respectivement (Capone et coll., 2010), les images que Capone et coll. présentent pour appuyer leurs observations ne semblent pas exclure et même suggèrent que les pieds astrocytaires expriment une ou ces deux composantes. Une étude sur l'expression des COX dans le cortex somatosensoriel appuyée par la microscopie

électronique est à prescrire afin de vérifier cette proposition. Outre le mécanisme retrouvé dans l'HA neurogénique, on sait aussi que les ROS, notamment le H₂O₂, sont en mesure de stimuler les COX. Récemment, Park et coll. ont démontré que les astrocytes et non la microglie pouvaient percevoir le H₂O₂ via un mécanisme de phosphorylation de la protéine STAT6 et en retour induire l'expression de la COX-2 et la production de prostaglandines dont la PGE₂. La phosphorylation de STAT6 se produit dès la première minute d'exposition (Park et coll., 2012). Cela indique que les astrocytes pourraient être une des premières cellules affectées par l'induction de ROS et que ces ROS peuvent entraîner des modifications dans l'expression de protéines astrocytaires qui pourraient en retour affecter la signalisation dans d'autres types cellulaires. En somme, la voie de la PGE₂ pourrait être impliquée dans l'altération de la polarité de la réponse vasculaire induite par l'Ang II, toutefois cette voie semble complexe et demeure mal comprise, ce qui invite à la prudence dans le choix des approches à prioriser pour l'étudier.

5.6 Autres effets des ROS

Il a été montré que les ROS peuvent potentialiser certains types de récepteurs P2X de l'ATP (Coddou et coll., 2009). Tel qu'illustré à la figure 1, les récepteurs P2X et P2Y de l'ATP sont responsables de la propagation des vagues calciques intercellulaires astrocytaires (Guthrie et coll., 1999). Il a déjà été montré que les réponses calciques astrocytaires possédant une plus grande capacité de propagation sont associées à de plus fortes vasoconstrictions (Mulligan et MacVicar, 2004). La potentialisation des vagues calciques pourrait donc être un mécanisme engendré par la voie des ROS de l'Ang II et

expliquant en partie nos observations sur la réponse vasculaire. Ce mécanisme pourrait aussi être amplifié par le niveau calcique élevé que nous avons observé. Cela demeure donc à être vérifié.

5.7 Inhibition des oscillations spontanées

Dans une culture d'astrocytes isolés, nous avons observé que l'Ang II peut inhiber les oscillations calciques spontanées que l'on retrouve dans une majorité d'astrocytes en culture, mais aussi présentes *in vivo*. Pour expliquer ce phénomène, les connaissances actuelles sur la voie des ROS dérivées de la NADPH oxydase sont porteuses de plusieurs possibilités. Premièrement, on sait que les ROS peuvent, tel qu'illustré à la figure 10, en inhibant la Ca^{2+} -ATP-ase du réticulum endoplasmique (SERCA), entraîner une déplétion des stocks de Ca^{2+} du RE (Yan et coll., 2006). Une telle déplétion a été associée à l'inhibition de l'activité calcique spontanée astrocytaire (Parri et coll., 2001). La baisse de la disponibilité du NO consécutive à l'activation de la NADPH oxydase pourrait aussi être en cause sachant que le NO astrocytaire participe à la réplétion des stocks de Ca^{2+} du RE (Li et coll., 2003). Un modèle de réplétion des stocks a aussi été proposé selon lequel les stocks de Ca^{2+} du RE « rempli » gardent certains canaux plasmatiques qui permettent l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire dans le cytoplasme fermés (Putney et coll., 2001). On peut donc émettre l'hypothèse que si les stocks du RE astrocytaire sont abaissés par l'inhibition du NO, la $[\text{Ca}^{2+}]_C$ s'en retrouvera augmentée. Cela correspondrait avec ce que nous avons observé *in situ* sur tranches de cerveau. On pourrait s'attendre à ce que l'Ang II affecte ainsi la réponse calcique induite par des agonistes. Toutefois, nos données suggèrent que l'amplitude de la réponse à l'ATP n'est

pas modifiée par l'Ang II dans les astrocytes en culture (données non montrées). De plus, très récemment, Koide et coll. ont observé que les oscillations spontanées de plus forte amplitude qui sont retrouvées en contexte pathologique dans les pieds astrocytaires stimulaient les canaux BK astrocytaires et transformaient la vasodilatation en vasoconstriction. Toutefois en observant leurs résultats de plus près, on s'aperçoit qu'il semble exister une tendance associant ces oscillations de forte amplitude à une fréquence d'oscillation plus faible (Koide et coll., 2012). Il pourrait donc y avoir un certain lien entre amplitude et fréquence des réponses et les propriétés intrinsèques de la signalisation calcique astrocytaire comme la $[Ca^{2+}]_{lum}$. De plus, on sait que le Ca^{2+} astrocytaire semble affecter la phosphorylation de la protéine kinase C (PKC) qui elle en retour dicte la phase de terminaison des réponses calciques et la fréquence des oscillations (Codazzi et coll., 2001). De manière intéressante, on sait aussi que l'Ang II active la PKC dans plusieurs tissus (de Gasparo et coll., 2000). Toutes ces observations suggèrent qu'il faudrait évaluer la dynamique des oscillations calciques spontanées et les quantifier dans les pieds astrocytaires avec différentes concentrations d'Ang II. Cela nécessiterait un design expérimental *in situ* ou *in vivo* adéquat pour la réalisation de telles mesures.

6. Conséquences des observations

6.1 Ca²⁺ et effets pathologiques

Comme mentionné dans l'introduction de ce mémoire, plusieurs pathologies présentant un CNV altéré ont une dynamique calcique astrocytaire aberrante. Parfois, cela est associé directement à une modification de la réponse vasculaire. Un tel effet sera discuté dans la prochaine sous-section intitulée « conséquences de l'effet vasculaire ». Il faut toutefois ajouter qu'il est possible que cette altération de la signalisation calcique astrocytaire, comme nous l'avons retrouvé avec l'Ang II, participe aux dysfonctions vasculaires retrouvées dans ces pathologies. La possibilité contraire sera débattue dans la section 6.3. De plus, bien que les résultats présentés soient focalisés sur les pieds astrocytaires, donc à l'opposé anatomiquement parlant de la synapse, on peut suggérer par extensions qu'une modification de la dynamique calcique puisse participer à d'autres mécanismes pathologiques qui n'affectent pas nécessairement le CNV. Par exemple, on retrouve dans l'épilepsie une augmentation de la [Ca²⁺] astrocytaire qui entraîne la libération de glutamate, phénomène qui est associé avec la pathologie (Zorec et coll., 2012).

6.2 Conséquences de l'effet vasculaire

Il est important de comprendre l'impact pathologique possible du mouvement de la polarité de la réponse vasculaire que nous avons observé et dont l'Ang II est responsable. Plus spécifiquement, il s'agit de répondre à la question : quelles sont les conséquences de l'atténuation des réponses vasculaires vasodilatatrices et de la potentialisation des vasoconstrictions au niveau du cortex ? Une manière d'aborder cette

question est de regarder ce qui s'ensuit d'un effet semblable dans certaines pathologies cérébrales.

Une telle inversion du CNV a déjà été observée dans un modèle d'hémorragie subarachnoïde, une pathologie associée à une perfusion sanguine déficiente (Koide et coll., 2012). Toutefois, il reste à démontrer dans ce cas, si cela participe directement à la pathologie ou s'il s'agit d'un effet secondaire bénin. De plus, grâce à un modèle d'ischémie focale, Shin et coll. ont montré que la vasoconstriction privait le cortex d'une partie importante de l'approvisionnement en sang oxygéné en diminuant le CBF (Shin et coll., 2006). Cette observation n'est pas surprenante, si l'on rappelle que les petites artères du cortex somatosensoriel irriguent de grandes régions et apportent un tiers de la résistance périphérique (Iadecola et Nedergaard, 2007). Il est aussi possible qu'un autre processus important à l'élévation du CBF dans les artérioles, la vasodilatation rétrograde, soit affecté. En effet, suite à l'activation locale de la machinerie du CNV et à la vasodilatation d'une artériole cérébrale, un signal doit être transmis aux vaisseaux situés en amont afin qu'eux aussi se relaxent afin de permettre l'irrigation optimale de toute la branche artérielle. On croit que ce processus encore mal compris s'effectue entre autres par la transmission de signaux vasodilatateurs par les jonctions de type « gap » situées dans les cellules musculaires lisses des artérioles et l'endothélium (Iadecola, 2004; Iadecola et Nedergaard, 2007). Ainsi, la perte de ce signal pourrait décupler les conséquences de l'inversion de la polarité des réponses vasculaires retrouvée dans les petites artères du parenchyme.

