

Université de Montréal

**Étude *in vivo* de l'impact de la pression pulsée sur les  
capillaires cérébraux de souris**

par  
Anie Lapointe

Département de physiologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade d'une maîtrise en physiologie

Décembre 2015

© Anie Lapointe, 2015



## Résumé

Plusieurs décennies de recherche ont permis de mieux comprendre les effets de l'athérosclérose sur le système cardiovasculaire, d'améliorer la prévention et de développer des traitements efficaces. Les effets de l'athérosclérose sur le cerveau demeurent toutefois mal compris même si le lien entre le fonctionnement cognitif et la santé du système vasculaire est maintenant bien établi. La venue de nouvelles méthodes d'imagerie telle la microscopie laser à 2-photons (TPLM) permet d'étudier l'impact de certaines maladies sur la microvasculature cérébrale en mesurant le flux sanguin dans des vaisseaux uniques situés dans des régions cérébrales millimétriques sous la surface. Les résultats des études *in vitro* peuvent dorénavant être corrélés à ceux obtenus *in vivo*. En premier lieu, ce mémoire revoit la théorie ayant permis le développement de la TPLM qui permet de prendre des mesures hémodynamiques *in vivo* dans des vaisseaux de très petits calibres tels des capillaires cérébraux de souris. Par la suite, son utilisation est décrite chez des souris anesthésiées afin de comparer les mesures d'hémodynamie cérébrale tels la vitesse des globules rouges, le flux de globules rouges, le flux sanguin cérébral, l'hématocrite sanguin et le diamètre des vaisseaux. Finalement, nous avons comparé les données hémodynamiques entre des souris de 3 mois normales (WT ; n=6) et des souris atteintes d'athérosclérose précoce (ATX ; n=6). Les résultats obtenus sur un nombre total de 209 capillaires (103 pour les souris WT et 106 pour les souris ATX) démontrent que les souris ATX possèdent une vitesse des globules rouges (+40%) plus grande, un flux de globule rouge plus grand (+12%) et un flux capillaire plus élevé (+14%) sans démontrer pour aucun de ces paramètres, une différence statistiquement significative. L'hématocrite moyen ( $35\pm 4\%$  vs  $33\pm 2\%$  ;  $p=0.71$ ) et le diamètre moyen des vaisseaux ( $4.88\pm 0.22\mu\text{m}$  vs  $4.86\pm 0.20\mu\text{m}$  ;  $p=0.23$ ) étaient également comparables. La vitesse des globules rouges a démontré une faible corrélation avec le diamètre des vaisseaux ( $r=0.39$ ) et avec le flux de globules rouges/seconde ( $r=0.59$ ). En conclusion, les travaux menés dans le cadre de ce mémoire de maîtrise permettent d'envisager, grâce aux nouvelles méthodes d'imagerie cérébrale telle la TPLM, une meilleure compréhension des mécanismes hémodynamiques sous-jacents à la microcirculation cérébrale. L'effet d'une pression pulsée augmentée, tel que proposée dans l'athérosclérose reste cependant à démontrer avec cette méthode d'imagerie.

**Mots-clés** : Hémodynamie cérébrale, pression pulsée cérébrale, microscopie laser 2-photons, vitesse des globules rouges

## Abstract

Many decades of research have given us a better understanding of the effects of atherosclerosis on different organs. For example, works on the cardiovascular effects of atherosclerosis have improved the prevention, screening and treatment resulting in a better prognosis. The effects of atherosclerosis on cerebral vessels are misunderstood even if the link between brain function and cerebral perfusion is well known. With the improvements in brain imaging, there are more possibilities to better define the physiopathology of brain perfusion and the impact of disease on cerebral microvasculature. First, this work reviews the theory behind the development of two-photon laser microscopy (TPLM) and the measure of hemodynamics in small vessels such as cerebral capillaries in mice. We also describe how we measured cerebral hemodynamics in anesthetized mice: red blood cell speed, red blood cell flux, blood hematocrit, and vessel diameter. We compared results obtained between normal mice (WT ; n=6) and pathological mice (ATX ; n=6), all aged 3 months old. ATX mice are well recognized to develop early atherosclerosis and served as a model for high pulse pressure. We measured 209 cerebral capillaries (103 on WT mice and 106 on ATX mice). ATX mice tend to show a trend toward a higher red blood cell speed (+40%), higher red blood cell flux (+12%) and higher capillary flux (+14%) in ATX mice. Mean hematocrit ( $35\pm 4\%$  vs  $33\pm 2\%$  ;  $p=0.71$ ) and mean vessel diameter ( $4.88\pm 0.22\mu\text{m}$  vs  $4.86\pm 0.20\mu\text{m}$  ;  $p=0.23$ ) were not statistically different between both groups. Red blood cell speed showed a weak correlation with vessel diameter ( $r=0.39$ ) and red blood cell flux ( $r=0.59$ ). In conclusion, the TPLM should permit a better understanding of the effect of vascular disease in cerebral hemodynamics. However, the effect of high pulse pressure on cerebral microvasculature needs to be better defined.

**Keywords** : Cerebral hemodynamics, two-photon laser microscopy, cerebral pulse pressure, red blood cell velocity



# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xix
1. Introduction.....	1
1.1 Physiologie cérébro-vasculaire.....	1
1.2 Anatomie cérébro-vasculaire.....	2
1.3 Unité fonctionnelle neuronale vasculaire.....	5
1.4 Débit sanguin cérébral (DSC).....	8
1.5 Autorégulation cérébrale.....	8
1.6 Contrôle neuronal sympathique.....	10
1.7 Propriétés physiques de la circulation cérébrale.....	11
1.7.1 Pression de perfusion cérébrale vs pression de perfusion périphérique.....	11
1.7.2 Constituants de la paroi des artères.....	11
1.7.3 Spécificités de la paroi des artères cérébrales.....	14
1.7.4 Compliance vs rigidité vasculaire.....	14
1.7.5 Relation entre compliance et capacitance vasculaire.....	15
1.7.6 Contraintes de cisaillement.....	16
1.7.7 Équation de Poiseuille.....	17
1.7.8 La vasoréactivité des artères cérébrales.....	18
1.7.9 Le tonus myogénique.....	18
1.7.10 La dilatation et la contraction induites par le débit.....	19
1.8 Facteurs et maladies influençant les propriétés physiques des artères.....	22
1.9 Pression pulsée (PP).....	23
1.9.1 Pression pulsée cérébrale (PPC).....	26
1.9.2 Fonctions vasculaires cérébrales en condition statique vs pulsatile.....	26

1.9.3	L'athérosclérose et la PP .....	28
1.9.3.1	Dysfonction endothéliale et compliance cérébrale dans le contexte d'athérosclérose.....	28
1.10	Modalité d'imagerie cérébrale.....	29
1.10.1	Généralités.....	29
1.10.2	Méthodes d'imageries standard.....	29
1.10.3	Microscopie confocale et microscopie laser multiphotons .....	30
1.10.4	Principes de la spectroscopie par fluorescence .....	30
1.10.5	Microscopie conventionnelle confocale au laser.....	32
1.10.6	Microscopie laser multiphotons .....	33
1.10.6.1	Fluorescence en photon unique vs multiphotons .....	34
1.10.6.2	Intégration de l'excitation laser multiphotons dans les microscopes laser .....	36
1.10.6.3	Avantages et risques de la microscopie laser 2-photons (TPLM) .....	36
1.10.6.4	TPLM pour mesurer les vitesses sanguines .....	38
1.10.6.5	Développements futurs de la TPLM en recherche clinique.....	39
2.	Justification, hypothèse et objectifs.....	42
3.	Matériels et Méthodes .....	43
3.1	Modèle animal .....	43
3.2	Chirurgie des souris .....	44
3.3	Protocole d'imagerie cérébrale.....	46
3.4	Acquisition des données .....	47
3.5	Analyse des données.....	50
3.5.1	Diamètre des vaisseaux .....	50
3.5.2	Vitesse des globules rouges et du flux sanguin.....	50
3.5.3	Flux des globules rouges .....	51
3.5.4	Hématocrite (Hct).....	52
3.6	Analyses statistiques.....	52
4.	Résultats .....	53
4.1	Caractéristiques physiologiques des différents groupes.....	53
4.2	Mesures des paramètres hémodynamiques des capillaires cérébraux .....	54
4.3	Corrélations entre les mesures hémodynamiques.....	58



5. Discussion.....	59
5.1 Difficultés rencontrées lors des expérimentations .....	60
5.2 Choix du modèle expérimental .....	61
5.3 Facteurs pouvant avoir influencé les résultats .....	62
5.4 Retour sur les objectifs de l'étude.....	67
5.5 Avenues futures.....	67
6. Conclusion et recommandations.....	69
Bibliographie.....	i



## Liste des tableaux

Tableau 1: Comparaison des paramètres physiologiques (n= 6 pour le groupe WT et n=6 pour le groupe ATX).....	53
Tableau 2: Mesures des paramètres hémodynamiques cérébraux obtenus dans chaque groupe de souris.....	57



## Liste des figures

Figure 1: Représentation des artères du polygone de Willis qui acheminent le sang au cerveau chez (A) la souris et (B) l'humain .....	4
Figure 2 : Représentation de l'unité neurovasculaire cérébrale.....	6
Figure 3: Schématisation de l'autorégulation cérébrale du débit sanguin cérébral (DSC) .....	10
Figure 4 : Constituants de la paroi des artères .....	13
Figure 5: Schématisation des mécanismes généraux impliqués dans la FMD .....	21
Figure 6 : Représentation du diagramme de Jablonski .....	31
Figure 7 : Comparaison du modèle de fluorescence à 1-photon vs 2-photons .....	35
Figure 8 : Représentation de la fluorescence en TPLM vs microscopie laser 1-photon.....	37
Figure 9 : Anatomie vasculaire du cerveau de la souris en coupe basale .....	45
Figure 10 : Représentation schématique d'une expérimentation par TPLM.....	47
Figure 11 : Angiogramme vasculaire d'une partie du cortex pariétal d'une souris obtenu lors d'une imagerie par TPLM suite au marquage du plasma sanguin par du FITC-Dextran.....	48
Figure 12 : Angiogramme de 400 $\mu\text{m}$ X 400 $\mu\text{m}$ suivi d'un zoom démontrant la position perpendiculaire et longitudinale du balayage de ligne ainsi que l'axe des x et y.....	49
Figure 13 : Mesures de la vitesse des globules rouges (GR) et du diamètre des vaisseaux par balayage de lignes .....	51
Figure 14 : Analyses obtenues lors d'un balayage de lignes perpendiculaires et horizontales d'un capillaire cérébral (identifié en rouge).....	55
Figure 15 : Distribution du diamètre, de la vitesse des GR, de l'Hct et de la PA moyenne pour tous les capillaires mesurés dans chaque groupe de souris.....	56

Figure 16 : Relations entre les différents paramètres vasculaires cérébraux mesurés.....58

## Liste des abréviations

$\Delta$ Pression : Variation de pression

20-HETE : 20-hydroxyeicosatétraénoïque

ACA : Artère cérébrale antérieure (*anterior cerebral artery*)

ADP: Adénosine diphosphate

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ApoB-100 : Apolipoprotéine B-100

ATP : Adénosine triphosphate

ATX : Souris athérosclérotiques

AVC: accident vasculaire cérébral

BA : Artère basilaire (*basilar artery*)

BBB : Barrière hémato-encéphalique (*blood-brain-barrier*)

BOLD: *Blood oxygen level dependent*

Ca<sup>2+</sup> : Calcium

CE : Cellule endothéliale

CGRP : *Calcitonin gene-related peptide*

CMLV : Cellule musculaire lisse vasculaire

COX : Cyclo-oxygénase

DSC : Débit sanguin cérébral

ECG : Électrocardiogramme

EDCF : Facteur contractile dérivé de l'endothélium (*endothelium-derived constricting factor*)

EDHF : Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*)

eNOS : Monoxyde d'azote synthase endothéliale (*endothelial nitric oxide synthase*)

FITC-D : *Fluorescein-isothiocyanate-dextran*

FMC : Contraction induite par le débit (*flow-mediated contraction*)

FMD : Dilatation induite par le débit (*flow-mediated dilation*)

fs: Femtosecondes

GCs: Guanylate cyclase soluble

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

GTP : Guanosine triphosphate  
Hct : Hématocrite sanguin  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène  
ICA : Artère carotide interne (*internal carotid artery*)  
IRMf : Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle  
LCR : Liquide céphalo-rachidien  
LDLr : Récepteur aux lipides de faible densité (*low density lipid receptor*)  
LEE : Limitante élastique externe  
LEI : Limitante élastique interne  
L-NMMA : L-N<sup>G</sup>-monométhyl arginine citrate  
MAP : Pression artérielle moyenne (*mean arterial pressure*)  
MCA : Artère cérébrale antérieure (*middle cerebral artery*)  
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide  
NADPH : Dihyronicotinamide-adénine dinucléotide phosphate  
NO : Monoxyde d'azote  
NPY : Neuropeptide Y  
O<sub>2</sub> : Oxygène  
OCT : Tomographie par cohérence optique (*optical coherence tomography*)  
PA : Pression artérielle  
PaCO<sub>2</sub> : Pression partielle en dioxyde de carbone  
PAd : Pression artérielle diastolique  
PaO<sub>2</sub> : Pression partielle en oxygène  
PAs : Pression artérielle systolique  
PCA : Artère cérébrale postérieure (*posterior cerebral artery*)  
PGI<sub>2</sub> : Prostacycline  
PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase  
PIC : Pression intracrânienne  
PP : Pression pulsée  
PPC : Pression pulsée cérébrale  
PPCA : Artère communicante postérieures (*posterior cerebral artery*)  
ps : Picosecondes



PVC : Pression veineuse centrale

PVJ : Pression veineuse jugulaire

PWV : *Pulse wave velocity*

ROS : Espèce réactive à l'oxygène (*reactive oxygen species*)

RVC: Résistance vasculaire cérébrale

SPIM : Microscopie par illumination en plan sélectif (*selective-plane illumination microscopy*)

SS : Contraintes de cisaillement (*shear-stress*)

SV : Volume d'éjection (*stroke volume*)

TM : Tonus myogénique

TPLM : Microscopie laser 2-photons (*two photon laser microscopy*)

VA : Artère vertébrale (*vertebral artery*)

VIP : Peptide intestinal vasoactif (*vasoactive intestinal peptide*)

WT : Souris type sauvage (*Wild-type*)



*À Matis et Olivia les plus belles merveilles de  
ma vie. Merci de me ramener à l'essentiel. Je  
vous adore.*



# Remerciements

Après avoir parcouru déjà un long parcours universitaire, la décision de m'engager à nouveau dans une maîtrise en physiologie fondamentale m'est venue de mon désir à mieux comprendre l'origine de mes actions quotidiennes dans mon travail. Je sais que c'est grâce à vous, les chercheurs fondamentaux que les avancées scientifiques aboutissent en clinique. Grâce à vos découvertes, vous changez des pronostics et de ce fait des vies ! Je vous savais brillants et vaillants mais ma petite aventure avec vous pour mon projet de maîtrise m'a permis de mieux connaître votre monde, de mieux l'apprécier et d'en faire partie l'espace de quelques années.

Merci au Dr Éric Thorin et à son équipe de laboratoire pour la patience qu'ils ont eue envers moi, tant dans leurs explications des bases des recherches fondamentales que dans le temps de leurs assimilations. Je n'étais pas l'étudiante qui pouvait être présente chaque jour avec vous mais sachez que je pensais souvent à vous et me demandais constamment comment vos travaux évoluaient. Éric, un merci tout spécial à toi de m'avoir ouvert la porte de ton laboratoire et de m'avoir permis de découvrir votre univers qu'est la recherche. Merci de ta patience et de ta compréhension. Nathalie, j'ai été impressionnée par ta vivacité d'esprit et ta rigueur scientifique. Merci d'avoir lu et relu mes travaux. Je me suis sentie comprise et soutenue dans mon rôle de maman qui se rajoutait à tout le reste.

Merci à Xiochang, Carol, Cécile et Albert de m'avoir expliqué les bases du fonctionnement du laboratoire et d'avoir répondu si souvent à mes questions. Merci à Adeline pour l'échange des connaissances sur nos travaux. Même si nous nous sommes côtoyés très peu de temps, merci François de m'avoir rassurée sur la possibilité de réussir malgré une famille à la maison et un temps compté à la seconde près.

Merci à l'équipe de Dr Frédéric Lesage de m'avoir ouvert les portes du labo en imagerie! God que je ne connaissais rien en physique de l'imagerie avant de travailler avec vous ! Merci Romain d'avoir permis que mes expérimentations réussissent après de multiples tentatives. Ta capacité à trouver la solution aux problèmes est impressionnante. Pour moi, avoir un problème avec le microscope = appeler Romain pour qu'il m'aide. Merci de ta patience.

Merci à Michèle pour les explications sur les analyses d'images et les statistiques. Merci d'avoir pris de ton temps si précieux et de m'avoir accueillie dans ton bureau si souvent même en apportant avec moi un bébé naissant quand la gestion d'horaire l'obligeait.

Merci à Marc-Antoine Gillis pour les nombreuses heures passées à tes côtés pendant les chirurgies. Merci d'avoir fait tout ça pour mon projet et merci pour toutes les agréables discussions intéressantes qu'on a eues sur les sujets d'actualité.

Mathieu, ma douce moitié, merci de ta tolérance, de ta patience et de tes encouragements face à mes ambitions académiques qui n'en finissent jamais. Tu es le meilleur papa que nos enfants puissent avoir et le meilleur conjoint que quelqu'un comme moi puisse trouver à ses côtés. Désolée de mon impatience parfois quand rien ne marchait et désolée d'avoir eu la tête prise dans mes réflexions à plusieurs reprises. C'est grâce à toi si je réussis à tout faire. C'est grâce à toi si je suis si fière de la famille qu'on est en train de bâtir ensemble. Je t'aime.

Merci à ma mère, Madone, qui sans elle, je ne serai pas la personne que je suis maintenant. Merci de m'avoir poussé à avoir confiance en moi et à croire en moi. Toi, tu as toujours cru en moi et tu n'as jamais douté. Merci d'avoir lu et relu ce mémoire. Tu y as participé grandement lors de sa rédaction et je t'en suis si reconnaissante ! Merci d'être une grand-maman si incroyable pour Matis et Olivia. Ils t'aiment tellement et je t'aime tellement!

Merci à mon papa, qui a toujours été là et qui continue de toujours être là pour m'aider et me supporter. Je ne te le dis pas assez. Merci d'être là pour maman et moi.

Merci à mes collègues du CHU Ste-Justine qui ont accepté que j'embarque dans cette aventure de maîtrise et qui ont accepté que je sois absente du service pour mener à bien mes expériences. Je suis choyée de travailler avec vous.

# 1. Introduction

Les facteurs contrôlant la régulation du débit sanguin à travers le corps humain sont nombreux et complexes. Un apport adéquat en nutriments et en oxygène (O<sub>2</sub>) aux cellules est essentiel au métabolisme. Les vaisseaux sanguins ont cette incroyable capacité de se dilater ou de se contracter aux moments opportuns critiques. La fragilité inhérente du cerveau rend cet organe beaucoup plus susceptible aux variations de perfusion sanguine. La pression artérielle et le flux sanguin oscillent à chaque battement cardiaque, générant une pulsativité; la pression pulsée (la différence entre la pression artérielle systolique et la pression diastolique) se propage à travers le réseau artériel. Cette onde de pression est propagée et amortie par les artères élastiques et se propage jusqu'aux plus petits capillaires (Mitchell et al., 2011). L'objectif de nos travaux de recherche ici soumis, est de vérifier quel est l'impact *in vivo* de la pression pulsée augmentée sur le débit sanguin cérébral (DSC), chez la souris en condition physiologique et pathologique.

## 1.1 Physiologie cérébro-vasculaire

Chez l'humain, le cerveau représente ~2% du poids corporel et reçoit jusqu'à 15-20% du débit cardiaque total (Hall, 2006; Lassen, 1959). Par conséquent, le cerveau est l'un des organes les plus perfusés du corps humain, d'où sa grande fragilité face aux variations de son débit de perfusion (Iadecola, 2004). Le cerveau possède des besoins métaboliques élevés lesquels reposent surtout sur le métabolisme oxydatif. Pour son bon fonctionnement, le cœur doit dévier une grande proportion de son débit sanguin vers ce noble organe qu'est le cerveau. Le DSC se doit donc d'être relativement constant en plus d'être finement régulé afin de maintenir la demande métabolique, tout en s'ajustant à la contrainte permanente qu'est la boîte crânienne, structure inflexible qui ne permet pas l'expansion du liquide extracellulaire ou des tissus cérébraux. C'est pourquoi le cerveau est doté d'une propriété unique d'autorégulation qui maintient constant le DSC (Bolduc, Thorin-Trescases et Thorin, 2013) et qui de plus protège l'intégrité fonctionnelle du cerveau lors des variations extrêmes de pression de perfusion. L'autorégulation du DSC se fait par un contrôle fin du calibre des vaisseaux qui assurent la perfusion cérébrale: une vasoconstriction suite à une augmentation de la pression (tonus myogénique) ou une vasodilatation dépendante de l'endothélium suite à

une augmentation du débit de perfusion. Ces deux réponses antagonistes permettent un maintien du DSC (Bolduc et al., 2013). Un changement de compliance (élasticité) des vaisseaux cérébraux associé à une dysfonction endothéliale et un tonus myogénique anormal peut altérer cette autorégulation, conduire à des perturbations hémodynamiques, menant à des dysfonctions cognitives chez la souris (Drouin, Bolduc, et al., 2011) (Bolduc et al., 2012; Bolduc et al., 2011). L'âge et l'athérosclérose sont associés à une diminution de la compliance vasculaire au niveau des grosses artères élastiques (aorte, carotides), ce qui engendre une pression pulsée accrue (Mitchell et al., 2004). Une compliance périphérique plus faible avec une pression pulsée accrue, le cocktail est en place pour une surcharge mécanique dans le circuit cérébral (O'Rourke, Safar et Dzau, 2010).

## **1.2 Anatomie cérébro-vasculaire**

Le cerveau reçoit son apport sanguin via quatre artères principales, soit deux vertébrales et deux carotides. De la crosse aortique, naissent la carotide interne gauche et le tronc brachiocéphalique duquel part la carotide interne droite; les artères vertébrales gauche et droite, quant à elles, prennent leur origine dans les artères sous-clavières respectives.

De chaque côté du cou, on retrouve anatomiquement les carotides primitives dont chacune se subdivise pour former la carotide interne (ICA) et la carotide externe. Les carotides externes perfusent le visage et la surface crânienne tandis que les carotides internes assument une grande partie de l'apport sanguin au cerveau (~75%). Elles pénètrent dans le lobe temporal et donnent naissance à quatre branches du polygone de Willis : l'artère cérébrale antérieure (ACA), l'artère cérébrale moyenne (MCA), l'artère communicante postérieure (PPCA) et l'artère postérieure (PCA) (Forbes, 1928). Ces quatre grosses artères du polygone de Willis communiquent directement entre elles, ce qui en fait un système de suppléance vasculaire permettant au cerveau de recevoir du sang même si une artère du cou est lésée ou bouchée. Elles sont des artères dites de résistance comparées aux carotides dites de conductance (Greenwald, 2007). En effet, la média des artères cérébrales contient principalement des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) lui permettant d'exercer un contrôle étroit sur le DSC (Betz, 1972). Les carotides, quant à elles, ont une matrice extracellulaire riche en élastine et en collagène afin d'amortir la pulsativité du flux sanguin et d'assurer une perfusion sanguine stable et continue vers le cerveau tout au long du cycle cardiaque (Betz, 1972;



Greenwald, 2007). Il est important de noter que le polygone de Willis de l'humain est différent de celui de la souris. En effet, chez la souris, il n'existe pas vraiment de polygone vasculaire car il n'y a pas de communication entre les domaines antérieur et postérieur du cerveau. La carotide interne se jette directement dans les artères postérieures et le sang quitte le domaine antérieur par l'ACA qui devient alors l'artère olfactive chez la souris (Okuyama et al., 2004).

Le cerveau postérieur (cortex occipital, tronc cérébral, cervelet et moelle épinière) quant à lui, est perfusé par le système vertébro-basilaire lequel est constitué par les deux artères vertébrales (VA) et l'artère basilaire (BA) (Fitzgerald, 1996). Les deux artères vertébrales prennent leur origine dans l'artère sous-clavière, longent la colonne et pénètrent le cerveau par le foramen magnum. C'est alors qu'elles se rencontrent pour former l'artère basilaire d'où naît la PCA qui rejoint le polygone de Willis par la PCCA. Finalement, du polygone de Willis naissent aussi les artères collatérales aussi appelées artères piales. Celles-ci longent la surface du cerveau sous la pie-mère pour ensuite le pénétrer et deviennent alors terminales (Cipolla, 2009).

Le drainage veineux du cerveau humain peut être divisé en deux systèmes, l'un superficiel et l'autre profond. Le système veineux superficiel draine la surface corticale des deux hémisphères cérébraux et se subdivise en quatre groupes selon leur territoire : le sinus sagittal supérieur, le sinus sphéno-pariétal et caveux, le sinus sagittal inférieur et la veine de Galen (Oka, Rhoton, Barry et Rodriguez, 1985). Le système profond, quant à lui, comprend les veines corticales profondes, les sinus latéraux, le sinus droit et le sinus sigmoïde qui vont tous drainer les structures centrales des hémisphères, les ganglions de la base, le corps calleux, le thalamus et la région pinéale limbique. Les deux systèmes convergent vers les veines jugulaires internes (Kilic et Akakin, 2008). La majorité du volume de sang intracrânien (~70-80%) est contenu dans les sinus veineux et les veines piales, ce qui constitue la capacitance des vaisseaux de la circulation cérébrale (Chen et al., 2015). Une réduction passive de ce volume peut atténuer l'augmentation de volume des autres constituants intracrâniens (cerveau et liquide céphalo-rachidien (LCR)). Le contrôle strict de la pression intracrânienne (PIC) est donc important car lorsque les mécanismes compensatoires pour la contrôler sont dépassés, même une petite augmentation du volume

sanguin cérébral peut résulter en une augmentation drastique de la PIC et ainsi être dramatique pour l'humain (Freeman, 2015).

La microcirculation cérébrale, quant à elle, réfère aux vaisseaux de  $<100\ \mu\text{m}$  de diamètre (Sehba et Friedrich, 2011). Elle est hautement organisée et l'arrangement en colonnes avec les groupes neuronaux et les unités fonctionnelles physiologiques respectives tel que perçue pendant de nombreuses années (Iadecola, 2004) a été remis en question récemment. En effet, des études récentes d'imagerie ont démontré que la microvasculature cérébrale était effectivement dépourvue d'un réseau de micro-vaisseaux tous interliés entre eux mais plutôt reliés au réseau principal par une ou quelques bordures de tissu cortical. Cependant, la correspondance entre les vaisseaux pénétrants (artérioles) qui alimentent la microvasculature cérébrale et les colonnes corticales n'existeraient pas. Cette constatation a permis de réfuter la notion d'une unité neurovasculaire liée à une structure de colonne corticale (Blinder et al., 2013). Le nombre de capillaires cérébraux augmente rapidement dans un cerveau en croissance selon le nombre de synapses créées pour atteindre son niveau adulte seulement après quelques années (Cipolla, 2009).

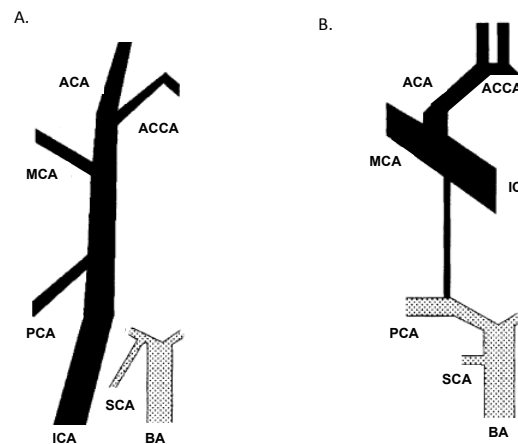


Figure 1: Représentation des artères du polygone de Willis qui acheminent le sang au cerveau chez (A) la souris et (B) l'humain

ACA : artères cérébrale antérieure, ACCA : artère cérébrale communicante antérieure, MCA : artère cérébrale moyenne, PCCA : artères cérébrale communicante postérieure, PCA : artère cérébrale postérieure, ICA : artère carotide interne, SCA : artère cérébelleuse supérieure, BA : artère basilaire. Inspirée (Okuyama et al., 2004)

### 1.3 Unité fonctionnelle neuronale vasculaire

Tel qu'il a été mentionné précédemment, l'intégrité fonctionnelle et structurelle du cerveau dépend de la balance délicate entre les substrats délivrés via le flux sanguin et la demande métabolique imposée par l'activité neuronale. Une des défenses pour maintenir un DSC constant est la régulation de ce débit selon l'activité fonctionnelle des différentes régions du cerveau. Cela signifie que, lorsque l'activité du cerveau augmente dans une région précise, la réponse hémodynamique vasculaire de cette région sera une dilatation de l'artériole à l'endroit où l'activité neuronale est la plus prononcée suivie d'une vasoconstriction retardée des autres artérioles (Devor et al., 2008). Les neurones, la glie et les vaisseaux cérébraux interagissent alors conjointement tel une unité fonctionnelle pour générer, coordonner et transmettre les signaux moléculaires qui induisent ces modifications du flux sanguin (Figure 1). Même si plusieurs voies vasoactives sont supposées contribuer à la réponse hémodynamique de l'unité neuronale vasculaire, leurs rôles n'en demeurent pas moins imprécis (Attwell et al., 2010).

