

Incidence de la circulation lymphatique méningée sur la réponse à un accident vasculaire cérébral

Jean-Léon Thomas^{1,2}, Ligia S.B. Boisserand², Marie-Rénée El Kamouh¹

¹Institut du cerveau, Université Pierre et Marie Curie Paris 06, UMR51127, Sorbonne Université, Paris, France.

²Department of Neurology, Yale University School of Medicine, New Haven, États-Unis.
jean-leon.thomas@yale.edu

➤ Le cerveau est un organe singulier à bien des égards. En particulier, son système circulatoire et son système de drainage tissulaire sont différents de ceux des autres organes : des caractéristiques importantes pour la physiopathologie cérébrale et, potentiellement, pour les approches thérapeutiques des maladies cérébrales.

Dans le cerveau, comme dans les autres organes, il existe un réseau vasculaire sanguin composé d'artères, de veines, et de capillaires, qui sillonnent le parenchyme et assurent les échanges de nutriments et de gaz indispensables au fonctionnement cérébral. En revanche, le tissu cérébral est dépourvu du système vasculaire lymphatique qui, dans les autres tissus, est chargé de collecter les déchets métaboliques et de transporter les cellules immunitaires vers les ganglions lymphatiques périphériques. Ces vaisseaux lymphatiques sont relégués à la surface du cerveau, dans les méninges, et sont connectés aux ganglions lymphatiques du cou. Ils n'ont pas de contact direct avec le parenchyme cérébral [1] (→).

Une deuxième originalité de la circulation cérébrale est la contribution d'un autre fluide, le liquide cérébro-spinal¹, au drainage parenchy-

mateux. Ce fluide est contenu dans les réservoirs ventriculaires et dans l'espace sous-arachnoïdien² des méninges. Mais le liquide cérébro-spinal de l'espace sous-arachnoïdien s'écoule également dans le parenchyme autour des vaisseaux sanguins cérébraux, dans les espaces paravasculaires des artères perforantes et des veines cérébrales. Il est ainsi en contact direct avec les astrocytes³ du parenchyme cérébral, et sa présence dans les espaces intercellulaires contribue à l'élimination des déchets produits par l'activité des cellules cérébrales. Ce système de drainage cérébral impliquant le liquide cérébro-spinal avec une contribution astrogliale est connu sous le nom de système glymphatique (g pour « glial ») [2].

Le système circulatoire cérébral, avec ses trois composantes que sont les vaisseaux sanguins, le système glymphatique et les vaisseaux lymphatiques méningés, remplit donc les fonctions d'alimentation, de répuration et de communication neuro-immunitaire pour le tissu cérébral. Le dysfonctionnement du système lymphatique méningé a été associé à de multiples maladies du système nerveux [3], et les vaisseaux sanguins cérébraux, les vaisseaux lymphatiques méningés et les astrocytes du système glymphatique sont des cibles thérapeu-

tiques potentielles contre les maladies neurodégénératives, neurovasculaires, ou traumatiques. En reliant les méninges aux ganglions lymphatiques, où a lieu l'activation des lymphocytes, les vaisseaux lymphatiques méningés et la lymphe qui y circule ont un rôle majeur dans la surveillance neuro-immunitaire, en façonnant les réponses immunitaires aux agents infectieux neurotropes et en modulant la neuro-inflammation dans divers modèles de maladies du système nerveux central. Le vieillissement entraîne des anomalies morphologiques du système lymphatique méningé et perturbe sa fonction de drainage, et le « rajeunissement » lymphatique, par l'administration d'un facteur de croissance agissant sur ce système, le VEGF-C (*vascular endothelial growth factor C*), restaure certaines fonctions cognitives chez les souris âgées [4].

VEGF-C : un acteur majeur du système lymphatique méningé

Nos travaux de recherches portent sur le réseau lymphatique méningé, qui est présent chez tous les vertébrés examinés à ce jour, y compris chez l'homme. Le maintien et le fonctionnement de la vascularisation lymphatique méningée dépendent de la signalisation par le VEGF-C, via ses récepteurs VEGFR2 et VEGFR3 [5]. Compte tenu du potentiel des vaisseaux lymphatiques méningés comme cible thérapeutique contre diverses maladies du système nerveux central, il importait de caractériser les effets cérébraux et méningés de ce facteur de croissance.