6.3 L'effet vasculaire est-il dépendant de l'effet calcique ?

Il existe une possibilité que l'effet de l'Ang II sur la réponse vasculaire cérébrale soit indépendant de l'effet calcique retrouvé au niveau des astrocytes. En effet, il a déjà été démontré que l'octopeptide pouvait entraîner une augmentation de la $[Ca^{2+}]_C$ dans les neurones et causer de façon indépendante une augmentation des ROS dans ces derniers (Zimmerman et coll., 2005). Dans ce cas, seul l'effet des ROS pourrait affecter la réponse vasculaire. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait utiliser un tampon calcique intracellulaire dans tous les groupes expérimentaux et vérifier ainsi la réponse vasculaire (voir la sous-section « expérimentations futures»). Enfin, on ne peut exclure la possibilité qu'une partie de l'effet vasculaire soit dépendant des récepteurs de l'Ang II situés sur le muscle vasculaire lisse artériolaire ou sur les péricytes (Kazama et coll., 2004). Bien qu'aucun effet sur le tonus basal n'ait été observé en présence d'Ang II dans les présentes expérimentations, il demeure possible qu'une vasoconstriction soit masquée par l'effet sur le calcium astrocytaire du peptide.

6.4 Considérations anatomiques

Il est important de mentionner que bien que les hypothèses sur les différents mécanismes impliqués ont été abordées davantage du point de vue du contrôle de l'astrocyte sur la microvasculature en raison de notre hypothèse expérimentale et des résultats obtenus, différents types de cellules sont situés à proximité de l'unité astrocyto-vasculaire et pourraient, elles, être affectées par l'Ang II et participer à l'altération du CNV observée.

Nous savons toutefois que l'Ang II appliquée de manière topique sur le cortex ne modifie pas les potentiels évoqués somesthésiques (Kazama et coll., 2003) et nous avons déterminé en inhibant les influx nerveux avec la tétrodotoxine que ces derniers ne participent pas à l'altération du CNV induite par l'administration aiguë d'Ang II. On ne peut toutefois pas exclure un effet sur les neurones locaux qui en retour pourrait affecter la signalisation calcique astrocytaire ou la réponse vasculaire. Par exemple, il a été démontré dans l'hippocampe que les astrocytes sont en mesure de stimuler certains courants neuronaux par leur relâche de glutamate, même en présence de tétrodotoxine. De plus, la réponse endothélium dépendante pourrait elle aussi être affectée. Cependant, jusqu'à maintenant, aucune étude n'a démontré un rôle de l'endothélium dans le CNV, on suppose plutôt un rôle modulateur. Les ROS produites dans l'endothélium, qui est enrichi en NADPH oxydase (Kazama et coll., 2004), ou d'autres molécules comme le NO pourraient aussi affecter les pieds astrocytaires, puisqu'il sont situés à proximité immédiate de celui-ci. Ce pourrait aussi être le cas pour les neurones ou même la glie. Les expérimentations futures (voir sous-section « expérimentations futures ») auront pour but de confirmer les mécanismes astrocytaires proposés dans ce mémoire. Il faudra toutefois considérer en tout temps l'interaction avec les autres types cellulaires et considérer les processus pathologiques non seulement d'un point de vue local, mais à la fois d'un point de vue global.

6.5 Impact sur la pharmacothérapie et la recherche

Il apparaît que la potentialisation de la $[Ca^{2+}]$ dans les pieds astrocytaires que nous avons observée est responsable de l'altération de la réponse vasculaire dépendante de la

stimulation agoniste-dépendante des voies calciques astrocytaires. Cela demeure toutefois à être confirmé avec des expériences supplémentaires (voir la sous-section « expérimentations futures »). Ensemble avec les résultats de Girouard et coll. (Girouard et coll., 2010) et de Koide et coll. (Koide et coll., 2012), nos résultats suggèrent qu'il faille considérer les mécanismes affectant la $[Ca^{2+}]$ astrocytaire comme de nouvelles cibles pour le traitement de pathologies présentant une altération du CNV dépendante de la réponse calcique gliale. De plus, cette étude contribue à mieux comprendre comment les ARA exercent un effet protecteur dans de nombreuses pathologies associées à des anomalies du CNV. Il apparaît probable que les mécanismes de protection cérébrale ne soient pas les mêmes dans toutes ces pathologies, sachant qu'ils diffèrent entre différents modèles d'HA induite par l'Ang II. Il apparaît même qu'un ARA peut agir à plusieurs niveaux. Par exemple, pour l'HA, l'effet protecteur des ARA semble s'établir au niveau de l'inhibition des ROS produits dans l'OSF. Toutefois, grâce à l'application topique d'un ARA (le losartan) au niveau du cortex, il est aussi possible de réduire localement une partie des dysfonctions du CNV associées au modèle d'HA induite par l'Ang II (Capone et coll., 2012). D'une manière qui semble similaire, dans un modèle d'AD, l'omesartan rétablit aussi l'hyperémie fonctionnelle, tout en diminuant les ROS retrouvées au niveau des artérioles (Takeda et coll., 2009). Par contre, une partie de l'effet protecteur associé à certains ARA pourrait dépendre de propriétés propres à ceux-ci et non de leur effet antagoniste sur le récepteur AT_1 . Cela semble être le cas pour le telmisartan et son effet sur les récepteurs PPAR (de l'anglais : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) gamma qui est protecteur dans un modèle d'AD (Tsukuda et coll., 2009). Une des raisons pour laquelle nous avons choisi d'employer le candesartan dans

nos expérimentations est d'ailleurs qu'il présente la plus faible affinité pour ces récepteurs parmi tous les ARA (Marshall et coll., 2006).

7. Limitations

La technique de mesure du CBF *in vivo* par le FLD présente certaines limites. Entre autres, tous les anesthésiants utilisés présentent certains effets sur le CBF ou sur des composantes du CNV. Comme beaucoup des auteurs des études les plus récentes, nous avons choisi l'emploi de l'alpha-chloralose et de l'uréthane. Présentant moins d'effet sur l'activité neuronale et cardiorespiratoire il semble toutefois que ces anesthésiants peuvent augmenter la dépendance du CNV au NO (Nakao et coll., 2001). Considérant les mécanismes proposés, dont l'effet des ROS sur la disponibilité du NO, cela pourrait avoir des conséquences significatives justifiant d'être prise en considération. L'option alternative consistant à mesurer le CBF chez le rongeur éveillé est toutefois praticable. Par contre, il faut tenir compte des conséquences du stress induit par la contention de l'animal qui pourraient elles aussi influencer le CNV. De plus, en considérant que toute expérience future impliquant des manœuvres plus invasives nécessitera l'anesthésie, il faut réfléchir sur la comparabilité des données lors du choix initial des anesthésiants (Masamoto et Kanno, 2012). Un autre défi associé à la FDL est qu'elle requiert une surveillance minutieuse et continue des paramètres de circulation sanguine et de la respiration de l'animal (Iadecola et Nedergaard, 2007), ce qui a été effectué dans les expériences rapportées ici. Enfin, bien qu'aucune donnée ne semble suggérer un tel effet et considérant les mécanismes proposés dans ce mémoire, il serait important de vérifier que ces anesthésiants n'ont pas d'effet sur la signalisation calcique astrocytaire.

