

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 2 Décembre 2022 par

Mickaël Bobot

Atteintes Neurovasculaires de l'Insuffisance Rénale

Impact de l'insuffisance rénale sur la barrière hémato-encéphalique et
la prédisposition aux Accidents vasculaires cérébraux

Discipline

Biologie Santé

Spécialité

Pathologie vasculaire et nutrition

École doctorale

ED 62 Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire/Partenaires de recherche

Laboratoire C2VN, Team 3

Centre Européen de Recherche en Imagerie
Médicale (CERIMED)

Composition du jury

Pr. Sophie LIABEUF Rapporteuse

CHU d'Amiens, Université de Picardie Jules Verne

Pr. Lara ZAFRANI Rapporteuse

AP-HP, Hôpital Saint Louis, Université Paris Cité

Dr. Pierre GALICHON Examineur

AP-HP, Pitié-Salpêtrière, Sorbonne Université

Pr. Stéphane BURTEY Président du jury

AP-HM, Aix-Marseille Université

Pr. Benjamin GUILLET Directeur de thèse

AP-HM, Aix-Marseille Université

Dr. Guillaume HACHE Co-directeur de thèse

AP-HM, Aix-Marseille Université

Affidavit

Je soussigné, Mickaël BOBOT, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique du Pr Benjamin GUILLET et du Dr Guillaume HACHE, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 21 juillet 2022



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. **Bobot M**, Thomas L, Moyon A, Fernandez S, McKay N, Balasse L, Garrigue P, Brige P, Chopinet S, Poitevin S, Cérini C, Brunet P, Dignat-George F, Burtey S, Guillet B, Hache G. Uremic Toxic Blood-Brain Barrier Disruption Mediated by AhR Activation Leads to Cognitive Impairment During Experimental Renal Dysfunction. J Am Soc Nephrol. 2020 Jun 11:ASN.2019070728 (1) - IF : 14.98
2. **Bobot M**, Hache G, Moyon A, Fernandez S, Balasse L, Daniel L, Garrigue P, Brige P, Chopinet S, Dignat-George F, Brunet P, Burtey S, Guillet B. Renal SPECT/CT with 99mTc - dimercaptosuccinic acid is a non-invasive predictive marker for the development of interstitial fibrosis in a rat model of renal insufficiency. Nephrol Dial Transplant. 2021 Apr 26;36(5):804-810. (2) - IF : 7.19

2) Publications en cours de soumission :

“Kidney disease and stroke: epidemiology and potential mechanisms of susceptibility” en cours de Soumission au journal Neurology – IF : 9.91

3) Participation aux conférences au cours de la période de thèse :

1. Septembre 2022 : **Bobot M**. – « Expérience Scientifique : ma thèse de science en néphrologie » – 8^{ème} séminaire Recherche de la Société Francophone de Néphrologie Dialyse et Transplantation (SFNDT) – Lyon (Conférence sur Invitation)
2. Octobre 2021 : **Bobot M**. – « Uremic toxins and the blood-brain barrier » – European Uremic Toxin (EUTox) Meeting - En ligne (Conférence sur Invitation)
3. Octobre 2021 : **Bobot M**. « Actualités Recherche - Rein et Cerveau » – Congrès de la SFNDT – Toulouse (Conférence sur invitation)
4. Octobre 2020 : **Bobot M**. « Étude BREIN : évaluation de la rupture de la barrière hématoencéphalique au cours de la maladie rénale chronique par scintigraphie cérébrale au 99mTc-DTPA (protocole) » - Congrès de la SFNDT – Nancy (Poster)

5. Octobre 2019 : **Bobot M.** « L'atteinte cognitive est associée à une rupture de la barrière hémato-encéphalique et aux concentrations d'indoxyl sulfate dans deux modèles de maladie rénale chronique chez le rat » - Congrès de la SFNDT – Nancy (Poster)

6. Juin 2019 : **Bobot M.** - « Cognitive impairment was associated with brain-blood barrier permeability in two models of chronic kidney disease in rats » – ERA-EDTA Congress – Budapest (Communication orale)

7. Octobre 2018 : **Bobot M.** - « La scintigraphie rénale à l'acide dimercaptosuccinique ^{99m}Tc permet d'évaluer le développement de la fibrose interstitielle au cours d'un régime riche en adénine chez le rat » – Congrès de la SFNDT – Lille (Poster)

Table des matières

Affidavit	2
Liste de publications et participation aux conférences	3
Table des matières	5
INTRODUCTION	7
ETAT DES LIEUX DE LA LITTERATURE	8
1. Insuffisance rénale et atteintes neurocognitives	8
1.1. Généralités sur la Maladie Rénale Chronique (MRC) et les toxines urémiques	8
1.2. Atteintes neurocognitives au cours de la MRC	11
1.3. Atteintes neurologiques au cours de l'insuffisance rénale aiguë (IRA)	15
2. La barrière hémato-encéphalique (BHE)	18
2.1. Architecture de la BHE	18
2.2. Evaluation de la perméabilité de la BHE	21
2.3. La BHE au cours des pathologies neurologiques chroniques	22
3. Susceptibilité aux accidents vasculaires cérébraux (AVC) au cours de la MRC	23
3.1. Généralités sur les AVC	23
3.2. Article de revue : « Kidney disease and stroke: epidemiology and potential mechanisms of susceptibility »	25
TRAVAUX ORIGINAUX	47
1. Article 1 : Renal SPECT/CT with 99mTc-dimercaptosuccinic acid is a non-invasive predictive marker for the development of interstitial fibrosis in a rat model of renal insufficiency	47
1.1. Résultats principaux	48
1.2. Publication	48
2. Article 2 : Uremic Toxic Blood-Brain Barrier Disruption Mediated by AhR Activation Leads to Cognitive Impairment during Experimental Renal Dysfunction	57
2.1. Résultats principaux	57
2.2. Publication	58
3. Conséquences neurologique de l'insuffisance rénale aiguë	77
3.1. Méthodologie	77
3.2. Résultats préliminaires	82
3.3. Conclusions	88
4. Impact de la fonction rénale sur la sévérité des AVC ischémiques : approche pré-clinique	89
4.1. Méthodologie	89
4.2. Résultats préliminaires	93

4.3. Conclusions	97
5. Evaluation de l'impact de la fonction rénale sur la taille et le pronostic des AVC ischémiques après thrombectomie chez l'homme	98
5.1. Méthodologie	98
5.2. Résultats	100
5.3. Conclusions	106
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	107
CONCLUSION	115
BIBLIOGRAPHIE	116
ANNEXES	132
Abréviations	136
Soutiens et prix	137
Remerciements	138
Résumé	139
Abstract	142

Introduction

La maladie rénale chronique (MRC) est associée à une altération progressive des fonctions cognitives, se présentant sous la forme d'une démence vasculaire d'apparition précoce dont la physiopathologie est mal comprise (3). La MRC est également un facteur de risque majeur de survenue et de sévérité des accidents vasculaires cérébraux (AVC)(4). Le risque d'AVC est multiplié par 4 à 10 chez les patients souffrant d'insuffisance rénale terminale (IRCT). L'AVC est la troisième cause de décès cardiovasculaire dans cette population (4). La gravité de l'AVC est également plus élevée chez les patients atteints de MRC. A 30 jours, la mortalité après un AVC est de 30% chez les patients dialysés chroniques contre 10% dans la population générale. De plus, le pronostic fonctionnel est également plus mauvais, puisque seulement 56 % des patients dialysés retournent chez eux après une hospitalisation pour un AVC, contre 72 à 76 % dans la population générale. Identifier l'interaction physiopathologique entre la MRC et les lésions cérébrales responsables de la gravité accrue des AVC est important pour proposer de nouvelles approches thérapeutiques afin d'améliorer le pronostic des patients (5). Les patients avec une MRC sont exposés à des concentrations importantes de toxines urémiques. Le risque d'événements cardiovasculaires est corrélé à l'accumulation de ces toxines. Notre équipe a rapporté que certaines toxines indoliques comme l'indoxyl sulfate (IS) activent aryl hydrocarbon receptor (AhR), entraînant une dysfonction endothéliale (6). Par ailleurs, l'insuffisance rénale aiguë (IRA) est également associée à des troubles neurologiques à type de confusion dont les mécanismes sont mal compris (7).

Les objectifs principaux de ces travaux de thèse sont de caractériser les atteintes neurologiques et neurovasculaires au cours de la MRC, et leur lien aux toxines urémiques selon une approche translationnelle, afin d'expliquer la susceptibilité aux AVC et aux troubles cognitifs des patients atteints de MRC. Nous nous intéresserons également aux atteintes neurologiques associées à l'IRA.

Etat des lieux de la littérature

1. Insuffisance rénale et atteintes neurocognitives

1.1 Généralités sur la maladie rénale chronique (MRC) et les toxines urémiques

La maladie rénale chronique (MRC) concerne plus de 10% de la population mondiale, soit plus de 843 millions de personnes en 2022. Elle représente la douzième cause de mortalité dans le monde (8). En France, sa prévalence est évaluée entre 1,5 et 2,1% (9), dont 91 875 personnes au stade terminal de la MRC, 55% en dialyse chronique et 45% transplantées rénales, selon le Rapport *REIN 2019*.

La MRC est définie selon les recommandations KDIGO (*Kidney Diseases : Improving Global Outcome*) 2012 par la présence pathologique persistante sur une période supérieure à 3 mois d'une albuminurie, d'anomalies du sédiment urinaire, de troubles électrolytiques en rapport avec des anomalies tubulaires, d'anomalies structurelles rénales histologiques, d'antécédent de transplantation rénale, et/ou d'une altération du débit de filtration glomérulaire inférieur (DFG) inférieure à 60 mL/min/1,73 m² (10). Si le DFG est inférieur à ce seuil, on parle d'insuffisance rénale chronique (IRC).

La MRC se caractérise par une atteinte progressive des fonctions physiologiques du rein. En particulier, le rein permet de contrôler l'équilibre du milieu intérieur en régulant le bilan hydro-électrolytique et acido-basique et en assurant l'élimination de déchets issus du métabolisme cellulaire et de l'alimentation. Lorsque ces déchets vont s'accumuler dans l'organisme au cours de la MRC et exercer un effet clinique ou biologique délétère, ils sont appelés toxines urémiques (11,12). On dénombre à ce jour 130 toxines urémiques (*EUTox Database*). Les patients atteints de MRC sont exposés à des niveaux de toxines urémiques 10 à 100 fois supérieurs à ceux observés dans la population générale. La morbi-mortalité au cours de la MRC est principalement liée aux maladies cardio-vasculaires, dont le MRC est un facteur de risque majeur (13), indépendamment des autres facteurs de risques traditionnels comme l'hypertension artérielle (HTA). L'accumulation des toxines participe à ce surrisque cardiovasculaire. Parmi les toxines urémiques, deux familles sont issues du métabolisme du tryptophane, un acide aminé essentiel : les kynurénines et les indoles (**Figure 1**) (14).