(→) Voir la Synthèse de J.L. Thomas et al., m/s n° 1, janvier 2019, page 55

¹ Le liquide cérébro-spinal baigne le cerveau et la moelle épinière. Il est produit par les plexus choroïdes et circule dans les ventricules cérébraux et le canal épendymaire de la moelle épinière. Il amortit les mouvements et les chocs, évacue les déchets produits par le tissu cérébral, et joue également un rôle de protection immunitaire.

² Espace compris entre la pie-mère (méninge la plus profonde, qui enveloppe directement le cerveau et la moelle épinière) et l'arachnoïde.

³ Cellules gliales dont la fonction principale est de fournir les nutriments nécessaires au fonctionnement des neurones et contrôler leur environnement chimique.



Dans la grande majorité des manipulations moléculaires visant à stimuler ou à activer le système lymphatique méningé, les chercheurs utilisent soit le VEGF-C, soit la forme soluble du VEGFR3, qui agit comme un antagoniste du VEGF-C en le séquestrant. Les vaisseaux lymphatiques ne sont toutefois pas les seules cibles du VEGF-C ; les cellules souches neurales, par exemple, expriment le VEGFR3 et sont activées par le VEGF-C, et les cellules immunitaires macrophagiques produisent du VEGF-C.

Nous avons donc utilisé une combinaison de techniques d'immunohistochimie, d'analyse transcriptionnelle et biochimique, pour examiner les réponses cellulaires au VEGF-C dans le cerveau, les méninges et les ganglions lymphatiques cervicaux. Nous avons également étudié le drainage lymphatique dans le circuit ganglionnaire méningo-cervical par des techniques d'imagerie par résonance magnétique et de microscopie à feuille de lumière.

Le spectre des réponses au VEGF-C a été examiné chez des souris adultes dans des conditions physiologiques, ainsi que dans le contexte pathologique d'un stress ischémique cérébral provoqué par une occlusion temporaire (durant 45 minutes) de l'artère cérébrale moyenne [6]. Le choix de ce modèle a été motivé par l'hypothèse principale qu'une amélioration du drainage lymphatique méningé pourrait faciliter l'élimination des produits toxiques cérébraux consécutifs à la lésion ischémique. Une hypothèse supplémentaire était que l'effet neurotrophique déjà connu du VEGF-C [7] contribuerait à la réparation du tissu cérébral.

Liquide cérébro-spinal : une voie d'administration qui cible à la fois les méninges et le tissu cérébral

Le VEGF-C a été administré dans le liquide cérébro-spinal par une injection intrathécale en arrière du cervelet⁴ (Figure 1). Cette voie d'adminis-

tration du VEGF-C lui permet d'accéder non seulement au parenchyme à partir de l'espace sous-arachnoïdien, via le système glymphatique, mais aussi à la surface des méninges, dans la dure-mère où se trouvent les vaisseaux lymphatiques méningés, via les jonctions de drainage autour des veines cérébrales, à l'emplacement où celles-ci sortent des méninges. Le VEGF-C a été administré sous deux formes différentes : la protéine recombinante, ou via un vecteur d'expression, un virus adéno-associé (*adeno-associated virus*, AAV) de sérotype 9. Le VEGF-C, comme de nombreux autres facteurs de croissance, a une demi-vie courte dans les tissus (moins de 24 heures). Nous avons donc réservé l'administration de la protéine recombinante à l'étude d'une réponse à court terme, comme traitement potentiel du stress aigu causé par l'ischémie cérébrale. Quant au vecteur d'expression viral, qui permet une délivrance différée et continue du VEGF-C dans les tissus par les cellules transduites (dans ce cas, les cellules musculaires lisses de la paroi des vaisseaux, les neurones, et les oligodendrocytes), nous l'avons utilisé en prophylaxie de 2 à 4 semaines pour évaluer l'effet potentiellement protecteur ou facilitateur de réparation tissulaire du VEGF-C à moyen terme [6].