La mesure de la réponse calcique et vasculaire sur tranches aiguës *in situ* a quant à elle la contrainte de ne pas présenter de débit sanguin à l'intérieur des artères, qui sont par le fait même dénuées de tonus vasculaire. De plus, les stimulations impliquent des méthodes artificielles (par exemple la stimulation directe avec des agonistes des récepteurs astrocytaires) et l'apport d'oxygène se fait par l'extérieur au lieu de l'intérieur des vaisseaux sanguins (Iadecola et Nedergaard, 2007). Afin de simuler le tonus vasculaire dans notre modèle, une précontraction a été effectuée avec un agoniste des récepteurs du thromboxane. Pour s'assurer de l'absence d'interaction de ce dernier avec les mécanismes étudiés, il serait essentiel de comparer nos résultats en utilisant un autre agent vasoconstricteur. De plus, pour identifier les astrocytes, le SR-101 a été employé. Récemment toutefois, Kang et coll. ont soulevé la possibilité que ce composé puisse activer les récepteurs NMDA du glutamate (Kang et coll., 2010). Par contre, la concentration utilisée par ces derniers (10^{-3}M) est supérieure à celle que nous avons employée durant l'incubation des tranches (10^{-4}M). Un lavage par la perfusion de LCR a de plus été effectué avant le début de toute expérience. De surcroît, le SR-101 ne semble pas présenter d'effet sur le CNV puisqu'aucune différence significative n'a été observée dans certaines expériences que nous avons effectuées en absence de SR-101 (données non montrées). Il semble enfin que le marqueur n'affecte pas l'activité calcique *in vivo* (Hirase et coll., 2004).

8. Expérimentations futures

Nous pouvons à la lumière des résultats obtenus et présentés dans ce mémoire, suggérer quelques expériences qui représentent une suite logique et pourraient permettre de vérifier certaines hypothèses formulées dans les dernières sections de cet ouvrage. Elles seront décrites autant que possible dans un ordre chronologique ou selon leur importance. Premièrement, il est incontournable de vérifier si la potentialisation de la réponse calcique des pieds astrocytaires participe effectivement à l'effet observé sur la réponse vasculaire comme le suggèrent nos résultats et si elle est nécessaire à celui-ci. Pour ce faire, un modèle dans lequel on peut abaisser l'amplitude de cette réponse devrait être adéquat. Il pourrait être intéressant d'utiliser les propriétés de tampon calciques exogènes qui seraient injectés dans un astrocyte ou alternativement la surexpression de tampons endogènes par ces mêmes cellules. Il faut toutefois faire attention de bien distinguer l'effet sur l'amplitude de la réponse calcique initiale de l'effet retrouvé sur la propagation des vagues intercellulaire. En effet, cette propagation peut être influencée par l'effet de ces tampons endogènes (Wang et coll., 1997). Dans le même ordre d'idées, il serait ainsi important de vérifier si l'Ang II module la propagation des signaux calciques entre astrocytes (vitesse et distance des vagues calciques, synchronisme des oscillations spontanées, etc.), puisque cela pourrait affecter la réponse vasculaire (Mulligan et MacVicar, 2004).

Par la suite, bien que nous ayons établi que l'Ang II administrée de manière topique diminue la réponse d'augmentation du CBF *in vivo*, il faudrait vérifier de la même

manière si l'effet sur le calcium astrocytaire et sur la réponse vasculaire sont les mêmes que ceux observés sur tranches de cerveau. La microscopie multiphoton *in vivo* a déjà été employée afin d'observer la réponse calcique astrocytaire et la réponse vasculaire (Takano et coll., 2006). Toutefois, l'estimation de la concentration calcique en utilisant la ionomycine telle que nous l'avons effectuée sur tranches de cerveau apparaît difficilement applicable *in vivo*, une des raisons étant qu'elle induit des dommages cellulaires importants. Il faudrait donc envisager une autre approche de quantification.

Ensuite, dans le but d'approfondir la compréhension des mécanismes en cause, il serait important de vérifier l'implication de la voie des ROS. D'abord, l'emploi de capteurs de ROS ou d'antioxydants *in vivo* et *in situ* pourrait répondre à la question de leur implication à la fois dans la réponse calcique et dans la réponse vasculaire. L'inhibiteur de la NADPH oxydase (Capone et coll., 2011), ou alternativement la souris transgénique présentant une enzyme déficiente de ce complexe (Kazama et coll., 2004) en combinaison avec des marquages fluorescents du stress oxydant en comarqueage avec des indicateurs anatomiques, permettraient de déterminer l'origine des ROS.

Dans la mesure où la relation entre l'altération de la réponse calcique astrocytaire et vasculaire est confirmée, comme discuté plus tôt, le mécanisme étant le plus susceptible d'être en cause est celui des canaux BK et du K^+ . L'utilisation de molécules inhibant ces canaux comme la paxilline (Girouard et coll., 2010) ou d'un modèle génétique de souris présentant une absence de la sous-unité β_4 (Brenner et coll., 2005) des canaux BK pourraient permettre de circonscrire le rôle de ces derniers. La mesure des

concentrations potassiques dans l'espace périvasculaire ou encore celle des propriétés électrophysiologiques des canaux BK astrocytaires et vasculaires et de celles de la membrane des cellules musculaires lisses et de l'astrocyte en présence de l'octopeptide pourraient apporter des données davantage précises.

De plus, comme Capone et coll. l'ont démontré, lorsque l'octopeptide est administré de manière systémique, les mécanismes impliqués dans les effets aigus versus chroniques de l'Ang II sur le CNV peuvent varier grandement (Capone et coll., 2010; Capone et coll., 2012). Puisqu'il est très probable que les mécanismes délétères associés à une augmentation locale d'Ang II dans le cortex somatosensoriel varient de manière similaire dans le temps, l'administration intracérébrale chronique d'Ang II, par exemple à l'aide d'une minipompe osmotique, constituerait un bon moyen de vérifier cette possibilité.

Enfin, une manière intéressante d'étudier comment l'Ang II affecte la dynamique du Ca^{2+} et de l' IP_3 serait d'employer des indicateurs cytosoliques et luminaux spécifiques permettant leur visualisation dans les compartiments astrocytaires. Des indicateurs permettant la quantification sont à privilégier.

9. Conclusion

En somme, nous avons démontré que l'Ang II induit une altération de la réponse calcique dans les pieds astrocytaires et une translation de la réponse vasculaire qu'elle

déplace vers la vasoconstriction. Ensemble, cela apparait expliquer en totalité ou en partie la diminution de la réponse d'augmentation du CBF causée par le peptide dans le cortex somatosensoriel que nous avons mesurée lorsque ce dernier est appliqué de manière topique. Les résultats présentés viennent appuyer l'importance de la signalisation calcique astrocytaire dans le CNV. De plus, mis ensemble avec ceux démontrant une altération de cette dernière dans certaines pathologies où le CNV est altéré, ils supportent l'importance de continuer l'investigation des mécanismes pathologiques proposés. Cela permettra entre autres d'identifier des cibles pharmacologiques permettant de rétablir ce processus important et éventuellement de traiter ces maladies qui représentent ensemble, un fardeau important pour notre société vieillissante. En outre, l'étude des mécanismes qui gouvernent la signalisation calcique astrocytaire permettra de mieux comprendre le CNV et éventuellement, d'utiliser avec un meilleur discernement les technologies médicales qui s'appuient sur ce mécanisme.