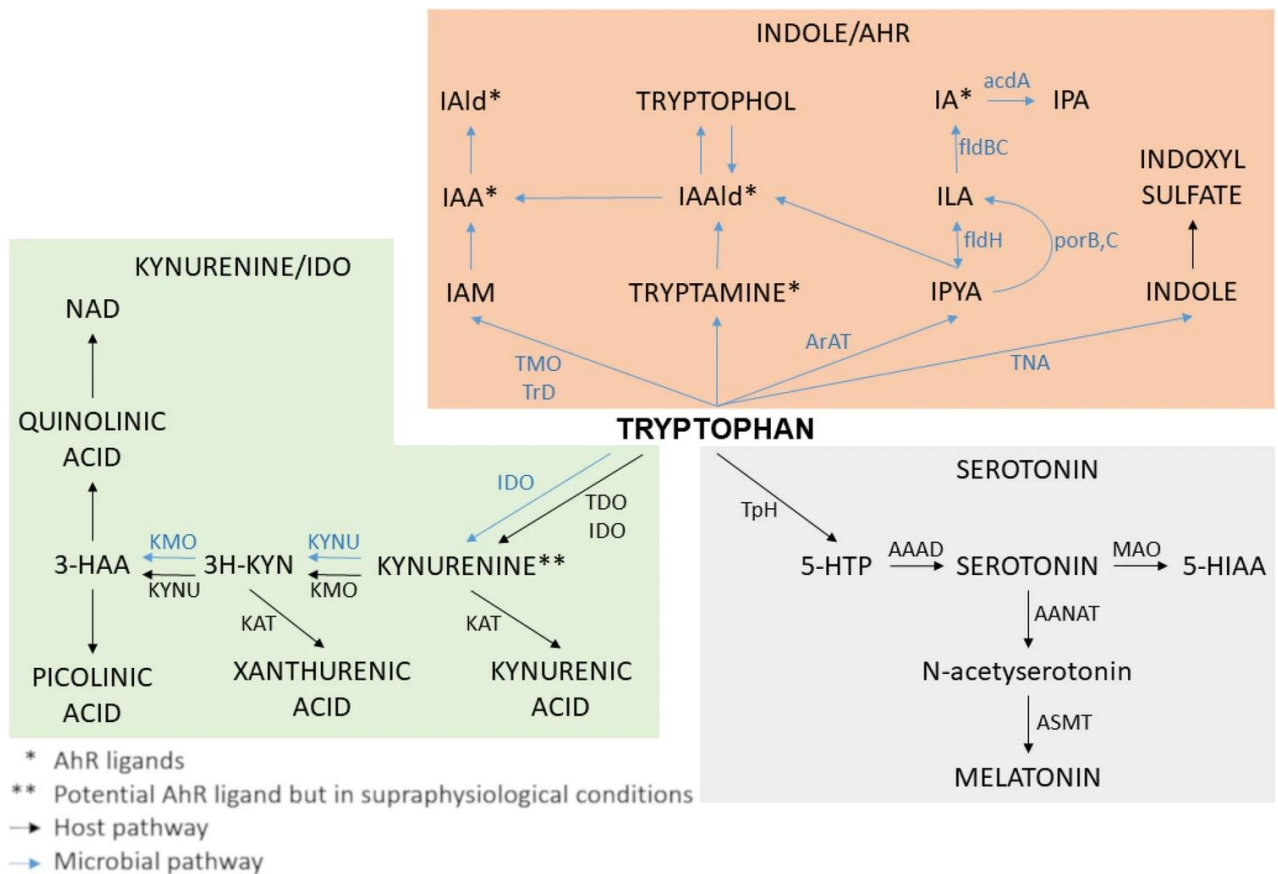


Figure 1 : Métabolisme du tryptophane et toxines urémiques – d'après Brydges CR et al., *Sci Rep* 2021 (14)

Les indoles font partie des toxines urémiques liées aux protéines, rendant leur épuration par la dialyse difficile. Les concentrations plasmatiques de ces toxines sont associées au risque d'événements cardiovasculaires majeurs (15). Parmi les indoles, l'indoxyl sulfate (IS) est particulièrement connu pour exercer une toxicité endothéliale (16). Après ingestion de protéines, le tryptophane est transformé en indole par le microbiote colique porteur de tryptophanase. L'indole sera absorbé par l'épithélium colique puis transformé en indoxyl puis en IS par le foie (17). En situation physiologique, l'IS sera éliminé par les reins par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire notamment via les transporteurs d'anions organiques (*OAT*) 1 et 3. Son accumulation, notamment en situation pathologique, conduit à l'activation du facteur de transcription Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) (**Figure 2**). AhR est un facteur de transcription cytosolique d'expression ubiquitaire, de la famille des basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim(PAS) impliqué dans la détoxification, et est notamment connu pour être le récepteur à la dioxine. AhR module de nombreuses voies de signalisation.

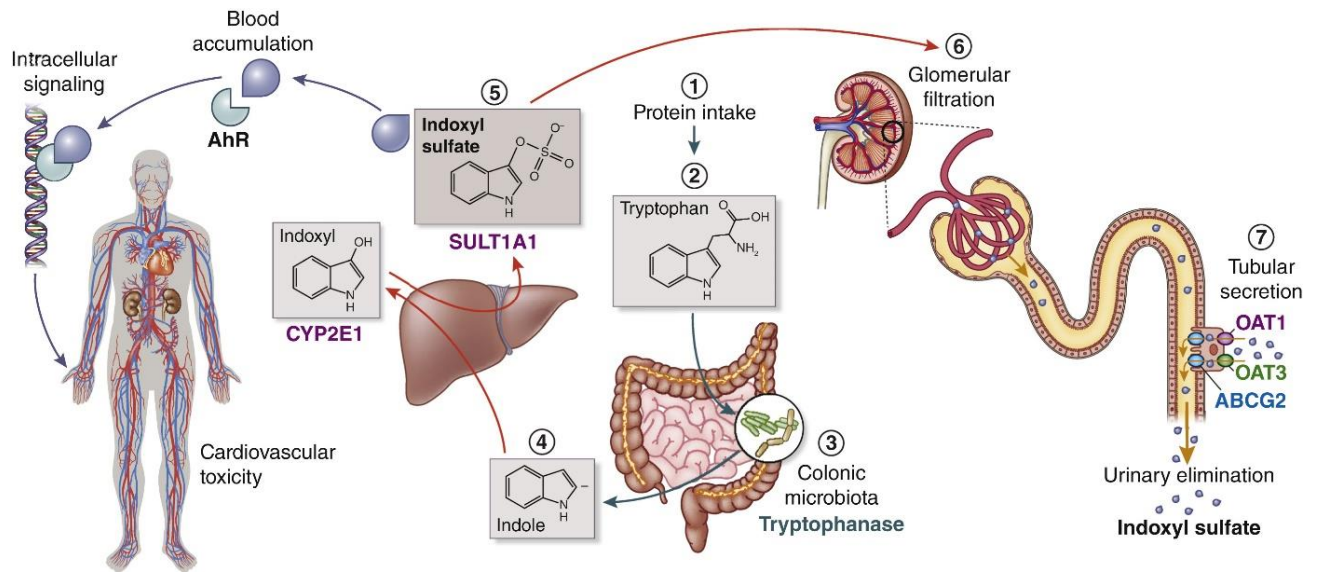


Figure 2 : Métabolisme de l'indoxyl sulfate – d'après Jourde-Chiche N et al., *Kidney Int* 2020 (17)

Plusieurs travaux ont montré que l'activation d'AhR par l'IS conduit à une augmentation du risque d'événements cardiovasculaires au cours de la MRC. L'activation d'AhR par les indoles (indoxyl sulfate ou acide indole acétique, issus du métabolisme du tryptophane) conduit à une dysfonction endothéliale (16,18) en induisant une inflammation endothéliale, une augmentation du stress oxydatif et une activation de la cascade de coagulation, notamment en augmentant la production de facteur tissulaire, entraînant une augmentation du risque thrombotique ((6,19–21) (**Figure 3**). En particulier au niveau moléculaire, l'activation d'IS par AhR va induire à la fois la translocation nucléaire d'AhR dans la cellule endothéliale (voie génomique), et la translocation du facteur nucléaire kB (NF-kB) et de la protéine AP-1 (voie inflammatoire non génomique). Les voies NF-kB et AP-1 vont être également activées par les dérivés réactifs de l'oxygène induits par l'exposition de la cellule endothéliale à l'IS, via une activation de la NADPH oxydase mitochondriale. Cela aura pour conséquence l'augmentation de la production de protéines impliquées dans l'inflammation, la thrombose et l'adhésion leucocytes comme le facteur tissulaire, les protéines d'adhérences intercellulaires ICAM-1 et MCP1, l'E-selectine et l'interleukine 18. L'IS va provoquer une altération du glycocalyx endothélial et perturber l'adhésion des cellules endothéliales, leur contractilité et leur prolifération via notamment une diminution de la production locale de monoxyde d'azote (NO) par la NO-synthase endothéliale (eNOS) et de l'expression des protéines de jonctions ZO-1 et VE-cadhérine. L'IS peut également augmenter les mécanismes de sénescence dans la cellule endothéliale, sous l'influence du facteur de transcription p53 (16).