Nous avons vu précédemment que les artères piales sont des artérioles qui parcourent la surface du cerveau. Elles sont constituées d'une couche de cellules endothéliales (CE), d'une couche de cellules musculaires lisses et d'une couche externe de cellules leptoméningées, appelées l'adventice. L'adventice est séparée du cerveau par l'espace de Virchow-Robin. Au fur et à mesure que les artérioles pénètrent plus profondément dans le cerveau, l'espace de Virchow-Robin disparaît et la membrane basale vasculaire entre alors en contact direct avec les pieds astrocytaires qui entourent presque complètement les vaisseaux intra parenchymateux (Figure 2). Ces astrocytes sont impliqués dans le métabolisme neuronal énergétique et dans la fonction de la synapse (Newman, 2003). Quant aux CE cérébrales, elles sont caractérisées par le fait qu'elles ne sont pas dotées de fenestrations mais sont plutôt inter-reliées par des adhésions focales appelées jonctions serrées (*tight junctions*). Cette morphologie unique constitue la barrière hémato-encéphalique (*BBB; blood-brain barrier*) (Serlin, Shelef, Knyazer et Friedman, 2015).

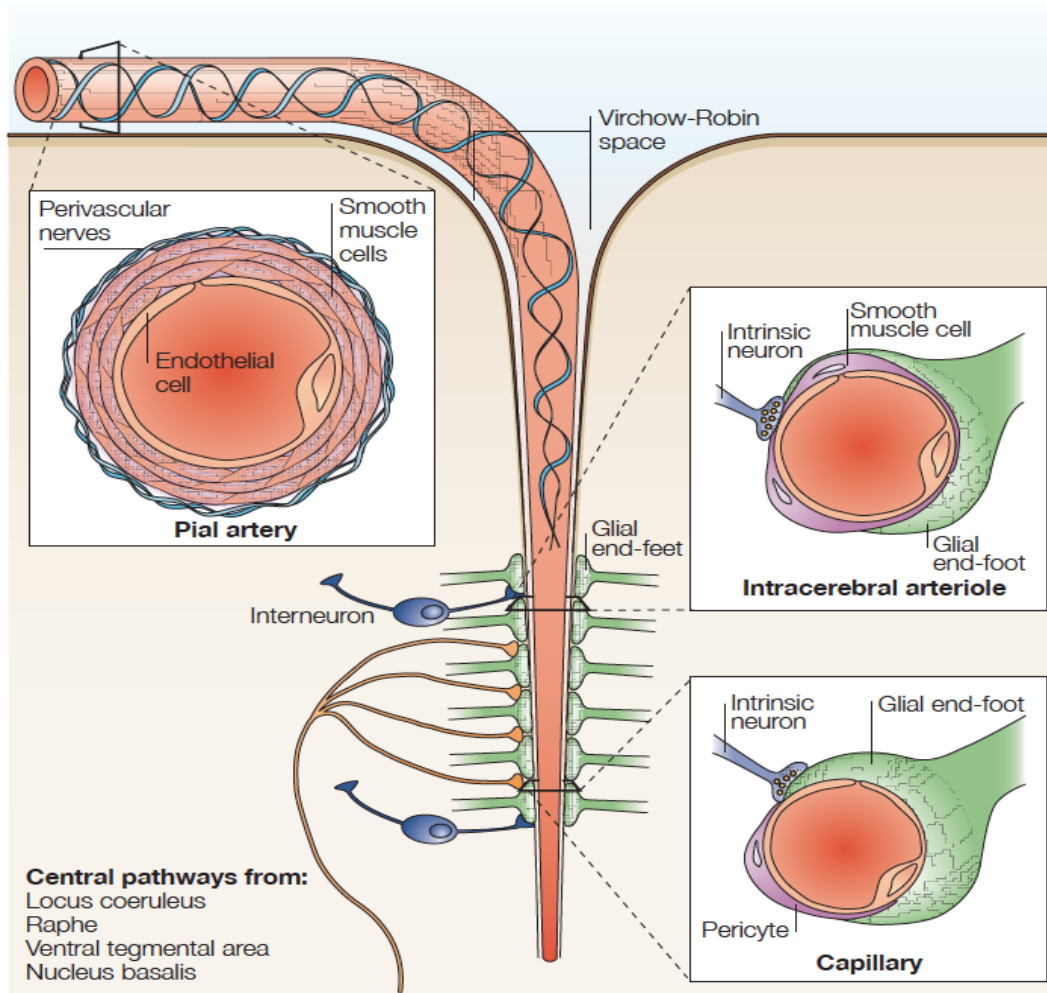


Figure 2 : Représentation de l'unité neurovasculaire cérébrale

L'artère piale est constituée de CE et de cellules leptoméningées qui sont séparées du cerveau par l'espace de Virchow-Robin. Comme les artérioles pénètrent dans le cerveau, cet espace disparaît et la membrane vasculaire basale vient en contact direct avec les pieds astrocytaires (artérioles intracérébrales et capillaires). Les artères piales sont aussi innervées par des nerfs périvasculaires d'où naissent des ganglions autonomes et sensitifs.

Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Neuroscience](#), Costantino Iadecola. Neurovascular Regulation in the Normal Brain and in Alzheimer Disease, 5, 347-360, Copyright (2004).

Les CE produisent des puissants vasodilatateurs tels le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et le monoxyde de carbone, ainsi que des vasoconstricteurs tels l'endothéline et d'autres facteurs contractiles dérivés de l'endothélium (EDCF) (Faraci et

Heistad, 1998). Les espèces réactives à l'oxygène (ROS) lorsqu'elles sont à faible concentration, agissent comme vasodilatateurs mais peuvent causer une dérégulation vasculaire lorsqu'elles sont à haute concentration. Les substances endothéliales vasoactives sont libérées après activation des récepteurs cellulaires par des agonistes spécifiques ou après stimulation par les forces de cisaillement (*SS*; *shear stress*) produites par les frictions du flux sanguin à la surface des cellules (Busse et Fleming, 2003). Les jonctions lacunaires (*gap junctions*) présentes à ce niveau permettent ainsi aux réponses intracellulaires d'être transmises aux CE adjacentes (Segal, 2000). Quant aux cellules musculaires lisses et aux péricytes, ils convertissent les signaux chimiques qui proviennent des CE, des neurones et des astrocytes en changements dans le diamètre vasculaire. Les vaisseaux se contractent ou se dilatent selon les changements de la concentration de calcium ( $Ca^{2+}$ ) intracellulaire et la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (Somlyo, Wu, Walker et Somlyo, 1999).

Les CMLV répondent elles aussi aux changements de flux sanguin et se contractent lors d'une augmentation de la pression intra vasculaire. De plus, les CMLV sont aussi reliées par des jonctions lacunaires (*gap junctions*) permettant ainsi une propagation intramurale du signal vasculaire (Lagaud, Karicheti, Knot, Christ et Laher, 2002).

Pour conclure, des processus neuronaux sont étroitement reliés avec les vaisseaux cérébraux. Les artères piales sont densément innervées par des nerfs périvasculaires qui naissent du système nerveux autonome et des ganglions sensitifs. Les innervations contiennent plusieurs vasodilatateurs (NO, acétylcholine, peptide intestinal vasoactif (VIP), *calcitonine gene-related peptide* (CGRP), substance P, cholecystokinine, neurokinine A) et des vasoconstricteurs (noradrénaline, neuropeptide Y (NPY) et sérotonine) (Edvinsson, 2002). Par conséquent, les neurones périvasculaires, les astrocytes et les cellules vasculaires constituent une unité fonctionnelle, dont le but principal est de protéger le cerveau en maintenant l'homéostasie du microenvironnement cérébral. Cette unité neurovasculaire peut constituer une première ligne de défense contre les effets délétères de l'ischémie cérébrale ou de toutes autres formes d'atteintes cérébrales.

## **1.4 Débit sanguin cérébral (DSC)**

Un DSC constant est primordial pour la survie de l'être humain. Le cerveau ne peut en effet tolérer que de très courtes périodes d'ischémie car les neurones ne peuvent produire leur énergie (adénosine triphosphate; ATP) que quasi exclusivement par le métabolisme oxydatif de substrats tels le glucose (surtout) et les corps cétoniques (Siegel, 2006; Thomas, Alhasawi, Appanna, Auger et Appanna, 2015). Le cerveau a donc des capacités limitées dans le cadre d'un métabolisme anaérobique et n'a pas l'avantage des autres organes tels le foie et les reins qui sont plus tolérants à l'ischémie vasculaire.

La perfusion cérébrale est hautement sensible aux changements de pressions partielles du dioxyde de carbone dans le sang artériel ( $\text{PaCO}_2$ ) mais à un moindre degré à ceux de la pression partielle en oxygène dans le sang artériel ( $\text{PaO}_2$ ) (Kety et Schmidt, 1948). Ces hautes sensibilités, surtout à la  $\text{PaCO}_2$ , sont exclusives aux artères cérébrales lorsque comparées aux artères périphériques (Ainslie, Ashmead, Ide, Morgan et Poulin, 2005). Ainsi, une élévation de la  $\text{PaCO}_2$  (hypercapnie) cause une diminution de la résistance cérébrovasculaire et par conséquent, une augmentation du flux sanguin cérébral (Kety et Schmidt, 1948). Une hypocapnie a, quant à elle, l'effet inverse soit, une augmentation de la résistance cérébrovasculaire entraînant une diminution du flux sanguin cérébral (Kety et Schmidt, 1948). Cette réponse de la circulation cérébrale à la  $\text{PaCO}_2$  a donc pour but principal de stabiliser le contrôle autonome respiratoire et cardiovasculaire, qui est régulé par des régions spécifiques du tronc cérébral sensibles au pH des tissus environnants (Ainslie et Duffin, 2009). En condition normale, l'hypoxie augmente la ventilation résultant en une hypocapnie. La  $\text{PaO}_2$  et la  $\text{PaCO}_2$  ont donc une régulation réciproque au niveau du contrôle autonome et respiratoire du tronc cérébral (Ainslie et Tzeng, 2010).

## **1.5 Autorégulation cérébrale**

L'autorégulation cérébrale est le mécanisme par lequel le cerveau est capable de maintenir un flux sanguin constant face à des variations de pressions artérielles (PA), entre 70 et 150 mm Hg (Figure 2). On dit communément que les artères cérébrales se contractent quand la PA augmente et se dilatent quand la PA diminue.

Le cerveau humain a des capacités limitées lorsqu'il s'agit d'emmagasiner des substrats. Il fonctionne donc avec un haut métabolisme, ce qui rend la précision de la régulation du DSC essentielle pour le maintien de l'apport constant en nutriments et en oxygène (Ainslie et al., 2014). Afin de moduler avec précision la perfusion selon les demandes métaboliques régionales, le modèle décrit pendant des décennies était le contrôle unique de la résistance cérébrovasculaire au niveau des artères piales (Wolff et Lennox, 1930). Cependant, de récentes évidences semblent démontrer que les grosses artères cérébrales (VA, MCA, ICA, PCA) modulent elles aussi régionalement le DSC selon l'équilibre des gaz sanguins. Le système vertébro-basilaire serait le moins sensible à l'hypoxie et à la PaCO<sub>2</sub> tandis que ses contreparties antérieures (MCA et ICA) auraient une sensibilité diminuée à la PaCO<sub>2</sub> mais plus grande à la PaO<sub>2</sub> (Sato et al., 2012; Willie et al., 2012). La circulation cérébrale serait donc hétérogène, et non homogène tel que préalablement imaginé, et cette contribution des grosses artères dans la résistance vasculaire cérébrale distinguerait la circulation cérébrale de la circulation périphérique (Ainslie et Brassard, 2014).

L'autorégulation cérébrale est souvent décrite comme étant statique ou dynamique (Tiecks, Lam, Aaslid et Newell, 1995). L'état statique se met en place sur des minutes/heures et représente l'état de repos ainsi que la relation entre la pression artérielle moyenne (MAP) et le DSC. Elle correspond à des valeurs de MAP entre 70 et 150 mm Hg (Figure 3). À l'opposé, l'état dynamique est celui référé quand la relation pression-flux sanguin est observée lors des moments de changements transitoires de MAP (augmentation ou diminution de l'ordre de 15-30 mm Hg par rapport à la valeur de MAP de base). Ces ajustements prennent place en quelques secondes et ont lieu, par exemple, lors des changements de posture ou pendant l'exercice physique. La complémentarité vs la séparation de ces deux composantes statique vs dynamique sont toutefois mal comprises ainsi que leurs effets possibles à court et long terme (Tan et Taylor, 2014).

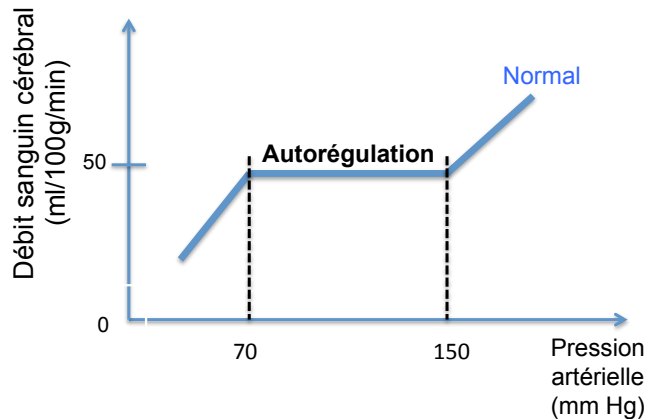


Figure 3: Schématisation de l'autorégulation cérébrale du débit sanguin cérébral (DSC)

## 1.6 Contrôle neuronal sympathique

Un dernier groupe de composantes régulatrices est impliqué dans le contrôle du calibre des vaisseaux cérébraux et de la perfusion cérébrale : le stimulus neural. La contribution neurale a fait l'objet de certaines controverses depuis la première description des fibres nerveuses périvasculaires dans la paroi des vaisseaux cérébraux (Edvinsson, 1975). La circulation cérébrale est riche en fibres nerveuses périvasculaires et les cellules musculaires lisses des artérioles possèdent des récepteurs *alpha*- et *bêta*-adrénergiques (Hamel, 2006). Les études animales ont démontré des résultats contradictoires allant d'une abolition complète de l'autorégulation cérébrale lorsque le sinus carotidien chez des chiens était coupé (Sagawa et Guyton, 1961) à une préservation complète de l'autorégulation chez des chats dénervés au niveau sympathique et parasympathique (Busija et Heistad, 1984). Chez l'humain, les résultats des expériences tentant de déterminer la contribution du système nerveux sympathique sur le DSC sont mitigés et sont limités par les méthodes expérimentales servant à étudier l'autorégulation cérébrale (Mitchell et al., 2009). Le NO (via l'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse du NO, le : L-N<sup>G</sup>-monomethyl arginine citrate (L-NMMA)), molécule vasodilatatrice ayant le potentiel de moduler l'autorégulation cérébrale n'a pas, lui non plus, démontré d'influence sur la relation pression-flux sanguin cérébral (Zhang et al., 2004). Toute la controverse entourant le contrôle neural de la régulation cérébrale reste donc à être élucidée.



## **1.7 Propriétés physiques de la circulation cérébrale**

Pour assurer un débit sanguin cérébral constant, les vaisseaux cérébraux sont dotés de propriétés inhérentes à la physiologie vasculaire. Ces propriétés peuvent s'expliquer par les principes physiques décrits ci-dessous.

### **1.7.1 Pression de perfusion cérébrale vs pression de perfusion périphérique**

Le concept de la pression de perfusion au niveau cérébral est différent de celui des autres organes. La pression de perfusion de ces derniers représente la différence entre la pression artérielle et veineuse alors que dans le cerveau, la pression en aval n'est pas celle des veines jugulaires mais celle de la pression intracrânienne (PIC). Cela est dû au fait que le cerveau est maintenu dans la boîte crânienne, une cavité fermée, et que lorsque la PIC s'élève, il en résulte un collapsus de la paroi des veines piales et des sinus veineux. Par conséquent, la pression de perfusion cérébrale est définie comme la différence entre la MAP et la PIC (pression de perfusion cérébrale = MAP- PIC) (Shardlow, 2011).

### **1.7.2 Constituants de la paroi des artères**

La paroi des artères est constituée de trois tuniques allant de la cavité endoluminale jusqu'à la périphérie de l'artère. Ces tuniques sont : l'intima, la média et l'adventice (Lee, 1995; Stevens, 1997).

#### L'intima :

L'intima est la couche interne de la paroi artérielle. Elle est principalement constituée d'une monocouche de CE qui reposent sur une membrane basale, séparée de la limitante élastique interne (LEI) par un espace virtuel acellulaire : la zone sous-endothéliale. La LEI est une couche bien délimitée qui sépare l'intima de la média.

#### La bordure endothéliale :

On trouve dans chaque type de vaisseau une seule couche de CE, formant l'endothélium. De par sa position stratégique, l'endothélium vasculaire n'est pas seulement une simple barrière anatomique entre le sang circulant et les cellules musculaires vasculaires, mais il joue

également un rôle essentiel dans une multitude de régulations physiologiques fondamentales, à savoir l'hémostase, le transport de métabolites entre le sang et les tissus, les phénomènes d'angiogenèse et de réparation des dommages vasculaires, et le contrôle du tonus vasculaire (Thorin et Shreeve, 1998). Ainsi, un des rôles principaux de ces cellules dans la circulation est de fournir une paroi lisse permettant une perméabilité sélective à l'eau, aux électrolytes, aux sucres et aux autres substances qui transigent du courant sanguin aux tissus. Il semble que cette fonction de transport soit plus développée dans l'endothélium des capillaires que dans l'endothélium des larges artères, bien qu'un transport soit indiscutable à travers la bordure des parois des artères de conduction.

#### La média :

La tunique moyenne qu'est la média est la couche principale de l'artère. Elle est limitée par ce qu'on appelle les limitantes élastiques interne et externe (LEE), qui sont d'épaisses lames d'élastine percées de fenestrations. Ces ouvertures sont suffisamment grandes pour permettre le passage bidirectionnel de substances et de cellules. La média est le résultat de l'empilement concentrique d'unités lamellaires formées de cellules musculaires lisses et d'une matrice conjonctive (élastine, collagène et mucopolysaccharides). Selon la proportion relative des constituants de cette matrice, deux grands types d'artères sont ainsi distingués :

- \* les artères musculaires (artères cérébrales, coronaires, fémorales, tibiales, brachiales, rénales, artérioles) dont l'absence de fibres élastiques est le déterminant principal. La couche de CMLV assure les propriétés vasomotrices de ce type artériel, ajustant le diamètre selon les conditions physiologiques, assurant ainsi un contrôle fin sur le débit sanguin local. Ce sont les artères dites de résistances.
- \* les artères élastiques (aorte, gros troncs artériels supra-aortiques, carotides, artères iliaques) qui pour leur part possèdent une média riche en fibres élastiques donnant ainsi des propriétés de compliance artérielle (mesure de l'élasticité de l'artère). Elles peuvent amortir la pulsativité du flux sanguin afin d'assurer une perfusion sanguine stable et continue tout au long du cycle cardiaque. Ce sont les artères dites de conductance.

### L'adventice :

L'adventice est la tunique externe et est composée d'un tissu conjonctif simple. Elle repose sur une LEE qui la rend différente de la média. Elle contient des fibroblastes, des cellules adipeuses et des vasa et nervi vasorum. Le rôle nourricier des vasa vasorum est toutefois restreint à la partie externe de la média. En effet l'adventice est avasculaire tant que son épaisseur n'atteint pas une trentaine d'unités lamellaires.

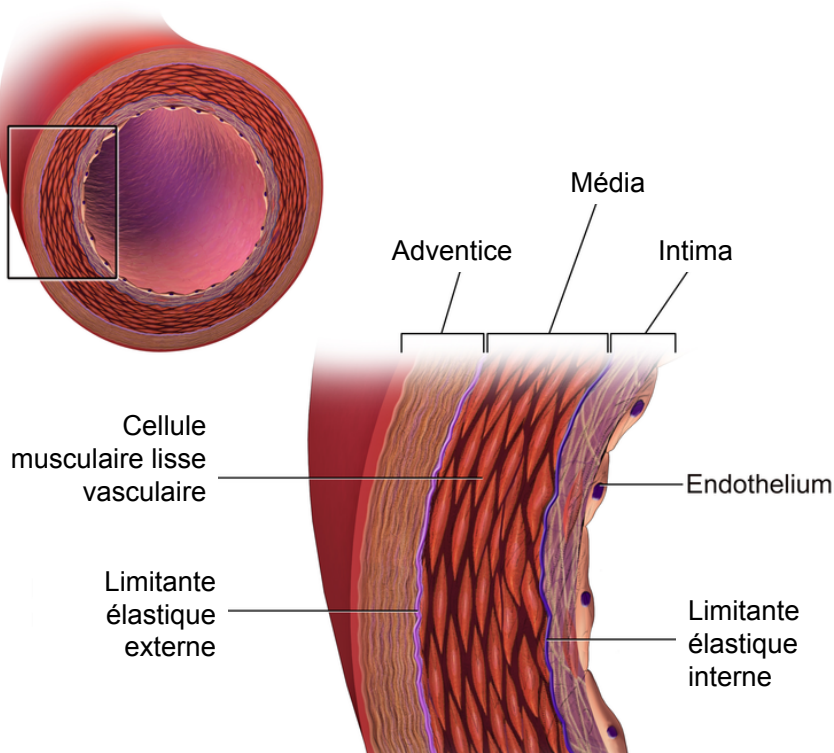


Figure 4 : Constituants de la paroi des artères

L'intima est la couche interne de la paroi et elle est constituée des CE qui forment l'endothélium vasculaire. La média est la tunique moyenne qui est limitée d'une part par la limitante élastique interne (LEI) et d'autre part par la limitante élastique externe (LEE). Elle contient les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). L'adventice est la tunique externe et se constitue principalement de tissu conjonctif. Tiré de [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

### **1.7.3 Spécificités de la paroi des artères cérébrales**

Tel que vu précédemment, l'endothélium vasculaire des capillaires cérébraux est unique de par la présence d'ultrastructures lui permettant de gérer étroitement le contenu du liquide extracellulaire et cérébrospinal. La BBB laisse pénétrer les petites molécules lipophiliques et des nutriments tel le glucose par diffusion facilitée grâce à des transporteurs spécifiques. En contrepartie, elle empêche le passage des grosses molécules hydrosolubles (Siegel, 2006). Les capillaires cérébraux à cet endroit ont également moins de vésicules synoptiques endothéliales et possèdent un agencement serré des CE adjacentes appelées jonctions serrées servant de cloison étanche (Fitzgerald, 1996; Siegel, 2006).

Quant à la media des artères cérébrales, elle est composée surtout de CMLV arrangées concentriquement et en moins grand nombre qu'en périphérie (Schievink, 1997). Cette media permet de contrôler la résistance vasculaire en maintenant un tonus myogénique (TM) (Cottart et al., 2009). Elle est délimitée par une LEI seule qui contient des fenestrations permettant aux nutriments sanguins de diffuser vers les cellules plus éloignées de la lumière. Elle ne contient donc pas de LEE comme les autres artères (Lee, 1995; Schievink, 1997). Cette absence de LEE avec une media pauvre en fibres élastiques et un adventice quasi inexistant constituent les principales distinctions entre les artères cérébrales et les artères systémiques. Cette composition des artères cérébrales fait en sorte qu'elles sont extrêmement délicates et peuvent être fragilisées lors de variations trop importantes du débit de perfusion (Heistad, 2001; O'Rourke et al., 2010).

### **1.7.4 Compliance vs rigidité vasculaire**

L'aorte et les carotides ont des parois compliantes permettant leur expansion lors de l'éjection du sang du ventricule gauche qui se produit lors de la systole; cela leur confère ainsi un rôle très important d'amortissement de la pulsativité du flux sanguin, amortissement qui contribue à assurer une perfusion stable et continue vers le cerveau (Greenwald, 2007). La pression systolique étire la paroi pour accommoder le bolus de sang qui arrive en systole, formant ainsi un réservoir élastique qui emmagasine de l'énergie. Cette énergie permet d'entretenir le flux sanguin vers la circulation systémique pendant que la paroi artérielle revient à son diamètre initial en fin de diastole. Pour un même volume d'éjection, si la paroi

était plus rigide, il faudrait une plus grande force de pression systolique pour étirer la paroi (loi de Laplace).

L'éjection d'un bolus de sang dans l'aorte donne lieu à une ondulation qui se déplace dans le temps et est appelée *pulse wave velocity* (PWV) (Greenwald, 2007). La rigidité d'une artère se définit comme son habilité à résister à la distension lorsqu'une force est appliquée sur sa paroi et est dépendante des propriétés intrinsèques de ses composantes. Elle peut être calculée avec une mesure de la PWV (Loukogeorgakis, Dawson, Phillips, Martyn et Greenwald, 2002) qui dit que plus l'artère est rigide, plus la PWV est rapide. Ainsi, lorsqu'il y a augmentation de la PWV cela signifie une diminution de la compliance artérielle, un phénomène qui peut être associé au vieillissement et/ou à un bon nombre de conditions pathologiques comme l'hypertension artérielle, le diabète et l'athérosclérose (Correia et Haynes, 2007). Toutefois, en ce qui concerne la compliance des artères cérébrales, elle semble réagir différemment en conditions pathologiques, du moins chez la souris. En effet, des travaux du laboratoire ont démontré que chez la souris athérosclérotique, alors que la compliance des carotides est diminuée, la compliance des artères cérébrales est paradoxalement augmentée et est secondaire à une dysfonction endothéliale (Bolduc et al., 2011).

### **1.7.5 Relation entre compliance et capacitance vasculaire**

La compliance est une mesure de la capacité d'une structure (ici une artère) à contenir un certain volume et d'accommoder des changements possibles de ce volume ( $\Delta$  volume/  $\Delta$  pression), tandis que la capacitance vasculaire correspond à la compliance de la circulation artérielle dans son ensemble. La compliance est largement présente dans la circulation artérielle mais est principalement déterminante dans l'aorte (Kelly, Tunin et Kass, 1992) et ses branches majeures. La compliance artérielle peut être simplifiée par la formule suivante :

$$C = SV/PP \quad (1)$$

où SV représente le volume d'éjection (ml/kg/min) et PP la pression pulsée (Chemla et al., 1998; Stergiopoulos, Segers et Westerhof, 1999).

### 1.7.6 Contraintes de cisaillement

La surface de l'endothélium des grosses artères subit, sous l'effet du flux sanguin, une force tangentielle appelée contrainte de cisaillement (SS) de la part des composantes présentes à l'intérieur des vaisseaux sanguins (Paszkowiak et Dardik, 2003). Cette contrainte, soit le rapport de la force de cisaillement par unité de surface, va forcer les cellules de l'endothélium à se déplacer dans le sens de la direction du flux artériel (Giannoglou et al., 2008). Cependant, il est nécessaire de garder à l'esprit que cette dite contrainte évolue au cours du cycle cardiaque et que sa direction peut s'inverser (Mohamied et al., 2015).

Aussi, si en culture, les cellules endothéliales (CE) sont d'une forme grossièrement polygonale en l'absence de flux, l'application d'une contrainte de cisaillement modifie leur morphologie en quelques heures seulement: les cellules deviennent allongées et orientent leur grand axe dans le sens du flux circulant (Ando et Yamamoto, 2009; Malek et Izumo, 1996). En contrepartie, cette observation est plus complexe lorsque les CE sont *in vivo*. Ainsi, au sinus aortique, et de façon moins marquée aux points de bifurcation artérielle où le flux n'est pas laminaire (c'est-à-dire turbulent) et que le cisaillement est faible, les CE ont un aspect plus rond et n'ont pas une orientation uniforme (Langille et Adamson, 1981; Nerem, Levesque et Cornhill, 1981). En revanche, au niveau des artères de conductance (aorte) où le flux est laminaire et le cisaillement normal, la morphologie des CE est allongée laissant ainsi croire qu'elles s'adaptent aux forces de friction entre elles et le sang circulant (Ando et Yamamoto, 2009).