IV. Bibliographie

- Abbott, N.J. (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 200, 629-638.
- Abramov, A.Y., et Duchen, M.R. (2005). The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360, 2309-2314.
- Aguado, F., Espinosa-Parrilla, J.F., Carmona, M.A., et Soriano, E. (2002). Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J Neurosci* 22, 9430-9444.
- Alkayed, N.J., Narayanan, J., Gebremedhin, D., Medhora, M., Roman, R.J., et Harder, D.R. (1996). Molecular characterization of an arachidonic acid epoxygenase in rat brain astrocytes. *Stroke* 27, 971-979.
- Alliot, F., Rutin, J., Leenen, P.J., et Pessac, B. (1999). Brain parenchyma vessels and the angiotensin system. *Brain Res* 830, 101-112.
- Appaix, F., Girod, S., Boisseau, S., Romer, J., Vial, J.C., Albrieux, M., Maurin, M., Depaulis, A., Guillemain, I., et Van Der Sanden, B. (2012). Specific in vivo staining of astrocytes in the whole brain after intravenous injection of sulforhodamine dyes. *PLoS One* 7, e35169.
- Astrup, J., Siesjo, B.K., et Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12, 723-725.
- Audoly, L.P., Oliverio, M.I., et Coffman, T.M. (2000). Insights into the functions of type 1 (AT1) angiotensin II receptors provided by gene targeting. *Trends Endocrinol Metab* 11, 263-269.
- Baeres, F.M., et Moller, M. (2004). Origin of PACAP-immunoreactive nerve fibers innervating the subarachnoidal blood vessels of the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 24, 628-635.
- Balazs, R., Miller, S., Romano, C., De Vries, A., Chun, Y., et Cotman, C.W. (1997). Metabotropic glutamate receptor mGluR5 in astrocytes: pharmacological properties and agonist regulation. *J Neurochem* 69, 151-163.
- Baltatu, O., Nishimura, H., Hoffmann, S., Stoltenburg, G., Haulica, I.D., Lippoldt, A., Ganten, D., et Urata, H. (1997). High levels of human chymase expression in the pineal and pituitary glands. *Brain Res* 752, 269-278.
- Bass, N.H., Hess, H.H., Pope, A., et Thalheimer, C. (1971). Quantitative cytoarchitectonic distribution of neurons, glia, and DNA in rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 143, 481-490.
- Beason-Held, L.L., Moghekar, A., Zonderman, A.B., Kraut, M.A., et Resnick, S.M.

- (2007). Longitudinal changes in cerebral blood flow in the older hypertensive brain. *Stroke* 38, 1766-1773.
- Bergles, D.E., Diamond, J.S., et Jahr, C.E. (1999). Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 9, 293-298.
- Bezprozvanny, I., et Ehrlich, B.E. (1995). The inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptor. *J Membr Biol* 145, 205-216.
- Bezprozvanny, I., Watras, J., et Ehrlich, B.E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 351, 751-754.
- Blanco, V.M., Stern, J.E., et Filosa, J.A. (2008). Tone-dependent vascular responses to astrocyte-derived signals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H2855-2863.
- Boitano, S., Dirksen, E.R., et Sanderson, M.J. (1992). Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science* 258, 292-295.
- Bowman, C.L., et Kimelberg, H.K. (1984). Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. *Nature* 311, 656-659.
- Brenner, R., Chen, Q.H., Vilaythong, A., Toney, G.M., Noebels, J.L., et Aldrich, R.W. (2005). BK channel beta4 subunit reduces dentate gyrus excitability and protects against temporal lobe seizures. *Nat Neurosci* 8, 1752-1759.
- Brix, G., Lechel, U., Glatting, G., Ziegler, S.I., Munzing, W., Muller, S.P., et Beyer, T. (2005). Radiation exposure of patients undergoing whole-body dual-modality 18F-FDG PET/CT examinations. *J Nucl Med* 46, 608-613.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., et Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22, 183-192.
- Capone, C., Faraco, G., Anrather, J., Zhou, P., et Iadecola, C. (2010). Cyclooxygenase 1-derived prostaglandin E2 and EP1 receptors are required for the cerebrovascular dysfunction induced by angiotensin II. *Hypertension* 55, 911-917.
- Capone, C., Faraco, G., Park, L., Cao, X., Davisson, R.L., et Iadecola, C. (2011). The cerebrovascular dysfunction induced by slow pressor doses of angiotensin II precedes the development of hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300, H397-407.
- Capone, C., Faraco, G., Peterson, J.R., Coleman, C., Anrather, J., Milner, T.A., Pickel, V.M., Davisson, R.L., et Iadecola, C. (2012). Central cardiovascular circuits contribute to the neurovascular dysfunction in angiotensin II hypertension. *J Neurosci* 32, 4878-4886.
- Cauli, B., Tong, X.K., Rancillac, A., Serluca, N., Lambolez, B., Rossier, J., et Hamel, E. (2004). Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J Neurosci* 24, 8940-8949.
- Chan, S.H., Tai, M.H., Li, C.Y., et Chan, J.Y. (2006). Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxide dismutases and catalase contributes to oxidative stress and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Free Radic Biol Med* 40, 2028-2039.
- Chauvel, E.N., Llorens-Cortes, C., Coric, P., Wilk, S., Roques, B.P., et Fournie-Zaluski, M.C. (1994). Differential inhibition of aminopeptidase A and aminopeptidase N by new beta-amino thiols. *J Med Chem* 37, 2950-2957.

- Choi, M., Yoon, J., Ku, T., Choi, K., et Choi, C. (2011). Label-free optical activation of astrocyte in vivo. *J Biomed Opt* 16, 075003.
- Codazzi, F., Teruel, M.N., et Meyer, T. (2001). Control of astrocyte Ca(2+) oscillations and waves by oscillating translocation and activation of protein kinase C. *Curr Biol* 11, 1089-1097.
- Coddou, C., Codocedo, J.F., Li, S., Lillo, J.G., Acuna-Castillo, C., Bull, P., Stojilkovic, S.S., et Huidobro-Toro, J.P. (2009). Reactive oxygen species potentiate the P2X2 receptor activity through intracellular Cys430. *J Neurosci* 29, 12284-12291.
- Cohen, Z., Ehret, M., Maitre, M., et Hamel, E. (1995). Ultrastructural analysis of tryptophan hydroxylase immunoreactive nerve terminals in the rat cerebral cortex and hippocampus: their associations with local blood vessels. *Neuroscience* 66, 555-569.
- Cohen, Z., Molinatti, G., et Hamel, E. (1997). Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 17, 894-904.
- Condorelli, D.F., Dell'albani, P., Amico, C., Casabona, G., Genazzani, A.A., Sortino, M.A., et Nicoletti, F. (1992). Development profile of metabotropic glutamate receptor mRNA in rat brain. *Mol Pharmacol* 41, 660-664.
- Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., et Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247, 470-473.
- D'ascenzo, M., Fellin, T., Terunuma, M., Revilla-Sanchez, R., Meaney, D.F., Auberson, Y.P., Moss, S.J., et Haydon, P.G. (2007). mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1995-2000.
- Dabertrand, F., Hannah, R.M., Pearson, J.M., Hill-Eubanks, D.C., Brayden, J.E., et Nelson, M.T. (2013). Prostaglandin E2, a postulated astrocyte-derived neurovascular coupling agent, constricts rather than dilates parenchymal arterioles. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 479-482.
- Dani, J.W., et Smith, S.J. (1995). The triggering of astrocytic calcium waves by NMDA-induced neuronal activation. *Ciba Found Symp* 188, 195-205; discussion 205-199.
- Danielyan, L., Klein, R., Hanson, L.R., Buadze, M., Schwab, M., Gleiter, C.H., et Frey, W.H. (2010). Protective effects of intranasal losartan in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Rejuvenation Res* 13, 195-201.
- Davisson, R.L., Oliverio, M.I., Coffman, T.M., et Sigmund, C.D. (2000). Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain. *J Clin Invest* 106, 103-106.
- De Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., et Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52, 415-472.
- De Mello, W.C., et Danser, A.H.J. (2000). Angiotensin II and the Heart. *Hypertension* 35, 1183-1188.
- Detre, J.A., Ances, B.M., Takahashi, K., et Greenberg, J.H. (1998). Signal averaged laser Doppler measurements of activation-flow coupling in the rat forepaw somatosensory cortex. *Brain Res* 796, 91-98.