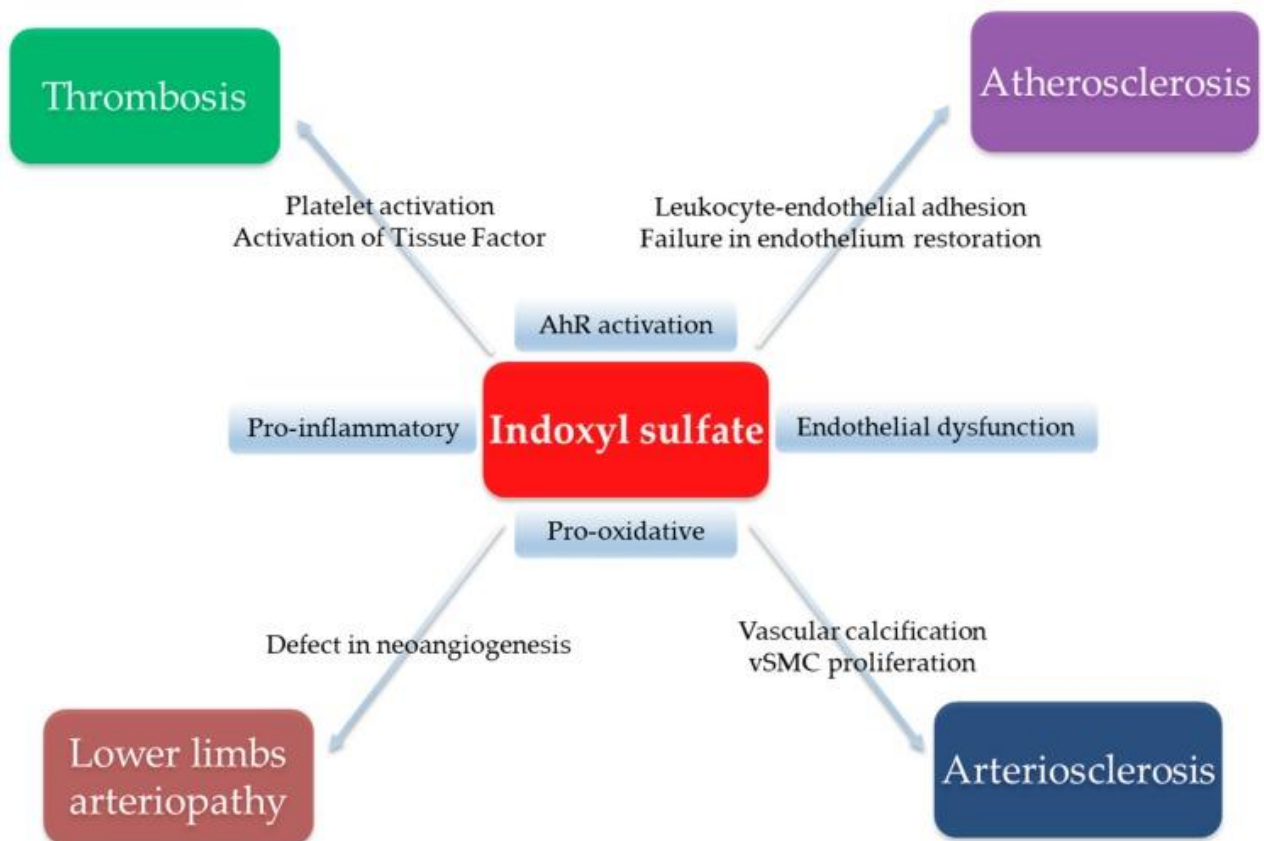


Figure 3 : Conséquences vasculaires pathologiques de l'accumulation d'indoxyl sulfate au cours de la MRC - d'après Lano G et al., *Toxins* 2021 (16)

Le chélateur des toxines urémiques le plus utilisé est l'AST-120, il s'agit d'un charbon permettant l'adsorption de l'indole et des toxines urémiques dans le tube digestif (22), il est principalement utilisé à visée de recherche fondamentale, mais également en clinique au Japon.

1.2 Atteintes neurocognitives au cours de la MRC

La MRC s'accompagne d'une altération fréquente des fonctions cognitives comme la mémoire (3,23–27). La prévalence de ces atteintes cognitives peut atteindre 30 à 80% des patients chez les patients IRCT (3), soit au moins deux fois plus importante que dans la population générale (28). Cette altération existe dès les stades précoces de la maladie rénale chronique, sa gravité est corrélée au déclin du DFG (24) et se présente sous la forme d'une démence vasculaire précoce dont la physiopathologie est insuffisamment comprise (3,4,29). De plus, la MRC apparaît comme un facteur de risque indépendant de développer une démence. En particulier un DFG inférieur à 30 mL/min/1,73m² est associé à une augmentation importante de l'incidence de démence vasculaire (HR : 2,56) ou de maladie d'Alzheimer (HR : 1,65) (30). Les performances cognitives semblant les plus altérées au cours de la MRC sont l'orientation, l'attention et le langage (31). Il ne

semble pas exister de corrélation entre ces atteintes cognitives et des modifications structurelles cérébrales à l'IRM chez des enfants et des jeunes adultes atteints de MRC (32). Une étude de randomisation Mendélienne a toutefois mis en évidence une association entre l'épaisseur et la surface du cortex cérébral et à la fois la MRC, le DFG et l'albuminurie ; en particulier l'association semble la plus forte avec l'épaisseur de la *pars opercularis*, une partie de l'aire de Broca impliquée dans le langage et la compréhension (33). Le dépistage des troubles cognitifs au cours de la MRC par les néphrologues et les gériatres est primordial car ils peuvent avoir un retentissement important sur la vie quotidienne des patients et leur entourage, et leur adhésion au traitement (34).

La prévalence de certains facteurs de risques classiques de démence vasculaire est élevée dans la population MRC, comme l'âge avancé, l'hypertension artérielle (présente chez plus de 80% des patients MRC (35)), et le diabète (représentant la première cause d'IRCT en France (36)), la dyslipidémie ou le tabagisme. Cependant la prévalence importante de ces facteurs de risque n'explique pas à elle seule la fréquence et la gravité des troubles cognitifs au cours de la MRC (**Figure 4** - (37)). Il a par ailleurs été montré que l'acidose métabolique chronique, fréquente chez les patients MRC, en plus d'aggraver la progression de la MRC, aurait également un effet délétère sur les performances cognitives et motrices (38,39), bien que la physiopathologie des atteintes du système nerveux central liées à l'acidose ne soit pas actuellement élucidée. Une diminution d'un mmol/L de bicarbonatémie correspondrait à un vieillissement cérébral de 4,3 mois (38). De plus chez les patients IRCT, les séances d'hémodialyse sont associées à une diminution du flux sanguin cérébral de 10% en moyenne (40). Si des études longitudinales ont montré que la transplantation rénale permet d'améliorer les troubles cognitifs comme la mémoire chez les patients IRCT, cette amélioration n'est que partielle et les patients transplantés présentent des performances cognitives restant inférieures aux contrôles sains (41-43), en particulier chez les patients les plus fragiles (43), suggérant des atteintes cérébrales irréversibles.

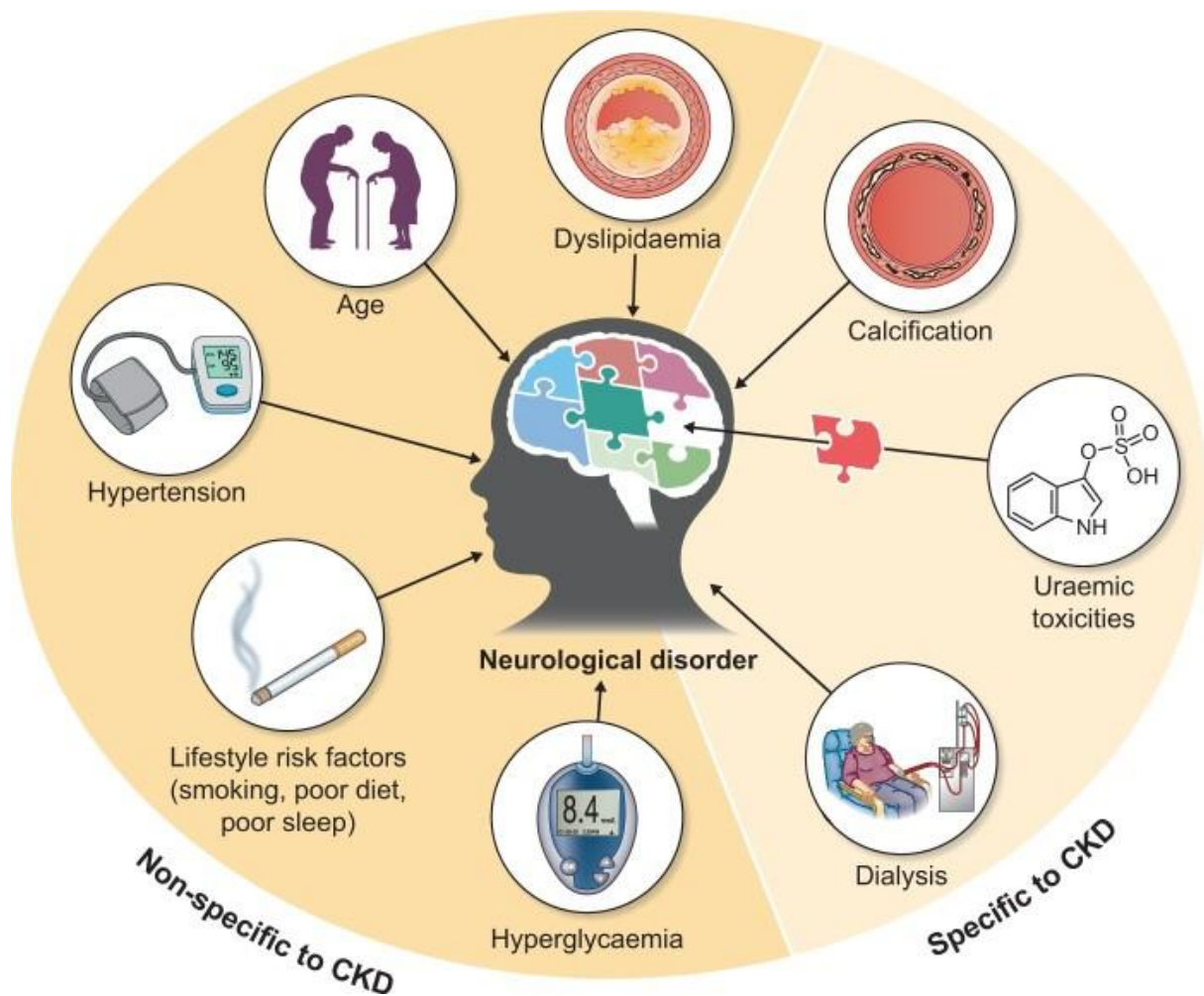


Figure 4 : Facteurs de risques spécifiques et aspécifiques des atteintes cérébrales au cours de la MRC – d'après Liabeuf S et al., *Nephrol Dial Transplant* 2022 (37)

La MRC s'accompagne également d'une altération thymique, la dépression touchant de 21 à 25% des patients, et jusqu'à 39% en hémodialyse (44), contre une prévalence de 3 à 4% en population générale (OMS). De plus, la dépression au cours de la MRC semble souvent résistante aux traitements, notamment aux antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (traitement de référence en première intention dans la dépression). Les résultats de l'essai randomisé CAST ont mis en évidence que le traitement par sertraline n'était pas plus efficace que le placebo, chez les patients atteints de MRC (45).