Le SS contribue aussi au remodelage de l'ensemble du vaisseau lors d'une modification durable du débit sanguin. Ainsi, une augmentation durable du débit sanguin (de quelques jours à quelques mois) provoque une augmentation du calibre de l'artère (remodelage expansif) tandis qu'une diminution durable en provoque la réduction (Paszkowiak et Dardik, 2003). Cela confirme donc la règle selon laquelle l'artère s'adapte à son environnement afin de garder une contrainte de cisaillement constante (Lehoux, Castier et Tedgui, 2006). En effet, une augmentation du SS pourrait provoquer un déchirement des CE. Il est donc clair que le SS est une cause importante de la régulation des signaux mécaniques aigus au niveau de l'endothélium, entraînant des modifications du tonus vasculaire (Thorin-Trescases et Bevan, 1998). En ce qui a trait aux CE, leurs réponses aux contraintes mécaniques peuvent résulter en une hiérarchie spatio-temporelle. Deux conséquences physiologiques peuvent

ainsi résulter des signaux initiaux dus aux contraintes de cisaillement :

1 - Une libération rapide de facteurs vasoactifs comme le NO afin de contrebalancer l'état de contraction des cellules musculaires (Tronc et al., 1996).

2 - L'adaptation des cellules endothéliales au nouvel environnement hémodynamique par un processus complexe impliquant l'intervention d'un autre signal de régulation des gènes responsables du remodelage vasculaire, des facteurs de transcription et des événements associés au cytosquelette (Tronc et al., 2000; Wechezak, Viggers et Sauvage, 1985). Le remodelage le plus connu est l'alignement des CE dans la direction de l'écoulement sanguin (Malek et Izumo, 1996).

### 1.7.7 Équation de Poiseuille

L'équation de Hagen-Poiseuille décrit le flux laminaire d'un liquide visqueux (fluide Newtonien) dans un cylindre incompressible avec une aire sectionnelle constante (Paszkowiak et Dardik, 2003). Même si ni le sang, ni le vaisseau ne remplissent les critères d'un liquide newtonien ou d'un cylindre incompressible, le sang tend à vouloir circuler lui aussi de manière laminaire dans les capillaires. On peut donc utiliser l'équation de Poiseuille pour tenter d'expliquer physiquement l'écoulement du sang dans les vaisseaux sanguins et l'appliquer au flux sanguin cérébral (Breckler, Christensen et Sun, 2013; Clifford, 2011).

$$\text{Flux sanguin cérébral} = \Delta P \pi R^4 / 8 \mu l \quad (2)$$

où  $\Delta P$  = pression de perfusion cérébrale (mm Hg),  $R$  = rayon du vaisseau sanguin (mm),  $\mu$  = viscosité du sang (0.035 poise),  $l$  = longueur du vaisseau sanguin (mm),  $\pi$  = constante 3.1416.

Cette équation ne s'applique cependant pas dans les capillaires cérébraux très petits car le flux laminaire devient impossible en raison de la lumière du vaisseau en grande partie bloquée par un seul GR. D'autres facteurs interviennent aussi dans la régulation du calibre des vaisseaux cérébraux. Citons en exemple la viscosité du sang, directement liée à l'hématocrite (Hct), qui lorsqu'il chute, diminue la capacité du sang à transporter l'oxygène (Usami, 1982). Pour compenser, le DSC général subit alors une augmentation (Muizelaar, Wei, Kontos et Becker, 1983). De plus, le DSC est sensible aux changements de température. Par exemple, à une température corporelle de 27°C, l'extraction cérébrale

d'oxygène (O<sub>2</sub>) et le DSC sont à environ la moitié des valeurs normales observées en conditions normothermiques (Shardlow, 2011). Finalement, la plupart des médicaments anesthésiques provoquent eux aussi des effets sur les vaisseaux cérébraux tels les agents volatils qui entraînent une diminution de la tension des CMLV cellules provoquant ainsi une augmentation du DSC due à une vasodilatation (Sloan, 2002; Szabo, Luginbuehl et Bissonnette, 2009).

### **1.7.8 La vasoréactivité des artères cérébrales**

La résistance ou tonus de base vasculaire est le résultat de l'équilibre entre les molécules vasoactives relâchées par l'endothélium et les propriétés constrictrices des CMLV. On pensait autrefois que la BBB ne laissait pénétrer de la circulation systémique que les petites molécules lipophiles et de faible masse moléculaire (<400-500 Daltons (Da)) (Pardridge, 2003). Cette croyance est tombée quand il a été démontré que des facteurs humoraux comme l'angiotensine II et la vasopressine pouvaient agir sur l'endothélium cérébral (Faraci, Baumbach et Heistad, 1990; Faraci et Heistad, 1990) et que la résistance des vaisseaux cérébraux réagissait à leurs contrôles neuronaux, sympathiques et cholinergiques (Ainslie et Brassard, 2014). En condition physiologique, le diamètre artériel est surtout contrôlé par des forces exercées sur la paroi suite au passage du sang soit les contraintes de cisaillement tangentielles à la paroi et la tension pariétale exercée par la pression artérielle (PA) perpendiculairement à la paroi de l'endothélium, tension qui elle est dictée par la loi de Laplace qui est représentée par la formule suivante (Klabunde, 2011):

$$\text{Tension pariétale} = \text{PA} \times \text{R} \quad (3)$$

où PA est pression artérielle en mm Hg et R le rayon du vaisseau (en mm).

### **1.7.9 Le tonus myogénique**

Le tonus myogénique (TM) est la capacité des artères de résistance à ajuster leur diamètre en réponse à des variations de PA. Le TM est donc le niveau de contraction induit par la pression intraluminale du sang sur la paroi (Henrion, 2005). Lors de l'étirement membranaire des CMLV, il y a un changement de tension au niveau du cytosquelette et les canaux ioniques (canaux perméables aux Ca<sup>2+</sup>, canaux activés par l'étirement, canaux à



potentiel de récepteur transitoire (TRP), canaux sodiques de la membrane apicale des cellules épithéliales (eNaC)) détectent ces changements (Balligand, Feron et Dessy, 2009). Ainsi lorsque la pression intraluminale s'élève, l'activation des canaux calciques non-sélectifs dépolarise les CMLV, ce qui active subséquemment l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage nécessaire à la contraction (Ledoux, Werner, Brayden et Nelson, 2006)

### **1.7.10 La dilatation et la contraction induites par le débit**

L'effet des contraintes de cisaillement (SS) provoquées par le débit du sang sur la paroi des artères cérébrales se traduit par une réponse physiologique de dilatation ou de contraction. Cette réponse permet ainsi à l'artère d'ajuster son diamètre pour obtenir le débit optimal nécessaire.

#### **A) La dilatation induite par le débit (*flow-mediated dilation*; FMD)**

Il est reconnu depuis les années 1980 que l'endothélium vasculaire agit sur les CMLV (Furchgott et Zawadzki, 1980). Plus précisément, dans le cas des artères cérébrales, Vanhoutte fut le premier à observer une relaxation endothélium-dépendante *in vitro* après une stimulation avec la vasopressine (Vanhoutte, Katusic et Shepherd, 1984). Aujourd'hui, plusieurs autres stimuli capables de relaxer *ex vivo* les CMLV via l'endothélium ont été mis en évidence (ex : acétylcholine, adénosine diphosphate (ADP), sérotonine, bradykinine, carbachol et forces de cisaillement) (Bagi, Hamar, Kardos et Koller, 2006; Davis et Hill, 1999).

La dilation induite par le débit signifie que suite à une augmentation de débit, les artères vont se dilater *in vivo* ou *in vitro*. Dans un premier temps, des structures sur la membrane des CE détectent les contraintes tangentielles de cisaillement ainsi que la déformation mécanique du cytosquelette exercées par le sang qui circule et dans un deuxième temps, les traduisent en signal biochimique (Ando et Yamamoto, 2009). Rapidement, les contraintes de cisaillement entraînent l'ouverture des canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  sur les CE et il en résulte une élévation de la concentration intracellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$  de manière dose-dépendante selon l'intensité du stimulus mécanique (Ando et Yamamoto, 2009). Les voies de signalisation dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire permettent d'activer la synthétase endothéliale du NO (eNOS) (Ando et

Yamamoto, 2009) et de provoquer ainsi une augmentation du NO, un puissant gaz vasodilatateur (Ignarro, Buga, Wood, Byrns et Chaudhuri, 1987).

Une autre voie, qui est cette fois indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , est aussi responsable de la FMD. Elle requiert la phosphorylation de la eNOS par l'intermédiaire de la cascade de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt (Jin, Wong, Wu et Berk, 2005). Au niveau périphérique, le NO est le principal facteur vasodilatateur relâché suite à l'activation de la eNOS. Le NO diffuse alors jusqu'aux CMLV, où il se lie à la guanylate cyclase soluble (GCs), activant ainsi la formation de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) à partir de la guanosine triphosphate (GTP) afin d'induire une relaxation. Au niveau cérébral, le mécanisme de la FMD est plus complexe et pourrait, en plus du NO, également impliquer le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) produit par la eNOS (Drouin et Thorin, 2009). Cette différence pourrait s'expliquer par un découplage physiologique de la eNOS qui serait spécifique au domaine cérébrovasculaire (Drouin, Thorin-Trescases, Hamel, Falck et Thorin, 2007).

Finalement, deux autres facteurs sont générés par l'endothélium en réponse aux contraintes de cisaillement : la  $\text{PGI}_2$  et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). La  $\text{PGI}_2$  est un produit qui résulte du métabolisme arachidonique avec la cyclo-oxygénase (COX) et qui agira par la formation d'un second messenger, l'adénosine monophosphate (AMPc). Ce dernier va réduire la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  de l'appareil contractile et activera des canaux potassiques qui eux, vont hyperpolariser la membrane cellulaire (Yang et al., 2008). En ce qui a trait à l'EDHF, il englobe tous les facteurs autres que la  $\text{PGI}_2$  et le NO (ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le cerveau) capables d'hyperpolariser les CMLV (Kang, 2014).

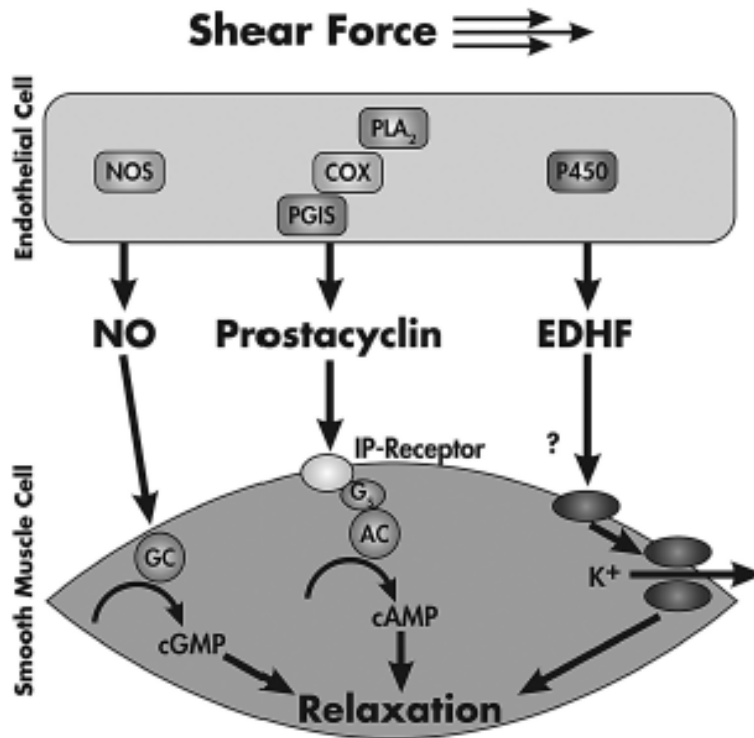


Figure 5: Schématisation des mécanismes généraux impliqués dans la FMD

Les contraintes de cisaillement propulsées par le débit sanguin stimulent la relâche de NO, de prostaglandine et d'EDHF par les CE. Les EDRF migrent jusqu'au CMLV et induisent la relaxation.

NO : monoxyde de carbone, NOS : NO synthétase, PLA<sub>2</sub> : Phospholipase A<sub>2</sub>, COX : cyclo-oxygénase, PGIS : prostacycline synthétase, P450 : enzymes du cytochrome P450, EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, IP-Receptor : récepteur des prostaglandine I<sub>2</sub>, GC : guanylate cyclase soluble, cGMP : guanosine monophosphate cyclique, G<sub>s</sub> : protéine G stimulatrice, AC : adénylate cyclase, CAMP : adénosine monophosphate cyclique, K<sup>+</sup> : ion potassique. Tiré de (Clifford, 2011). Permission non requise.

#### B) La contraction induite par le débit (*flow-mediated contraction* : FMC)

Comme mentionné plus haut, les contraintes de cisaillement peuvent aussi induire une contraction suite à une augmentation du débit de perfusion. Dans une étude, Garcia-Roldan et al. ont proposé que cette contraction serait dépendante de la pression intraluminale. En effet, dans les artères cérébrales de lapin utilisées pour leurs expérimentations, sous une pression intraluminale faible de 30 mm Hg, une augmentation de débit induit une dilatation tandis que sous une pression intraluminale de 90 mm Hg, une augmentation de débit induit

une contraction (Garcia-Roldan et Bevan, 1990). Dans des artères cérébrales de rat, la relâche de ROS par les CMLV cause une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et serait à l'origine de la FMC (Bryan, Marrelli, Steenberg, Schildmeyer et Johnson, 2001). Récemment, une étude faite sur des artères cérébrales humaines et sur la MCA de rat confirme l'implication des ROS et révèle la participation d'un facteur constricteur dérivé de l'endothélium (EDCF). L'hypothèse proposée est que la FMC serait engendrée suite à la formation de 20-hydroxyeicosatétraénoïque (20-HETE) via l'activation des COX en plus d'augmenter la concentration de ROS (Toth, Rozsa, Springo, Doczi et Koller, 2011).

## **1.8 Facteurs et maladies influençant les propriétés physiques des artères**

Comme les artères vieillissent, croissent et peuvent être atteintes de maladies telles l'athérosclérose, elles se transforment, selon le cas, en modifiant leur composition, leur géométrie et leur façon de distribuer les forces mécaniques sur leur paroi. Avec l'âge, l'intima et la média épaississent (Nagai, Metter et Fleg, 1999) et les artères deviennent rigides (O'Rourke et Hashimoto, 2007). L'arbre artériel garde alors son rôle de conduit pour délivrer le sang aux différents organes mais sa fonction d'amortissement du flux artériel pulsatile décline, amenant potentiellement des effets dévastateurs sur la microcirculation, spécialement celle du cerveau (O'Rourke et Hashimoto, 2007). Cet arbre artériel perd aussi son action antiproliférative des cellules musculaires lisses, favorisant la contraction plutôt que la dilatation et exprime des marqueurs pro-inflammatoires et de stress oxydant (Brandes, Fleming et Busse, 2005). L'augmentation de la rigidité augmentée qui s'en suit prédispose au développement de l'hypertension artérielle, de l'athérosclérose, des infarctus du myocarde et des accidents cérébro-vasculaires (Thijssen, Carter et Green, 2015).

L'athérosclérose en soi modifie les propriétés des artères en créant un remodelage vasculaire important aux endroits où les forces de cisaillement sont moindres (typiquement la bifurcation des artères) (Nixon, Gunel et Sumpio, 2010), résultant en la formation de plaques lipidiques très inflammatoires (Ku, Giddens, Zarins et Glagov, 1985). L'hypertension artérielle accélère le remodelage et la dysfonction endothéliale liés à l'âge, processus qui peut être atténué quand la pression artérielle est normalisée (Harvey, Montezano et Touyz, 2015).

Le diabète de type 2 cause une augmentation de la vitesse des ondes de pouls (PWV) dans l'aorte en diminuant la compliance (Lo, Relf, Myers et Wahlqvist, 1986). Les carotides des diabétiques subissent elles aussi des changements de nature plus athérotiques que sclérotiques au niveau de l'intima et de la média comparé à leurs homologues non diabétiques (Taniwaki et al., 1999).

Un dernier facteur pouvant contribuer à influencer les propriétés physiques des artères et pouvant s'ajouter à tous ceux déjà décrits, est le rythme cardiaque au repos: un haut rythme cardiaque au repos (i.e. au-delà de 70 battements/min) magnifie le dommage induit par le stress mécanique de chaque battement cardiaque et est, par conséquent, délétère au système cardiovasculaire à long terme (Thorin et Thorin-Trescases, 2009).

## **1.9 Pression pulsée (PP)**

La PP est la différence entre les lectures des pressions artérielles systolique (PAs) et diastolique (PAd). Elle est mesurée en millimètres de mercure (mm Hg) et représente la force générée par le cœur à chaque contraction. En d'autres termes, la PP est une conséquence de la nature épisodique d'une contraction cardiaque et des propriétés du système artériel circulatoire. Elle dépend du volume d'éjection (SV) du ventricule gauche et des propriétés de la paroi vasculaire qui caractérisent la compliance et les propriétés de transmission du système artériel. La PP est complexe et ne peut donc pas être expliquée par un système simple de circulation. Selon le modèle de 2-éléments de Windkessel, la circulation y est décrite en termes de résistance vasculaire parallèle et de capacitance qui correspond à la compliance de la circulation artérielle (Dart et Kingwell, 2001). Une extrapolation de la formule de la compliance afin d'y inclure la composante de PP tel que vu précédemment est la suivante :

$$C = SV/PP \quad (4)$$

où C est la compliance, SV le volume d'éjection cardiaque (ml/kg/min) et PP la pression pulsée (mm Hg).

L'augmentation de la PP est reconnue comme un indicateur d'incidents cardiovasculaires (Benetos et al., 1997; Laurent et Boutouyrie, 2007). L'élévation de la PP peut être secondaire à une augmentation du SV ou à une diminution de la compliance. L'analyse faite

avec le modèle de Windkessel est limitée car ce modèle morcelle l'arbre artériel en des entités telles la compliance et la résistance, tout en assumant que les changements de pressions arrivent instantanément et que le débit cardiaque s'en trouve affecté dans tout le réseau artériel. Donc, ce modèle ne prend pas en compte les phénomènes pertinents à un système de distribution, comme la réflexion d'onde de pouls qui se crée à chaque branchement des artères. En effet, à ces endroits précis de jonction, une fraction de l'onde de pouls sera reflétée de manière rétrograde vers le cœur où elle s'additionnera avec l'onde de pouls (Dart et Kingwell, 2001).

Dans les microvaisseaux, la propagation de la PP à partir du cœur est dominée par des forces visqueuses et peut être décrite par la formule suivante :

$$d^2P/dx^2 = CG \times dP/dt \quad (5)$$

où P est le pression intraluminale (mm Hg) selon la position le long du vaisseau (x) et le temps (t en secondes), G est la résistance visqueuse et C la compliance vasculaire (Gross, Intaglietta et Zweifach, 1974; Schmid-Schonbein, Lee et Sutton, 1989).

La résistance visqueuse, quant à elle, est déterminée par la formule suivante :

$$G = 8\mu/\pi R^4 \quad (6)$$

où  $\mu$  est la viscosité du sang (0.035 poise) et R le rayon du vaisseau (mm).

Fait à noter, l'estimation périphérique de la PP n'est pas identique à la PP centrale mesurée (Dart et Kingwell, 2001). En d'autres termes, il est réaliste de dire que l'estimation de la pression centrale dans l'aorte, laquelle est la mesure de la pression de perfusion clé pour les organes, donne une information pronostique plus rationnelle que la pression périphérique dans les bras. Dans deux études populationnelles d'envergure, la pression artérielle centrale mesurée de manière non invasive s'est avérée supérieure à la pression artérielle brachiale dans la prédiction des événements cardiovasculaires (Roman et al., 2007; Williams et al., 2006).

Plusieurs facteurs influencent la PP, le premier étant l'âge avancé qui entraîne une perte d'élasticité de l'aorte et des conduits artériels majeurs. Avec le vieillissement, s'installe une rigidité artérielle résultant de la fragmentation, de la perturbation des lamelles élastiques et de l'altération du ratio collagène/élastine (Alfie, Waisman, Galarza et Camera, 1999). Cela

provoque une augmentation de la PP car la compliance vasculaire étant diminuée, cela induit une diminution de l'atténuation de l'onde pulsée. Cette perte d'élasticité, en l'absence de dilatation compensatoire, va ainsi réduire la compliance artérielle et augmenter la vitesse de transmission. L'effet final sera un retour au cœur plus précoce de l'onde rétrograde qui causera une systole elle aussi plus précoce, ce qui résultera en une augmentation de la pression systolique contribuant aussi à une PP augmentée (Dart et Kingwell, 2001). Le temps que prend le retour de l'onde rétrograde dépend aussi de la distance du site principal de réflexion, ce qui signifie que la grandeur, qu'elle soit d'un homme ou d'une femme, (Smulyan, Asmar, Rudnicki, London et Safar, 2001), est un facteur contributif à une PP augmentée (London, Guerin, Pannier, Marchais et Stimpel, 1995).

D'autres facteurs précurseurs d'évènements cardiovasculaires tels que le cholestérol, le diabète et l'hypertension ont démontré des effets contradictoires sur la PP (Dart et Kingwell, 2001). Quant au lien entre l'athérosclérose et la PP, le concept bidirectionnel mettant à la fois l'athérosclérose en cause et consécutive d'une PP augmentée semble le mieux l'expliquer. En d'autres termes, l'élévation de la PP induit une dysfonction endothéliale dans les vaisseaux et la dysfonction endothéliale est un antécédent possible de l'athérosclérose. De plus, on sait que l'athérosclérose amplifie l'augmentation de la rigidité artérielle avec l'âge (O'Rourke et Hashimoto, 2007), mais il est difficile d'affirmer que les effets délétères de la pression pulsée ne sont pas des facteurs contributifs au développement de l'athérosclérose. Conséquemment à toutes ces avancées dans la compréhension de la PP et de ses effets cardiovasculaires, beaucoup d'études à visées thérapeutiques ont vu le jour. Des approches non pharmacologiques telles que l'exercice aérobique (Cameron et Dart, 1994), la diète (ex: suppléments des n-3-acides gras, régime alimentaire hyposalé) et les œstrogènes améliorent sans contredit la compliance artérielle (McVeigh et al., 1994; Nestel et al., 1997). En ce qui concerne les approches pharmacologiques, elles ne sont pas concluantes à cause des effets croisés sur le rythme cardiaque et sur la pression artérielle, mais les grosses artères semblent davantage réagir aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion (Dart et Kingwell, 2001).

### 1.9.1 Pression pulsée cérébrale (PPC)

La pression pulsée cérébrale est celle qui entraîne un flux sanguin au niveau cérébral. Il s'agit de la différence de pression entre les artères et les veines cérébrales. Une PPC trop petite entraîne de l'ischémie tandis qu'une PPC trop grande résulte en une hypertension intracrânienne. La relation entre le DSC (ml/100g/min) et la PPC (mm Hg) peut être résumée par l'équation suivante (Shardlow, 2011):

$$\text{DSC} = \text{PPC} / \text{RVC} \quad (7)$$

$$\text{où PPC} = \text{MAP} - \text{PIC} \quad (8)$$

où RVC est la résistance vasculaire cérébrale (mmHg/(ml/min)), PIC la pression intracrânienne (mm Hg) et MAP la pression artérielle moyenne (mm Hg).

Une augmentation de la PIC crée une diminution du DSC car elle comprime les artères cérébrales et augmente la pression hydrostatique interstitielle qui diminue la filtration capillaire. Les effets réels des changements de la pression pulsée, qu'elle soit augmentée ou diminuée au niveau cérébral, demandent plus d'études car ils demeurent peu connus. Nous savons, suite à l'étude *Japan Public Health Center-based prospective*, que la PP est un facteur de risque indépendant des accidents vasculaires cérébraux (AVC) dans une population d'âge moyen qui est normotendue (Okada, Iso, Cui, Inoue et Tsugane, 2011). De plus, une autre étude récente a démontré que cette pression pulsée centrale (extrapolée par la mesure de la PA au niveau brachial) pourrait être un déterminant indépendant du remodelage dans les petits vaisseaux rétiniens (Ott, Raff, Harazny, Michelson et Schmieder, 2013), vaisseaux qui sont de même morphologie que les vaisseaux cérébraux car tous deux naissent de la carotide interne. Les vaisseaux rétiniens auraient alors le potentiel de constituer une avenue possible pour étudier les effets de la PP augmentée au niveau cérébral.

### 1.9.2 Fonctions vasculaires cérébrales en condition statique vs pulsatile

*In vivo*, le DSC est pulsatile et jusqu'à maintenant, beaucoup d'études ont tenté de comprendre les fonctions vasculaires des artères cérébrales *ex vivo* en absence de pulse, c'est à dire en condition statique. Il est néanmoins connu que la pulsatilité altère le SS ainsi que la



fréquence et la puissance des forces exercées perpendiculairement à la paroi, ce qui influence les réponses vasculaires telles que la FMD, la FMC et le TM. Par exemple, sur des artères isolées soumises à un débit pulsatile, la FMD est sensible à la fréquence des pulsations et est inhibée par l'augmentation de la PP dans l'aorte du lapin (Hutcheson et Griffith, 1991). D'autre part, les CE d'artères cérébrales de porc sont déformées par un débit pulsatile qui transforme la FMC observée en condition statistique en une FMD (Shimoda, Norins et Madden, 1998). En ce qui a trait au TM, des travaux récents du laboratoire ont mis en évidence qu'il serait potentialisé en condition pulsée via des mécanismes en lien avec la régulation de la eNOS (Raignault, Bolduc, Lesage et Thorin, 2016).

À l'inverse, une étude a récemment étudié les effets d'une absence de pulsatilité : la FMD est diminuée et le TM augmenté tous deux de manière significative dans des artères mésentériques de rat maintenues 180 minutes avant le début de l'expérience qui comparait des conditions non-pulsées à des conditions pulsées (Pinaud et al., 2011). Sans pulsatilité, il y a une augmentation de la production de ROS et il y a installation d'un état pro-inflammatoire qui altère les réponses au débit et à la pression. Cette étude démontre aussi que les effets délétères de l'absence de pouls sont renversés par un traitement antioxydant, suggérant ainsi que la pulsatilité pourrait jouer un rôle protecteur en inhibant l'élévation des ROS (Pinaud et al., 2011)

La microcirculation semble aussi bénéficier de la pulsatilité du flux sanguin. En effet, une diminution de PP résulte en une plus grande résistance vasculaire, un métabolisme en O<sub>2</sub> diminué et conséquemment une diminution de l'efficacité de la microcirculation (Wilkins, Regelson et Hoffmeister, 1962). Maintenant que les techniques d'imagerie se peaufinent et s'améliorent, la quantification du flux sanguin et les changements vasculaires sont maintenant rendus possibles au niveau de la microcirculation et il est primordial d'étudier les fonctions vasculaires en condition pulsée pour ainsi mieux les extrapoler à l'être humain. Par exemple, de manière surprenante, une étude *in vivo* récente sur des vaisseaux cérébraux de souris a révélé que le flux sanguin cérébral serait pulsatile dans presque tous les vaisseaux cérébraux incluant capillaires et veinules, contrairement à ce qui était pensé auparavant (Santisakultarm et al., 2012).

### **1.9.3 L'athérosclérose et la PP**

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire affectant les vaisseaux sanguins. Suite aux facteurs de risque tels l'hypertension artérielle et le taux élevé de cholestérol plasmatique, la paroi artérielle subit des agressions inflammatoires qui mènent à la formation de plaques complexes obstruant de plus en plus la lumière vasculaire au fur et à mesure que la maladie progresse (Hansson, 2005; Ramji et Davies, 2015). Silencieuse à ses débuts, l'athérosclérose est à l'origine de la maladie coronarienne et d'AVC. Quand les plaques progressent au niveau des carotides, elles multiplient les risques d'AVC et créent une diminution du DSC. L'athérosclérose augmente la rigidité artérielle et la mesure souvent utilisée pour la mesurer est la PP. Lorsque celle-ci est augmentée, c'est un facteur contributif au déclin cognitif et à la démence (Mitchell et al., 2011). Comme nous l'avons vu précédemment, au niveau cérébral, le bon fonctionnement de l'unité neurovasculaire cérébrale demande une bonne intégration globale des messages diffusés par des cellules cérébrales (astrocytes, neurones et CE) à l'endothélium vasculaire cérébral local et antérograde afin qu'il ajuste le débit cérébral à la demande métabolique locale. La progression de plaques athérosclérotiques dans les carotides est associée à des événements ischémiques cérébraux et à une diminution de la perfusion cérébrale. Les vaisseaux cérébraux plus petits subissent eux aussi une dysfonction endothéliale vasculaire qui perturbe l'apport en substrat aux cellules cérébrales. Combinée à une altération de l'intégrité de l'unité neurovasculaire, cette perfusion cérébrale anormale contribue ainsi à la dégénérescence neuronale, au début du déclin cognitif et à la démence vasculaire (Gold, Giannakopoulos, Herrmann, Bouras et Kovari, 2007).