- Dickinson, C.J. (1961). Functional efficiency of the circle of Willis. Implications for reconstructive surgery of main cerebral arteries. *Br Med J* 1, 858-859.
- Ding, S., Fellin, T., Zhu, Y., Lee, S.Y., Auberson, Y.P., Meaney, D.F., Coulter, D.A., Carmignoto, G., et Haydon, P.G. (2007). Enhanced astrocytic Ca²⁺ signals contribute to neuronal excitotoxicity after status epilepticus. *J Neurosci* 27, 10674-10684.
- Dirnagl, U., Kaplan, B., Jacewicz, M., et Pulsinelli, W. (1989). Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 9, 589-596.
- Doobay, M.F., Talman, L.S., Obr, T.D., Tian, X., Davisson, R.L., et Lazartigues, E. (2007). Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin-angiotensin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R373-381.
- Duchemin, S., Boily, M., Sadekova, N., et Girouard, H. (2012). The complex contribution of NOS interneurons in the physiology of cerebrovascular regulation. *Front Neural Circuits* 6, 51.
- Edvinsson, L., et Krause, D.N. (2002). *Cerebral Blood Flow and Metabolism*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 521 p.
- Ekstrom, A. (2010). How and when the fMRI BOLD signal relates to underlying neural activity: the danger in dissociation. *Brain Res Rev* 62, 233-244.
- Fagan, S.C., Kozak, A., Hill, W.D., Pollock, D.M., Xu, L., Johnson, M.H., Ergul, A., et Hess, D.C. (2006). Hypertension after experimental cerebral ischemia: candesartan provides neurovascular protection. *J Hypertens* 24, 535-539.
- Farr, H., et David, T. (2011). Models of neurovascular coupling via potassium and EET signalling. *J Theor Biol* 286, 13-23.
- Fatatis, A., et Russell, J.T. (1992). Spontaneous changes in intracellular calcium concentration in type I astrocytes from rat cerebral cortex in primary culture. *Glia* 5, 95-104.
- Filosa, J.A., Bonev, A.D., Straub, S.V., Meredith, A.L., Wilkerson, M.K., Aldrich, R.W., et Nelson, M.T. (2006). Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat Neurosci* 9, 1397-1403.
- Fleegal-Demotta, M.A., Doghu, S., et Banks, W.A. (2009). Angiotensin II modulates BBB permeability via activation of the AT(1) receptor in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 640-647.
- Fraiman, D., et Dawson, S.P. (2004). A model of IP₃ receptor with a luminal calcium binding site: stochastic simulations and analysis. *Cell Calcium* 35, 403-413.
- Friel, D.D. (2000). Mitochondria as regulators of stimulus-evoked calcium signals in neurons. *Cell Calcium* 28, 307-316.
- Gallagher, P.E., Chappell, M.C., Ferrario, C.M., et Tallant, E.A. (2006). Distinct roles for ANG II and ANG-(1-7) in the regulation of angiotensin-converting enzyme 2 in rat astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C420-426.
- Ganong, W.F. (1993). Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol* 14, 233-249.
- Ganong, W.F. (2005). «Les circulations régionales spéciales» dans *Physiologie*

- médicale.* : De Boeck Supérieur, 580-581.
- Gebke, E., Muller, A.R., Jurzak, M., et Gerstberger, R. (1998). Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience* 85, 509-520.
- Gebremedhin, D., Yamaura, K., Zhang, C., Bylund, J., Koehler, R.C., et Harder, D.R. (2003). Metabotropic glutamate receptor activation enhances the activities of two types of Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 23, 1678-1687.
- Gelband, C.H., Sumners, C., Lu, D., et Raizada, M.K. (1998). Angiotensin receptors and norepinephrine neuromodulation: implications of functional coupling. *Regul Pept* 73, 141-147.
- Girouard, H., Bonev, A.D., Hannah, R.M., Meredith, A., Aldrich, R.W., et Nelson, M.T. (2010). Astrocytic endfoot Ca²⁺ and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3811-3816.
- Girouard, H., Park, L., Anrather, J., Zhou, P., et Iadecola, C. (2007). Cerebrovascular nitrosative stress mediates neurovascular and endothelial dysfunction induced by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 303-309.
- Golovina, V.A., et Blaustein, M.P. (2000). Unloading and refilling of two classes of spatially resolved endoplasmic reticulum Ca(2+) stores in astrocytes. *Glia* 31, 15-28.
- Gordon, G.R., Choi, H.B., Rungta, R.L., Ellis-Davies, G.C., et Macvicar, B.A. (2008). Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456, 745-749.
- Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V., Charles, A.C., et Kater, S.B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19, 520-528.
- Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D., et Taugner, R. (1990). Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70, 1067-1116.
- Hamel, E. (2006). Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* 100, 1059-1064.
- Hebert, L.E., Weuve, J., Scherr, P.A., et Evans, D.A. (2013). Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 80, 1778-1783.
- Hermann, K., Raizada, M.K., Sumners, C., et Phillips, M.I. (1987). Presence of renin in primary neuronal and glial cells from rat brain. *Brain Res* 437, 205-213.
- Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., et Robinson, S.R. (1999). Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* 57, 417-428.
- Hirase, H., Qian, L., Bartho, P., et Buzsaki, G. (2004). Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biol* 2, E96.
- Horiuchi, M., et Mogi, M. (2011). Role of angiotensin II receptor subtype activation in cognitive function and ischaemic brain damage. *Br J Pharmacol* 163, 1122-1130.
- Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., et Giaume, C. (2008). Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* 28, 5207-5217.
- Hu, Q., Zheng, G., Zweier, J.L., Deshpande, S., Irani, K., et Ziegelstein, R.C. (2000).

- NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular Ca^{2+} stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells. *J Biol Chem* 275, 15749-15757.
- Hurley, S.D., Olschowka, J.A., et O'banion, M.K. (2002). Cyclooxygenase inhibition as a strategy to ameliorate brain injury. *J Neurotrauma* 19, 1-15.
- Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5, 347-360.
- Iadecola, C., et Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 10, 1369-1376.
- Ito, T., Eggena, P., Barrett, J.D., Katz, D., Metter, J., et Sambhi, M.P. (1980). Studies on angiotensinogen of plasma and cerebrospinal fluid in normal and hypertensive human subjects. *Hypertension* 2, 432-436.
- Ito, T., Yamakawa, H., Bregonzio, C., Terron, J.A., Falcon-Neri, A., et Saavedra, J.M. (2002). Protection against ischemia and improvement of cerebral blood flow in genetically hypertensive rats by chronic pretreatment with an angiotensin II AT1 antagonist. *Stroke* 33, 2297-2303.
- Ito, U., Hakamata, Y., Kawakami, E., et Oyanagi, K. (2011). Temporary [corrected] cerebral ischemia results in swollen astrocytic end-feet that compress microvessels and lead to delayed [corrected] focal cortical infarction. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 328-338.
- Jaiswal, N., Tallant, E.A., Diz, D.I., Khosla, M.C., et Ferrario, C.M. (1991). Subtype 2 angiotensin receptors mediate prostaglandin synthesis in human astrocytes. *Hypertension* 17, 1115-1120.
- Jennings, J.R., Muldoon, M.F., Ryan, C., Price, J.C., Greer, P., Sutton-Tyrrell, K., Van Der Veen, F.M., et Meltzer, C.C. (2005). Reduced cerebral blood flow response and compensation among patients with untreated hypertension. *Neurology* 64, 1358-1365.
- Johren, O., et Saavedra, J.M. (1996). Expression of AT1A and AT1B angiotensin II receptor messenger RNA in forebrain of 2-wk-old rats. *Am J Physiol* 271, E104-112.
- Jolivet, R., Magistretti, P.J., et Weber, B. (2009). Deciphering neuron-glia compartmentalization in cortical energy metabolism. *Front Neuroenergetics* 1, 4.
- Jones, E.G. (1970). On the mode of entry of blood vessels into the cerebral cortex. *J Anat* 106, 507-520.
- Jueptner, M., et Weiller, C. (1995). Review: does measurement of regional cerebral blood flow reflect synaptic activity? Implications for PET and fMRI. *Neuroimage* 2, 148-156.
- Kang, J., Jiang, L., Goldman, S.A., et Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1, 683-692.
- Kang, J., Kang, N., Yu, Y., Zhang, J., Petersen, N., Tian, G.F., et Nedergaard, M. (2010). Sulforhodamine 101 induces long-term potentiation of intrinsic excitability and synaptic efficacy in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuroscience* 169, 1601-1609.
- Kazama, K., Anrather, J., Zhou, P., Girouard, H., Frys, K., Milner, T.A., et Iadecola, C. (2004). Angiotensin II impairs neurovascular coupling in neocortex through