Ces atteintes neurocognitives ont également été mises en évidence dans quelques travaux chez le rongeur après modélisation expérimentale d'une MRC (46–50). Les travaux de Mazumder *et al.* ont mis en évidence plusieurs atteintes neurocomportementales et thymiques au cours d'un modèle de MRC par régime enrichi en adénine à 0,3% chez la souris : les auteurs ont décrit une atteinte de la mémoire de travail au test de reconnaissance du nouvel objet (RNO), de la mémoire spatiale au test

de localisation de l'objet, et un phénotype dépressif-like au test de la nage forcée, ainsi qu'un phénotype anxieux chez les animaux MRC, en lien avec une inflammation cérébrale, une augmentation du stress oxydatif, et une dysfonction mitochondriale cérébrale, ainsi qu'une diminution de l'activité d'acétylcholinestérase neuronale (48,51). Des atteintes de la mémoire spatiale, de la mémoire de travail et de la coordination motrice, ainsi que des phénotypes anxieux et dépressif ont également été retrouvées dans les travaux de Fusikaji *et al.*, Haruyama *et al.*, et de Karbowska *et al.* après un modèle de MRC par néphrectomie des 5/6^{èmes} (47,49,52), notamment en lien avec une augmentation du stress oxydatif.

L'accumulation des toxines urémiques au cours de la MRC pourrait jouer un rôle important dans ces atteintes neuro-cognitives (37,53). En effet, chez les patients MRC, les taux sériques d'IS sont associés à une atteinte des fonctions cognitives aux stades précoces de la MRC (54) et en hémodialyse (55); cette association n'était pas retrouvée avec le para-cresyl sulfate dans les deux études précédentes (54,55). Une étude rétrospective japonaise a retrouvé que la chélation digestive de toxines urémiques par AST-120 chez les patients MRC était associée à une diminution du risque d'AVC de 10% et 26% à 3 et 5 ans, respectivement (56).

Si plusieurs toxines urémiques comme les composés guanidino (57,58) et les kynurénines (59) semblent associées à une neurotoxicité ainsi qu'aux atteintes neuro-cognitives, l'IS est la toxine de loin la plus étudiée dans la littérature dans le contexte des atteintes neuro-cognitives au cours de la MRC. C'est la seule toxine urémique dont l'accumulation a été rapportée dans des travaux pré-cliniques comme associée à la fois à l'augmentation de l'inflammation, à la dysfonction endothéliale, au stress oxydatif, à l'activation des cellules gliales et à l'apoptose neuronale (60).

En particulier, *in vitro*, l'IS semble avoir une toxicité neuronale directe (61,62), ainsi que sur les cellules gliales en induisant des phénomènes neuro-inflammatoires et du stress oxydatif (61,63).

L'induction d'une MRC par régime enrichi en adénine chez le rongeur provoque une augmentation des taux d'IS dans le cerveau des animaux (49,64). Certains travaux chez le rat retrouvent des atteintes préférentielles de l'hippocampe (62), structure cérébrale impliquée dans la mémoire ; ou du tronc cérébral associée à une diminution des neurotransmetteurs cérébraux comme la noradrénaline, la dopamine et la sérotonine et à des atteintes cognitives (49). L'étude d'Oshima *et al.* chez le rat a montré que les neurones de la médullaire bulbospinale rostro-ventrale médiale expriment les OAT1 et 3, qui permettent le passage d'IS dans le cytoplasme des neurones (65). L'hypothèse des auteurs est qu'en cas d'accumulation d'IS, celui-ci va ainsi entrer de façon importante dans les neurones, induisant la production de dérivés réactifs de l'oxygène conduisant à leur hyperactivation et pouvant provoquer une hypertension artérielle (65).

De plus, chez le rat, AhR est particulièrement exprimé dans le cerveau, notamment dans les zones impliquées dans la mémoire comme les zones corticale ou l'hippocampe (66).

Par ailleurs, une étude a montré que l'activation d'AhR par l'IS induisait une augmentation de la perméabilité vasculaire *in vitro* sur des cellules d'aorte bovines, notamment via une altération de la phosphorylation des VE-cadhérines (67). Il semble alors probable que la dysfonction endothéliale périphérique médiée par l'activation d'AhR en réponse à l'accumulation entre autres de l'IS (16) puisse participer à l'atteinte cérébrale au cours de la MRC, altérant l'intégrité de la barrière-hémato-encéphalique (BHE), bien qu'il n'existe pas actuellement dans la littérature de travaux s'intéressant à ce phénomène au niveau cérébral. Bien qu'à ce jour il ne soit pas possible de relier de façon certaine l'activation d'AhR par l'accumulation des toxines urémiques, la dysfonction endothéliale cérébrale, l'atteinte de la BHE, et les atteintes cognitives au cours de la MRC, la voie IS-AhR constitue une hypothèse sérieuse pour expliquer ces atteintes.

1.3 Atteintes neurologiques au cours de l'insuffisance rénale aiguë (IRA)

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) correspond à une diminution rapide et brutale du DFG à laquelle va s'associer une augmentation rapide de la créatininémie. Sa définition la plus récente correspond aux critères KDIGO 2012, qui ont permis d'harmoniser les définitions antérieures RIFLE et AKIN, et qui définissent l'IRA comme une augmentation de la créatininémie de plus de 26,5 $\mu\text{mol/L}$ ou plus d'1,5 fois la valeur de base, ou une diminution de la diurèse de moins de 0,5 ml/kg/h pendant 6 à 12h et la classent en 3 stades de gravité (68).

L'IRA est une problématique fréquente, sa prévalence varie entre 3,0 et 18,3% chez les patients adultes hospitalisés (69), et entre de 39,3 et 57,3% en réanimation (70,71). La survenue d'une IRA est associée à une mortalité accrue (72), de façon proportionnelle à sa sévérité, en particulier en réanimation où elle est associée à augmentation du risque de mortalité à court terme jusqu'à plus de de 7 fois (70).

Le recours à l'épuration extra-rénale (EER) en cas d'IRA est indiquée en cas de complication métabolique sévère comme une hyperkaliémie menaçante sans réponse au traitement médical, une acidose métabolique sévère, en cas d'oligurie ou d'anurie supérieure à 72h (diurèse inférieure à 0,3 ml/kg/h ou inférieure à 500 ml/jour), ou d'une urémie supérieure à 40 mmol/L (73,74), ou encore en cas d'intoxication à une molécule dont l'EER permettrait une élimination rapide et efficace (75). Le recours à l'EER en cas d'IRA reste rare en hospitalisation (<5% de patients) mais plus fréquent en réanimation.

Les causes d'IRA sont nombreuses. Mais les plus fréquentes sont l'IRA fonctionnelle (ou pré-rénale) par hypoperfusion rénale, la nécrose tubulaire aiguë et l'insuffisance rénale aiguë obstructive (ou post-rénale) en cas d'obstruction sur les voies excrétrices urinaires.

Si dans la majorité des cas une IRA est réversible, de nombreuses données montrent qu'un épisode d'IRA, en particulier sévère, est associé à un risque accru de développer une MRC à long terme, ainsi qu'à un risque augmenté de mortalité à long terme (76).

Au décours d'un épisode d'IRA les patients peuvent développer des atteintes neurologiques multiples à type de confusion avec désorientation temporo-spatiale. Une étude de 1978 a montré, que l'enregistrement électroencéphalographique des patients présentant une IRA retrouvait un ralentissement important de l'activité électrique cérébrale, en lien avec une accumulation de calcium intracérébrale, retrouvée après autopsie (77), possiblement en lien avec l'augmentation des taux sériques de parathormone (PTH) observée chez les patients après une IRA, même non sévère. De plus, certaines études ont montré que la survenue d'une IRA était associée de façon indépendante à une aggravation du pronostic neurologique chez les patients neuro-lésés, comme en cas d'asphyxie néo-natale (78) ou de traumatisme crânien (79,80).

La sévérité des atteintes neurologiques semble corrélée à la gravité de l'insuffisance rénale aiguë. Chez les patients de réanimation, une IRA sévère est un facteur de risque de confusion et de coma de façon sévérité-dépendante (OR : 2,6 et OR : 3,3 respectivement en cas d'IRA stade 3) (81), et peut être associée à un retard à la reprise de la conscience. Dans une étude prospective en réanimation, l'EER permettait de diminuer partiellement le risque de confusion et de coma (81).

Les mécanismes des atteintes neurologiques au décours de l'IRA sont peu étudiés à ce jour. Plusieurs hypothèses physiopathologiques sont envisagées :