#### **1.9.3.1 Dysfonction endothéliale et compliance cérébrale dans le contexte d'athérosclérose**

Il est connu que les facteurs de risques cardiovasculaires entraînent une dysfonction endothéliale. Chez des souris dyslipidémiques qui développent de l'athérosclérose, la dysfonction endothéliale cérébrale est caractérisée par une augmentation de la production de ROS et par une diminution de la production de NO (Miller et al., 2010), deux phénomènes qui peuvent entretenir une diminution du DSC (Crimi, Ignarro et Napoli, 2007; Kalaria, 1996). Les artères cérébrales semblent moins sujettes à l'athérosclérose que les coronaires. Effectivement, les artères cérébrales de souris athérosclérotiques répondent à un traitement

antioxydant à la catéchine (polyphénol) en diminuant les marqueurs de stress oxydant, en améliorant la fonction endothéliale, en restaurant le DSC et en préservant les fonctions cognitives (Drouin, Bolduc, et al., 2011). Paradoxalement, toujours chez la souris, la dyslipidémie sévère est associée à une augmentation de la compliance artérielle cérébrale plutôt qu'à une rigidité telle que vue dans l'aorte et les carotides et cette compliance cérébrovasculaire est essentiellement régulée par l'endothélium (Bolduc et al., 2011). Comme quoi les mécanismes par lesquels les stress mécaniques agissent sur la compliance de la paroi artérielle peuvent être différents dans les artères carotides et cérébrales. En ciblant le maintien de cette fonction endothéliale, l'autorégulation cérébrale aura plus de chance de fonctionner correctement et retarder ainsi les effets délétères de l'athérosclérose. Toutes les études démontrant une dysfonction endothéliale cérébrale et une compliance augmentée ont été réalisées *in vitro* et la corrélation de ces résultats à des études *in vivo* reste à démontrer.

## **1.10 Méthodes d'imagerie cérébrale**

### **1.10.1 Généralités**

Les techniques d'imagerie cérébrale capables d'imager *in vivo* de très petites structures cellulaires et leurs interactions moléculaires fournissent maintenant des outils nécessaires permettant d'améliorer notre compréhension de la physiologie cérébrovasculaire. Les résultats des études *in vitro* peuvent dorénavant être corrélés à ceux obtenus *in vivo* et ainsi améliorer la prévention et les traitements des maladies touchant le cerveau. Des méthodes rigoureuses ont été développées afin d'étudier le flux sanguin dans des vaisseaux uniques situés à des régions cérébrales micrométriques et millimétriques sous la surface, où leur fonction vasculaire et leur régulation peuvent être étudiées.

### **1.10.2 Méthodes d'imageries standard**

Pour imager les vaisseaux piaux en surface, la microscopie intravitale se révèle être un bon outil. Elle peut mesurer les changements de diamètre des vaisseaux et la vitesse des globules rouges après injection d'un colorant fluorescent. Même la vitesse du plasma peut être déduite en pistant ces points fluorescents marqués (Rovainen, Woolsey, Blocher, Wang et Robinson, 1993). Cependant, cette technique est limitée car elle ne peut imager que les

vaisseaux en surface et non les changements de diamètre des vaisseaux pénétrants et des micros vaisseaux, endroits stratégiques où se produit le couplage neurovasculaire (Shih et al., 2012).

L'imagerie optique intrinsèque et par "speckle laser" peut donner des informations sur les changements de débit sanguin, mais n'a pas une assez haute résolution sous la surface corticale (Dunn, Bolay, Moskowitz et Boas, 2001; Frostig, Lieke, Ts'o et Grinvald, 1990). Les imageries par résonance magnétique fonctionnelle (BOLD IRMf) et par Doppler laser ont quant à elles peu de restriction sur la profondeur désirée, mais les résolutions spatiale et temporelle s'en trouvent réduites de manière importante (Ances, Greenberg et Detre, 1999; Ogawa et al., 1992). La tomographie par cohérence optique (OCT), la microscopie photo-acoustique et l'imagerie par ultrasons fonctionnelle sont prometteuses pour étudier la régulation du flux sanguin cérébral, mais elles ne peuvent combiner l'imagerie du débit sanguin et l'activité cellulaire à haute résolution (Hu et Wang, 2010; Srinivasan et al., 2011; Urban et al., 2015).

### **1.10.3 Microscopie confocale et microscopie laser multiphotons**

La microscopie confocale et la microscopie laser à 2-photons (TPLM) ont été les premières expériences d'imagerie ayant permis d'étudier les propriétés des vaisseaux cérébraux sous la surface piaie. Toutes deux utilisent le principe de la fluorescence qui sera décrit un peu plus loin.

### **1.10.4 Principes de la spectroscopie par fluorescence**

La première observation par fluorescence a été faite en 1845 par Sir John F.W Herschel qui a utilisé une solution de quinine à la lumière du soleil. Cette expérience a mené au développement du premier spectrofluorimètre et a permis de déterminer que la quinine émettait une lumière bleue à une longueur d'onde de 450 nm. Plus tard, ce phénomène a été nommé fluorescence en 1853 par G.G. Stokes. Mais ce n'est qu'en 1920-1930 que Jablonski, considéré comme le père de la fluorescence, a concentré ses travaux pour mieux comprendre le phénomène. Par définition, la fluorescence est une émission lumineuse provoquée par diverses formes d'excitation autre que la chaleur et est parfois appelée « lumière froide ». Les molécules fluorescentes (fluorophores) absorbent l'énergie

lumineuse (lumière d'excitation) et la renvoient sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). Pour ce faire, trois étapes illustrées par le diagramme de Jablonski (Figure 3) doivent s'effectuer :

### Étape 1 : l'excitation

Un photon d'énergie  $h\nu_{EX}$  est fourni par une source externe, par exemple un laser, et est absorbé par le fluorophore créant ainsi un état électronique excité ( $S_1'$ ).

### Étape 2 : l'état excité

L'état excité existe pour un temps défini (typiquement de 1 à 10 ns). Pendant cette période, le fluorophore subit des changements de conformation et est ainsi sujet à une multitude d'interactions avec son environnement.

### Étape 3 : l'émission de fluorescence

Un photon d'énergie  $h\nu_{EM}$  est émis, lequel renvoie le fluorophore à son état d'origine ( $S_0$ ). Due à l'énergie dissipée pendant la durée de l'état excité, l'énergie du photon est donc plus petite et de longueur d'onde supérieure au photon d'excitation  $h\nu_{EX}$ .

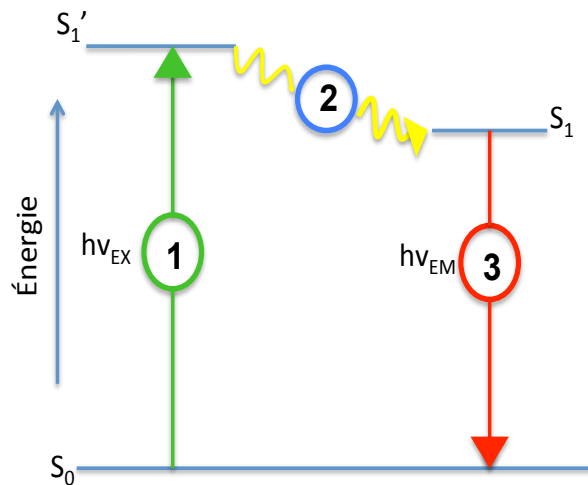


Figure 6 : Représentation du diagramme de Jablonski

1. Un photon d'énergie  $h\nu_{EX}$  est fourni par une source externe (ex : laser) et est absorbé par le fluorophore créant ainsi un état électronique excité ( $S_1'$ )
2. Pendant l'état excité, le fluorophore subit des changements de conformation
3. Un photon d'énergie  $h\nu_{EM}$  est émis et renvoie le fluorophore à son état d'origine  $S_0$ . Adapté de Subcellular Biochemistry (Hilderson, 1988)

Le processus de fluorescence est cyclique, i.e. à moins qu'il ne soit irréversiblement détruit pendant la durée de l'état excité (phénomène connu sous le nom de photoblanchiment, voir ci-dessous), le fluorophore peut absorber et émettre un photon de manière répétitive. Le fait qu'un seul fluorophore peut générer à lui seul plusieurs milliers de photons détectables, est en partie responsable de la grande sensibilité des techniques de détection par fluorescence.

Il existe des fluorophores naturels tels les acides aminés aromatiques (ex : phénylalanine, tyrosine), les polyphénols (ex : catéchine), les cofacteurs (ex : ATP, NAD), les vitamines (ex : vit A, B2, B6) et la chlorophylle. En présence de molécules non fluorescentes, il est toutefois possible de les marquer avec un fluorophore extrinsèque (ex : fluorescéine, rhodamine) afin de leur conférer la propriété de fluorescence. Le principal inconvénient de la fluorescence est le fait qu'elle est sujette au photoblanchiment, phénomène par lequel il y a dégradation photoinduite du chromophore, réaction photochimique qui implique l'oxygène et les radicaux libres. Il se produit alors une perte de la fluorescence du fluorochrome, ce qui est particulièrement gênant en imagerie. De plus, étant donné que la fluorescence est fortement influencée par son environnement, il faut porter une grande attention aux changements de pH, à la température, aux viscosités et à la polarité (Hilderson, 1988)

### **1.10.5 Microscopie conventionnelle confocale au laser**

L'arrivée de la microscopie confocale au laser a beaucoup amélioré la capacité de mesurer le débit sanguin dans des vaisseaux uniques grâce à des indicateurs d'activité cellulaire sous la surface piale. En microscopie optique conventionnelle, une émission de lumière focalisée et floue était détectée. Le microscope confocal au laser est indispensable pour supprimer toutes les émissions des structures en dehors du plan focal de l'objectif du microscope. On atteint cela grâce à une ouverture très petite (en trou d'aiguille) au site de détection placé sur la voie du rayon selon un plan optique conjugué au point de la source de lumière. Par conséquent, l'obtention d'images par balayage sectionnel microscopique est possible avec le laser confocal. Pour avoir une image dans le plan focal, l'échantillon est balayé avec un rayon laser dans les axes du "x" et du "y". En bougeant l'échantillon dans l'axe optique (direction en z) ceci facilite l'imagerie spatiale.

Le microscope confocal au laser de base est composé de quatre éléments : 1) L'unité d'illumination avec le séparateur du rayon laser principal permettant le couplage de la lumière du laser (l'excitation) en trajectoire du rayon. Le séparateur du rayon sépare également l'excitation de la lumière retournée émise par l'échantillon (l'épifluorescence). 2) L'unité de balayage avec des miroirs galvanomètres contrôlés permettant de bouger le point du rayon laser sur le spécimen fixé dans un plan optique (directions  $x$  et  $y$ ). La fluorescence émise par l'échantillon est balayée avant d'être dirigée dans l'ouverture de l'unité de détection. 3) L'ouverture de détection, dont le diamètre est variable, supprimant les lumières floues. La combinaison du diamètre, de la longueur d'onde de la lumière et de l'ouverture de l'objectif détermine la dimension axiale de la section optique. 4) L'unité de détection de longueur d'onde spécifique de la lumière émise par l'échantillon. L'émission différente des fluorophores est optiquement séparée. Cette séparation est atteinte avec des séparateurs secondaires, un prisme ou une grille (Tauer, 2002).

L'imagerie par microscopie conventionnelle confocale au laser permet d'imager des vaisseaux jusqu'à  $\sim 100 \mu\text{m}$  sous la surface. Cependant, l'imagerie de la population neuronale nécessite des profondeurs pouvant aller de 300 à 500  $\mu\text{m}$ .

### **1.10.6 Microscopie laser multiphotons**

L'apparition de la microscopie laser par photons a permis d'imager plus en profondeur les vaisseaux cérébraux tout en gardant une bonne qualité d'images. La venue de sources de femtolasers a été le début des expérimentations en microscopie par excitation laser multiphotons, et a permis une méthode d'imagerie non invasive pour examiner les fonctions et les structures des cellules et tissus vivants (Denk, Strickler et Webb, 1990). Elle a été décrite pour la première fois en 1990 et est depuis considérée comme l'une des techniques d'imagerie biomédicale des plus prometteuses (Denk et al., 1990).

Son principe physique est basé sur l'absorption simultanée de deux photons émis par une source de laser pulsée infrarouge. L'avantage majeur de cette technique est que l'excitation est restreinte à un focus très petit donnant ainsi des images de meilleure qualité, sans décoloration floue et avec moins de photo-dommages, et cela, à des profondeurs plus grandes. Étant donné que le microscope laser biphotonique est l'outil d'imagerie principal de mes recherches, voyons plus en détail son fonctionnement.

### 1.10.6.1 Fluorescence en photon unique vs multiphotons

Nous avons vu plus haut que la fluorescence est le fruit de l'absorption de la lumière par un fluorophore, suivi de l'émission d'une lumière dont la longueur d'onde diffère de l'originale. En fluorescence traditionnelle, le photon unique est utilisé pour exciter l'état de repos d'un fluorophore en un état d'énergie supérieur : l'état excité. Quand le photon retourne à son état de repos, il émet alors une lumière qui peut être détectée et identifiée comme lumière fluorescente. Pour exciter de manière satisfaisante le fluorophore, le photon d'excitation doit avoir une longueur d'onde qui correspond à l'énergie de l'état excité du fluorophore. Le même fluorophore peut être excité et détecté à répétition.

Le principe de la fluorescence par 2-photons est basé sur l'absorption simultanée de deux photons par un fluorophore permettant d'atteindre l'état excité. Chaque photon possède la moitié de l'énergie qu'aurait un photon unique dans l'absorption à 1-photon. Comme l'énergie d'un photon est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde, en excitation à 2-photons, ces derniers doivent avoir une longueur d'onde approximative du double de celle requise pour atteindre une transition équivalente à l'excitation à 1-photon (Figure 4). Par exemple, si un fluorophore absorbe correctement la lumière à 400 nm dans des conditions d'excitation conventionnelle, il pourra être excité simultanément par deux photons de 800 nm. Par conséquent, on peut obtenir la fluorescence avec une lumière infrarouge, plutôt que par l'illumination ultra-violette.

La méthode d'excitation par 2-photons a pour la première fois été expérimentée par Maria Göppert-Mayer lors de la rédaction de sa thèse pour l'obtention de son doctorat en 1931 (Göppert-Mayer, 1931; Masters et So, 2004). L'unité de l'aire sectionnelle d'absorption de deux photons (GM) a ainsi été nommée en son honneur ( $1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ sec-photon}^{-1}$ ) (Fan et al., 2015).

Chacune des multiples absorptions induit une excitation moléculaire de magnitude équivalente à la somme de l'énergie des photons. Dans le cas d'une excitation à deux photons, l'échantillon est illuminé avec une longueur d'onde équivalente au double du pic d'absorption (Figure 4). Par exemple, l'absorption simultanée de deux photons rouges



(chacun 980 nm) est équivalente à l'absorption d'un photon bleu (490 nm). Durant le processus d'absorption, un électron de la molécule (i.e. le fluorophore) est transformé en un état excité moléculaire orbital. Cet état d'excitation confère à la molécule une haute probabilité d'émission d'un photon durant sa phase de relaxation de l'état de base (Wang, König et Halbhuber, 2010). La combinaison de l'excitation par deux photons additionnée au principe d'imagerie par fluorescence permet d'augmenter la discrimination entre plusieurs molécules localisées à des profondeurs plus grandes.

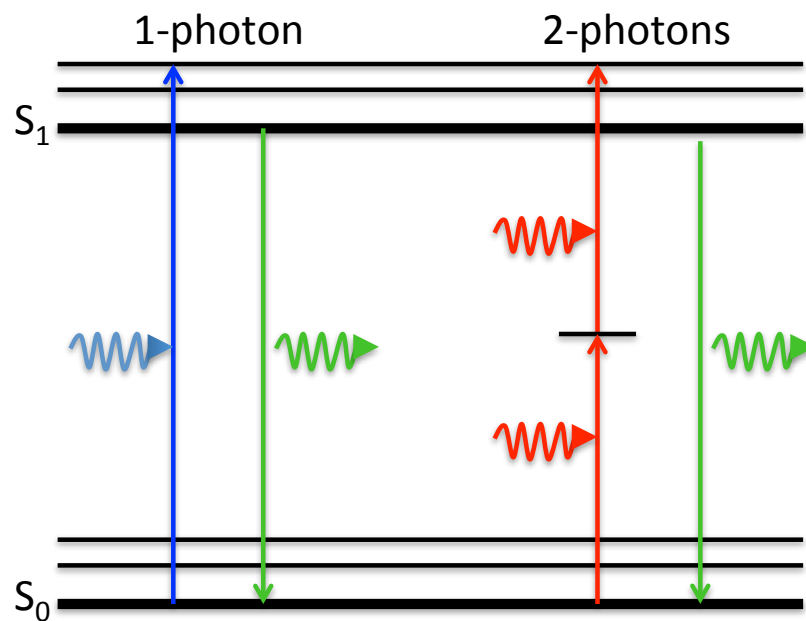


Figure 7 : Comparaison du modèle de fluorescence à 1-photon vs 2-photons

Le principe de la fluorescence par 2-photons est basé sur l'absorption simultanée de deux photons par un fluorophore permettant d'atteindre l'état excité. Chaque photon possède la moitié de l'énergie qu'aurait un photon unique dans l'absorption à 1-photon. Comme l'énergie d'un photon est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde, en excitation à 2-photons, ces derniers doivent avoir une longueur d'onde approximative du double de celle requise pour atteindre une transition équivalente à l'excitation à 1-photon. (Inspiré de (Benninger et Piston, 2013))

### **1.10.6.2 Intégration de l'excitation laser multiphotons dans les microscopes laser**

C'est en 1961, après l'invention du laser, que le phénomène d'excitation par 2-photons fut observé expérimentalement pour la première fois (Kaiser, 1961). Comme l'excitation par 2-photons nécessite que ces derniers soient absorbés presque simultanément (dans un intervalle de  $\sim 10^{-18}$  sec), le flux de photons requis est  $10^6$  fois plus élevé que l'excitation à 1-photon. Cette composante a été rendue possible dans les années 1980 avec l'avènement de lasers plus puissants permettant des pulses plus rapides (femtosecondes (fs),  $\sim 10^{-15}$ sec) (Benninger et Piston, 2013).

Le phénomène de l'excitation par multiphotons se produit uniquement dans une région très restreinte (Denk et al., 1990). Par conséquent, la lumière fluorescente origine seulement de cet endroit précis. Par ce fait, l'ouverture en trou d'aiguille indispensable dans les microscopes confocaux n'est plus nécessaire en microscopie laser multiphotons. Ce sont des détecteurs "non-descanned" qui sont alors utilisés et qui permettent de collecter les photons fluorescents qui ont été balayés; cela augmente de beaucoup le rendement.

Les microscopes laser multiphotons actuels utilisent des lasers pulsés infrarouges, habituellement un laser titanium saphire (Ti:saphirre) qui a un écart entre 700 et 1000 nm. Ces lasers ont des pics de puissance très élevés mais une puissance moyenne basse. Les pulses ont une durée ultra courte, de l'ordre de picosecondes (ps) ou femtosecondes (fs) et le taux de répétition est élevé, allant de 80-90 MHz (Wang et al., 2010).

### **1.10.6.3 Avantages et risques de la microscopie laser 2-photons (TPLM)**

Les avantages procurés par la TPLM proviennent surtout du principe physique stipulant que l'absorption des deux photons dépend du carré de l'intensité d'excitation. Suivant le focus de la source pulsée infrarouge envoyée, l'illumination converge vers une région limitée au plan focal. Au fur et à mesure que le plan focal se rapproche, la densité des photons augmente et la probabilité d'une interaction des deux photons avec le fluorophore au même moment est plus grande. Comme l'absorption 2-photons possède une dépendance quadratique à l'intensité d'excitation, la probabilité d'absorption 2-photons au centre du focus est substantiellement plus grande que celle en dehors du focus et diminue ainsi le

blanchiment flou qui pourrait survenir (Figure 5). De plus, à des longueurs d'onde plus grandes pour l'excitation à deux photons, le coefficient de dispersion est plus bas que celui utilisé pour l'excitation à un photon. Il en résulte une réduction de la perte de la lumière en permettant ainsi d'imager des structures plus profondes. La pénétration possible, quant à elle, dépend beaucoup des caractéristiques des tissus de l'échantillon étudié. Un avantage non négligeable est la phototoxicité générée qui est plus basse en raison de la moins grande quantité de fluorophore qui est excitée. Ainsi, la TPLM permet des séances d'imagerie plus longues (Tauer, 2002). Finalement, il est possible d'enregistrer l'activité cellulaire grâce à l'utilisation de marqueurs fluorescents des signaux endogènes ou des fonctions cellulaires. Par exemple, des changements dans le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Wang et al., 2006) ou encore du ratio NADPH (dihyronicotinamide-adénine dinucléotide phosphate)/NAD<sup>+</sup> intracellulaire (Murphy, Li, Betts et Liu, 2008) peuvent être observés par la TPLM.

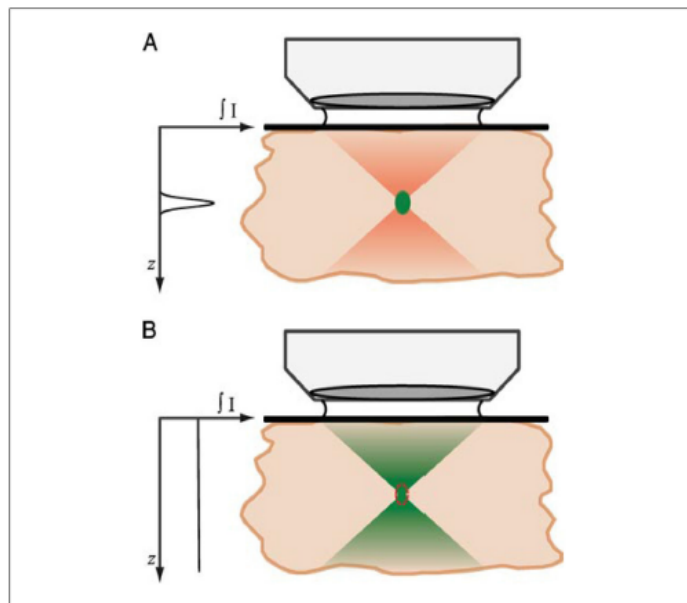


Figure 8 : Représentation de la fluorescence en TPLM vs microscopie laser 1-photon

A. Les images produites en TPLM proviennent d'un plan focal précis. Le focus de la source pulsée infrarouge envoyée converge vers une région limitée au plan focal. Comme l'absorption 2-photons possède une dépendance quadratique à l'intensité d'excitation, la probabilité d'absorption 2-photons au centre du focus est substantiellement plus grande que celle en dehors du focus et diminue ainsi le blanchiment flou qui pourrait survenir. B. Exemple d'imagerie avec microscopie laser à 1-photon ou le volume d'excitation n'est pas à un point focal précis. Tiré de [www.currentprotocols.com/protocol/cb0411](http://www.currentprotocols.com/protocol/cb0411)

La TPLM comporte aussi des risques et des inconvénients. Par exemple, le photoblanchiment et le photodommage peuvent être observés plus fréquemment en excitation par multiphotons que par uniphoton (Drummond, Carter et Cross, 2002). Le photodommage peut amener une dénaturation des protéines, un stress oxydant ou un dommage de l'ADN. En culture cellulaire, la viabilité des cellules est alors diminuée (Konig, Becker, Fischer, Riemann et Halbhuber, 1999) et dans les images neuronales de capture calcique, des changements morphologiques et pathologiques sont observés (Koester, Baur, Uhl et Hell, 1999). Des dommages cellulaires peuvent aussi se produire selon la durée du pulse qui est utilisée. Les pulses en *ps* ou en *fs* permettent une fenêtre optique sécuritaire pour la microscopie fluorescente en deux photons. Les pulses en *ps* permettent d'utiliser des puissances moyennes plus élevées avant que les dommages cellulaires ne se produisent. Cependant, il faut appliquer des puissances laser plus grandes pour générer la fluorescence. Avec des pulses en *fs*, les cellules résistent à des puissances moyennes plus basses, mais la génération de fluorescence est plus haute (Konig et al., 1999). Enfin, les cellules peuvent être endommagées par la chaleur générée. La TPLM n'est pas conçue pour imager des processus rapides avec des magnifications hautes *in vivo*. Cette dernière limitation a permis le développement d'une nouvelle approche combinant l'excitation par deux photons sans imagerie par balayage pour plus de versatilité et la rapidité pour l'imagerie *in vivo* (Hwang et al., 2011). En contrepartie, la résolution axiale étant diminuée, on obtient donc des images de moins bonnes qualités.

#### **1.10.6.4 TPLM pour mesurer les vitesses sanguines**

La TPLM s'est avérée une méthode de choix pour étudier l'hémodynamie de haute résolution chez la souris et le rat (Shih et al., 2012). Contrairement aux autres méthodes précédentes de photométrie ou par vidéo qui permettaient des mesures de vitesse limitées seulement à des vaisseaux superficiels, la TPLM peut générer des images de structure plus profondes (centaines de  $\mu\text{m}$  selon les propriétés des tissus) avec peu d'effet de dispersion de l'image (Helmchen et Denk, 2005). L'obtention de ces images se fait aux dépens de l'incapacité de quantifier de grandes vitesses (Kim et al., 2012).

La vitesse du sang peut se faire en pistant les globules rouges sur une certaine distance. En surchargeant le plasma d'un traceur fluorescent, les globules rouges apparaissent comme des points noirs en mouvement qui produisent une traînée et génèrent des données dans l'espace-temps (Ellis, Ellsworth, Pittman et Burgess, 1992). La méthode par balayage de ligne permet donc l'obtention de plusieurs images par secondes et quand il est orienté le long du vaisseau, le balayage peut suivre les mouvements des globules rouges sur une assez longue distance. Le balayage doit de plus être assez rapide car si la vitesse des globules rouges est augmentée, les cellules individuelles sont difficiles à pister et aucune traînée n'est alors discernable (Kim et al., 2012) puisque la pente de chaque traînée est inversement proportionnelle à la vitesse des globules rouges. Les vitesses sanguines sont calculées d'après la détermination de l'angle de cette pente qui est créé dans la figure espace-temps.

Utilisant cette technique, le débit sanguin des vaisseaux cérébraux au repos et en réponse à des stimuli a pu être étudiée (Kleinfeld, Mitra, Helmchen et Denk, 1998). Plus récemment, dans le cadre des études sur le vieillissement, cette technique a permis de mieux définir les paramètres d'hémodynamie cérébrale telles la vitesse des globules rouges, le diamètre des vaisseaux, l'hématocrite cérébral, le flux de globules rouges et la densité capillaire (Desjardins, Berti, Lefebvre, Dubeau et Lesage, 2014).

#### **1.10.6.5 Développements futurs de la TPLM en recherche clinique**

Avec la sensibilité améliorée de la TPLM, des progrès récents ont pu faire avancer les connaissances dans plusieurs domaines médicaux. La discipline prédominante est sans doute l'ophtalmologie avec énormément de données générées via l'imagerie de la rétine, de la cornée et de toutes leurs composantes cellulaires. Cela a par exemple permis l'amélioration des suivis des chirurgies de la cataracte (Kim, Hartner, Behe, Behr et Hampp, 2006). Autre exemple, la pharmacocinétique: la diffusion et les réponses cellulaires des produits cosmétiques et pharmaceutiques ont été étudiées. Il a également été possible de comprendre davantage le vieillissement et le cancer de la peau. Effectivement, en TPLM la peau d'une personne jeune vs âgée démontre *in vivo* des différences significatives au niveau du réseau de collagène et de la fibrine (Koehler, König, Elsner, Buckle et Kaatz, 2006). Les mélanomes (Dimitrow et al., 2009) ou les cancers de la peau non mélanome (Paoli, Smedh, Wennberg et

Ericson, 2008) ont ainsi le potentiel d'être dépistés plus tôt. En pharmacologie, la diffusion dans la couche cornée des agents cosmétiques topiques a pu être observée et en néphrologie, la fonction microvasculaire (Dunn, Sandoval et Molitoris, 2003), la perméabilité et la filtration glomérulaire du rein ont été quantifiées en TPLM (Sipos, Toma, Kang, Rosivall et Peti-Peterdi, 2007). En cancérologie, l'étude en TPLM de l'effet des médicaments angiogéniques sur les tumeurs (Tozer et al., 2005) et la découverte que la pénétration des médicaments dans les tumeurs pourrait être améliorée en modifiant la matrice de collagène extracellulaire sont prometteuses (Brown et al., 2003).

Durant la dernière décennie, la TPLM a permis l'émergence d'études fonctionnelles sur le cerveau. Le rôle des astrocytes dans les fonctions cérébrales normales a été exploré (Tian et al., 2006). Les études sur la maladie de Parkinson et l'épilepsie ont révélé une participation de l'inflammation et du système immunitaire dans leur pathophysiologie. Plus précisément, l'invasion du SNC par les cellules lymphocytaires T (Kawakami et al., 2005) et les leucocytes (Zenaro, Rossi, Angiari et Constantin, 2013) commencent à être mieux définie et ouvre la voie vers des nouvelles explorations dans ces maladies qui touchent un grand nombre de gens. La maladie d'Alzheimer a elle-aussi démontré des avancements grâce au TPLM (Eichhoff, Busche et Garaschuk, 2008) tout autant que l'effet du vieillissement normal sur l'hémodynamie cérébrale. Des travaux sur ce dernier ont d'ailleurs été récemment publiés par l'équipe du Dr Lesage et ont été réalisés avec le même microscope biphotonique que celui utilisé dans le cadre des travaux présentés ici (Desjardins et al., 2014). Finalement, les poumons et les tissus cardiaques ont eux aussi fait l'objet de recherches en TPLM et elles semblent prometteuses (Levene, Dombeck, Kasischke, Molloy et Webb, 2004; Pena et al., 2007; Zoumi, Lu, Kassab et Tromberg, 2004).