Effet combiné du VEGF-C : rapide sur la neurogenèse, et progressif sur le drainage du liquide cérébro-spinal

L'injection intrathécale de la protéine recombinante chez la souris adulte stimule la neurogenèse de la zone sous-ventriculaire dans les 48 heures, mais n'induit pas de changement morphologique significatif des vaisseaux lymphatiques méningés. En revanche, l'injection du vecteur viral recombinant AAV-VEGF-C entraîne une augmentation du calibre des vaisseaux lymphatiques méningés, associée à un drainage accru du liquide cérébro-spinal vers les ganglions lymphatiques cervicaux profonds. Cet effet nécessite quatre semaines de stimulation continue par le VEGF-C : il n'est pas

encore constaté deux semaines après l'administration du vecteur AAV-VEGF-C [6] (Figure 2).

Le VEGF-C stimule la phosphorylation du VEGFR3 et du VEGFR2, activant les voies de signalisation AKT (protéine kinase B) / ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) en aval de ces deux récepteurs. La lymphangiogenèse reflète l'activation du VEGFR3. En revanche, aucune modification de la surface couverte par les vaisseaux sanguins et de leur perméabilité n'a été constatée dans les méninges ou dans le cerveau après l'administration de la protéine recombinante ou du vecteur AAV-VEGF-C, probablement en raison d'un niveau insuffisant d'activation du VEGFR2. L'exposition prolongée au VEGF-C a donc un effet bénéfique sur le drainage cérébral, sans affecter la barrière hémato-encéphalique. De plus, l'analyse transcriptomique unicellulaire du parenchyme cérébral a révélé une réponse du tissu nerveux, principalement des interneurons inhibiteurs, à cette exposition, avec une mobilisation de la signalisation du facteur neurotrophique issu du cerveau (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) [6].

VEGF-C : prophylaxie avantageuse, mais traitement inefficace, de l'ischémie cérébrale

Dans le contexte d'un stress ischémique cérébral expérimental par occlusion artérielle temporaire, l'administration prophylactique de VEGF-C par l'injection du vecteur viral AAV-VEGF-C a entraîné une réduction des lésions cérébrales et une amélioration des performances motrices dans la phase subaiguë après l'occlusion vasculaire. Ces bénéfices disparaissent chez les souris dont les ganglions cervicaux profonds ont été cautérisés⁵, ce qui compromet le drainage lymphatique du liquide cérébro-spinal [6]. L'action progressive et promotrice

⁴ Il s'agit d'une injection sous-durale, dans le liquide cérébro-spinal de la grande citerne (*cisterna magna*) située en arrière du cervelet.

⁵ La destruction, au moyen d'un scalpel électronique, des afférences et efférences vasculaires lymphatiques des ganglions cervicaux profonds supprime le drainage du tissu cérébral par les vaisseaux lymphatiques méningés.