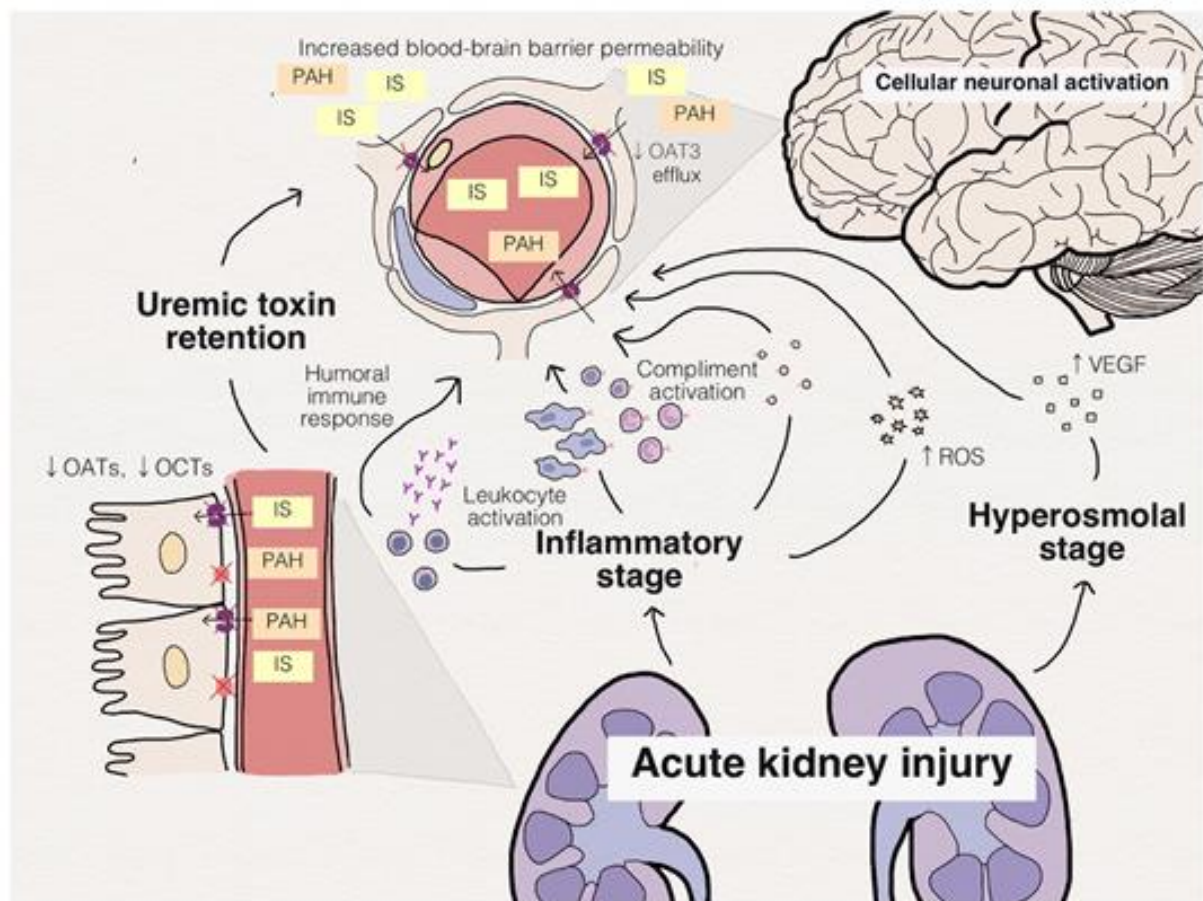


Figure 7 : Mécanismes potentiels de l'atteinte cérébrale au cours de l'IRA – d'après Nongunch A et al. *Critical Care* 2014 (7)

1- La neurotoxicité des toxines urémiques

L'IRA s'accompagne de l'accumulation de toxines urémiques par défaut d'élimination rénale (82). Leur accumulation semble toutefois moindre que dans la MRC. A titre d'exemple, l'accumulation d'IS est plus de 10 fois plus importante chez les patients MRC que chez les patients ayant présenté une IRA (83,84). Une étude prospective monocentrique Taiwanaise a retrouvé une association entre l'accumulation d'IS dans l'IRA et la mortalité, sans précisions sur les causes de mortalité (85). La valeur pronostique de la concentration des toxines urémiques, dont l'IS, et de leur cinétique au cours du choc septique avec IRA fait l'objet de l'étude TOX-AKI en cours (*Clinical Trials : NCT03920982*). Après modélisation d'une IRA par injection de cisplatine chez le rat, des taux élevés d'IS étaient retrouvés dans le sang et le cerveau des animaux, associés à une perturbation du rythme nyctéméral (86), mais la relation de cause à effet avec l'accumulation de l'IS n'est à l'heure actuelle pas démontrée.

2- Les processus inflammatoires

L'IRA s'accompagne d'un état inflammatoire avec une production de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine (IL)-6 et l'IL-1b et de radicaux libres (87). Après modélisation d'une IRA chez la souris, certaines cytokines ont été retrouvées en quantité

augmentée dans le cerveau (88) et pourraient altérer la perméabilité des jonctions serrées endothéliales au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (83,88). L'IRA semble induire également une réponse humorale plus importante (89).

3- Les troubles hydro-électrolytiques

L'IRA peut s'accompagner fréquemment de troubles hydro-électrolytiques comme l'hyponatrémie et l'acidose métabolique. Les conséquences neurologiques de l'acidose métabolique ont essentiellement été mis en évidence en cas de MRC, leurs conséquences en cas d'atteinte rénale aiguë n'est pas démontré. Cependant, une hyponatrémie aiguë sévère (inférieure à 125 mmol/L), correspondant à une hypo-osmolalité plasmatique, va entraîner un transfert d'eau rapide depuis le secteur extra-cellulaire vers le secteur intra-cellulaire ce qui va augmenter le volume intra-cellulaire, notamment au niveau cérébral, ce qui va provoquer un œdème cérébral. L'œdème cérébral peut se traduire, selon sa gravité et sa rapidité d'installation, par une atteinte neurologique allant de la confusion, aux convulsions, voire au coma, et dont l'issue peut être fatale (90,91).

4- Perturbations des neurotransmetteurs cérébraux

Les travaux d'Ali et al. ont montré en 1985 chez le rat que l'IRA par néphrectomie bilatérale pouvait être associée à une diminution des concentrations cérébrales de neurotransmetteurs tels que la dopamine, de noradrénaline et d'adrénaline (92). En contexte d'IRA, une altération de ces neurotransmetteurs semble associée à une altération de l'activité motrice des animaux (93), et une augmentation des concentrations cérébrales d'acides aminés comme l'histidine, la phénylalanine et la tyrosine (94); l'accumulation des deux derniers pouvant être neurotoxique (95,96).

5- Perturbation de la pharmacocinétique des médicaments

De plus, chez le patient, l'IRA peut perturber la pharmacocinétique des médicaments en allongeant leur demi-vie et conduire à une accumulation systémique de médicaments potentiellement neurotoxiques à élimination rénale (antibiotiques, antiviraux, sédatifs, morphiniques) (97,98).

2. La barrière hémato-encéphalique (BHE)

2.1 Architecture de la barrière hémato-encéphalique

La BHE, est une barrière physiologique entre le compartiment sanguin et le système nerveux central et entre le compartiment sanguin. Elle a été définie en 1900 par Max Lewandowsky (99), suite aux premières observations de Paul Ehrlich en 1885 qui observait en microscopie un marquage de tous les organes excepté le cerveau après

injection intra-vasculaire de colorants. Elle est en effet, particulièrement sélective pour protéger les cellules neuronales du système nerveux central des agents pathogènes et des molécules neurotoxiques circulantes. Cette sélectivité est assurée par ses caractéristiques anatomiques et cellulaires. Elle est composée de l'endothélium cérébral, des péricytes, de la lame basale et des pieds des astrocytes.

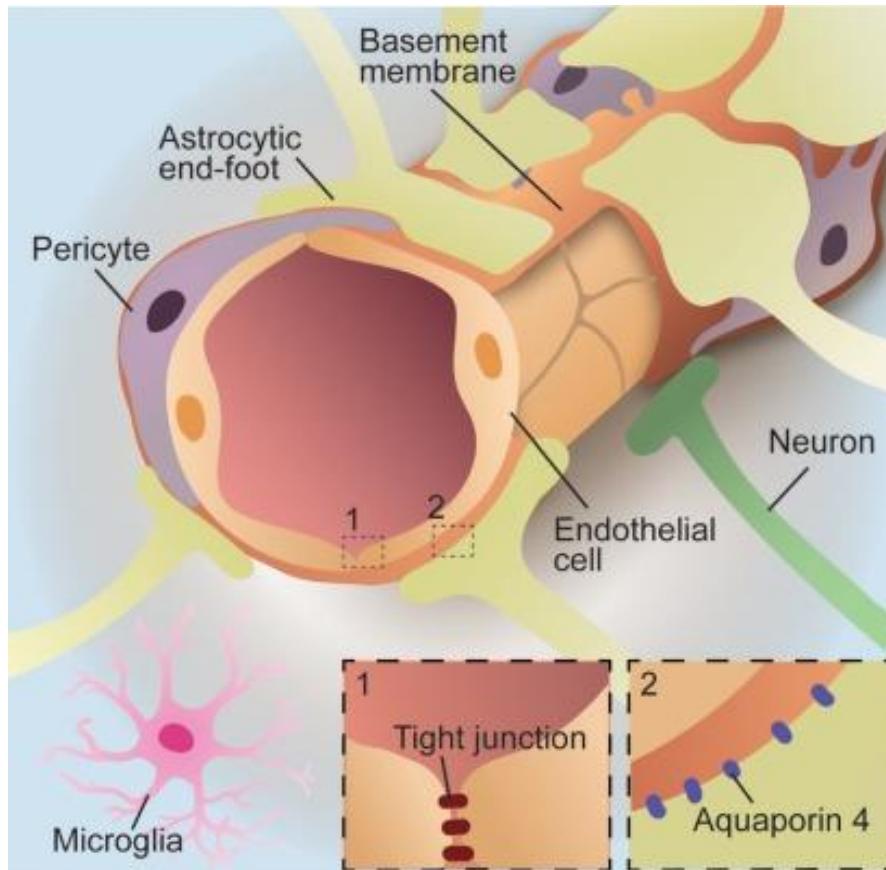


Figure 8 : Représentation de la barrière hémato-encéphalique – d'après Ahn SI et al. *Trends in Biotechnology* 2021 (100)

L'endothélium cérébral a la particularité d'être non-fenêtré, contrairement à l'endothélium dans les vaisseaux périphériques, les cellules endothéliales sont reliées par des jonctions serrées, garantissant son étanchéité. Ces jonctions serrées empêchent la circulation des fluides et des molécules par voie paracellulaire. Elles sont composées de protéines à quatre domaines transmembranaires : les claudines (dans le cerveau, majoritairement la Claudine 5) et les occludines. Elles sont connectées aux protéines ZO1, ZO2, ZO3 et à la cinguline qui permet leur liaison aux filaments d'actine de la cellule. Les cellules endothéliales au sein de la BHE sont également pourvues de jonctions adhérentes dont la plus importante est la VE-Cadhérine. La partie luminale de la membrane des cellules endothéliales cérébrale est le siège de nombreuses pompes d'efflux dépendantes de l'ATP, les transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*, comme la Glycoprotéine P ou P-gp) (101,102), permettant l'efflux actif de médicaments de l'endothélium vers le sang et contribuant elles aussi à la sélectivité de la BHE. Les cellules endothéliales cérébrales possèdent des mitochondries 2 à 5 fois plus nombreuses et de

volume plus important que les cellules endothéliales périphériques (21), signe de besoins énergétiques importants dus à l'activité des pompes d'efflux et au maintien de l'architecture de l'endothélium. L'endothélium cérébral semble également posséder sur sa face luminale un glycocalyx à 3 à 10 fois plus dense que dans les capillaires cardiaques et pulmonaires chez la souris (103). La lame basale borde la face basale de l'endothélium cérébral.