Pour conclure cette section, les messages principaux à retenir sont les suivants : l'athérosclérose entraîne des anomalies cérébrovasculaires tels une fonction endothéliale altérée et un remodelage de la paroi vasculaire qui diffèrent des vaisseaux en périphérie. Ceci engendre des conséquences sur les fonctions cérébrales et dans la régulation du DSC. La TPLM offre la possibilité exceptionnelle d'objectiver *in vivo* ces changements dans des vaisseaux aussi petits que les capillaires cérébraux de souris. La révision de la littérature présentée justifie les bases des travaux qui seront présentés dans le cadre de ce travail. Aux meilleures de nos connaissances, ce sera la première fois que la TPLM sera combinée à un modèle de souris transgénique d'athérosclérose afin d'en apprendre plus sur l'impact hémodynamique au niveau de la vasculature cérébrale.

## 2. Justification, hypothèse et objectifs

*In vivo*, le DSC étant pulsatile et influencé par l'amplitude et l'onde de pouls. L'étude *in vitro* des dilatations dépendantes de l'endothélium montre des différences selon qu'elles soient évaluées en condition statique ou pulsée. La PP semble donc réguler finement la fonction endothéliale, permettant ainsi d'ajuster le diamètre des vaisseaux cérébraux en vue de conserver les contraintes de cisaillement constantes et ainsi maintenir une autorégulation cérébrale efficace.

Parce qu'*in vitro* la pression, la fréquence de la PP et le flux peuvent être manipulés indépendamment, ces études sont essentielles pour isoler les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la fonction cérébrovasculaire. Cependant, ces signaux sont intimement intégrés *in vivo*, ils sont dépendants de la demande métabolique et du système de pression. Pour réussir à mesurer *in vivo* toutes les composantes hémodynamiques inhérentes à un vaisseau cérébral, i.e. le diamètre, la compliance en réponse à la pression pulsée et à la pression systémique, il faut une technologie sophistiquée telle la TPLM qui permet d'effectuer des images de haut niveau sur des vaisseaux aussi petits que quelques  $\mu\text{m}$  de diamètre.

**L'hypothèse** de notre travail est qu'une pression pulsée cérébrale augmentée dans un contexte de compliance cérébrovasculaire altérée (contexte d'athérosclérose) a un impact *in vivo* sur la circulation cérébrale. Cet effet se traduirait par une onde de pouls plus prononcée et plus en aval (i.e. jusqu'aux capillaires) au niveau de l'arbre vasculaire cérébral, dommageable, engendrant une altération de la vitesse du flux sanguin.

**Nos objectifs** sont :

- 1) De mesurer *in vivo* chez la souris, par imagerie TPLM, les valeurs hémodynamiques des microvaisseaux cérébraux, soient leur diamètre, la vitesse des globules rouges, le flux de globules rouges/sec et l'hématocrite.
- 2) De comparer les valeurs hémodynamiques des microvaisseaux cérébraux chez des souris sauvages (*wild-type*, WT) et des souris sévèrement dyslipidémiques (ATX) qui développent spontanément des lésions athérosclérotiques (souris LDLR<sup>-/-</sup>;hApoB-100<sup>+/+</sup>) (Bolduc et al., 2011; Drouin, Bolduc, et al., 2011).



## 3. Matériels et Méthodes

### 3.1 Modèle animal

Le modèle animal choisi a été celui des souris dont le cerveau s'étend sur 10 mm, où il est possible d'analyser des données de flux sanguin sur des colonnes corticales, une région d'activation neuronale nominalement uniforme qui couvre toute l'étendue de la matière grise. Cela correspond à un cylindre de tissu de quelques centaines de  $\mu\text{m}$  de diamètre et de 1 mm de profondeur.

Afin d'étudier l'impact *in vivo* de la pression pulsée augmentée sur la circulation cérébrale, nous avons utilisé une souris chez laquelle l'athérosclérose se développe spontanément et de manière accélérée. Ces souris athérosclérotiques (ATX) n'expriment pas le récepteur aux lipoprotéines de basse densité (LDLr) mais surexpriment plutôt l'apolipoprotéine B-100 (ApoB-100) humaine (LDLr<sup>-/-</sup>;hApoB-100<sup>+/+</sup>). Elles se distinguent par une dyslipidémie sévère et l'apparition spontanée de lésions athérosclérotiques vers l'âge de 3 mois, sous une diète standard (Sanan et al., 1998). Ces lésions apparaissent progressivement dans l'aorte et les carotides dès l'âge de 3 ou 4 mois (1-3% des lésions) et sont facilement visibles à l'œil nu (Bolduc et al., 2011; Drouin, Bolduc, et al., 2011).

La colonie de souris ATX provient à l'origine du laboratoire de Dr Helen H. Hobbs (University of Texas SouthWestern Dallas, TX, USA). Depuis 2003, elle est maintenue à l'animalerie du Centre de recherche de l'Institut de cardiologie de Montréal (Montréal, Qc, CA) pour le laboratoire du Dr Eric Thorin. Les souris de cette colonie possèdent toutes le même bagage génétique.

Nous avons utilisé des souris ATX mâles et des souris mâles contrôles de type sauvage C57B1/6 (elles aussi avec le même bagage génétique) (Charles River Laboratories, St-Constant, Qc, CA) toutes âgées de trois mois. Les souris ont été hébergées dans l'animalerie du centre de recherche de l'Institut de cardiologie de Montréal dans des conditions conventionnelles (cycle de lumière de 12h/jr et diète régulière).

## 3.2 Chirurgie des souris

En préparation de l'imagerie, les souris ont été anesthésiées à l'uréthane (200  $\mu$ L/10 g) injecté en intra péritonéal et elles ont été trachéotomisées pour favoriser une ouverture stable des voies respiratoires. Avant et pendant la chirurgie, l'efficacité de l'anesthésie était vérifiée par un pincement de l'une des pattes de la souris. Le rythme cardiaque, la tension artérielle, le rythme respiratoire et la température corporelle étaient surveillés en continu durant la chirurgie et durant l'acquisition des données d'imagerie. Les souris étaient maintenues à 37 °C grâce à un matelas chauffant avec bio contrôle intégré (Physiosuite, Kent Scientific, CT, USA) qui effectuait les ajustements selon leur température corporelle centrale. Des électrodes sous-cutanées et un capteur de la respiration transmettaient l'électrocardiogramme (ECG) et le rythme respiratoire.

La chirurgie débutait par la mise en place d'un cathéter central dans la veine jugulaire lequel permettait l'injection de salin physiologique et du fluorophore. La surveillance de la tension artérielle nécessitait la mise en place d'un cathéter fluide au niveau de l'une des artères fémorales. Une attention particulière était portée au risque de saignement artériel, facile à induire suite à la dissection et la canulation de l'artère. Pour finir, une craniotomie était effectuée au niveau du cortex pariétal pour permettre la visualisation des vaisseaux cérébraux. Pour ce faire, la souris était installée minutieusement sur un support stéréotaxique (WPI, FL, USA) avec des barres d'oreilles non traumatiques conçues pour la chirurgie et l'imagerie et cela dans le but de garder la tête immobilisée. Une petite ouverture du crâne de  $\sim$ 5mm X 5mm était effectuée au niveau du cortex pariétal cérébral sensorimoteur droit suivi d'un retrait de l'os crânien et de la dure-mère. Cette ouverture crânienne était recouverte d'une pellicule de verre de 0,5 mm d'épaisseur scellée avec de l'agarose 1% dans du LCR artificiel (Nimmerjahn et Helmchen, 2012). La fenêtre optique pour l'accès au cerveau était ainsi créée (Figure 6).

En tout temps, les saignements étaient contrôlés en effectuant de l'hémostase ou par injection locale d'épinéphrine à la concentration 1mg/ml (1:1000). Juste avant l'imagerie, une dose intraveineuse de 100  $\mu$ L de fluorescéine isothiocyanate-dextran (FITC-Dextran, poids moléculaire de 70 kDa, Sigma Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) à la concentration de 25 mg/ml dans du salin physiologique était injectée dans la veine jugulaire. Ces doses étaient

considérées sécuritaires afin d'éviter l'agrégation plaquettaire qui peut être causée par une concentration trop élevée de FITC-Dextran en circulation (Neu, Wenby et Meiselman, 2008). Pour les séances d'imagerie qui étaient plus longues, des doses supplémentaires (~15-25  $\mu$ L) étaient injectées au besoin, après plusieurs heures. La durée de chacune des chirurgies variait entre 50 et 90 minutes et les séances d'acquisition des données entre 1 heure et 4 heures.

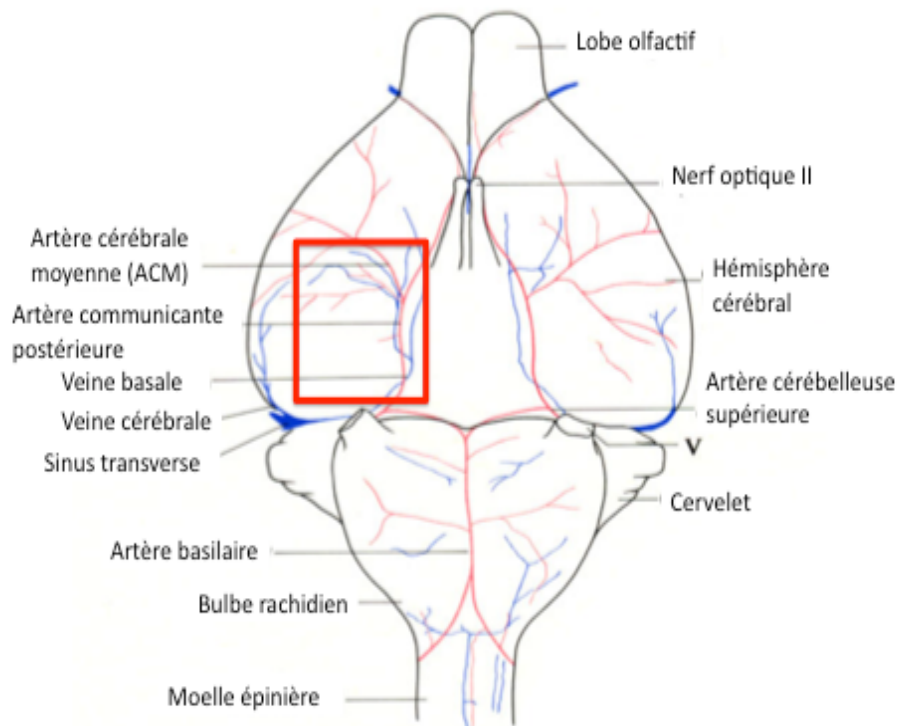


Figure 9 : Anatomie vasculaire du cerveau de la souris en coupe basale

Le carré rouge représente approximativement l'endroit de la craniotomie pour nos expérimentations

(Image modifiée de *The Anatomy of the Laboratory Mouse* par Margaret J. Cook tiré du site web MGI-Mouse Genome Informatics, <http://www.informatics.jax.org>)

### 3.3 Protocole d'imagerie cérébrale

Les images et les scans de lignes ont été effectués grâce à un microscope conçu localement par une équipe d'étudiants de l'école polytechnique de l'Université de Montréal sous la supervision du Dr. Frédéric Lesage. Ce microscope était localisé non loin de l'animalerie et de la salle de chirurgie animale et était relié à une interface de travail informatique LabView (National Instruments, TX, USA). Ce microscope a déjà permis quelques publications récentes (Desjardins et al., 2014; Gagnon et al., 2015)

Le microscope est conçu avec un laser oscillateur Ti:Sapphire (MaiTai-BB, Newport Corporation, CA, USA) pour générer des pulses de laser avec une sortie de  $\sim 2$  W à travers un polariseur acousto-optique utilisé pour ajuster le gain selon l'intensité de l'excitation lors de la pénétration. La longueur d'onde d'excitation et de détection du FITC-Dextran étaient respectivement de 800 et 520 nm. La lumière balayait la région d'intérêt ( $800\mu\text{m} \times 800\mu\text{m}$ ) de l'échantillon à l'aide de miroirs galvanométriques. Elle était dirigée sur l'échantillon et sa réflexion était collectée par un objectif 20X (ouverture numérique = 1) pour ensuite être séparée en quatre rayons à l'aide de miroirs dichroïques. L'excitation par 2-photons était donc générée à un volume focal précis avec une résolution qui comporte le minimum possible de diffraction (Figure 7). Le premier rayon était envoyé à une photodiode pour mesurer les éléments non fluorescents et ensuite utilisé pour localiser les éléments en surface de l'échantillon. Le deuxième rayon quant à lui, était séparé, filtré en longueurs d'onde de 460, 520 et 593 nm et mesuré sur trois tubes photomultiplicateurs (Hamamatsu, Photonics, Japan). L'interface utilisée permettait un affichage en temps réel des images enregistrées de basse énergie d'une durée de 100 fs à une vitesse de 80 mHz et centrées à 870 nm.

Pour la séance d'imagerie, la souris, déjà immobilisée sur le module stéréotaxique, était alors installée sur une plate-forme de mouvement en trois dimensions (11SI70521 Rev. 01; Newport) qui permettait une position précise du cerveau selon le focus de l'image (Figure 7).

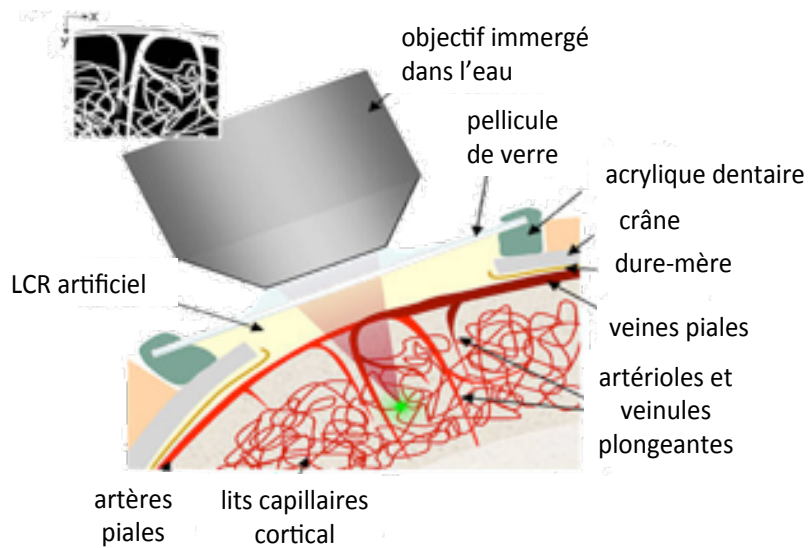


Figure 10 : Représentation schématique d'une expérimentation par TPLM

Les composantes du microscope ainsi que leur relation avec les structures anatomiques sont illustrées. Tiré de [www.wikipedia.ca](http://www.wikipedia.ca)

### 3.4 Acquisition des données

Pour chaque animal, un premier angiogramme était effectué sur une région de  $800 \mu\text{m} \times 600 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$  (Figure 8). La région était balayée par le miroir galvanométrique sur différents plans de profondeur ( $z$ ) pour lesquels  $\Delta z = 2 \mu\text{m}$ . Cet angiogramme servait par la suite à localiser les capillaires d'intérêt et à guider les balayages de lignes perpendiculaires et longitudinaux (Figure 9). Une fois bien identifié, chaque vaisseau était balayé perpendiculairement, afin de déterminer le diamètre, et longitudinalement afin de comptabiliser les globules rouges. Ces balayages de ligne comptaient 200 points sur une distance variable ( $\sim 25 \mu\text{m}$ ) à une vitesse  $\sim 400 \text{ kHz}$  ( $2 \text{ kHz/ligne}$ ), alternant entre des balayages perpendiculaires et longitudinaux pour le même vaisseau. Les balayages de lignes étaient répétés pendant  $\sim 45$  secondes afin d'en évaluer les moyennes. Pour chaque animal, le plus grand nombre possible de capillaires étaient mesurés. Nous avons analysé les données des animaux dont le nombre de capillaires imagés était supérieur à 10 ( $\Delta$  de 10 à 35 capillaires/animal).

Le plasma sanguin était chargé du marqueur fluorescent permettant l'imagerie des vaisseaux perfusés. Les globules rouges ne captent pas le fluorophore et apparaissent donc comme des particules noires en mouvement dans le vaisseau coloré (Figure 8 et Figure 9). Ce protocole d'imagerie permet de mesurer les données hémodynamiques *in vivo* du flux sanguin cérébral, de la variation du diamètre des capillaires cérébraux et de l'hématocrite sanguin.

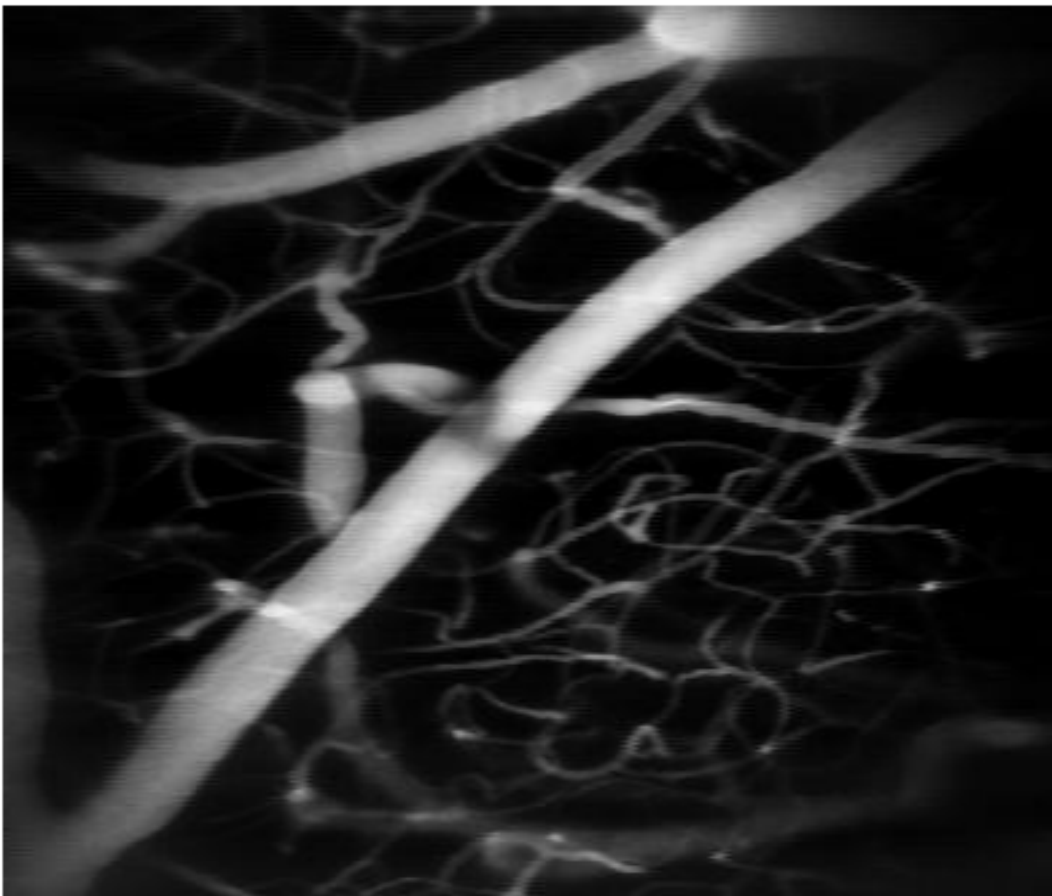


Figure 11 : Angiogramme vasculaire d'une partie du cortex pariétal d'une souris obtenu lors d'une imagerie par TPLM suite au marquage du plasma sanguin par du FITC-Dextran

Les artères piales et veines piales représentent les plus gros vaisseaux tandis que les capillaires sont les plus petits

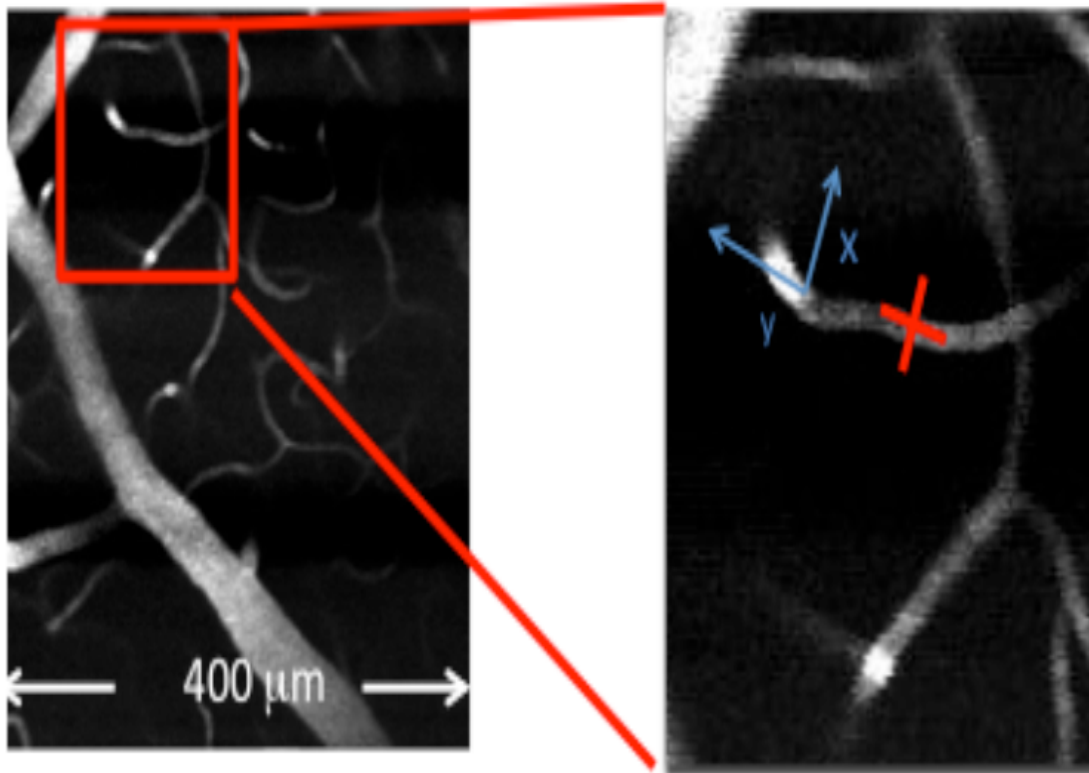


Figure 12 : Angiogramme de  $400\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$  suivi d'un zoom démontrant la position perpendiculaire et longitudinale du balayage de ligne ainsi que l'axe des x et y

La figure de gauche représente la projection maximale sur  $60\ \mu\text{m}$  d'épaisseur d'un angiogramme. La figure de droite illustre le grossissement pour le positionnement perpendiculaire et longitudinal (lignes rouges) lors du balayage d'un capillaire.

### **3.5 Analyse des données**

Toutes les analyses ont été effectuées par Matlab (MathWorks, MA, USA) selon un code programmé et mis au point par l'équipe du laboratoire du Dr Frédéric Lesage. Tel qu'illustré sur la Figure 8, le plasma sanguin était chargé avec le marqueur fluorescent permettant ainsi la visualisation des vaisseaux perfusés et les globules rouges apparaissaient comme des particules noires en mouvement dans le capillaire coloré (Figure 9). Le principe de mesure de vitesse du flux sanguin est basé sur la poursuite du mouvement de ces particules noires par des balayages de ligne successifs dans une même région (Kleinfeld et al., 1998). Les variables mesurées de notre étude sont les suivantes :

VARIABLES PRIMAIRES : vitesse des GR (mm/s), flux des GR (GR/s), flot capillaire (cell/s) et diamètre des capillaires cérébraux ( $\mu\text{m}$ ).

VARIABLES SECONDAIRES : poids des souris (g), rythme cardiaque (BPM), rythme respiratoire, MAP (mm Hg), hémotacrite sanguin (%) et nombre de capillaires mesurés.

#### **3.5.1 Diamètre des vaisseaux**

Les balayages de ligne perpendiculaires représentaient le profil des vaisseaux (Figure 10) et étaient ajustés avec une courbe Gaussienne. La largeur du vaisseau à la moitié de son maximum est définie comme le diamètre du vaisseau.

#### **3.5.2 Vitesse des globules rouges et du flux sanguin**

L'enchaînement successif des balayages de lignes longitudinaux avec les globules rouges en mouvement produit une image espace-temps avec des traînées diagonales noires tel qu'illustré sur la Figure 10. L'angle de la traînée était déterminé comme l'angle  $\theta$  où la transformation Radon de l'image a sa plus grande variation (Santisakultarm et al., 2012). Ensuite,  $\tan \theta$  a donné la pente inverse,  $\Delta y/\Delta t$ , de la traînée. La vitesse en mm/s a été automatisée en multipliant l'inverse de la pente par la dimension du pixel en millimètre par la vitesse d'acquisition en Hertz (Hz). La positivité ou la négativité du chiffre obtenu donne ainsi la direction du flux relatif au balayage et la vitesse de sa valeur absolue. Le flux volumétrique est le produit de la vitesse par l'aire sectionnelle du vaisseau ( $\pi X(\text{diamètre}/2)^2$ ) (Desjardins et al., 2014).



### 3.5.3 Flux des globules rouges

Dans les capillaires où les globules rouges circulent en file indienne, le flux des globules rouges est égal au nombre de particules noires dans l'image espace-temps (Figure 10) divisé par le temps requis pour faire l'acquisition de cette image (ex : 100 ms dans l'exemple représenté).

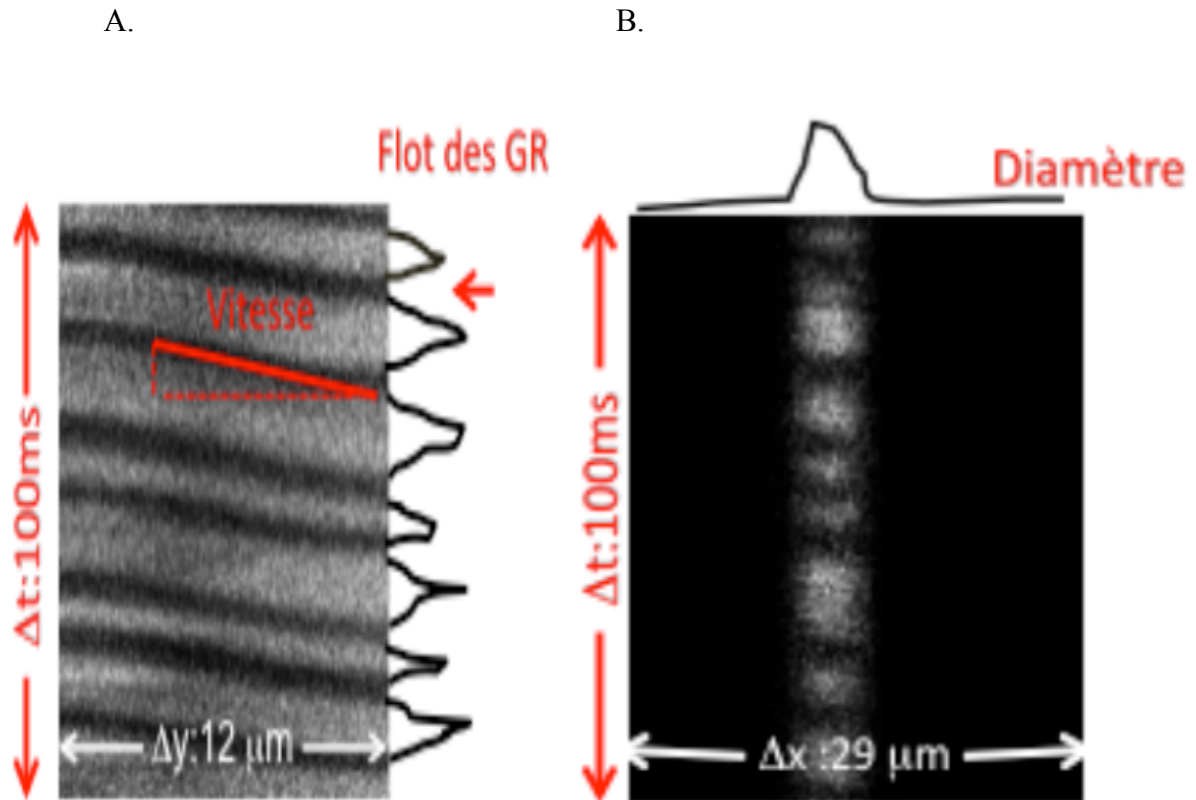


Figure 13 : Mesures de la vitesse des globules rouges (GR) et du diamètre des vaisseaux par balayage de lignes

A. Profil d'intensité d'un balayage de ligne longitudinal utilisé servant à calculer la vitesse des GR (distance/temps) et le flux de GR (nombre de cellules par unité de temps). Les pixels clairs et foncés qui s'alternent représentent le plasma et les GR au fur et à mesure qu'ils se déplacent dans le temps, apparaissant ainsi comme une trainée noire dans l'image espace-temps. B. Profil d'intensité d'un balayage perpendiculaire utilisé pour calculer le diamètre du vaisseau. Dans l'exemple présenté, vitesse =  $0,12 \mu\text{m/s}$  et le diamètre de  $4,5 \mu\text{m}$ .