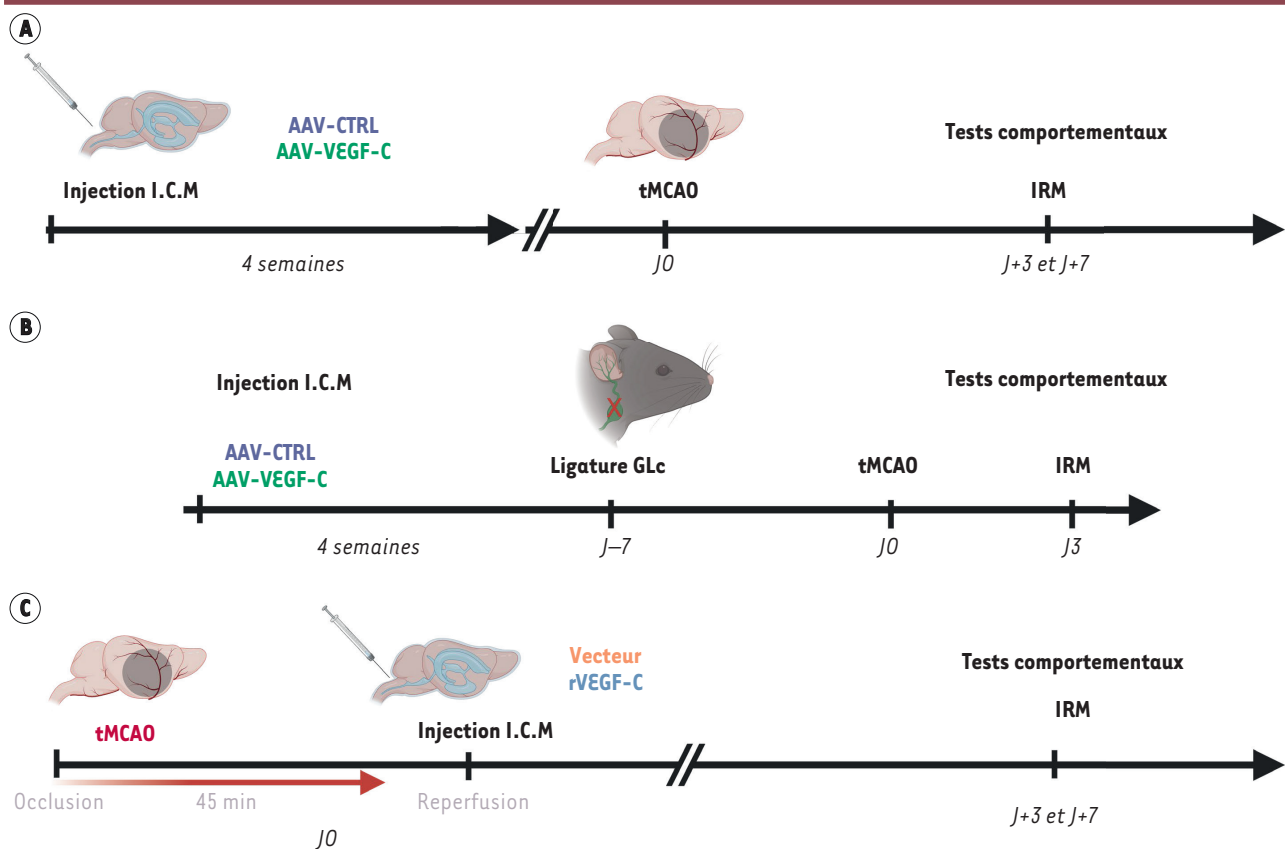
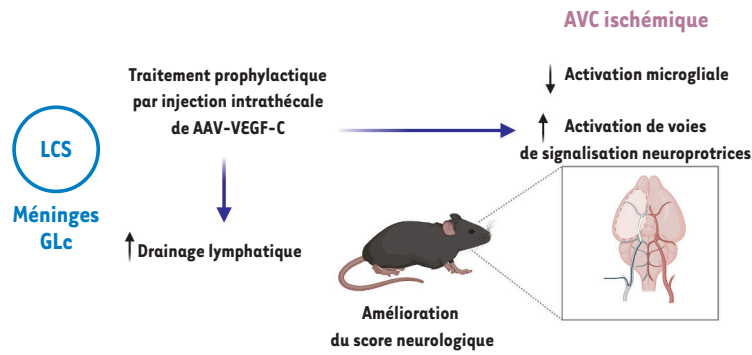


Figure 1. Différentes procédures expérimentales utilisées pour étudier les effets de l'administration de VEGF-C sur la réponse à un accident vasculaire cérébral isémique chez la souris. **A.** Les souris ont reçu une injection intrathécale d'AAV-VEGF-C ou d'un vecteur AAV témoin (AAV-CTRL). Elles ont ensuite subi une intervention chirurgicale pour réaliser l'occlusion transitoire (45 minutes) de l'artère cérébrale moyenne (*transient middle cerebral artery occlusion*, tMCAO) quatre semaines après l'injection. Les animaux ont enfin été évalués par imagerie par résonance magnétique (IRM) et par des tests comportementaux, à 3 jours (J+3) et 7 jours (J+7) après l'accident vasculaire cérébral (J0). **B.** Les souris ont reçu une injection intrathécale d'AAV-VEGF-C ou d'AAV-CTRL, avant de subir, trois semaines après (J-7), une cautérisation des ganglions lymphatiques cervicaux profonds. Une semaine plus tard, elles ont subi un accident vasculaire cérébral (J0) puis, après 3 jours (J+3), ont été évaluées par IRM et des tests comportementaux. **C.** Les souris ont subi un accident vasculaire cérébral, et, après reperfusion, ont reçu une injection intrathécale de VEGF-C recombinant (rVEGF-C) ou d'une solution témoin (0,25 % de sérumalbumine bovine).