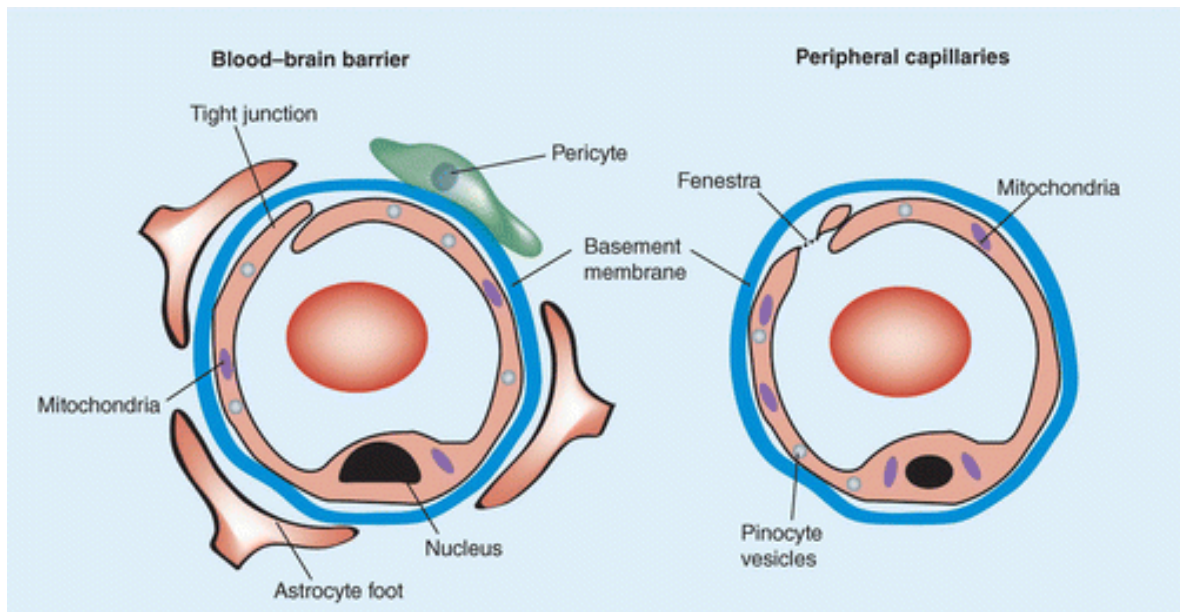


Figure 9 : Différences entre l'endothélium cérébral et périphérique – d'après Geldenhuys WJ et al., *Ther Deliv* 2015 (104)

Les péricytes couvrent la surface externe des capillaires le long de la lame basale, ils possèdent de longs prolongements cytoplasmiques. Ils jouent à la fois un rôle structurel, permettant la modulation du diamètre des vaisseaux cérébraux (105), un rôle de régulation immunitaire (106) et un rôle régulateur de l'angiogenèse. Ils jouent un rôle important dans l'intégrité de la BHE en régulant la polarisation des pieds des astrocytes au niveau de la BHE. Les péricytes expriment le récepteur *Platelet-derived growth factor receptor beta* (PDGFR- β). Les péricytes sont en contact étroit avec les cellules endothéliales via des jonctions communicantes et des plaques d'adhésion focales permettant l'ancrage de ces cellules à la lame basale. La fixation de du *Platelet-derived growth factor beta* (PDGF- β), produit par la cellule endothéliale, au PDGFR- β est nécessaire pour le recrutement des péricytes lors de l'angiogenèse, et le maintien de l'intégrité de la BHE (107). Chez la souris, l'invalidation du gène PDGF- β conduit à une raréfaction des péricytes et à une perméabilité importante de la BHE (107).

Les astrocytes font partie des cellules gliales du système nerveux central. Ils ont une forme d'étoile et assurent de nombreuses fonctions participant à la protection des neurones (synthèse de cholestérol pour les gaines de myéline, régulation de l'homéostasie, production de substrats énergétiques). Ils expriment la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP). Les astrocytes possèdent de longs prolongements permettant des

connexions aux neurones et aux autres astrocytes, ces prolongements se terminent par des pieds qui sont au contact des cellules endothéliales cérébrales et participent à l'architecture de la BHE (108). Une augmentation du calcium intracellulaire dans les astrocytes sous l'influence de l'histamine, de la substance P et du 5-HT va entraîner une sécrétion d'ATP et de prostaglandines qui permet la régulation de la perméabilité endothéliale et du tonus vasculaire, grâce à leur contact étroit au sein de la BHE (108). En cas de lésion cérébrale, les astrocytes peuvent s'hypertrophier et être recrutés localement pour former une barrière limitant la diffusion des leucocytes dans le parenchyme cérébral (109,110). AhR est largement exprimé dans les astrocytes, les cellules endothéliales cérébrales et les neurones (66).

La BHE est présente sur la quasi-intégralité du système nerveux central à l'exception des organes circumventriculaires possédant une fonction neuroendocrine comme l'hypophyse ou la glande pinéale, où les capillaires sont très perméables.

2.2 Evaluation de la perméabilité de la BHE

En situation pathologique, la BHE peut être rompue, aggravant alors les lésions cérébrales. Elle va ainsi permettre la diffusion intra-cérébrale de molécules toxiques. Cette rupture peut être brutale comme lors d'un accident vasculaire cérébral (AVC) (111), d'un traumatisme crânien (112), d'une méningo-encéphalite infectieuse (113) ou d'un arrêt cardiaque (114), ou plus chronique comme dans le cas de tumeurs cérébrales (115). La rupture de la BHE, notamment après un processus ischémique, va conduire à une augmentation des processus inflammatoires au niveau cérébral (109), et une activation des cellules microgliales, principales cellules immunitaires du système nerveux central de la famille des macrophages. En cas d'activation, les cellules microgliales vont passer d'un phénotype ramifié à un phénotype amiboïde capable de phagocytose (110) et vont exprimer le marqueur CD163 (116). En réponse à ces processus inflammatoires, les astrocytes vont être secondairement activés, exprimant la Vimentine (117), et recrutés afin de limiter l'accès des leucocytes au parenchyme cérébral depuis le compartiment vasculaire (109).

En recherche *in vivo*, l'examen de référence pour observer une perméabilité de la BHE est de quantifier la fuite cérébrale du colorant Bleu Evans injecté en intra-vasculaire (118,119), ce qui peut être fait par spectrophotométrie sur l'organe total ou sur coupe histologique. On peut également rechercher la fuite intra-cérébrale de dextrans couplés à un marqueur fluorescent (120). Plus récemment, des techniques d'imagerie modernes permettent de visualiser la rupture de la BHE comme la scintigraphie cérébrale au DTPA (121) ou encore l'IRM cérébrale (122).

Des marqueurs sanguins sont également utilisés comme marqueurs de la rupture de la BHE. La Neuron Specific Enolase (NSE) est la forme neuronale de l'énolase, une enzyme de glycolyse intracytoplasmique. En cas d'altération de la BHE, elle peut s'élever dans le LCR et/ou le sang, comme après un AVC, un traumatisme crânien (123) ou un arrêt cardiaque (114). Les taux précoces et leur cinétique ont une valeur pronostique neurologique après arrêt cardiaque (124,125). Après traumatisme crânien, des concentrations de NSE plus élevées sont associées à un moins bon pronostic neurologique mais leur valeur pronostic est plus discutée (126). La protéine S-100 β est synthétisée principalement par les cellules gliales du système nerveux central. Sa concentration sanguine est également corrélée au pronostic de récupération neurologique après arrêt cardiaque ou traumatisme crânien, et semblerait plus discriminante que la NSE (127,128).

2.3 La barrière hémato-encéphalique au cours des pathologies neurologiques chroniques

La rupture de la barrière hémato-encéphalique semble être un mécanisme important des pathologies neurodégénératives.

L'étude de Nation *et al.* a montré que la rupture de la BHE et l'atteinte ces capillaires cérébraux dans l'hippocampe et le gyrus parahippocampique étaient associées aux atteintes neurocognitives précoces, indépendamment de l'accumulation des protéines Beta-Amyloïde et tau (129). La rupture de la BHE semble apparaître précocement dans la maladie d'Alzheimer, ainsi que dans d'autres pathologies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, la Sclérose Latérale Amyotrophique, la maladie de Huntington et l'Atrophie Multi-Systématisée (130,131). En effet, une dégénérescence des cellules endothéliales et des péricytes, des fuites intra-parenchymateuses de protéines dérivées du sang, d'hématies et de leucocytes à partir des capillaires cérébraux et une altération de l'angiogenèse ont été retrouvées après analyse post-mortem de cerveaux de patients porteurs de ces maladies neurodégénératives (130). Alors que l'hypothèse autrefois prédominante de l'accumulation de protéine bêta-amyloïde comme cause de la maladie d'Alzheimer est désormais de plus en plus controversée et ne semble pas pouvoir en expliquer toute la physiopathologie (132), ces observations confortent l'importance des atteintes vasculaires dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives.

Par ailleurs, une atteinte de l'intégrité de la BHE a été décrite dans d'autres pathologies systémiques comme le diabète. En effet, le diabète est responsable d'une atteinte microvasculaire systémique importante, notamment via une augmentation de l'inflammation et des dérivés réactifs de l'oxygène au niveau endothélial (133). En particulier, il est associé à une diminution de l'expression des protéines de jonction serrées endothéliales de la BHE comme l'occludine, la claudine 5 et ZO-1 (134), l'hyper- et l'hypoglycémie perturbent l'expressions des transporteurs de glucose GLUT-1, GLUT-3 et GLUT-4 au sein de la BHE (133) et la consommation énergétique cérébrale. Ces

éléments participent à expliquer que le diabète est un facteur de risque important de démence et un facteur aggravant en cas d'AVC (135).

L'hypertension artérielle, elle aussi facteur de risque majeur de démence et de survenue d'un AVC. De nombreuses données expérimentales ont mis en évidence d'existence d'une rupture de la BHE au cours de l'hypertension (136). En particulier, l'hypertension dépendante de l'angiotensine-II semble responsable d'une rupture de la BHE importante avec activation microgliale et d'une atteinte cognitive chez la souris (137). Le contrôle tensionnel médicamenteux, en particulier par des inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone chez le rongeur hypertendu permet d'atténuer la rupture de la BHE chez le rongeur hypertendu (136). Une rupture de la BHE a également été retrouvée dans d'autres pathologies systémiques à tropisme cérébral comme le VIH (138). Enfin, la dysfonction de la BHE semble être impliquée dans la physiopathologie de la dépression et être un facteur associé à la résistance aux traitements (139).