- NADPH oxidase-derived radicals. *Circ Res* 95, 1019-1026.
- Kazama, K., Wang, G., Frys, K., Anrather, J., et Iadecola, C. (2003). Angiotensin II attenuates functional hyperemia in the mouse somatosensory cortex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H1890-1899.
- Kessler, R.M. (2003). Imaging methods for evaluating brain function in man. *Neurobiol Aging* 24 Suppl 1, S21-35; discussion S37-29.
- Kety, S.S., et Schmidt, C.F. (1948). The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man; theory, procedure and normal values. *J Clin Invest* 27, 476-483.
- Kitami, Y., Okura, T., Marumoto, K., Wakamiya, R., et Hiwada, K. (1992). Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptor subtypes in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 188, 446-452.
- Kleinfeld, D., Mitra, P.P., Helmchen, F., et Denk, W. (1998). Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15741-15746.
- Ko, K.R., Ngai, A.C., et Winn, H.R. (1990). Role of adenosine in regulation of regional cerebral blood flow in sensory cortex. *Am J Physiol* 259, H1703-1708.
- Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L.G., et Nishiyama, A. (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 59, 251-287.
- Koide, M., Bonev, A.D., Nelson, M.T., et Wellman, G.C. (2012). Inversion of neurovascular coupling by subarachnoid blood depends on large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E1387-1395.
- Koizumi, S., Fujishita, K., Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., et Inoue, K. (2003). Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11023-11028.
- Konishi, H., Kuroda, S., Inada, Y., et Fujisawa, Y. (1994). Novel subtype of human angiotensin II type 1 receptor: cDNA cloning and expression. *Biochem Biophys Res Commun* 199, 467-474.
- Krainik, A., Hund-Georgiadis, M., Zysset, S., et Von Cramon, D.Y. (2005). Regional impairment of cerebrovascular reactivity and BOLD signal in adults after stroke. *Stroke* 36, 1146-1152.
- Kramar, E.A., Harding, J.W., et Wright, J.W. (1997). Angiotensin II- and IV-induced changes in cerebral blood flow. Roles of AT1, AT2, and AT4 receptor subtypes. *Regul Pept* 68, 131-138.
- Kramer, S.P. (1912). On the Function of the Circle of Willis. *J Exp Med* 15, 348-364.
- Kuchibhotla, K.V., Lattarulo, C.R., Hyman, B.T., et Bacsikai, B.J. (2009). Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science* 323, 1211-1215.
- Lassen, N.A. (1959). Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiol Rev* 39, 183-238.
- Lavoie, J.L., Cassell, M.D., Gross, K.W., et Sigmund, C.D. (2004). Localization of renin expressing cells in the brain, by use of a REN-eGFP transgenic model. *Physiol Genomics* 16, 240-246.
- Law, M., Saindane, A.M., Ge, Y., Babb, J.S., Johnson, G., Mannon, L.J., Herbert, J., et

- Grossman, R.I. (2004). Microvascular abnormality in relapsing-remitting multiple sclerosis: perfusion MR imaging findings in normal-appearing white matter. *Radiology* 231, 645-652.
- Lecrux, C., Toussay, X., Kocharyan, A., Fernandes, P., Neupane, S., Levesque, M., Plaisier, F., Shmuel, A., Cauli, B., et Hamel, E. (2011). Pyramidal neurons are "neurogenic hubs" in the neurovascular coupling response to whisker stimulation. *J Neurosci* 31, 9836-9847.
- Lee, M.Y., et Griendling, K.K. (2008). Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal* 10, 1045-1059.
- Lenkei, Z., Corvol, P., et Llorens-Cortes, C. (1995). The angiotensin receptor subtype AT1A predominates in rat forebrain areas involved in blood pressure, body fluid homeostasis and neuroendocrine control. *Brain Res Mol Brain Res* 30, 53-60.
- Lenkei, Z., Palkovits, M., Corvol, P., et Llorens-Cortes, C. (1997). Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol* 18, 383-439.
- Li, J., Culman, J., Hortnagl, H., Zhao, Y., Gerova, N., Timm, M., Blume, A., Zimmermann, M., Seidel, K., Dirnagl, U., et Unger, T. (2005). Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J* 19, 617-619.
- Li, N., Sul, J.Y., et Haydon, P.G. (2003). A calcium-induced calcium influx factor, nitric oxide, modulates the refilling of calcium stores in astrocytes. *J Neurosci* 23, 10302-10310.
- Li, N.C., Lee, A., Whitmer, R.A., Kivipelto, M., Lawler, E., Kazis, L.E., et Wolozin, B. (2010). Use of angiotensin receptor blockers and risk of dementia in a predominantly male population: prospective cohort analysis. *BMJ* 340, b5465.
- Liu, X., Li, C., Falck, J.R., Roman, R.J., Harder, D.R., et Koehler, R.C. (2008). Interaction of nitric oxide, 20-HETE, and EETs during functional hyperemia in whisker barrel cortex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H619-631.
- Logothetis, N.K., Pauls, J., Augath, M., Trinath, T., et Oeltermann, A. (2001). Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* 412, 150-157.
- Logothetis, N.K., et Wandell, B.A. (2004). Interpreting the BOLD signal. *Annu Rev Physiol* 66, 735-769.
- Macgregor, D.P., Murone, C., Song, K., Allen, A.M., Paxinos, G., et Mendelsohn, F.A. (1995). Angiotensin II receptor subtypes in the human central nervous system. *Brain Res* 675, 231-240.
- Macvicar, B.A. (1984). Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science* 226, 1345-1347.
- Magistretti, P.J. (2008). «Brain energy metabolism» dans *Fundamental Neuroscience*, eds. L.R. Squire, F.E. Bloom et N.C. Spitzer. 3e ed (San Diego: Academic Press), 271-296.
- Mak, D.O., McBride, S., et Foskett, J.K. (1998). Inositol 1,4,5-trisphosphate [correction of tris-phosphate] activation of inositol trisphosphate [correction of tris-phosphate] receptor Ca²⁺ channel by ligand tuning of Ca²⁺ inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15821-15825.

- Marshall, T.G., Lee, R.E., et Marshall, F.E. (2006). Common angiotensin receptor blockers may directly modulate the immune system via VDR, PPAR and CCR2b. *Theor Biol Med Model* 3, 1.
- Masamoto, K., et Kanno, I. (2012). Anesthesia and the quantitative evaluation of neurovascular coupling. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 1233-1247.
- Mathiisen, T.M., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., et 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.
- Matsusaka, T., Niimura, F., Shimizu, A., Pastan, I., Saito, A., Kobori, H., Nishiyama, A., et Ichikawa, I. (2012). Liver Angiotensinogen Is the Primary Source of Renal Angiotensin II. *J Am Soc Nephrol*, doi: 10.1681/ASN.2011121159.
- Matsushita, T., Isobe, N., Kawajiri, M., Mogi, M., Tsukuda, K., Horiuchi, M., Ohyagi, Y., et Kira, J. (2010). CSF angiotensin II and angiotensin-converting enzyme levels in anti-aquaporin-4 autoimmunity. *J Neurol Sci* 295, 41-45.
- Mccormick, D.A. (1992). Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Prog Neurobiol* 39, 337-388.
- Mckinley, M.J., Allen, A.M., Clevers, J., Paxinos, G., et Mendelsohn, F.A. (1987). Angiotensin receptor binding in human hypothalamus: autoradiographic localization. *Brain Res* 420, 375-379.
- Metaa, M.R., et Newman, E.A. (2006). Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J Neurosci* 26, 2862-2870.
- Millan, M.A., Jacobowitz, D.M., Aguilera, G., et Catt, K.J. (1991). Differential distribution of AT1 and AT2 angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11440-11444.
- Miller, R.H., et Raff, M.C. (1984). Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci* 4, 585-592.
- Milsted, A., Barna, B.P., Ransohoff, R.M., Brosnihan, K.B., et Ferrario, C.M. (1990). Astrocyte cultures derived from human brain tissue express angiotensinogen mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5720-5723.
- Mistry, D.K., et Garland, C.J. (1998). Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 124, 1131-1140.
- Monti, J., Schinke, M., Böhm, M., Ganten, D., Bader, M., et Bricca, G. (2001). Glial angiotensinogen regulates brain angiotensin II receptors in transgenic rats TGR(ASrAOGEN). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280, R233-R240.
- Moreno, A., Jego, P., De La Cruz, F., et Canals, S. (2013). Neurophysiological, metabolic and cellular compartments that drive neurovascular coupling and neuroimaging signals. *Front Neuroenergetics* 5, 3.
- Morimoto, S., Cassell, M.D., et Sigmund, C.D. (2002). The brain renin-angiotensin system in transgenic mice carrying a highly regulated human renin transgene. *Circ Res* 90, 80-86.
- Mossi, A. (1880). *Sulla circolazione del sangue nel cervello dell'uomo*. Rome: Coi Tipi Del Salviucci.
- Muller, M., Van Der Graaf, Y., Visseren, F.L., Mali, W.P., Geerlings, M.I., et Group, S.S.