### 3.5.4 Hématocrite (Hct)

Le calcul de l'Hct est basé sur la formule suivante :

$$\text{Hct} = fV_{\text{RBC}}/v\pi R^2 \quad (9)$$

où GR : globules rouges,  $f$  est le flux des GR/s,  $V$  est le volume corpusculaire moyen du GR de la souris,  $v$  la vitesse centrale des GR (mm/s) et  $R$  le rayon du vaisseau (mm).

Nous avons aussi inclus les vaisseaux où il y avait au moins un seul GR visible en mouvement, i.e. quand la traînée générée était distincte dans l'image espace-temps. Le volume corpusculaire moyen des GR de la souris utilisé est de  $45 \mu\text{m}^3$  (Hawkey, Bennett, Gascoyne, Hart et Kirkwood, 1991).

## 3.6 Analyses statistiques

Les balayages de lignes perpendiculaires et longitudinaux ont été enregistrés pour une durée d'environ 45 secondes. Pour chaque vaisseau, la valeur moyenne  $\pm$  dérivation standard a été prise pour calculer la vitesse des GR, le diamètre du vaisseau et le flux des GR/s. Pour chaque animal, la moyenne des mesures de tous les capillaires ( $n=10-26$ , moyenne = 19 capillaires/animal) a été transformée en une seule valeur. Un test *T Student* a été effectué pour comparer les variables entre les deux groupes de souris (WT et ATX).

## 4. Résultats

### 4.1 Caractéristiques physiologiques des différents groupes

Le tableau 1 représente les différences entre les caractéristiques physiologiques des deux groupes étudiés. Tel qu'attendu et décrit dans la littérature (Bolduc et al., 2011; Drouin, Bolduc, et al., 2011; Drouin, Farhat, et al., 2011), les souris ATX ont une pression artérielle centrale moyenne plus grande que les souris WT ( $46 \pm 6$  vs  $39 \pm 6$  mm Hg;  $p=0.08$ ). Vu le petit nombre d'animaux testés, la différence de PA moyenne n'est pas statistiquement significative, seule une tendance est observée. Les paramètres tels le rythme cardiaque moyen et le rythme respiratoire moyen par minute ne sont pas statistiquement différents entre les deux groupes témoignant ainsi d'une anesthésie semblable pour les deux groupes.

	Groupes		Valeur p
	WT	ATX	
Poids (g)	27	29	0.12
Rythme cardiaque (BPM)	$230 \pm 159$	$394 \pm 180$	0.26
Pressions artérielle moyenne (mm Hg)	$39 \pm 6$	$46 \pm 6$	0.08
Rythme respiratoire	$62 \pm 8$	$63 \pm 6$	0.73

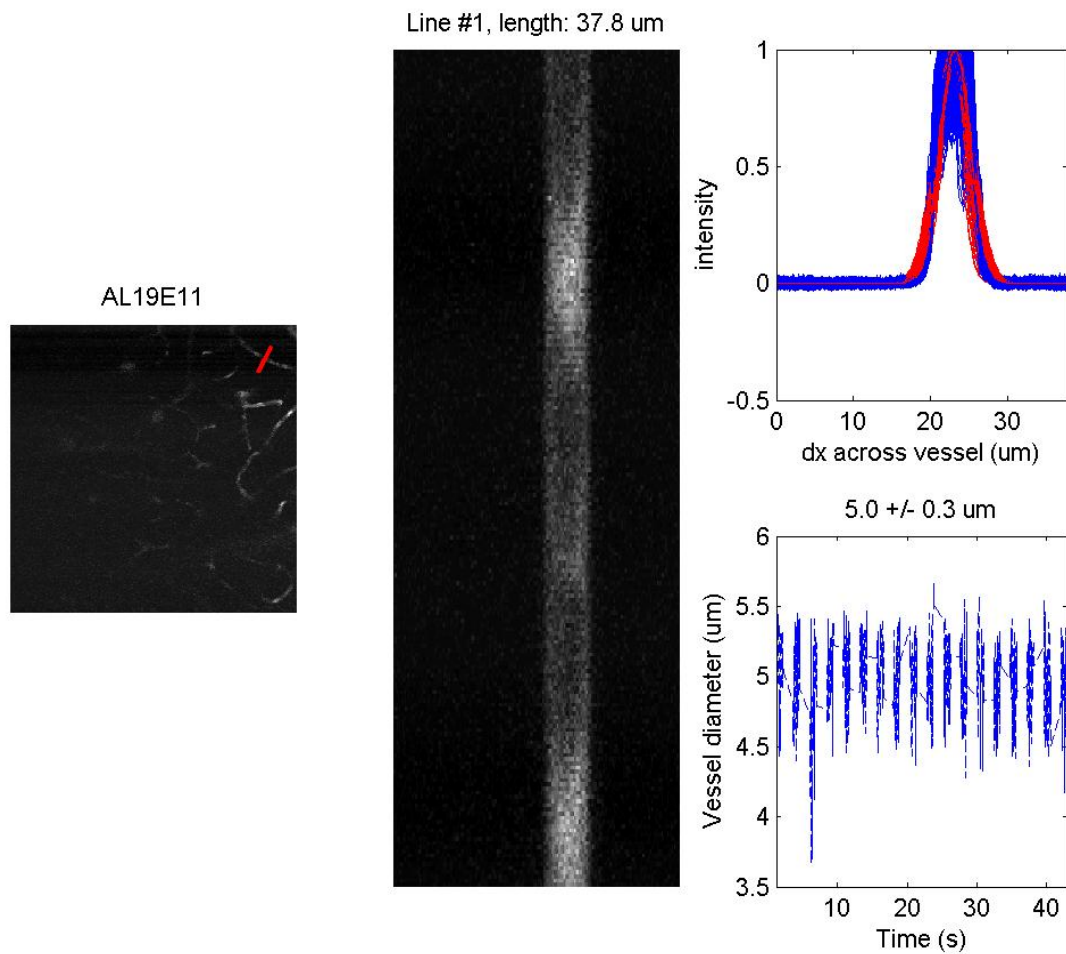
Tableau 1: Comparaison des paramètres physiologiques (n= 6 pour le groupe WT et n=6 pour le groupe ATX).

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  déviation standard. Une valeur  $p < 0.05$  était considérée comme statistiquement significative.

## 4.2 Mesures des paramètres hémodynamiques des capillaires cérébraux

La Figure 11 illustre les mesures hémodynamiques *in vivo* obtenues pour chaque capillaire cérébral. Sur une certaine distance, un balayage perpendiculaire et longitudinal était effectué pendant une période donnée. Pour chaque capillaire, il était possible d'obtenir un diamètre moyen, un pourcentage d'hématocrite (Hct) moyen et un flux de GR/s moyen (Figure 11).

A.



B.

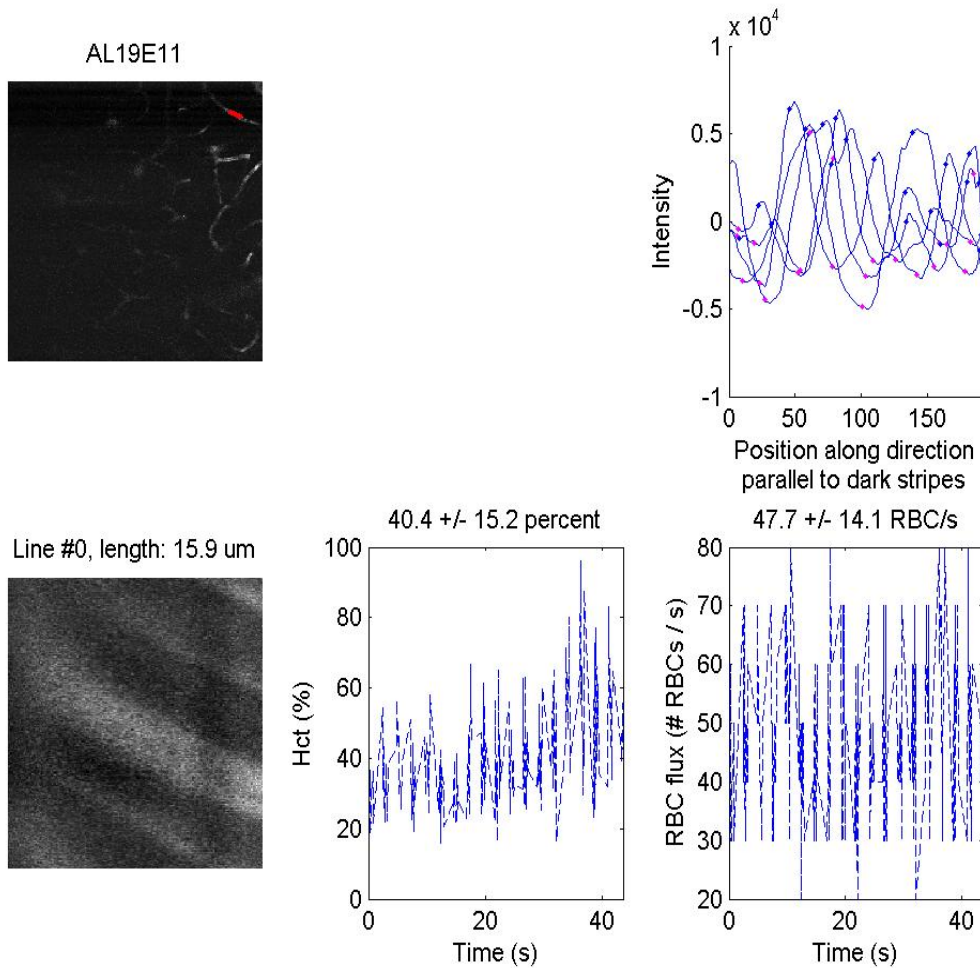


Figure 14 : Analyses obtenues lors d'un balayage de lignes perpendiculaires et horizontales d'un capillaire cérébral (identifié en rouge)

A. Balayage de lignes perpendiculaires au vaisseau pour mesurer le diamètre du capillaire. Pour une longueur de capillaire précise (ici 37.8  $\mu\text{m}$ ), des graphiques du profil d'intensité de l'image et de la variation du diamètre dans le temps sont obtenus.

B. Balayage de lignes longitudinaux au vaisseau pour mesurer le flux de globules rouges et leur vitesse: chaque séquence de balayage apparaît en dessous du précédent, formant une image espace-temps avec le temps augmentant du haut vers le bas. Chaque trainée noire correspond à un seul GR au fur et à mesure qu'il se déplace tout au long du balayage. Il est ainsi possible de calculer la vitesse en  $\mu\text{m/s}$  et le flux de GR/s. Ce balayage longitudinal de ligne permet aussi de calculer l'hématocrite sanguin (selon la formule décrite dans la section Matériels et Méthodes).

Dans l'exemple présenté pour le capillaire 11 de l'expérience 19, le diamètre moyen calculé du vaisseau est de  $5.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$ , l'Hct de  $44.4 \pm 15.2\%$  et le flux de GR de  $47.7 \pm 14.1 \text{ GR/s}$ .

La Figure 12 illustre la distribution des paramètres mesurés pour tous les capillaires des deux groupes de souris (WT vs ATX). Les mesures ne sont pas normalement distribuées (basé sur un chi-carré). La vitesse des globules rouges (Figure 12b) démontre une tendance à être plus grande chez les souris ATX, quoique non statistiquement significative. La même chose est remarquée pour les PA moyennes qui semblent plus hautes chez les souris ATX (Figure 12d).

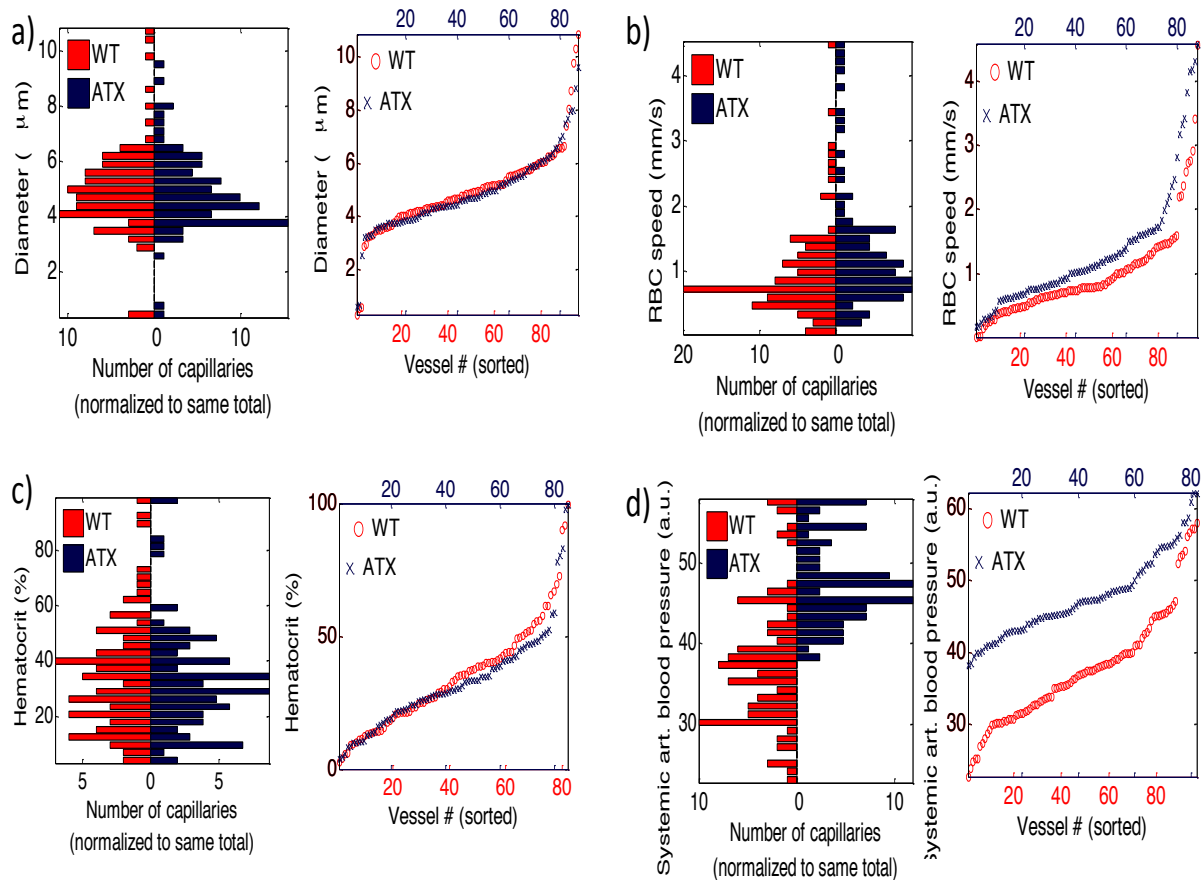


Figure 15 : Distribution du diamètre, de la vitesse des GR, de l'Hct et de la PA moyenne pour tous les capillaires mesurés dans chaque groupe de souris

*RBC* = vitesse des GR/s et *Systemic art. blood pressure* = PA moyenne

Les valeurs moyennes pour tous les animaux de chaque groupe sont représentées dans le Tableau 2. Lors des analyses, nous avons exclu les capillaires ayant des valeurs extrêmes de diamètre et de vitesse afin de se concentrer sur les capillaires et non sur les artérioles cérébrales. Malheureusement, aucun des paramètres mesurés n'a démontré de différence statistiquement significative entre les deux groupes. Cependant, nous pouvons constater une tendance à une augmentation de vitesse des GR (+40%), du flux de GR (+12%) et du flux capillaire (+14%) chez les souris ATX. L'augmentation de la vitesse des globules rouges est le paramètre le plus affecté chez les souris ATX. Ces résultats laissent suggérer des changements hémodynamiques qui se manifestent dans le DSC lorsqu'il y a présence d'athérosclérose.

Paramètres	Groupes		Valeur p	% de changement (WT ATX)
	WT	ATX		
Nombre de capillaires	103	106	0.88	-
Diamètre (µm)	4.88 ± 0.22	4.86 ± 0.20	0.96	- 0.3 %
Vitesse (mm/s)	0.98 ± 0.13	1.37 ± 0.21	0.16	+ 40 %
Flot capillaire (pL/s)	27.91 ± 6.02	31.84 ± 7.84	0.70	+ 14%
Flot des GR (cell/s)	100.53 ± 4.54	112.57 ± 7.95	0.23	+ 12%
Hct (%)	34.93 ± 3.90	33.27 ± 1.90	0.71	- 5%

Tableau 2: Mesures des paramètres hémodynamiques cérébraux obtenus dans chaque groupe de souris

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± déviation standard. Une valeur  $p < 0.05$  était considérée comme statistiquement significative. La dernière colonne représente le pourcentage de changement du paramètre mesuré chez les souris ATX par rapport à celui mesuré chez les souris WT.

### 4.3 Corrélations entre les mesures hémodynamiques

La Figure 16 illustre la relation entre les différentes variables mesurées. La vitesse des GR démontre une faible corrélation avec le diamètre du vaisseau ( $r = 0.39$ ) ainsi qu'avec le flux de GR/s ( $r=0.59$ ). Le diamètre et le flux de GR/s ne sont pas corrélés (données non montrées). Ces corrélations faibles peuvent témoigner du nombre trop petit de mesures ou que la relation linéaire n'est pas optimale pour décrire ces relations.

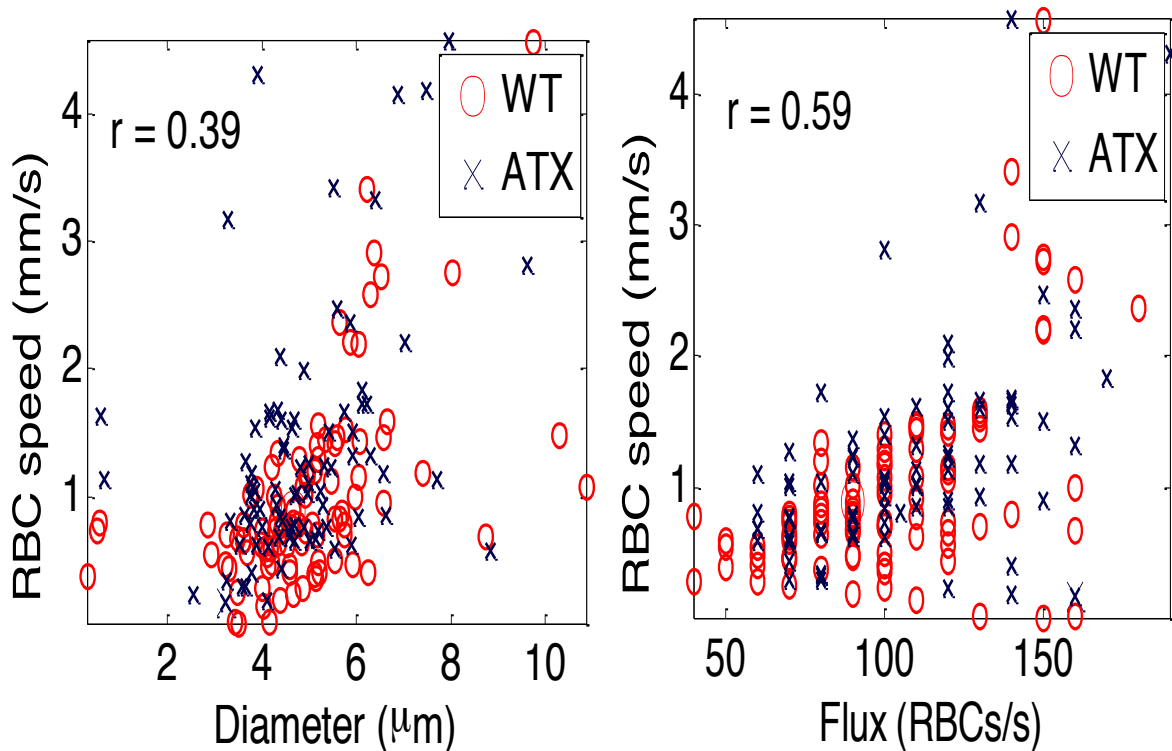


Figure 16 : Relations entre les différents paramètres vasculaires cérébraux mesurés

A. Relation entre la vitesse des GR et le diamètre des vaisseaux ( $r = 0.39$ )

B. Relation entre la vitesse des GR et le flux de GR/s ( $r = 0.59$ )



## 5. Discussion

Les avancées technologiques en imagerie fonctionnelle ont permis au TPLM de devenir un outil non invasif prisé pour étudier la biologie vasculaire des tissus organiques et des organismes vivants. Au niveau cérébral, la technique de TPLM donne la possibilité de pouvoir quantifier les changements du flux sanguin dans les microvaisseaux corticaux individuels qui répondent à l'activité neuronale locale (Kleinfeld et al., 1998) ou suite à une occlusion microvasculaire (Schaffer et al., 2006). Cette technique possède aussi l'avantage de permettre l'accès à tous les vaisseaux de la couche corticale du cerveau chez la souris (Kobat et al., 2009).

Dans le cadre des travaux de recherche pour ce mémoire, il n'a pas été confirmé par la méthode d'imagerie par TPLM que la pression pulsée *in vivo* était augmentée chez les souris atteintes d'athérosclérose. Cependant, des travaux précédents du laboratoire ont démontré une plus grande pression pulsée chez ces souris ATX avec la tomographie par cohérence optique (OCT) (Baraghis et al., 2011). Il est bien connu que l'athérosclérose augmente la rigidité de la paroi des artères diminuant ainsi la capacité d'amortissement de l'onde de pouls au niveau des artères de conduction telles l'aorte et les carotides (Farrar, Bond, Riley et Sawyer, 1991). Il en résulte ainsi une pression pulsée augmentée, laquelle se répercute jusqu'aux artères cérébrales. La pression pulsée augmentée qui vient des carotides dont la compliance est diminuée par l'athérosclérose est donc moins amortie et est potentiellement dommageable lorsqu'elle arrive au niveau de la fine circulation cérébrale. L'étude des impacts de cette pression pulsée augmentée au niveau cérébral et de ses répercussions hémodynamiques à court et moyen termes est importante car elle pourrait éclairer davantage sur les conséquences des changements fins du DSC. Ces derniers ont d'ailleurs été associés au déclin cognitif et à la démence (O'Brien, 2006). Une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents permettrait de retarder, voire d'éliminer le développement de certaines maladies cérébrales vasculaires. Nous croyons qu'il est aussi possible de mesurer la pulsatilité des vaisseaux cérébraux par la TPLM, mais la technique pour y arriver reste à définir. Dans le cadre de nos travaux de recherche de maîtrise, nous avons étudié l'impact hémodynamique d'une pression pulsée augmentée au niveau de la circulation cérébrale dans le contexte pathologique d'athérosclérose par la méthode d'imagerie par la TPLM.

Les résultats obtenus dans le cadre du présent projet de recherche ne démontrent malheureusement aucune différence statistiquement significative entre les deux groupes de souris utilisées (WT vs ATX) eu égard aux valeurs hémodynamiques mesurées, soient le diamètre des vaisseaux cérébraux, la vitesse des GR, le flux de GR/sec et l'Hct. Le petit nombre de souris dans chaque groupe pourrait en expliquer la raison. Cependant, il est important de noter que quelques tendances se sont révélées intéressantes. La plus forte tendance a été la vitesse des GR qui semble être plus élevée chez les souris ATX (+40%) avec un flux de GR/sec plus élevé (+12%). Cette observation pourrait appuyer notre hypothèse de travail qui stipule qu'en présence d'athérosclérose, la rigidité artérielle accrue dans les carotides, se manifeste par une PP augmentée transmise dans les artères cérébrales ce qui se traduirait par une plus grande vitesse des globules rouges dans le circuit cérébral. Nous pouvons aussi suggérer qu'en présence d'une PP plus grande, les variations entre le diamètre minimal et maximal des vaisseaux cérébraux seraient aussi plus grandes. Cette thèse reste toutefois à confirmer avec un plus grand nombre d'animaux et à un âge plus avancé où les dommages vasculaires de l'athérosclérose seraient plus évidents.

## **5.1 Difficultés rencontrées lors des expérimentations**

Pour notre laboratoire, il s'agissait du premier projet d'expérimentation *in vivo* utilisant la TPLM pour étudier la microcirculation cérébrale chez la souris. Les travaux de recherche présentés ont permis d'établir la faisabilité d'un protocole d'expérimentation sur des souris témoins (WT) et des souris pathologiques (ATX) qui ont été soumises à des chirurgies importantes de crâniotomie et de trachéotomie en plus de subir une instrumentation non négligeable qui consistait en la pose de voies centrales veineuse et artérielle. La chirurgie était longue (environ 1h30 par souris) et se traduisait par beaucoup de manipulations pour l'animal. C'est pourquoi nous avons eu beaucoup de décès ( $\approx 50\%$ ) avant le début du protocole d'imagerie car toutes les souris ne toléraient pas les interventions jusqu'au bout.

Au début, nous avons décidé de garder les souris sous respirateur lors de l'anesthésie par gaz inhalé (Isoflurane) et cela pour toute la durée de chaque expérience. Cela rendait toutefois les manipulations trop grandes et les souris semblaient plus instables et plus vulnérables. Nous avons donc dû nous réajuster et trouver une autre façon de faire qui permettrait aux souris de rester en vie plus longtemps malgré toutes les interventions qu'elles devaient subir.

C'est ainsi que nous avons privilégié l'utilisation d'un anesthésique intra péritonéal (uréthane) et avons gardé les souris en respiration spontanée avec la trachéotomie (Moldestad, Karlsen, Molden et Storm, 2009). Cela s'est avéré profitable car le taux de survie des souris s'est un peu amélioré (75% de survie après la chirurgie) et nous avons ainsi pu procéder à des séances d'imagerie par TPLM.

Le faible taux de survie conjugué au temps nécessaire que prenait l'exécution complète du protocole expérimental (chirurgie et imagerie par TPLM prenaient ~6-7 heures par souris, soit une expérience par jour) expliquent le petit nombre de souris dans chaque groupe qui nous a permis d'obtenir des images de vaisseaux cérébraux. Néanmoins, les souris qui ont pu atteindre un état de stabilité satisfaisant en condition post chirurgicales et qui ont pu être installées sous le microscope pour l'imagerie, nous ont donné un bon nombre d'images de leurs vaisseaux cérébraux qui ont pu être analysées (environ une centaine pour chaque groupe).

Une autre difficulté rencontrée est en lien avec la fragilité du modèle de souris *in vivo*. En effet, la crâniotomie était une étape cruciale dans la réalisation du protocole. Effectuer la petite ouverture crânienne jusqu'à atteindre la surface du cortex cérébral nécessitait un travail des plus minutieux. Le moindre saignement incontrôlé et nous perdions la région affectée comme endroit probable d'imagerie. De plus, dû au très petit volume circulant de la souris (une souris de 30 g possède un volume circulant de ~2,4 ml), une seule goutte de sang pouvait suffire à changer son hémodynamie, conséquence catastrophique pour nos analyses subséquentes. La même difficulté se rencontrait aussi lors de la canulation de l'artère fémorale pendant laquelle les saignements sont faciles. Cette technique est particulièrement difficile et nécessite de l'entraînement. C'est pourquoi, avant de débiter le protocole, nous l'avons pratiquée et mise au point sur quelques souris (n=5).

## **5.2 Choix du modèle expérimental**

Pour nos travaux nous avons opté pour un modèle de souris transgénique plutôt qu'un rat. Il est vrai que le rat présente des avantages non négligeables pour effectuer une étude par imagerie cérébrale que ce soit par ses dimensions physiques plus grandes qui facilitent une crâniotomie ou la mise en place de voies centrales, et par la meilleure stabilité de ses

paramètres physiologiques lors d'une anesthésie. Les deux modèles présentent de plus une vascularisation cérébrale, des densités vasculaires, une densité de leurs artérioles pénétrantes et une tortuosité de leurs vaisseaux plus profonds assez similaires. La grande différence se situe surtout au niveau de la surface totale du cortex cérébral qui est trois fois plus petite chez la souris (Blinder, Shih, Rafie et Kleinfeld, 2010). Ce dernier point donne un certain avantage pour pratiquer une imagerie, comme nous le verrons un peu plus bas.

Un autre élément majeur qui a fait arrêter notre choix sur la souris et que l'on ne retrouve pas chez le rat, est la possibilité d'utiliser des souris transgéniques pour étudier les conséquences et les effets de maladies spécifiques sur l'hémodynamie. Nous avons ainsi utilisé des souris  $LDLr^{-/-} :hApoB^{+/+}$  qui développent, en diète normale, des plaques d'athérosclérose dans les artères de conductance telles l'aorte et les carotides. Toutefois, leurs artères cérébrales semblent épargnées (données du laboratoire non publiées).

La comparaison des paramètres hémodynamiques entre nos deux groupes de souris a démontré que la PA moyenne des souris ATX tendait à être plus élevée que celle du groupe WT. Ce résultat concorde avec une étude du laboratoire ayant observé que les souris ATX sont légèrement hypertendues (Bolduc et al., 2011). De même, les adultes avec athérosclérose sont souvent hypertendus (Rosendorff et al., 2015).