La rupture de la BHE semble donc être un mécanisme important au cours de pathologies ayant en commun d'être associées à des atteintes cognitives, comme les maladies neurodégénératives et les maladies systémiques chroniques à tropisme cérébral, également associées à une susceptibilité accrue aux AVC, telle la MRC. Les travaux de Mazumder *et al.* ont en effet mis en évidence l'existence d'une altération de la BHE évaluée par la fuite intra-cérébrale de Bleu Evans au cours d'une MRC expérimentale chez la souris (48).

3. Susceptibilité aux accidents vasculaires cérébraux (AVC) au cours de la MRC

3.1 Généralités sur les AVC

Un AVC correspond à un déficit neurologique brutal en rapport avec une ischémie cérébrale, ou une hémorragie cérébrale. Ainsi on distingue AVC ischémique ou hémorragique.

En France, environ 150 000 personnes par an sont victimes d'un AVC et environ, 1 personne sur 6 sera victime d'un AVC au cours de sa vie. La mortalité chez l'adulte est de 30% à 30 jours. Un tiers des patients garderont un handicap physique. Les AVC surviennent à 90% après 50 ans, et à 75% après 65 ans (140,141).

Ses facteurs de risque dans la population générale sont l'HTA, le tabagisme, l'hypercholestérolémie, le diabète, l'obésité et la fibrillation atriale (140). Chez la femme,

il s'agit de la première cause de mortalité (18 000 décès par an et 55 000 hospitalisations par an), la fréquence des AVC est plus importante que chez l'homme, du fait d'une espérance de vie plus importante. La femme est également exposée à des facteurs de risques spécifiques comme la contraception oestro-progestative, surtout si associée au tabagisme, la grossesse et la ménopause (surtout en cas de prise de traitement hormonaux substitutifs) (140,141). Une étude Française récente a également retrouvé que les AVC étaient 40% plus fréquents, plus graves (risque de déficit persistant augmenté de 22%) et 10% moins souvent pris en charge en unité neurovasculaire spécialisée chez les patients aux revenus les plus modestes (142).

Par ailleurs, la survenue d'un AVC expose à un risque 3 fois supérieur de développer une démence et constitue la deuxième cause de démence chez les patients de plus de 65 ans (140,141).

L'AVC ischémique est le plus fréquent (plus de 80% des AVC), il correspond à un arrêt brutal de la circulation artérielle au niveau d'une partie du cerveau, occasionnant un infarctus cérébral. La symptomatologie dépend du territoire artériel occlus. La localisation la plus fréquente est l'AVC du territoire sylvien, correspondant à une occlusion de l'artère cérébrale moyenne. Le patient présentera classiquement une hémiparésie voire une hémiplégié controlatérale à la lésion, une hémianopsie homolatérale, et selon l'hémisphère cérébral atteint une dysarthrie ou une aphasie, ou une hémignégligence controlatérale à la lésion.

Les trois causes principales des AVC ischémiques sont par ordre de fréquence l'origine athéromateuse des gros vaisseaux comme l'aorte ou les artères carotides internes, l'origine cardio-embolique à partir d'un thrombus intracardiaque (en cas de fibrillation atriale ou d'altération importante de la fraction d'éjection ventriculaire gauche par exemple), et les causes lacunaires en cas d'atteinte des plus petits vaisseaux cérébraux.

Le traitement doit être initié le plus précocement possible. On estime qu'après survenue d'un AVC ischémique non traité, 1,9 millions de neurones et 12 km de fibres de myéline sont détruits chaque minute (143). Cela correspond à un vieillissement cérébral équivalent à 3,6 ans par heure après AVC.

Le traitement de référence de l'AVC ischémique à la phase aiguë repose en grande partie sur la thrombolyse intra-veineuse, consistant en l'injection d'un traitement fibrinolytique, l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rtPA, alteplase) permettant de dissoudre le thrombus. Sa réalisation précoce permet de diminuer le risque de mortalité et de déficit neurologique après AVC ischémique (144). Exposant à un risque de saignement important, notamment cérébral, ce traitement n'est indiqué qu'en cas d'AVC très récent jusqu'à 4h30 après l'apparition des premiers symptômes (145).

Plus récemment, la thrombectomie mécanique permettant la recanalisation de l'artère occluse, réalisée dans des centres experts en neuroradiologie interventionnelle, a montré une amélioration du pronostic des AVC dans les essais MR CLEAN, EXTEND-IA et SWIFT PRIME (146–148). Elle peut être réalisée jusqu'à 24 heures après le début des symptômes (149). Les résultats de l'essai randomisé SWIFT-DIRECT publiés en 2022, ont montré par ailleurs que l'association thrombolyse-thrombectomie (si réalisée dans les délais recommandés) obtenait de meilleurs résultats en termes de reperfusion cérébrale, sans surrisque hémorragique, par rapport à la thrombectomie seule (150).

Le traitement étiologique comportera par ailleurs des anticoagulants en cas d'origine thrombo-embolique, des antiagrégants plaquettaires en cas d'origine athéromateuse, voire une chirurgie d'endartériectomie carotidienne en cas d'athérome sévère responsable de l'AVC, ainsi que la correction des conditions pathologiques sous-jacentes comme le diabète ou l'HTA.

La principale complication précoce après AVC ischémique est l'hémorragie cérébrale secondaire symptomatique, survenant dans 1 à 4 % des cas spontanément, et dans 5 à 21% des cas après thrombolyse (151). Cette complication redoutée aggrave le pronostic vital et fonctionnel.

Les AVC hémorragiques, correspondent eux à une hémorragie intra-cérébrale ou sous-arachnoïdienne brutale consécutive à la rupture d'un vaisseau ou d'une malformation vasculaire. La symptomatologie neurologique peut et dépend également de la localisation du saignement et de son volume. Les causes les plus fréquentes sont l'HTA déséquilibrée, les malformations vasculaires (anévrismes, malformations artérioveineuses) et la prise d'anticoagulants. Les facteurs de risque les plus fréquemment retrouvés sont l'HTA, la consommation de toxiques (alcool, tabac, cocaïne, cannabis, héroïne) et les anomalies constitutionnelles ou acquises de l'hémostase (152).

3.2 Article de revue : « Kidney disease and stroke: epidemiology and potential mechanisms of susceptibility »

La MRC est également un facteur de risque majeur de survenue d'un AVC, et un facteur de mauvais pronostic neurologique et global. La survenue d'une IRA est également un facteur de mauvais pronostic après un AVC.

L'article de revue suivant détaille les conséquences des atteintes rénales sur la survenue et la sévérité des AVC, et les potentiels mécanismes sous-jacents.

Kidney disease and stroke: epidemiology and potential mechanisms of susceptibility

Mickaël Bobot^{1,2,3*}, Laurent Suissa^{2,4}, Jean-François Hak^{3,5}, Stéphane Burtey^{1,2}, Benjamin Guillet^{2,3,6}, Guillaume Hache^{2,3,7}

- (1) Centre de Néphrologie et Transplantation Rénale, Hôpital de la Conception, AP-HM, Marseille, France
- (2) Aix-Marseille Université, INSERM 1263, INRAE 1260, C2VN, Marseille, France
- (3) CERIMED, Aix Marseille Université, France
- (4) Unité Neurovasculaire / Stroke Center, Hôpital de la Timone, AP-HM, Marseille, France
- (5) Service de Radiologie, Hôpital de la Timone, AP-HM, Marseille, France
- (6) Service de Radiopharmacie, AP-HM, Marseille, France
- (7) Pharmacie, Hôpital de la Timone, AP-HM, Marseille, France

Running Title

Kidney impairment and stroke

Word count

Abstract: 287

Main text: 3837

*Corresponding author:

Mickaël Bobot, MD
Centre de Néphrologie et Transplantation rénale
APHM - Hôpital de la Conception
147 bld Baille
Tel : +33 491383042
Fax : +33 491381112
Mail : mickael.bobot@ap-hm.fr

KEYWORDS: Stroke, Chronic Kidney Disease, Acute Kidney Injury, Uremic Toxins, Blood-brain barrier

Abstract

Patients with Chronic Kidney Disease (CKD) have an increased risk of both ischemic and haemorrhagic stroke compared to the general population. Both acute and chronic kidney impairment are associated with poor outcome after the onset of a stroke, with the worst outcomes occurring in End-Stage Kidney Disease. ESKD is associated with a 7- and 9-fold increased incidence of both ischemic and haemorrhagic strokes, respectively, poorer neurological outcome and a 3-fold higher mortality. Acute kidney injury (AKI) occurs in 12% of patients with stroke and is associated with a 4-fold increased mortality and unfavourable functional outcome.

CKD patients have less access to revascularisation techniques like thrombolysis and thrombectomy despite their worst prognosis. Even if CKD patients could benefit from specific treatments like thrombolysis and/or thrombectomy, their prognosis remains poorer than in patients with normal kidney function. After thrombolysis, CKD is associated with a 40% increase in the risk of intracranial haemorrhage (ICH), a 20% increase in mortality and a poorer neurological outcome. After thrombectomy, CKD is not associated with ICH but still associated with an increased mortality and AKI with unfavourable outcome and mortality. The beneficial impact of gliflozins on the prevention of stroke in CKD patients is still uncertain.

Traditional risk factors of stroke, although highly prevalent, insufficiently explain the high risk of stroke in CKD patients and its severity. Non-traditional risk factors related to kidney damage, like uremic toxins, can lead to chronic cerebrovascular disease predisposing to stroke in CKD, notably through an increase in the blood-brain barrier permeability and impaired coagulation and thrombosis mechanisms. Preclinical and clinical studies are needed to specifically assess the impact of these non-traditional risk factors on the stroke incidence and outcomes, aiming to optimize and to identify potential therapeutic targets.

Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is concerning more than 10% of the global population (i.e. more than 800 million people), and is the eighth cause of mortality worldwide in 2022 (1). CKD is a major risk factor of cardiovascular events including heart failure, coronary artery disease, cardiac arrhythmias, peripheral artery disease and stroke; and is strongly associated with poor cardiovascular outcomes and cardiovascular mortality (2,3). This can be related to several intricate pathological mechanisms like the high prevalence of hypertension and diabetes, chronic anemia, mineral bone disease, volume overload and uremic toxin accumulation in CKD (3). Cardiovascular outcomes are not only related to the decline of glomerular filtration rate in CKD, but also with albuminuria. Indeed, albuminuria is associated with thrombosis (4,5) and global endothelial dysfunction (6) and is an important risk factor and prognosis factor for cardiovascular events (7).