- (2012). Hypertension and longitudinal changes in cerebral blood flow: the SMART-MR study. *Ann Neurol* 71, 825-833.
- Mulligan, S.J., et Macvicar, B.A. (2004). Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431, 195-199.
- Nakao, Y., Itoh, Y., Kuang, T.Y., Cook, M., Jehle, J., et Sokoloff, L. (2001). Effects of anesthesia on functional activation of cerebral blood flow and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7593-7598.
- Nedergaard, M., Ransom, B., et Goldman, S.A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26, 523-530.
- Nett, W.J., Oloff, S.H., et Mccarthy, K.D. (2002). Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiol* 87, 528-537.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J.N., et Helmchen, F. (2004). Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods* 1, 31-37.
- Nishimura, N., Schaffer, C.B., Friedman, B., Lyden, P.D., et Kleinfeld, D. (2007). Penetrating arterioles are a bottleneck in the perfusion of neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 365-370.
- Niwa, K., Araki, E., Morham, S.G., Ross, M.E., et Iadecola, C. (2000). Cyclooxygenase-2 contributes to functional hyperemia in whisker-barrel cortex. *J Neurosci* 20, 763-770.
- Nizar, K., Uhlirova, H., Tian, P., Saisan, P.A., Cheng, Q., Reznichenko, L., Weldy, K.L., Steed, T.C., Sridhar, V.B., Macdonald, C.L., Cui, J., Gratiy, S.L., Sakadzic, S., Boas, D.A., Beka, T.I., Einevoll, G.T., Chen, J., Masliah, E., Dale, A.M., Silva, G.A., et Devor, A. (2013). In vivo stimulus-induced vasodilation occurs without IP3 receptor activation and may precede astrocytic calcium increase. *J Neurosci* 33, 8411-8422.
- Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S., et Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci* 29, 547-553.
- Ogawa, S., Menon, R.S., Tank, D.W., Kim, S.G., Merkle, H., Ellermann, J.M., et Ugurbil, K. (1993). Functional brain mapping by blood oxygenation level-dependent contrast magnetic resonance imaging. A comparison of signal characteristics with a biophysical model. *Biophys J* 64, 803-812.
- Park, L., Anrather, J., Zhou, P., Frys, K., Pitstick, R., Younkin, S., Carlson, G.A., et Iadecola, C. (2005). NADPH-oxidase-derived reactive oxygen species mediate the cerebrovascular dysfunction induced by the amyloid beta peptide. *J Neurosci* 25, 1769-1777.
- Park, S.J., Lee, J.H., Kim, H.Y., Choi, Y.H., Park, J.S., Suh, Y.H., Park, S.M., Joe, E.H., et Jou, I. (2012). Astrocytes, but not microglia, rapidly sense H₂O₂ via STAT6 phosphorylation, resulting in cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release. *J Immunol* 188, 5132-5141.
- Parker, I., et Yao, Y. (1991). Regenerative release of calcium from functionally discrete subcellular stores by inositol trisphosphate. *Proc Biol Sci* 246, 269-274.
- Parri, H.R., Gould, T.M., et Crunelli, V. (2001). Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* 4, 803-812.

- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., et Carmignoto, G. (1997). Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 17, 7817-7830.
- Patel, S., Joseph, S.K., et Thomas, A.P. (1999). Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 25, 247-264.
- Paul, M., Poyan Mehr, A., et Kreutz, R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86, 747-803.
- Paulson, O.B., Strandgaard, S., et Edvinsson, L. (1990). Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 2, 161-192.
- Peach, M.J. (1977). Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* 57, 313-370.
- Pearce, B., Albrecht, J., Morrow, C., et Murphy, S. (1986). Astrocyte glutamate receptor activation promotes inositol phospholipid turnover and calcium flux. *Neurosci Lett* 72, 335-340.
- Phillips, M.I., et De Oliveira, E.M. (2008). Brain renin angiotensin in disease. *J Mol Med (Berl)* 86, 715-722.
- Phillips, M.I., et Sumners, C. (1998). Angiotensin II in central nervous system physiology. *Regulatory Peptides* 78, 1-11.
- Pineiro, R., Pendlebury, S., Johansen-Berg, H., et Matthews, P.M. (2002). Altered hemodynamic responses in patients after subcortical stroke measured by functional MRI. *Stroke* 33, 103-109.
- Platten, M., Youssef, S., Hur, E.M., Ho, P.P., Han, M.H., Lanz, T.V., Phillips, L.K., Goldstein, M.J., Bhat, R., Raine, C.S., Sobel, R.A., et Steinman, L. (2009). Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14948-14953.
- Price, D.L., Ludwig, J.W., Mi, H., Schwarz, T.L., et Ellisman, M.H. (2002). Distribution of rSlo Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat astrocyte perivascular endfeet. *Brain Res* 956, 183-193.
- Putney, J.W., Jr., Broad, L.M., Braun, F.J., Lievremont, J.P., et Bird, G.S. (2001). Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci* 114, 2223-2229.
- Qian, H., et Ripps, H. (2011). Neurovascular interaction and the pathophysiology of diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2011, 693426.
- Raizada, M.K., Muther, T.F., et Sumners, C. (1984). Increased angiotensin II receptors in neuronal cultures from hypertensive rat brain. *Am J Physiol* 247, C364-372.
- Rodriguez-Pallares, J., Rey, P., Parga, J.A., Munoz, A., Guerra, M.J., et Labandeira-Garcia, J.L. (2008). Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiol Dis* 31, 58-73.
- Romano, C., Sesma, M.A., McDonald, C.T., O'malley, K., Van Den Pol, A.N., et Olney, J.W. (1995). Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 355, 455-469.
- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., et Welty, D.F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675-686.

- Roy, C.S., et Sherrington, C.S. (1890). On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *J Physiol* 11, 85-158 117.
- Sakai, K., et Sigmund, C.D. (2005). Molecular evidence of tissue renin-angiotensin systems: a focus on the brain. *Curr Hypertens Rep* 7, 135-140.
- Salzet, M., Deloffre, L., Breton, C., Vieau, D., et Schoofs, L. (2001). The angiotensin system elements in invertebrates. *Brain Res Brain Res Rev* 36, 35-45.
- Scemes, E., et Giaume, C. (2006). Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia* 54, 716-725.
- Scemes, E., et Spray, D.C. (2009). «Connexin Expression (Gap Junctions and Hemichannels) in Astrocytes» dans *Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System*, eds. P.G. Haydon et V. Parpura. : Springer US, 107-150.
- Schinke, M., Baltatu, O., Böhm, M., Peters, J., Rascher, W., Bricca, G., Lippoldt, A., Ganten, D., et Bader, M. (1999). Blood pressure reduction and diabetes insipidus in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3975-3980.
- Sheppard, C.A., Simpson, P.B., Sharp, A.H., Nucifora, F.C., Ross, C.A., Lange, G.D., et Russell, J.T. (1997). Comparison of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor distribution and subcellular Ca²⁺ release sites that support Ca²⁺ waves in cultured astrocytes. *J Neurochem* 68, 2317-2327.
- Shin, H.K., Dunn, A.K., Jones, P.B., Boas, D.A., Moskowitz, M.A., et Ayata, C. (2006). Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 1018-1030.
- Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q.S., et Nedergaard, M. (2003). Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci* 23, 9254-9262.
- Simpson, J.E., Ince, P.G., Shaw, P.J., Heath, P.R., Raman, R., Garwood, C.J., Gelsthorpe, C., Baxter, L., Forster, G., Matthews, F.E., Brayne, C., et Wharton, S.B. (2011). Microarray analysis of the astrocyte transcriptome in the aging brain: relationship to Alzheimer's pathology and APOE genotype. *Neurobiol Aging* 32, 1795-1807.
- Sink, K.M., Leng, X., Williamson, J., Kritchevsky, S.B., Yaffe, K., Kuller, L., Yasar, S., Atkinson, H., Robbins, M., Psaty, B., et Goff, D.C., Jr. (2009). Angiotensin-converting enzyme inhibitors and cognitive decline in older adults with hypertension: results from the Cardiovascular Health Study. *Arch Intern Med* 169, 1195-1202.
- Sokoloff, L. (1981). Relationships among local functional activity, energy metabolism, and blood flow in the central nervous system. *Fed Proc* 40, 2311-2316.
- Song, K., Allen, A.M., Paxinos, G., et Mendelsohn, F.A. (1992). Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. *J Comp Neurol* 316, 467-484.
- Stornetta, R., Hawelu-Johnson, C., Guyenet, P., et Lynch, K. (1988). Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science* 242, 1444-1446.
- Strittmatter, S.M., Lo, M.M., Javitch, J.A., et Snyder, S.H. (1984). Autoradiographic visualization of angiotensin-converting enzyme in rat brain with [³H]captopril: localization to a striatonigral pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1599-1603.
- Sumners, C., Fleegal, M.A., et Zhu, M. (2002). Angiotensin AT1 receptor signalling pathways in neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29, 483-490.