### **5.3 Facteurs pouvant avoir influencé les résultats**

Comme nous l'avons décrit précédemment, le DSC est finement régulé et il peut être perturbé par plusieurs facteurs. Étudier l'hémodynamie cérébrale *in vivo* a donc constitué un grand défi étant donné les nombreux paramètres de surveillance qui nécessitent une attention et un souci constants. Les résultats qui ont été obtenus, ont pu être influencés par les variables expérimentales suivantes:

1. La crâniotomie : ouverture du crâne et exposition du cerveau à l'air libre.

Plus haut, nous disions que le cortex de la souris est trois fois plus petit que celui du rat, ce qui signifie qu'il possède aussi une dure mère plus mince. Cet élément est à considérer lorsque vient le temps de pratiquer une imagerie cérébrale car étant plus mince, la dure mère n'est pas un obstacle majeur lors d'une crâniotomie qui peut se faire sans qu'il soit même nécessaire de l'enlever. Cela limite ainsi l'exposition du cerveau à

l'air libre lors de la chirurgie et, de ce fait, diminue les possibilités d'inflammation du cerveau. Toutefois faire ce choix nous aurait empêché d'obtenir des images en profondeur et de qualité. Nous avons donc opté de retirer la dure-mère lors de la crâniotomie, augmentant l'exposition à l'air libre et les chances d'accentuer la PIC ainsi que les artéfacts dans les images causés par les rythmes cardiaque et respiratoire (Drew et al., 2010).

## 2. La PaO<sub>2</sub> et la PaCO<sub>2</sub>

La PaO<sub>2</sub> et la PaCO<sub>2</sub> influencent grandement la réactivité des vaisseaux cérébraux. Durant une expérience d'imagerie cérébrale il est recommandé de prendre des valeurs se situant dans des intervalles restreints au début et à la fin des expériences afin de s'assurer qu'elles n'ont pas varié de manière importante (Shih et al., 2012). Une PaCO<sub>2</sub> trop élevée et une PaO<sub>2</sub> trop basse ont pu provoquer une vasodilatation cérébrale et fausser ainsi les résultats. Idéalement, il aurait fallu contrôler les valeurs de PaO<sub>2</sub> et de PaCO<sub>2</sub> en mesurant les gaz sanguins au moins une fois durant chaque expérience. Cependant, nous savons que chez la souris, une seule goutte de sang extraite peut modifier son hémodynamie générale. L'autre possibilité aurait été de mesurer le CO<sub>2</sub> expiré lors d'une anesthésie par gaz anesthésiant, option non choisie dans ce protocole-ci. Pour tenter de surveiller cette variable très importante, nous avons porté une attention particulière à la fréquence respiratoire tout au long du protocole. En effet, cette dernière était surveillée en continu, et est demeurée constante et comparable dans les deux groupes.

## 3- Le choix de l'agent anesthésique

L'hémodynamie varie et n'est pas constante selon qu'il y ait anesthésie ou pas. Il est bien décrit que les agents anesthésiques modifient la perfusion cérébrale (Franceschini et al., 2010) (Szabo et al., 2009). Le choix de l'agent anesthésique utilisé durant les expériences *in vivo* mesurant des paramètres hémodynamiques est donc très important. Toute anesthésie modifie à la baisse les variations du rythme cardiaque et du rythme respiratoire. Il est donc important de prendre cela en considération quand vient le temps d'analyser les résultats obtenus lorsque les sujets sont anesthésiés. Comme il s'agit d'une limitation majeure de nos expérimentations, pour s'en affranchir, il faudrait faire

des mesures en imagerie TPLM en ayant recours à une crâniotomie modifiée et de plus longue durée , tel que discuté dans (Shih et al., 2012) par exemple. Les mesures d'hémodynamie cérébrale seraient alors calculées sans la contrainte de l'anesthésie (Drew et al., 2010).

#### 4- Le choix du fluorophore

Il existe plusieurs sortes de fluorophores pour marquer les vaisseaux lors d'une imagerie, Même si une étude récente mentionnait que le Texas Red-Dextran pouvait marquer le plasma et permettre des images plus en profondeur que le FITC-Dextran, il a l'inconvénient d'avoir une plus petite absorption de la lumière rouge par le sang et une plus grande aire sectionnelle pour les deux photons (Kim et al., 2012). C'est donc avec le FITC-Dextran que nous avons travaillé et que nous avons procédé aux analyses de vitesse des GR, du Hct et du flux des GR/sec car il satisfaisait aux exigences de notre objectif de recherche qui consistaient en un marquage du plasma sanguin afin de permettre une visualisation des vaisseaux par TPLM. En ce qui concerne les GR, comme ils ne captaient pas ce fluorophore, ils apparaissaient sur l'image comme des points noirs circulants, ce qui nous a permis de bâtir nos analyses.

#### 5- L'âge des souris

Les souris ATX développent spontanément des plaques athérosclérotiques dans l'aorte et les carotides. Ces plaques sont difficilement identifiables avant l'âge de 3 mois mais facilement visibles à partir de 6 mois car elles occupent une grande proportion de l'aorte (Bolduc et al., 2011). Il est reconnu que l'âge avancé est un facteur déterminant dans l'augmentation de la rigidité artérielle (Greenwald, 2007). Une rigidité artérielle accrue et la présence d'athérosclérose pourraient potentiellement résulter en une PP plus élevée au niveau cérébral. Il serait donc intéressant de répéter nos expériences sur un groupe de souris WT et ATX âgées de 6 mois et de comparer les résultats, lesquels seront probablement une vitesse et un flux de GR plus élevés avec une variation de diamètre minimal et maximal plus grande comparé aux données mesurées à l'âge de 3 mois. De plus, à 6 mois, des différences plus nettes entre les paramètres hémodynamiques des souris WT et ATX sont attendues.

## 6- La mesure du diamètre vasculaire obtenu par TPLM

Dans notre protocole d'analyse, la mesure du diamètre vasculaire était basée sur les variations du diamètre externe lors du balayage perpendiculaire dans le temps. On sait que les plaques qui se développent en contexte d'athérosclérose ont un point de départ intraluminal. Elles grossissent pour envahir la lumière endovasculaire jusqu'à en diminuer le rayon disponible par lequel le sang circule. Le flux sanguin devient alors turbulent à l'endroit où se situe la plaque. Une méthode d'imagerie par TPLM qui permettrait de mesurer le diamètre intraluminal pourrait donc avoir l'avantage d'être plus fiable pour quantifier les changements du calibre vasculaire en situation pathologique. Cependant, comme il ne semble pas y avoir de plaques d'athérosclérose dans les artères cérébrales des souris ATX, même à l'âge de 6 mois alors que dans l'aorte et les carotides les plaques sont bien visibles (Bolduc et al., 2011), il semble que le diamètre intraluminal des vaisseaux cérébraux ne soit finalement pas affecté par la pathologie et la mesure du diamètre vasculaire serait fiable.

Un autre point important à considérer pour interpréter nos résultats du diamètre vasculaire, est qu'il est exprimé en valeur du diamètre moyen pour chaque capillaire et que cette valeur reste la même, même si la PP est augmentée de manière significative. En effet, une PP très augmentée n'est pas incompatible avec une même valeur de diamètre moyen : si, en accord avec une PP plus élevée, le diamètre vasculaire maximal est plus grand et le diamètre minimal plus petit, alors le diamètre moyen ne change pas. Une analyse des changements du flux sanguin dans un capillaire avec l'aire sectionnelle interne du même vaisseau, observés par TPLM lors de la systole (mesure du diamètre maximal) et de la diastole (mesure du diamètre minimal) pourraient s'avérer très intéressante. En effet, cette analyse a été effectuée *in vivo* par imagerie OCT dans ces deux mêmes groupes de souris, et a mis en évidence une compliance cérébrovasculaire accrue (un diamètre vasculaire maximal plus grand et un diamètre minimal plus petit) chez les souris ATX (Bolduc et al., 2012).

## 7- Le choix de la méthode d'imagerie

Tout au long de ce mémoire, il a été mentionné à quel point les avantages de la TPLM étaient considérables pour effectuer une imagerie sur des spécimens vivants. Un autre avantage est qu'il permet d'obtenir des images en 3D sans qu'il y ait absorption de la fluorescence au-delà du plan de focus. Le risque de phototoxicité est ainsi beaucoup diminué. De plus, la qualité des images en profondeur, même s'il y a toujours de la place à l'amélioration, se trouve moins dégradée par la dispersion des photons d'excitation et d'émission (Benninger et Piston, 2013). Malgré tout, il subsiste un inconvénient non négligeable puisque le photoblanchiment ne s'élimine pas complètement.

Comme c'est l'épi-illumination qui a été utilisée pour notre protocole d'imagerie, la fluorescence de retour a été collectée par la même voie de l'illumination d'excitation de l'objectif du microscope. Ainsi, cela a limité la résolution spatiale en axe  $y$  relativement aux axes  $x$  et  $z$ .

Une autre possibilité aurait été la microscopie d'illumination par plan sélectif (SPIM; *selective-plane illumination microscopy*) qui est un outil récemment développé (Huisken et Stainier, 2009). Avec cette méthode d'imagerie, le plan illuminé ressemble à une mince feuille qui se place dans le sens perpendiculaire à l'axe d'imagerie. La résolution axiale ainsi atteinte est plus grande et la dispersion d'excitation minimisée. Il ne peut donc qu'en résulter une meilleure capacité tomographique car l'échantillon est reconstruit en de multiples positions d'imagerie. Cependant, cette méthode d'imagerie nécessite des microscopes hautement spécialisées (que nous n'avons pas), la profondeur d'imagerie qu'il est possible d'obtenir est moindre qu'en TPLM et une excitation très localisée est impossible (Benninger et Piston, 2013).



## 5.4 Retour sur les objectifs de l'étude

Les principaux objectifs de mes travaux étaient de mesurer *in vivo*, par imagerie TPLM, les données hémodynamiques des microvaisseaux cérébraux et de les comparer en situation physiologiques et pathologiques. En premier lieu, la mise en place du protocole, bien que beaucoup d'ajustements ont été nécessaires, a confirmé la possibilité d'effectuer cette méthode d'imagerie chez la souris, après une préparation chirurgicale minutieuse et délicate. Les images obtenues chez un grand nombre de capillaires cérébraux pour nos deux groupes nous ont permis de constater que la vitesse des globules rouges ( $\mu\text{m/s}$ ), le flux de globules rouges (GR/s) et le flux sanguin capillaire (pL/s) tendent à être plus élevés dans notre modèle de souris pathologique (ATX). Malheureusement, après les analyses statistiques, cette tendance ne s'est pas avérée significative. La souris transgénique utilisée lors de nos expérimentations constitue, à notre avis, un bon modèle d'étude pour étudier les effets de l'athérosclérose mais un plus grand nombre de sujets dans chaque groupe sera nécessaire pour confirmer cette tendance. De plus, le développement de la technique pour calculer la pulsativité des vaisseaux cérébraux de manière plus fiable par TPLM apportera d'autres éléments importants qui éventuellement permettront de pousser plus loin notre compréhension de la régulation vasculaire cérébrale.

## 5.5 Avenues futures

Il y a de plus en plus d'évidences que l'activité neuronale soit intimement liée au débit sanguin local. Tel que vu précédemment, les nouvelles avenues en imagerie du cerveau ont ouvert la voie vers une meilleure compréhension du fonctionnement de cette relation complexe. Le TPLM est actuellement la méthode de choix pour imager le flux sanguin cérébral (Kleinfeld et al., 1998). Beaucoup d'études ont été faites sur la dynamique vasculaire au niveau du cortex somatosensoriel (Blinder et al., 2010) et du bulbe olfactif (Chaigneau et al., 2007). Les avancées récentes ont permis de démontrer que le TPLM peut imager les microvaisseaux sur toute la surface du cortex (Kobat et al., 2009), caractéristique importante car la régulation vasculaire semble être initiée dans les couches plus profondes. De plus, un avantage intéressant est la capacité d'étudier l'activité cellulaire tels les changements du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Chaigneau et al., 2007) et du ratio  $\text{NADPH/NAD}^+$  (Murphy et al., 2008) en

même temps que le flux sanguin et les changements de diamètre des vaisseaux. L'hyperhémie fonctionnelle ou le couplage neurovasculaire est un domaine actif en recherche (Attwell et al., 2010) et plusieurs questions demeurent encore sans réponse. Comment les signaux neuronaux engendrent-ils la vasoréactivité? En particulier, quelles classes de cellules excitatrices ou inhibitrices ont un rôle dominant et comment cela se traduit-il dans leurs réponse vasculaire? Quel est le rôle des astrocytes? Sont-ils des cellules intermédiaires qui délivrent leur signal directement des neurones aux vaisseaux (Zonta et al., 2003) ou est-ce les signaux neuronaux qui ont un effet direct sur les vaisseaux (Cauli et al., 2004)? Finalement, comment les mécanismes de couplages neurovasculaires changent-ils en réponse aux maladies du SBC telles la maladie d'Alzheimer, l'hypertension et la démence vasculaire (Girouard et Iadecola, 2006)? Ces maladies causent des atteintes cognitives importantes et leur prévalence, en constante progression dans les dernières décennies, ne semble pas s'essouffler. Mieux comprendre ces maladies et mieux les prévenir offrirait un atout majeur dans le domaine de la santé publique.

## 6. Conclusion et recommandations

A cours de ce travail, la technique d'imagerie par microscopie laser à 2-photons a été utilisée pour tenter de démontrer l'impact d'une pression pulsée accrue sur les mesures d'hémodynamie cérébrale. Nous avons comparé des souris contrôles à des souris sévèrement dyslipidémiques atteintes d'athérosclérose. La conclusion principale est la suivante : la vitesse des globules rouges tend à être plus élevée chez les souris athérosclérotiques, ce qui pourrait être secondaire à une pression pulsée accrue elle-même engendrée par une diminution de la compliance des artères élastiques. L'étude plus approfondie de l'impact d'une arrivée plus rapide de globules rouges au niveau de la microvasculature cérébrale combinée à une compliance cérébrovasculaire accrue (démontrée par des travaux antérieurs du labo) pourrait permettre de mieux comprendre les effets du vieillissement et l'origine vasculaire des maladies avec atteinte des fonctions cognitives telles la démence vasculaire, la maladie d'Alzheimer et l'hypertension. De plus, comme peu d'études montrent que la pulsatilité modifie le comportement des artères, il faudra trouver des méthodes plus précises afin d'en évaluer l'effet au niveau de la circulation cérébrale, tant en condition physiologique qu'en condition pathologique.



## Bibliographie

- Ainslie, P. N., Ashmead, J. C., Ide, K., Morgan, B. J. et Poulin, M. J. (2005). Differential responses to CO<sub>2</sub> and sympathetic stimulation in the cerebral and femoral circulations in humans. *J Physiol*, 566(Pt 2), 613-624. doi: 10.1113/jphysiol.2005.087320
- Ainslie, P. N. et Brassard, P. (2014). Why is the neural control of cerebral autoregulation so controversial? *F1000Prime Rep*, 6, 14. doi: 10.12703/P6-14
- Ainslie, P. N. et Duffin, J. (2009). Integration of cerebrovascular CO<sub>2</sub> reactivity and chemoreflex control of breathing: mechanisms of regulation, measurement, and interpretation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296(5), R1473-1495. doi: 10.1152/ajpregu.91008.2008
- Ainslie, P. N., Shaw, A. D., Smith, K. J., Willie, C. K., Ikeda, K., Graham, J. et Macleod, D. B. (2014). Stability of cerebral metabolism and substrate availability in humans during hypoxia and hyperoxia. *Clin Sci (Lond)*, 126(9), 661-670. doi: 10.1042/CS20130343
- Ainslie, P. N. et Tzeng, Y. C. (2010). On the regulation of the blood supply to the brain: old age concepts and new age ideas. *J Appl Physiol (1985)*, 108(6), 1447-1449. doi: 10.1152/jappphysiol.00257.2010
- Alfie, J., Waisman, G. D., Galarza, C. R. et Camera, M. I. (1999). Contribution of stroke volume to the change in pulse pressure pattern with age. *Hypertension*, 34(4 Pt 2), 808-812.
- Ances, B. M., Greenberg, J. H. et Detre, J. A. (1999). Laser doppler imaging of activation-flow coupling in the rat somatosensory cortex. *Neuroimage*, 10(6), 716-723. doi: 10.1006/nimg.1999.0510
- Ando, J. et Yamamoto, K. (2009). Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circ J*, 73(11), 1983-1992.
- Attwell, D., Buchan, A. M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B. A. et Newman, E. A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, 468(7321), 232-243. doi: 10.1038/nature09613
- Bagi, Z., Hamar, P., Kardos, M. et Koller, A. (2006). Lack of flow-mediated dilation and enhanced angiotensin II-induced constriction in skeletal muscle arterioles of lupus-prone autoimmune mice. *Lupus*, 15(6), 326-334.
- Balligand, J. L., Feron, O. et Dessy, C. (2009). eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev*, 89(2), 481-534. doi: 10.1152/physrev.00042.2007
- Baraghis, E., Bolduc, V., Lefebvre, J., Srinivasan, V. J., Boudoux, C., Thorin, E. et Lesage, F. (2011). Measurement of cerebral microvascular compliance in a model of atherosclerosis with optical coherence tomography. *Biomed Opt Express*, 2(11), 3079-3093. doi: 10.1364/BOE.2.003079
- Benetos, A., Safar, M., Rudnichi, A., Smulyan, H., Richard, J. L., Ducimetieere, P. et Guize, L. (1997). Pulse pressure: a predictor of long-term cardiovascular mortality in a French male population. *Hypertension*, 30(6), 1410-1415.
- Benninger, R. K. et Piston, D. W. (2013). Two-photon excitation microscopy for the study of living cells and tissues. *Curr Protoc Cell Biol, Chapter 4, Unit 4* 11 11-24. doi: 10.1002/0471143030.cb0411s59

- Betz, E. (1972). Cerebral blood flow: its measurement and regulation. *Physiol Rev*, 52(3), 595-630.
- Blinder, P., Shih, A. Y., Rafie, C. et Kleinfeld, D. (2010). Topological basis for the robust distribution of blood to rodent neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(28), 12670-12675. doi: 10.1073/pnas.1007239107
- Blinder, P., Tsai, P. S., Kaufhold, J. P., Knutsen, P. M., Suhl, H. et Kleinfeld, D. (2013). The cortical angiome: an interconnected vascular network with noncolumnar patterns of blood flow. *Nat Neurosci*, 16(7), 889-897. doi: 10.1038/nn.3426
- Bolduc, V., Baraghis, E., Duquette, N., Thorin-Trescases, N., Lambert, J., Lesage, F. et Thorin, E. (2012). Catechin prevents severe dyslipidemia-associated changes in wall biomechanics of cerebral arteries in LDLr<sup>-/-</sup>:hApoB<sup>+/+</sup> mice and improves cerebral blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302(6), H1330-1339. doi: 10.1152/ajpheart.01044.2011
- Bolduc, V., Drouin, A., Gillis, M. A., Duquette, N., Thorin-Trescases, N., Frayne-Robillard, I., . . . Thorin, E. (2011). Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301(5), H2081-2092. doi: 10.1152/ajpheart.00706.2011
- Bolduc, V., Thorin-Trescases, N. et Thorin, E. (2013). Endothelium-dependent control of cerebrovascular functions through age: exercise for healthy cerebrovascular aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305(5), H620-633. doi: 10.1152/ajpheart.00624.2012
- Brandes, R. P., Fleming, I. et Busse, R. (2005). Endothelial aging. *Cardiovasc Res*, 66(2), 286-294. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.12.027
- Breckler, J. L., Christensen, T. et Sun, W. (2013). Using a physics experiment in a lecture setting to engage biology students with the concepts of Poiseuille's law. *CBE Life Sci Educ*, 12(2), 262-273. doi: 10.1187/cbe.12-08-0129
- Brown, E., McKee, T., diTomaso, E., Pluen, A., Seed, B., Boucher, Y. et Jain, R. K. (2003). Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation. *Nat Med*, 9(6), 796-800. doi: 10.1038/nm879
- Bryan, R. M., Jr., Marrelli, S. P., Steenberg, M. L., Schildmeyer, L. A. et Johnson, T. D. (2001). Effects of luminal shear stress on cerebral arteries and arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280(5), H2011-2022.
- Busija, D. W. et Heistad, D. D. (1984). Factors involved in the physiological regulation of the cerebral circulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 101, 161-211.
- Busse, R. et Fleming, I. (2003). Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends Pharmacol Sci*, 24(1), 24-29.
- Cameron, J. D. et Dart, A. M. (1994). Exercise training increases total systemic arterial compliance in humans. *Am J Physiol*, 266(2 Pt 2), H693-701.
- 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(41), 8940-8949. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3065-04.2004
- Chaigneau, E., Tiret, P., Lecoq, J., Ducros, M., Knopfel, T. et Charpak, S. (2007). The relationship between blood flow and neuronal activity in the rodent olfactory bulb. *J Neurosci*, 27(24), 6452-6460. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3141-06.2007

- Chemla, D., Hebert, J. L., Coirault, C., Zamani, K., Suard, I., Colin, P. et Lecarpentier, Y. (1998). Total arterial compliance estimated by stroke volume-to-aortic pulse pressure ratio in humans. *Am J Physiol*, 274(2 Pt 2), H500-505.
- Chen, S., Chen, Y., Xu, L., Matei, N., Tang, J., Feng, H. et Zhang, J. H. (2015). Venous system in acute brain injury: Mechanisms of pathophysiological change and function. *Exp Neurol*, 272, 4-10. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.03.007
- Cipolla, M. J. (2009). *The Cerebral Circulation*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences.
- Clifford, P. S. (2011). Local control of blood flow. *Adv Physiol Educ*, 35(1), 5-15. doi: 10.1152/advan.00074.2010
- Correia, M. L. et Haynes, W. G. (2007). Arterial compliance and endothelial function. *Curr Diab Rep*, 7(4), 269-275.
- Cottart, C. H., Laguillier, C., Nivet-Antoine, V., Klimczak, C., Sebban, C. et Beaudeau, J. L. (2009). [Biology of arterial ageing and arteriosclerosis]. *C R Biol*, 332(5), 433-447. doi: 10.1016/j.crvi.2008.10.002
- Crimi, E., Ignarro, L. J. et Napoli, C. (2007). Microcirculation and oxidative stress. *Free Radic Res*, 41(12), 1364-1375. doi: 10.1080/10715760701732830
- Dart, A. M. et Kingwell, B. A. (2001). Pulse pressure--a review of mechanisms and clinical relevance. *J Am Coll Cardiol*, 37(4), 975-984.
- Davis, M. J. et Hill, M. A. (1999). Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev*, 79(2), 387-423.
- Denk, W., Strickler, J. H. et Webb, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951), 73-76.
- Desjardins, M., Berti, R., Lefebvre, J., Dubeau, S. et Lesage, F. (2014). Aging-related differences in cerebral capillary blood flow in anesthetized rats. *Neurobiol Aging*, 35(8), 1947-1955. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.136
- Devor, A., Hillman, E. M., Tian, P., Waeber, C., Teng, I. C., Ruvinskaya, L., . . . Boas, D. A. (2008). Stimulus-induced changes in blood flow and 2-deoxyglucose uptake dissociate in ipsilateral somatosensory cortex. *J Neurosci*, 28(53), 14347-14357. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4307-08.2008
- Dimitrow, E., Riemann, I., Ehlers, A., Koehler, M. J., Norgauer, J., Elsner, P., . . . Kaatz, M. (2009). Spectral fluorescence lifetime detection and selective melanin imaging by multiphoton laser tomography for melanoma diagnosis. *Exp Dermatol*, 18(6), 509-515. doi: 10.1111/j.1600-0625.2008.00815.x
- Drew, P. J., Shih, A. Y., Driscoll, J. D., Knutsen, P. M., Blinder, P., Davalos, D., . . . Kleinfeld, D. (2010). Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull. *Nat Methods*, 7(12), 981-984. doi: 10.1038/nmeth.1530
- Drouin, A., Bolduc, V., Thorin-Trescases, N., Belanger, E., Fernandes, P., Baraghis, E., . . . Thorin, E. (2011). Catechin treatment improves cerebrovascular flow-mediated dilation and learning abilities in atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300(3), H1032-1043. doi: 10.1152/ajpheart.00410.2010
- Drouin, A., Farhat, N., Bolduc, V., Thorin-Trescases, N., Gillis, M. A., Villeneuve, L., . . . Thorin, E. (2011). Up-regulation of thromboxane A(2) impairs cerebrovascular eNOS function in aging atherosclerotic mice. *Pflugers Arch*, 462(3), 371-383. doi: 10.1007/s00424-011-0973-y

- Drouin, A. et Thorin, E. (2009). Flow-induced dilation is mediated by Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide in mouse cerebral arteries. *Stroke*, 40(5), 1827-1833. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.536805
- Drouin, A., Thorin-Trescases, N., Hamel, E., Falck, J. R. et Thorin, E. (2007). Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in mouse cerebral arteries. *Cardiovasc Res*, 73(1), 73-81. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.10.005
- Drummond, D. R., Carter, N. et Cross, R. A. (2002). Multiphoton versus confocal high resolution z-sectioning of enhanced green fluorescent microtubules: increased multiphoton photobleaching within the focal plane can be compensated using a Pockels cell and dual widefield detectors. *J Microsc*, 206(Pt 2), 161-169.
- Dunn, A. K., Bolay, H., Moskowitz, M. A. et Boas, D. A. (2001). Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21(3), 195-201. doi: 10.1097/00004647-200103000-00002
- Dunn, K. W., Sandoval, R. M. et Molitoris, B. A. (2003). Intravital imaging of the kidney using multiparameter multiphoton microscopy. *Nephron Exp Nephrol*, 94(1), e7-11. doi: 70813
- Edvinsson, L. (1975). Neurogenic mechanisms in the cerebrovascular bed. Autonomic nerves, amine receptors and their effects on cerebral blood flow. *Acta Physiol Scand Suppl*, 427, 1-35.
- Edvinsson, L. H., E. (2002). *Cerebral Blood Flow and Metabolism*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins.
- Eichhoff, G., Busche, M. A. et Garaschuk, O. (2008). In vivo calcium imaging of the aging and diseased brain. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 35 Suppl 1, S99-106. doi: 10.1007/s00259-007-0709-6
- Ellis, C. G., Ellsworth, M. L., Pittman, R. N. et Burgess, W. L. (1992). Application of image analysis for evaluation of red blood cell dynamics in capillaries. *Microvasc Res*, 44(2), 214-225.
- Fan, Y., Liu, H., Han, R., Huang, L., Shi, H., Sha, Y. et Jiang, Y. (2015). Extremely high brightness from polymer-encapsulated quantum dots for two-photon cellular and deep-tissue imaging. *Sci Rep*, 5, 9908. doi: 10.1038/srep09908
- Faraci, F. M., Baumbach, G. L. et Heistad, D. D. (1990). Cerebral circulation: humoral regulation and effects of chronic hypertension. *J Am Soc Nephrol*, 1(1), 53-57.
- Faraci, F. M. et Heistad, D. D. (1990). Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circ Res*, 66(1), 8-17.
- Faraci, F. M. et Heistad, D. D. (1998). Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev*, 78(1), 53-97.
- Farrar, D. J., Bond, M. G., Riley, W. A. et Sawyer, J. K. (1991). Anatomic correlates of aortic pulse wave velocity and carotid artery elasticity during atherosclerosis progression and regression in monkeys. *Circulation*, 83(5), 1754-1763.
- Fitzgerald. (1996). Neuroanatomy: Basic and Clinical.
- Forbes, H. S. W., H.G. (1928). The vasomotor control of cerebral vessels. *Archives of Neurology and Psychiatry*, (June).
- Franceschini, M. A., Radhakrishnan, H., Thakur, K., Wu, W., Ruvinskaya, S., Carp, S. et Boas, D. A. (2010). The effect of different anesthetics on neurovascular coupling. *Neuroimage*, 51(4), 1367-1377. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.03.060