du VEGF-C sur le drainage lymphatique du liquide cérébro-spinal est donc nécessaire à son effet favorable sur la réponse au stress isémique. Ces résultats expérimentaux sont en accord avec notre hypothèse initiale, selon laquelle l'augmentation du drainage lymphatique facilite l'évacuation des sous-produits toxiques du stress isémique. Ils sont également cohérents avec ceux d'études précédentes montrant une aggravation des lésions post-isémiques et des séquelles comportementales dans un modèle de souris présentant une perte du réseau lymphatique méningé [8].

De plus, les données transcriptomiques et biochimiques après l'injection prophylactique du vecteur AAV-VEGF-C viennent étayer notre seconde hypothèse en montrant l'induction d'une neuroprotection, caractérisée par une augmentation de la production du facteur de croissance nerveuse (*nerve growth factor*, NGF) et du BDNF, et par l'activation de la signalisation BDNF/TrkB (*tropomyosin receptor kinase B*) (Figure 2). L'état neuroprotecteur conféré par l'exposition prolongée au VEGF-C prophylactique, qui était « subliminal » dans des conditions physiologiques, a donc été considérablement amplifié en réponse au choc

isémique. Un autre effet bénéfique de l'injection d'AAV-VEGF-C est la répression de l'activation microgliale induite par le stress isémique, ce qui réduit l'inflammation intracérébrale [6]. L'expression du VEGFR-3 par les cellules nerveuses et microgliales étant difficile à détecter, on ignore à ce jour si les effets neuromodulateurs et neuroprotecteurs du VEGF-C résultent d'une action directe de ce facteur de croissance sur ces cellules (relayée par VEGFR2 ou VEGFR3), ou s'ils sont secondaires à l'activation des vaisseaux lymphatiques méningés (qui expriment VEGFR-3) et impliquent la sécrétion de cytokines par ces derniers.



- L'administration prophylactique prolongée de VEGF-C active la signalisation par le BDNF dans le cerveau.
- Le drainage lymphatique du liquide cérobro-spinal (LCS) vers les ganglions lymphatiques cervicaux (GLc) est nécessaire à l'effet bénéfique de l'administration prophylactique de VEGF-C.
- L'injection de la protéine VEGF-C dans le LCS après l'occlusion vasculaire temporaire est sans effet bénéfique sur les dommages tissulaires et neurologiques causés par l'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique.

Figure 2. Résumé des résultats expérimentaux. Dans un modèle murin d'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, un prétraitement par le vecteur viral recombinant AAV-VEGF-C réduit les lésions causées par l'AVC, et améliore les performances motrices au stade subaigu, en association avec une atténuation de l'inflammation microgliale et une augmentation de la signalisation par le BDNF dans les cellules cérébrales. Les effets neuroprotecteurs de l'administration prophylactique prolongée du VEGF-C sont perdus à la suite de la cautérisation des afférences et efférences des ganglions lymphatiques cervicaux profonds, et n'ont pas été reproduits par une injection unique de VEGF-C après l'AVC ischémique. Le traitement prophylactique prolongé par le VEGF-C favorise donc de multiples réponses vasculaires, immunitaires, et neuronales, dont la résultante atténue les dommages neurologiques provoqués par un AVC aigu (Figure adaptée de [6]).

Contrairement à ces effets bénéfiques de l'injection prophylactique du vecteur viral AAV-VEGF-C ayant entraîné une libération prolongée du VEGF-C pendant plusieurs semaines, nous n'avons pas constaté d'effet bénéfique du traitement par injection de la protéine recombinante VEGF-C dans la phase aiguë du stress ischémique [6]. Un tel traitement serait d'ailleurs plutôt pro-inflammatoire [9, 10].