- Summers, C., Tang, W., Zelezna, B., et Raizada, M.K. (1991). Angiotensin II receptor subtypes are coupled with distinct signal-transduction mechanisms in neurons and astrocytes from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7567-7571.
- Sun, W., McConnell, E., Pare, J.F., Xu, Q., Chen, M., Peng, W., Lovatt, D., Han, X., Smith, Y., et Nedergaard, M. (2013). Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. *Science* 339, 197-200.
- Tachibana, H., Meyer, J.S., Okayasu, H., Shaw, T.G., Kandula, P., et Rogers, R.L. (1984). Xenon contrast CT-CBF scanning of the brain differentiates normal age-related changes from multi-infarct dementia and senile dementia of Alzheimer type. *J Gerontol* 39, 415-423.
- Takano, T., Han, X., Deane, R., Zlokovic, B., et Nedergaard, M. (2007). Two-photon imaging of astrocytic Ca²⁺ signaling and the microvasculature in experimental mice models of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1097, 40-50.
- Takano, T., Tian, G.F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., et Nedergaard, M. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci* 9, 260-267.
- Takeda, S., Sato, N., Takeuchi, D., Kurinami, H., Shinohara, M., Niisato, K., Kano, M., Ogihara, T., Rakugi, H., et Morishita, R. (2009). Angiotensin receptor blocker prevented beta-amyloid-induced cognitive impairment associated with recovery of neurovascular coupling. *Hypertension* 54, 1345-1352.
- Tallant, E.A., et Higson, J.T. (1997). Angiotensin II activates distinct signal transduction pathways in astrocytes isolated from neonatal rat brain. *Glia* 19, 333-342.
- Tallant, E.A., Jaiswal, N., Diz, D.I., et Ferrario, C.M. (1991). Human astrocytes contain two distinct angiotensin receptor subtypes. *Hypertension* 18, 32-39.
- Tanaka, M., Shih, P.Y., Gomi, H., Yoshida, T., Nakai, J., Ando, R., Furuichi, T., Mikoshiba, K., Semyanov, A., et Itohara, S. (2013). Astrocytic Ca²⁺ signals are required for the functional integrity of tripartite synapses. *Mol Brain* 6, 6.
- Tang, X.D., Garcia, M.L., Heinemann, S.H., et Hoshi, T. (2004). Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by altering cysteine-mediated calcium sensing. *Nat Struct Mol Biol* 11, 171-178.
- Toussay, X., Basu, K., Lacoste, B., et Hamel, E. (2013). Locus coeruleus stimulation recruits a broad cortical neuronal network and increases cortical perfusion. *J Neurosci* 33, 3390-3401.
- Tsukuda, K., Mogi, M., Iwanami, J., Min, L.J., Sakata, A., Jing, F., Iwai, M., et Horiuchi, M. (2009). Cognitive deficit in amyloid-beta-injected mice was improved by pretreatment with a low dose of telmisartan partly because of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Hypertension* 54, 782-787.
- Tsutsumi, K., Seltzer, A., et Saavedra, J.M. (1993). Angiotensin II receptor subtypes and angiotensin-converting enzyme in the fetal rat brain. *Brain Res* 631, 212-220.
- Vaarmann, A., Gandhi, S., et Abramov, A.Y. (2010). Dopamine induces Ca²⁺ signaling in astrocytes through reactive oxygen species generated by monoamine oxidase. *J Biol Chem* 285, 25018-25023.
- Vaithianathan, T., Bukiya, A., Liu, J., Liu, P., Asuncion-Chin, M., Fan, Z., et Dopico, A. (2008). Direct regulation of BK channels by phosphatidylinositol 4,5-

- bisphosphate as a novel signaling pathway. *J Gen Physiol* 132, 13-28.
- Wang, D., Martens, J.R., Posner, P., Summers, C., et Gelband, C.H. (1996). Angiotensin II regulation of intracellular calcium in astroglia cultured from rat hypothalamus and brainstem. *J Neurochem* 67, 996-1004.
- Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G.F., Peng, W.G., Han, X., Kang, J., Takano, T., et Nedergaard, M. (2006). Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat Neurosci* 9, 816-823.
- Wang, Z., Tymianski, M., Jones, O.T., et Nedergaard, M. (1997). Impact of cytoplasmic calcium buffering on the spatial and temporal characteristics of intercellular calcium signals in astrocytes. *J Neurosci* 17, 7359-7371.
- Weir, M.R., et Dzau, V.J. (1999). The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens* 12, 205S-213S.
- Wright, A.D., et Dodson, P.M. (2010). Diabetic retinopathy and blockade of the renin-angiotensin system: new data from the DIRECT study programme. *Eye (Lond)* 24, 1-6.
- Xia, H., et Lazartigues, E. (2008). Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: properties and future directions. *J Neurochem* 107, 1482-1494.
- Yan, Y., Wei, C.L., Zhang, W.R., Cheng, H.P., et Liu, J. (2006). Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol Sin* 27, 821-826.
- Yang, G., Gray, T.S., Sigmund, C.D., et Cassell, M.D. (1999). The angiotensinogen gene is expressed in both astrocytes and neurons in murine central nervous system. *Brain Research* 817, 123-131.
- Zago, S., Lorusso, L., Ferrucci, R., et Priori, A. (2012). «Functional Neuroimaging: A Historical Perspective» dans *Neuroimaging - Methods*. 1-28.
- Zhang, G.X., Lu, X.M., Kimura, S., et Nishiyama, A. (2007). Role of mitochondria in angiotensin II-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation. *Cardiovasc Res* 76, 204-212.
- Zhao, G., Neeb, Z.P., Leo, M.D., Pachuau, J., Adebisi, A., Ouyang, K., Chen, J., et Jaggar, J.H. (2010). Type 1 IP₃ receptors activate BKCa channels via local molecular coupling in arterial smooth muscle cells. *J Gen Physiol* 136, 283-291.
- Zimmerman, M.C., Lazartigues, E., Lang, J.A., Sinnayah, P., Ahmad, I.M., Spitz, D.R., et Davisson, R.L. (2002). Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 91, 1038-1045.
- Zimmerman, M.C., Sharma, R.V., et Davisson, R.L. (2005). Superoxide mediates angiotensin II-induced influx of extracellular calcium in neural cells. *Hypertension* 45, 717-723.
- Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.A., Pozzan, T., et Carmignoto, G. (2003a). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6, 43-50.
- Zonta, M., Sebelin, A., Gobbo, S., Fellin, T., Pozzan, T., et Carmignoto, G. (2003b). Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes. *J Physiol* 553, 407-414.
- Zorec, R., Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Verkhratsky, A., et Parpura, V. (2012). Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. *ASN Neuro* 4.