- Freeman, W. D. (2015). Management of Intracranial Pressure. *Continuum (Minneapolis)*, 21(5 Neurocritical Care), 1299-1323. doi: 10.1212/CON.0000000000000235
- Frostig, R. D., Lieke, E. E., Ts'o, D. Y. et Grinvald, A. (1990). Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(16), 6082-6086.
- Furchgott, R. F. et Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373-376.
- Gagnon, L., Sakadzic, S., Lesage, F., Mandeville, E. T., Fang, Q., Yaseen, M. A. et Boas, D. A. (2015). Multimodal reconstruction of microvascular-flow distributions using combined two-photon microscopy and Doppler optical coherence tomography. *Neurophotonics*, 2(1), 015008. doi: 10.1117/1.NPh.2.1.015008
- Garcia-Roldan, J. L. et Bevan, J. A. (1990). Flow-induced constriction and dilation of cerebral resistance arteries. *Circ Res*, 66(5), 1445-1448.
- Giannoglou, G. D., Chatzizisis, Y. S., Zamboulis, C., Parcharidis, G. E., Mikhailidis, D. P. et Louridas, G. E. (2008). Elevated heart rate and atherosclerosis: an overview of the pathogenetic mechanisms. *Int J Cardiol*, 126(3), 302-312. doi: 10.1016/j.ijcard.2007.08.077
- Girouard, H. et Iadecola, C. (2006). Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol (1985)*, 100(1), 328-335. doi: 10.1152/jappphysiol.00966.2005
- Gold, G., Giannakopoulos, P., Herrmann, F. R., Bouras, C. et Kovari, E. (2007). Identification of Alzheimer and vascular lesion thresholds for mixed dementia. *Brain*, 130(Pt 11), 2830-2836. doi: 10.1093/brain/awm228
- Göppert-Mayer, M. (1931). Über Elementarake mit zwei Quantensprüngen. *Annals of Physics*, 9(3), 273-295. doi: 10.1002
- Greenwald, S. E. (2007). Ageing of the conduit arteries. *J Pathol*, 211(2), 157-172. doi: 10.1002/path.2101
- Gross, J. F., Intaglietta, M. et Zweifach, B. W. (1974). Network model of pulsatile hemodynamics in the microcirculation of the rabbit omentum. *Am J Physiol*, 226(5), 1117-1123.
- Hall, J. (2006). *Textbook of physiology*.
- Hamel, E. (2006). Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol (1985)*, 100(3), 1059-1064. doi: 10.1152/jappphysiol.00954.2005
- Hansson, G. K. (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 352(16), 1685-1695. doi: 10.1056/NEJMra043430
- Harvey, A., Montezano, A. C. et Touyz, R. M. (2015). Vascular biology of ageing- Implications in hypertension. *J Mol Cell Cardiol*, 83, 112-121. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.04.011
- Hawkey, C. M., Bennett, P. M., Gascoyne, S. C., Hart, M. G. et Kirkwood, J. K. (1991). Erythrocyte size, number and haemoglobin content in vertebrates. *Br J Haematol*, 77(3), 392-397.
- Heistad, D. D. (2001). What's new in the cerebral microcirculation? Landis Award lecture. *Microcirculation*, 8(6), 365-375. doi: 10.1038/sj/mn/7800109
- Helmchen, F. et Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods*, 2(12), 932-940. doi: 10.1038/nmeth818

- Henrion, D. (2005). Pressure and flow-dependent tone in resistance arteries. Role of myogenic tone. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 98(9), 913-921.
- Hilderson, H. (1988). *Fluorescence Studies on Biological Membranes*. New York and London: Plenum Press.
- Hu, S. et Wang, L. V. (2010). Photoacoustic imaging and characterization of the microvasculature. *J Biomed Opt*, 15(1), 011101. doi: 10.1117/1.3281673
- Huisken, J. et Stainier, D. Y. (2009). Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development*, 136(12), 1963-1975. doi: 10.1242/dev.022426
- Hutcheson, I. R. et Griffith, T. M. (1991). Release of endothelium-derived relaxing factor is modulated both by frequency and amplitude of pulsatile flow. *Am J Physiol*, 261(1 Pt 2), H257-262.
- Hwang, J. Y., Wachsmann-Hogiu, S., Ramanujan, V. K., Nowatzky, A. G., Koronyo, Y., Medina-Kauwe, L. K., . . . Farkas, D. L. (2011). Multimodal wide-field two-photon excitation imaging: characterization of the technique for in vivo applications. *Biomed Opt Express*, 2(2), 356-364. doi: 10.1364/BOE.2.000356
- Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 5(5), 347-360. doi: 10.1038/nrn1387
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. et Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(24), 9265-9269.
- Jin, Z. G., Wong, C., Wu, J. et Berk, B. C. (2005). Flow shear stress stimulates Gab1 tyrosine phosphorylation to mediate protein kinase B and endothelial nitric-oxide synthase activation in endothelial cells. *J Biol Chem*, 280(13), 12305-12309. doi: 10.1074/jbc.M500294200
- Kaiser, W. G., CGB. (1961). Two-photon excitation of CaF<sub>2</sub>:Eu<sup>2+</sup>. *Phys Rev Lett*, 7, 229-231.
- Kalaria, R. N. (1996). Cerebral vessels in ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther*, 72(3), 193-214.
- Kang, K. T. (2014). Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. *Toxicol Res*, 30(3), 141-148. doi: 10.5487/TR.2014.30.3.141
- Kawakami, N., Nagerl, U. V., Odoardi, F., Bonhoeffer, T., Wekerle, H. et Flugel, A. (2005). Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *J Exp Med*, 201(11), 1805-1814. doi: 10.1084/jem.20050011
- Kelly, R. P., Tunin, R. et Kass, D. A. (1992). Effect of reduced aortic compliance on cardiac efficiency and contractile function of in situ canine left ventricle. *Circ Res*, 71(3), 490-502.
- Kety, S. S. et Schmidt, C. F. (1948). The Effects of Altered Arterial Tensions of Carbon Dioxide and Oxygen on Cerebral Blood Flow and Cerebral Oxygen Consumption of Normal Young Men. *J Clin Invest*, 27(4), 484-492. doi: 10.1172/JCI101995
- Kilic, T. et Akakin, A. (2008). Anatomy of cerebral veins and sinuses. *Front Neurol Neurosci*, 23, 4-15. doi: 10.1159/0000111256
- Kim, H. C., Hartner, S., Behe, M., Behr, T. M. et Hampp, N. A. (2006). Two-photon absorption-controlled multidose drug release: a novel approach for secondary cataract treatment. *J Biomed Opt*, 11(3), 34024. doi: 10.1117/1.2209564

- Kim, T. N., Goodwill, P. W., Chen, Y., Conolly, S. M., Schaffer, C. B., Liepmann, D. et Wang, R. A. (2012). Line-scanning particle image velocimetry: an optical approach for quantifying a wide range of blood flow speeds in live animals. *PLoS One*, 7(6), e38590. doi: 10.1371/journal.pone.0038590
- Klabunde, R. (2011). *Cardiovascular Physiology Concepts*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- 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(26), 15741-15746.
- Kobat, D., Durst, M. E., Nishimura, N., Wong, A. W., Schaffer, C. B. et Xu, C. (2009). Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation. *Opt Express*, 17(16), 13354-13364.
- Koehler, M. J., Konig, K., Elsner, P., Buckle, R. et Kaatz, M. (2006). In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. *Opt Lett*, 31(19), 2879-2881.
- Koester, H. J., Baur, D., Uhl, R. et Hell, S. W. (1999). Ca<sup>2+</sup> fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage. *Biophys J*, 77(4), 2226-2236. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77063-3
- Konig, K., Becker, T. W., Fischer, P., Riemann, I. et Halhuber, K. J. (1999). Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes. *Opt Lett*, 24(2), 113-115.
- Ku, D. N., Giddens, D. P., Zarins, C. K. et Glagov, S. (1985). Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis*, 5(3), 293-302.
- Lagaud, G., Karicheti, V., Knot, H. J., Christ, G. J. et Laher, I. (2002). Inhibitors of gap junctions attenuate myogenic tone in cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283(6), H2177-2186. doi: 10.1152/ajpheart.00605.2001
- Langille, B. L. et Adamson, S. L. (1981). Relationship between blood flow direction and endothelial cell orientation at arterial branch sites in rabbits and mice. *Circ Res*, 48(4), 481-488.
- Lassen, N. A. (1959). Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiol Rev*, 39(2), 183-238.
- Laurent, S. et Boutouyrie, P. (2007). Arterial stiffness: a new surrogate end point for cardiovascular disease? *J Nephrol*, 20 Suppl 12, S45-50.
- Ledoux, J., Werner, M. E., Brayden, J. E. et Nelson, M. T. (2006). Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)*, 21, 69-78. doi: 10.1152/physiol.00040.2005
- Lee, R. M. (1995). Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther*, 66(1), 149-173.
- Lehoux, S., Castier, Y. et Tedgui, A. (2006). Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med*, 259(4), 381-392. doi: 10.1111/j.1365-2796.2006.01624.x
- Levene, M. J., Dombeck, D. A., Kasischke, K. A., Molloy, R. P. et Webb, W. W. (2004). In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue. *J Neurophysiol*, 91(4), 1908-1912. doi: 10.1152/jn.01007.2003

- Lo, C. S., Relf, I. R., Myers, K. A. et Wahlqvist, M. L. (1986). Doppler ultrasound recognition of preclinical changes in arterial wall in diabetic subjects: compliance and pulse-wave damping. *Diabetes Care*, 9(1), 27-31.
- London, G. M., Guerin, A. P., Pannier, B., Marchais, S. J. et Stimpel, M. (1995). Influence of sex on arterial hemodynamics and blood pressure. Role of body height. *Hypertension*, 26(3), 514-519.
- Loukogeorgakis, S., Dawson, R., Phillips, N., Martyn, C. N. et Greenwald, S. E. (2002). Validation of a device to measure arterial pulse wave velocity by a photoplethysmographic method. *Physiol Meas*, 23(3), 581-596.
- Malek, A. M. et Izumo, S. (1996). Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J Cell Sci*, 109 ( Pt 4), 713-726.
- Masters, B. R. et So, P. T. (2004). Antecedents of two-photon excitation laser scanning microscopy. *Microsc Res Tech*, 63(1), 3-11. doi: 10.1002/jemt.10418
- McVeigh, G. E., Brennan, G. M., Cohn, J. N., Finkelstein, S. M., Hayes, R. J. et Johnston, G. D. (1994). Fish oil improves arterial compliance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb*, 14(9), 1425-1429.
- Miller, A. A., De Silva, T. M., Judkins, C. P., Diep, H., Drummond, G. R. et Sobey, C. G. (2010). Augmented superoxide production by Nox2-containing NADPH oxidase causes cerebral artery dysfunction during hypercholesterolemia. *Stroke*, 41(4), 784-789. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.575365
- Mitchell, D. A., Lambert, G., Secher, N. H., Raven, P. B., van Lieshout, J. et Esler, M. D. (2009). Jugular venous overflow of noradrenaline from the brain: a neurochemical indicator of cerebrovascular sympathetic nerve activity in humans. *J Physiol*, 587(Pt 11), 2589-2597. doi: 10.1113/jphysiol.2008.167999
- Mitchell, G. F., Parise, H., Benjamin, E. J., Larson, M. G., Keyes, M. J., Vita, J. A., . . . Levy, D. (2004). Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing age in healthy men and women: the Framingham Heart Study. *Hypertension*, 43(6), 1239-1245. doi: 10.1161/01.HYP.0000128420.01881.aa
- Mitchell, G. F., van Buchem, M. A., Sigurdsson, S., Gotal, J. D., Jonsdottir, M. K., Kjartansson, O., . . . Launer, L. J. (2011). Arterial stiffness, pressure and flow pulsatility and brain structure and function: the Age, Gene/Environment Susceptibility-Reykjavik study. *Brain*, 134(Pt 11), 3398-3407. doi: 10.1093/brain/awr253
- Mohamied, Y., Rowland, E. M., Bailey, E. L., Sherwin, S. J., Schwartz, M. A. et Weinberg, P. D. (2015). Change of direction in the biomechanics of atherosclerosis. *Ann Biomed Eng*, 43(1), 16-25. doi: 10.1007/s10439-014-1095-4
- Moldestad, O., Karlsen, P., Molden, S. et Storm, J. F. (2009). Tracheotomy improves experiment success rate in mice during urethane anesthesia and stereotaxic surgery. *J Neurosci Methods*, 176(2), 57-62. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.08.015
- Muizelaar, J. P., Wei, E. P., Kontos, H. A. et Becker, D. P. (1983). Mannitol causes compensatory cerebral vasoconstriction and vasodilation in response to blood viscosity changes. *J Neurosurg*, 59(5), 822-828. doi: 10.3171/jns.1983.59.5.0822
- Murphy, T. H., Li, P., Betts, K. et Liu, R. (2008). Two-photon imaging of stroke onset in vivo reveals that NMDA-receptor independent ischemic depolarization is the major cause of rapid reversible damage to dendrites and spines. *J Neurosci*, 28(7), 1756-1772. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5128-07.2008

- Nagai, Y., Metter, E. J. et Fleg, J. L. (1999). Increased carotid artery intimal-medial thickness: risk factor for exercise-induced myocardial ischemia in asymptomatic older individuals. *Vasc Med*, 4(3), 181-186.
- Nerem, R. M., Levesque, M. J. et Cornhill, J. F. (1981). Vascular endothelial morphology as an indicator of the pattern of blood flow. *J Biomech Eng*, 103(3), 172-176.
- Nestel, P. J., Yamashita, T., Sasahara, T., Pomeroy, S., Dart, A., Komesaroff, P., . . . Abbey, M. (1997). Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(12), 3392-3398.
- Neu, B., Wenby, R. et Meiselman, H. J. (2008). Effects of dextran molecular weight on red blood cell aggregation. *Biophys J*, 95(6), 3059-3065. doi: 10.1529/biophysj.108.130328
- Newman, E. A. (2003). New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci*, 26(10), 536-542. doi: 10.1016/S0166-2236(03)00237-6
- Nimmerjahn, A. et Helmchen, F. (2012). In vivo labeling of cortical astrocytes with sulforhodamine 101 (SR101). *Cold Spring Harb Protoc*, 2012(3), 326-334. doi: 10.1101/pdb.prot068155
- Nixon, A. M., Gunel, M. et Sumpio, B. E. (2010). The critical role of hemodynamics in the development of cerebral vascular disease. *J Neurosurg*, 112(6), 1240-1253. doi: 10.3171/2009.10.JNS09759
- O'Brien, J. T. (2006). Vascular cognitive impairment. *Am J Geriatr Psychiatry*, 14(9), 724-733. doi: 10.1097/01.JGP.0000231780.44684.7e
- O'Rourke, M. F. et Hashimoto, J. (2007). Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J Am Coll Cardiol*, 50(1), 1-13. doi: 10.1016/j.jacc.2006.12.050
- O'Rourke, M. F., Safar, M. E. et Dzau, V. (2010). The Cardiovascular Continuum extended: aging effects on the aorta and microvasculature. *Vasc Med*, 15(6), 461-468. doi: 10.1177/1358863X10382946
- Ogawa, S., Tank, D. W., Menon, R., Ellermann, J. M., Kim, S. G., Merkle, H. et Ugurbil, K. (1992). Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(13), 5951-5955.
- Oka, K., Rhoton, A. L., Jr., Barry, M. et Rodriguez, R. (1985). Microsurgical anatomy of the superficial veins of the cerebrum. *Neurosurgery*, 17(5), 711-748.
- Okada, K., Iso, H., Cui, R., Inoue, M. et Tsugane, S. (2011). Pulse pressure is an independent risk factor for stroke among middle-aged Japanese with normal systolic blood pressure: the JPHC study. *J Hypertens*, 29(2), 319-324. doi: 10.1097/HJH.0b013e32834143d9
- Okuyama, S., Okuyama, J., Okuyama, J., Tamatsu, Y., Shimada, K., Hoshi, H. et Iwai, J. (2004). The arterial circle of Willis of the mouse helps to decipher secrets of cerebral vascular accidents in the human. *Med Hypotheses*, 63(6), 997-1009. doi: 10.1016/j.mehy.2003.12.055
- Ott, C., Raff, U., Harazny, J. M., Michelson, G. et Schmieder, R. E. (2013). Central pulse pressure is an independent determinant of vascular remodeling in the retinal circulation. *Hypertension*, 61(6), 1340-1345. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00617

- Paoli, J., Smedh, M., Wennberg, A. M. et Ericson, M. B. (2008). Multiphoton laser scanning microscopy on non-melanoma skin cancer: morphologic features for future non-invasive diagnostics. *J Invest Dermatol*, 128(5), 1248-1255. doi: 10.1038/sj.jid.5701139
- Pardridge, W. M. (2003). Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv*, 3(2), 90-105, 151. doi: 10.1124/mi.3.2.90
- Paszowski, J. J. et Dardik, A. (2003). Arterial wall shear stress: observations from the bench to the bedside. *Vasc Endovascular Surg*, 37(1), 47-57.
- Pena, A. M., Fabre, A., Debarre, D., Marchal-Somme, J., Crestani, B., Martin, J. L., . . . Schanne-Klein, M. C. (2007). Three-dimensional investigation and scoring of extracellular matrix remodeling during lung fibrosis using multiphoton microscopy. *Microsc Res Tech*, 70(2), 162-170. doi: 10.1002/jemt.20400
- Pinaud, F., Loufrani, L., Toutain, B., Lambert, D., Vandekerckhove, L., Henrion, D. et Baufreton, C. (2011). In vitro protection of vascular function from oxidative stress and inflammation by pulsatility in resistance arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 142(5), 1254-1262. doi: 10.1016/j.jtcvs.2011.07.007
- Raignault, A., Bolduc, V., Lesage, F. et Thorin, E. (2016). Pulse pressure-dependent cerebrovascular eNOS regulation in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. doi: 10.1177/0271678X16629155
- Ramji, D. P. et Davies, T. S. (2015). Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev*, 26(6), 673-685. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003
- Roman, M. J., Devereux, R. B., Kizer, J. R., Lee, E. T., Galloway, J. M., Ali, T., . . . Howard, B. V. (2007). Central pressure more strongly relates to vascular disease and outcome than does brachial pressure: the Strong Heart Study. *Hypertension*, 50(1), 197-203. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.089078
- Rosendorff, C., Lackland, D. T., Allison, M., Aronow, W. S., Black, H. R., Blumenthal, R. S., . . . American Society of, H. (2015). Treatment of hypertension in patients with coronary artery disease: a scientific statement from the American Heart Association, American College of Cardiology, and American Society of Hypertension. *Circulation*, 131(19), e435-470. doi: 10.1161/CIR.0000000000000207
- Rovainen, C. M., Woolsey, T. A., Blocher, N. C., Wang, D. B. et Robinson, O. F. (1993). Blood flow in single surface arterioles and venules on the mouse somatosensory cortex measured with videomicroscopy, fluorescent dextrans, nonoccluding fluorescent beads, and computer-assisted image analysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 13(3), 359-371. doi: 10.1038/jcbfm.1993.49
- Sagawa, K. et Guyton, A. C. (1961). Pressure-flow relationships in isolated canine cerebral circulation. *Am J Physiol*, 200, 711-714.
- Sanan, D. A., Newland, D. L., Tao, R., Marcovina, S., Wang, J., Mooser, V., . . . Hobbs, H. H. (1998). Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8), 4544-4549.
- Santisakultarm, T. P., Cornelius, N. R., Nishimura, N., Schafer, A. I., Silver, R. T., Doerschuk, P. C., . . . Schaffer, C. B. (2012). In vivo two-photon excited fluorescence microscopy reveals cardiac- and respiration-dependent pulsatile blood flow in cortical blood

- vessels in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302(7), H1367-1377. doi: 10.1152/ajpheart.00417.2011
- Sato, K., Sadamoto, T., Hirasawa, A., Oue, A., Subudhi, A. W., Miyazawa, T. et Ogoh, S. (2012). Differential blood flow responses to CO<sub>2</sub> in human internal and external carotid and vertebral arteries. *J Physiol*, 590(Pt 14), 3277-3290. doi: 10.1113/jphysiol.2012.230425
- Schaffer, C. B., Friedman, B., Nishimura, N., Schroeder, L. F., Tsai, P. S., Ebner, F. F., . . . Kleinfeld, D. (2006). Two-photon imaging of cortical surface microvessels reveals a robust redistribution in blood flow after vascular occlusion. *PLoS Biol*, 4(2), e22. doi: 10.1371/journal.pbio.0040022
- Schievink, W. I. (1997). Intracranial aneurysms. *N Engl J Med*, 336(1), 28-40. doi: 10.1056/NEJM199701023360106
- Schmid-Schonbein, G. W., Lee, S. Y. et Sutton, D. (1989). Dynamic viscous flow in distensible vessels of skeletal muscle microcirculation: application to pressure and flow transients. *Biorheology*, 26(2), 215-227.
- Segal, S. S. (2000). Integration of blood flow control to skeletal muscle: key role of feed arteries. *Acta Physiol Scand*, 168(4), 511-518. doi: 10.1046/j.1365-201x.2000.00703.x
- Sehba, F. A. et Friedrich, V. (2011). Early micro vascular changes after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*, 110(Pt 1), 49-55. doi: 10.1007/978-3-7091-0353-1\_9
- Serlin, Y., Shelef, I., Knyazer, B. et Friedman, A. (2015). Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin Cell Dev Biol*, 38, 2-6. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.01.002
- Shardlow, E. J., A. (2011). Cerebral blood flow and intracranial pressure. *Anaesthesia and Intensive care medicine*, 12(5), 220-223.
- Shih, A. Y., Driscoll, J. D., Drew, P. J., Nishimura, N., Schaffer, C. B. et Kleinfeld, D. (2012). Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32(7), 1277-1309. doi: 10.1038/jcbfm.2011.196
- Shimoda, L. A., Norins, N. A. et Madden, J. A. (1998). Responses to pulsatile flow in piglet isolated cerebral arteries. *Pediatr Res*, 43(4 Pt 1), 514-520. doi: 10.1203/00006450-199804000-00013
- Siegel, G. W. A., R.; Brady, S.; Price, S. (2006). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Canada: Elsevier Academic Press.
- Sipos, A., Toma, I., Kang, J. J., Rosivall, L. et Peti-Peterdi, J. (2007). Advances in renal (patho)physiology using multiphoton microscopy. *Kidney Int*, 72(10), 1188-1191. doi: 10.1038/sj.ki.5002461
- Sloan, T. B. (2002). Anesthetics and the brain. *Anesthesiol Clin North America*, 20(2), 265-292.
- Somlyo, A. P., Wu, X., Walker, L. A. et Somlyo, A. V. (1999). Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 134, 201-234.
- Srinivasan, V. J., Atochin, D. N., Radhakrishnan, H., Jiang, J. Y., Ruvinskaya, S., Wu, W., . . . Boas, D. A. (2011). Optical coherence tomography for the quantitative study of cerebrovascular physiology. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(6), 1339-1345. doi: 10.1038/jcbfm.2011.19

- Stergiopoulos, N., Segers, P. et Westerhof, N. (1999). Use of pulse pressure method for estimating total arterial compliance in vivo. *Am J Physiol*, 276(2 Pt 2), H424-428.
- Stevens, A. L., J. (1997). *Histologie humaine*. Paris: DeBoeck Université.
- Szabo, E. Z., Luginbuehl, I. et Bissonnette, B. (2009). Impact of anesthetic agents on cerebrovascular physiology in children. *Paediatr Anaesth*, 19(2), 108-118. doi: 10.1111/j.1460-9592.2008.02826.x
- Tan, C. O. et Taylor, J. A. (2014). Integrative physiological and computational approaches to understand autonomic control of cerebral autoregulation. *Exp Physiol*, 99(1), 3-15. doi: 10.1113/expphysiol.2013.072355
- Taniwaki, H., Kawagishi, T., Emoto, M., Shoji, T., Kanda, H., Maekawa, K., . . . Morii, H. (1999). Correlation between the intima-media thickness of the carotid artery and aortic pulse-wave velocity in patients with type 2 diabetes. Vessel wall properties in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 22(11), 1851-1857.
- Tauer, U. (2002). Advantages and risks of multiphoton microscopy in physiology. *Exp Physiol*, 87(6), 709-714.
- Thijssen, D. H., Carter, S. E. et Green, D. J. (2015). Arterial structure and function in vascular ageing: are you as old as your arteries? *J Physiol*. doi: 10.1113/JP270597
- Thomas, S. C., Alhasawi, A., Appanna, V. P., Auger, C. et Appanna, V. D. (2015). Brain metabolism and Alzheimer's disease: the prospect of a metabolite-based therapy. *J Nutr Health Aging*, 19(1), 58-63. doi: 10.1007/s12603-014-0511-7
- Thorin, E. et Shreeve, S. M. (1998). Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacol Ther*, 78(3), 155-166.
- Thorin, E. et Thorin-Trescases, N. (2009). Vascular endothelial ageing, heartbeat after heartbeat. *Cardiovasc Res*, 84(1), 24-32. doi: 10.1093/cvr/cvp236
- Thorin-Trescases, N. et Bevan, J. A. (1998). High levels of myogenic tone antagonize the dilator response to flow of small rabbit cerebral arteries. *Stroke*, 29(6), 1194-1200; discussion 1200-1191.
- Tian, G. F., Takano, T., Lin, J. H., Wang, X., Bekar, L. et Nedergaard, M. (2006). Imaging of cortical astrocytes using 2-photon laser scanning microscopy in the intact mouse brain. *Adv Drug Deliv Rev*, 58(7), 773-787. doi: 10.1016/j.addr.2006.07.001
- Tiecks, F. P., Lam, A. M., Aaslid, R. et Newell, D. W. (1995). Comparison of static and dynamic cerebral autoregulation measurements. *Stroke*, 26(6), 1014-1019.
- Toth, P., Rozsa, B., Springo, Z., Doczi, T. et Koller, A. (2011). Isolated human and rat cerebral arteries constrict to increases in flow: role of 20-HETE and TP receptors. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(10), 2096-2105. doi: 10.1038/jcbfm.2011.74
- Tozer, G. M., Ameer-Beg, S. M., Baker, J., Barber, P. R., Hill, S. A., Hodgkiss, R. J., . . . Vojnovic, B. (2005). Intravital imaging of tumour vascular networks using multiphoton fluorescence microscopy. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(1), 135-152. doi: 10.1016/j.addr.2004.07.015
- Tronc, F., Mallat, Z., Lehoux, S., Wassef, M., Esposito, B. et Tedgui, A. (2000). Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(12), E120-126.
- Tronc, F., Wassef, M., Esposito, B., Henrion, D., Glagov, S. et Tedgui, A. (1996). Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16(10), 1256-1262.



- Urban, A., Dussaux, C., Martel, G., Brunner, C., Mace, E. et Montaldo, G. (2015). Real-time imaging of brain activity in freely moving rats using functional ultrasound. *Nat Methods*. doi: 10.1038/nmeth.3482
- Usami, S. (1982). Physiological significance of blood rheology. *Biorheology*, 19(1/2), 29-46.
- Vanhoutte, P. M., Katusic, Z. S. et Shepherd, J. T. (1984). Vasopressin induces endothelium-dependent relaxations of cerebral and coronary, but not of systemic arteries. *J Hypertens Suppl*, 2(3), S421-422.
- Wang, B. G., Konig, K. et Halhuber, K. J. (2010). Two-photon microscopy of deep intravital tissues and its merits in clinical research. *J Microsc*, 238(1), 1-20. doi: 10.1111/j.1365-2818.2009.03330.x
- Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G. F., Peng, W. G., Han, X., . . . Nedergaard, M. (2006). Astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat Neurosci*, 9(6), 816-823. doi: 10.1038/nn1703
- Wechezak, A. R., Viggers, R. F. et Sauvage, L. R. (1985). Fibronectin and F-actin redistribution in cultured endothelial cells exposed to shear stress. *Lab Invest*, 53(6), 639-647.
- Wilkins, H., Regelson, W. et Hoffmeister, F. S. (1962). The physiologic importance of pulsatile blood flow. *N Engl J Med*, 267, 443-446. doi: 10.1056/NEJM196208302670907
- Williams, B., Lacy, P. S., Thom, S. M., Cruickshank, K., Stanton, A., Collier, D., . . . Writing, C. (2006). Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study. *Circulation*, 113(9), 1213-1225. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595496
- Willie, C. K., Macleod, D. B., Shaw, A. D., Smith, K. J., Tzeng, Y. C., Eves, N. D., . . . Ainslie, P. N. (2012). Regional brain blood flow in man during acute changes in arterial blood gases. *J Physiol*, 590(Pt 14), 3261-3275. doi: 10.1113/jphysiol.2012.228551
- Wolff, H. G. et Lennox, W. G. (1930). The effect on pial vessels of variations in the oxygen and carbon dioxide content of the blood. *Arch Neuro Psychiat*, 23, 1097-1120.
- Yang, Y., Shi, Y., Guo, S., Zhang, S., Cui, N., Shi, W., . . . Jiang, C. (2008). PKA-dependent activation of the vascular smooth muscle isoform of KATP channels by vasoactive intestinal polypeptide and its effect on relaxation of the mesenteric resistance artery. *Biochim Biophys Acta*, 1778(1), 88-96. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.08.030
- Zenaro, E., Rossi, B., Angiari, S. et Constantin, G. (2013). Use of imaging to study leukocyte trafficking in the central nervous system. *Immunol Cell Biol*, 91(4), 271-280. doi: 10.1038/icb.2012.81
- Zhang, R., Wilson, T. E., Witkowski, S., Cui, J., Crandall, G. G. et Levine, B. D. (2004). Inhibition of nitric oxide synthase does not alter dynamic cerebral autoregulation in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286(3), H863-869.
- Zonta, M., Angulo, M. C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K. A., Pozzan, T. et Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci*, 6(1), 43-50. doi: 10.1038/nn980
- Zoumi, A., Lu, X., Kassab, G. S. et Tromberg, B. J. (2004). Imaging coronary artery microstructure using second-harmonic and two-photon fluorescence microscopy. *Biophys J*, 87(4), 2778-2786. doi: 10.1529/biophysj.104.042887