Potentiel thérapeutique du VEGF-C dans l'ischémie cérébrale

L'effet bénéfique du VEGF-C sur le cerveau dépend donc du contexte. Une action progressive du VEGF-C dans un état non pathologique aura un effet bénéfique sur le drainage cérébral, la neuromodulation et la neuroprotection, tel que l'on peut attendre d'un facteur de

croissance, et sans altérer l'angiogenèse ni la barrière hémato-encéphalique. Nos résultats expérimentaux dans un modèle murin d'accident vasculaire cérébral ischémique suggèrent par ailleurs que des taux plus élevés de VEGF-C dans le liquide cérobro-spinal à l'état basal et l'augmentation de l'activité de drainage lymphatique qui en résulte pourraient être associés à une meilleure récupération neurologique après un tel accident. Une conclusion similaire a déjà été tirée dans le cadre d'autres maladies, notamment les maladies inflammatoires de l'intestin, la polyarthrite rhumatoïde et l'inflammation cutanée [11]. Les individus ayant une plus forte expression de VEGF-C seront donc vraisemblablement mieux protégés contre les conséquences délétères de l'ischémie cérébrale, et peut-être, plus généralement,

d'autres maladies cérébrales. Si cela se confirmait, la mesure de l'expression du VEGF-C pourrait constituer un nouveau biomarqueur prédictif de l'évolution de certaines situations pathologiques, notamment de la réponse réparatrice à un traumatisme cérébral.

En revanche, l'administration du VEGF-C en phase aiguë post-ischémique n'augmente pas à court terme le drainage lymphatique et donc la clairance parenchymateuse cérébrale. De plus, dans le contexte d'un stress ischémique, le VEGF-C stimule rapidement la croissance du réseau lymphatique dans les ganglions lymphatiques cervicaux et l'activation immunitaire qui s'y produit, ce qui conduit à une infiltration immunitaire et à une inflammation du tissu cérébral [9]. L'administration de VEGF-C dans la phase aiguë d'un stress ischémique ne peut donc pas être considérée comme bénéfique. Cependant, une fois la phase inflammatoire terminée, l'administration progressive d'AAV-VEGF-C à des fins neuromodulatrices et neuroprotectrices pourrait être envisagée en vue d'améliorer la réparation des tissus et la récupération neurologique. ♦

Impact of meningeal lymphatic circulation on the response to ischemic stroke

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Thomas JL, Jacob L, Boisserand L. Système lymphatique et cerveau. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 55-61.
2. Bohr T, Hjorth PG, Holst SC, et al. The glymphatic system: Current understanding and modeling. *iScience* 2022 ; 25 : 104987.
3. Jain A, Ang PS, Matrongolo MJ, et al. Understanding the development, pathogenesis, and injury response of meningeal lymphatic networks through the use of animal models. *Cell Mol Life Sci* 2023 ; 80 : 332.
4. Da Mesquita S, Louveau A, Vaccari A, et al. Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease. *Nature* 2018 ; 560 : 185-91.
5. Antila S, Karaman S, Nurmi H, et al. Development and plasticity of meningeal lymphatic vessels. *J Exp Med* 2017 ; 214 : 3645-67.
6. Boisserand LSB, Geraldo LH, Bouchart J, et al. VEGF-C prophylaxis favors lymphatic drainage and modulates neuroinflammation in a stroke model. *J Exp Med* 2024 ; 221 : e20221983.

RÉFÉRENCES

7. Le Bras B, Barallobre MJ, Homman-Ludiye J, *et al.* VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. *Nat Neurosci* 2006 ; 9 : 340-8.
8. Yanev P, Poinsatte K, Hominick D, *et al.* Impaired meningeal lymphatic vessel development worsens stroke outcome. *J Cereb Blood Flow Metab* 2020 ; 40 : 263-75.
9. Esposito E, Ahn BJ, Shi J, *et al.* Brain-to-cervical lymph node signaling after stroke. *Nat Commun* 2019 ; 10 : 5306.
10. Choi YH, Hsu M, Laaker C, *et al.* Dual role of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in post-stroke recovery. *bioRxiv* 2023 ; 2023.08.30.555144.
11. Schwager S, Detmar M. Inflammation and lymphatic function. *Front Immunol* 2019 ; 10 : 308.