Patients with CKD have an increased risk of both ischemic and haemorrhagic stroke compared to the general population (8), even with mildly decreased glomerular filtration rate (GFR) for ischemic stroke (8), and both acute and chronic kidney impairment seem associated with worse outcome after the onset of a stroke (9,10). Our goal is to summarize the

epidemiology and the recent clinical and experimental data about the impact of acute and chronic kidney impairment on the risk and prognosis of stroke.

Epidemiology and prognosis of stroke in CKD patients

Stroke is the third cause of cardiovascular death in people with CKD (11). Several studies (12–15) and large meta-analyses have identified CKD as a major risk factor of stroke, with an increased risk of incident stroke of 43% in patients with eGFR < 60 ml/min/1.73m² (16). Many reports highlighted that CKD also negatively impacts mortality after stroke (17–19). In CKD patients, the history of previous stroke also impacts negatively long-term mortality (20). Interestingly, an Indian study found that CKD was diagnosed for the first time in the event of a stroke in more than half of the patients (21).

A prospective study in Great Britain also found that subtle impairment of kidney function is associated with an increased stroke risk: stroke risk was significantly increased in patients with serum creatinine > 116 µmol/L (relative risk 1.6, 95%CI: 1.1-2.1), even after adjustment for cardiovascular risk factors (22). While mild CKD is already associated with an increased risk of stroke (23), the severity of CKD is also related with the risk of strokes and worse outcome. Stage 4-5 CKD is associated with a 3-fold increased incidence of stroke, a 5-fold increased bleeding rate and an 10-fold increased mortality compared to stage 1-3 CKD, in patients with nonvalvular atrial fibrillation (AF) (24). The meta-analysis of 83 studies of Masson et al. highlighted an inverse linear relationship between GFR and the risk of stroke, independently of the prevalence of cardiovascular risk factors (25). The prospective cohort study of Shimizu et al. found in Japanese patients that CKD is associated with both ischemic and haemorrhagic strokes in men and women. Excess risk was more important in women for ischemic strokes and in men for haemorrhagic stroke (26).

End-stage kidney disease (ESKD) is associated with the worst stroke incidence and outcomes (18,27). In a large cohort of 69 371 ESKD patients in the United States, the incidence of ischemic and hemorrhagic strokes was 21.1 and 4.7 per 1000 patient-years, respectively, versus 3.3 and 0.5 per 1000 person-years in the global population (28). The mortality rates after both ischemic and hemorrhagic strokes were also particularly high: 17.9 and 53.4%, respectively (27), almost 3 times higher than in the general population. Indeed, in ESKD patients, dialysis therapy can impact negatively on rehabilitation, especially in hemodialysis patients, by limiting access to physiotherapy due to the transport to and from the dialysis unit, and the fatigue following dialysis sessions (29). Only 56% ESKD patients will be back home after a stroke, compared to 72 to 76% in general population (19). Cardio-embolism is the most frequent cause of stroke in ESKD patients (30). Atrial fibrillation (AF) have a prevalence of 27% in ESKD patients (31), and oral anticoagulation by warfarin do not seem to reduce the incidence of stroke in patients with ESKD and AF (32).

Several studies have also highlighted that proteinuria is also an important and independent predictor of poor outcome and mortality after ischemic stroke, regardless of kidney function, and could even better predict poor outcome than kidney function (33–35). Apart from kidney

function, albuminuria is also associated with an increased risk of stroke, independently of GFR (25). Albuminuria is also an independent risk factor of hemorrhagic transformation (36).

The occurrence of a stroke increases the risk of developing dementia by a factor of 3 and is the second most common cause of dementia in patients over the age of 65. A recent prospective study in 2305 patients with transient ischemia attack (TIA) or stroke found that the prevalence of pre- or post-event dementia was twice as high in CKD patients, but CKD was not independently associated with dementia, suggesting that it was poorly influenced by CKD-specific mechanisms (37).

Interestingly, a recent meta-analysis found that gliflozins were associated with a reduction of 32% in stroke rates compared to placebo in patients with CKD and diabetes, but not in patients with diabetes without CKD (38), with a greater beneficial effect with canagliflozin and sotagliflozin (39). The randomized controlled trial CREDENCE found a significant protective effect of canagliflozin on the risk of stroke only in patients with eGFR between 45 and 30 mL/min/m² (OR: 0.46, 95%CI 0.24-0.87) in subgroup analysis (39), this beneficial effect was confirmed in patients with eGFR < 45 mL/min/1.73m² in a subsequent meta-analysis (39). An analysis of the DAPA-CKD randomized trial found that dapagliflozin reduced the risk of cardiovascular death in CKD patients (40), no specific focus on stroke risk was assessed. Since gliflozins have recently become an essential treatment for nephroprotection during CKD (41), it can be hypothesized that the stabilization of kidney function induced by gliflozins could improve the risk of stroke. Gliflozins could be especially effective through the reduction of albuminuria in patients with abundant albuminuria. However very few data are available, and the protective risk of gliflozins is unclear, as a meta-analysis in 2020 found that they were not associated with risk reduction of stroke in CKD and non-CKD patients (42).

Although very rare, children with CKD have also an increased incidence rate of ischemic stroke compared to the general paediatric population (36.8 per 100 000 vs. 2.0 per 100 000 children per year). Stroke was associated with poorer cognitive performance (43).

About patients with intracerebral hemorrhage (ICH), cohort studies highlighted a presence of CKD in a third of the patients (44), and CKD is associated with three-times larger hematomas (45) and poorer outcomes than patients with normal kidney function (44,45).

Influence of CKD on arterial stenosis and cardio-embolism

Large arterial stenosis, usually caused by atherosclerosis, is responsible for 15 to 32% of ischemic strokes (46,47). CKD is known to increase the stiffness, the diameter, the intima-media thickness, and the elastic modulus of carotid arteries (48). These features make the brain of CKD patients more sensitive to hypertension (49). CKD is also independently associated with intracranial artery stenosis in the middle-aged and elderly population, especially in the posterior circulation (50). Even microalbuminuria in elderly patients with normal kidney function is associated with carotid artery intima-media thickness (51). Furthermore, statins seem to be less efficient in CKD patients to improve carotid atherosclerosis (52). Asymptomatic

patients with CKD have also more major adverse events after carotid endarterectomy than patients with normal kidney function, especially more post-peri-operative strokes (53). The study of Avgerinos et al. only highlighted a negative association between CKD and both poor perioperative outcomes and long-term mortality in patients with severe CKD (54). However, carotid endarterectomy can improve stroke-free survival in CKD patients, especially if symptomatic (55). In ESKD patients, both carotid endarterectomy and carotid stenting were associated with a 4-folds increased mortality (56), the risk-benefit ratio must then be carefully considered and individualised for patients with ESKD before proposing a surgical treatment of carotid atherosclerosis, especially in asymptomatic patients in which the benefit is more uncertain.

Cardio-embolism is responsible for 14 to 30% of ischemic strokes and is the cause associated with the highest mortality in the general population (27%) (47). In CKD patients, cardioembolic strokes are more frequent and account for 33 to 38% of strokes (57). Both low eGFR and proteinuria are associated with increased cardioembolic strokes (57). AF is the most common cause of cardio-embolism and is an independent risk factor of stroke, especially in the elderly (58). CKD is associated with both increased prevalence and incidence of AF. The prevalence of AF in patients with CKD range from 7% to 27% (31), is associated with lower eGFR (59,60), and is associated with an increased risk of both stroke and bleeding in these patients (61). Albeit systemic anticoagulation by warfarin in patients with non-valvular AF showed a significant reduction in the risk of thromboembolic stroke and an acceptable risk of bleeding in the general population (31), it significantly increases the risk of bleeding in CKD patients (61) without a clear demonstrated benefit (32). Kumar et al. reported that anticoagulation of AF could also be associated with a paradoxical 2.6-fold increased risk of ischemic stroke in patients older than 65 years with CKD (62). A recent meta-analysis found that direct oral anticoagulants could be superior to warfarin for the prevention of thromboembolic events, and less associated with bleeding risk in CKD patients with GFR > 15 ml/min (63), but not in dialysis patients in which their use can increase bleeding and poor outcomes (63,64). In patient with severe stage 4 and 5 CKD, the prevention of thromboembolic complication in AF by anticoagulation is still matter of debate.

It is to note that the most frequent genetic disease responsible of CKD, autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is associated with aneurysms of intracerebral arteries and their complications. Five percent of patients with ADPKD have an aneurysm. Like in general population the risk increases with age, hypertension and smoking, specifically, aneurysms are more frequently associated to PKD1 genotype and female sex (65).

Potential stroke susceptibility factors in CKD

The prevalence of “traditional” risk factors of stroke, like hypertension (66), dyslipidemia or diabetes mellitus (67) is particularly high in CKD. However, as these factors could explain the high stroke incidence in CKD patients, they insufficiently explain the stroke severity observed in CKD.

First, CKD is associated with both increased risk of thrombosis (68) and bleeding, notably related to platelet dysfunction (69), that could worsen the incidence of ischemic and haemorrhagic stroke, as well as bleeding complications.

In CKD, non-traditional risk factors consecutive to kidney impairment, like uremic toxins accumulation, can lead to chronic cerebrovascular disease that may predispose these patients to stroke, as well as early cognitive impairment (70,71). Pre-clinical studies reported evidence that certain of these uremic toxins, like indoxyl sulfate (IS), could exert a neurotoxic effect in relation to neuro-cognitive impairment (71–75). In CKD, IS is known to induce endothelial dysfunction, pro-inflammatory and pro-oxidative responses through the activation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) and increase the risk of thrombosis in CKD (76–78), related to increased production of tissue factor (68). At the molecular level in the endothelial cell, the activation of IS by AhR induces both the nuclear translocation of AhR and the activation of its target genes, and the activation of the inflammatory pathway via nuclear factor κ B (NF- κ B) (79). The NF- κ B and AP-1 pathways will also be activated by reactive oxygen species induced by exposure of the endothelial cell to IS, via activation of mitochondrial NADPH oxidase (80). This will result in increased production of proteins involved in inflammation, thrombosis, and leukocyte adhesion such as tissue factor, intercellular adhesion proteins ICAM-1 and MCP1, E-selectin and interleukin 18. IS will cause an alteration of the endothelial glycocalyx and disrupt the adhesion of endothelial cells, their contractility, and their proliferation via a reduction in the local production of nitric oxide (NO) by endothelial NO-synthase (eNOS) and expression of ZO-1 and VE-cadherin junction proteins. IS can also increase senescence mechanisms in the endothelial cell, under the influence of the transcription factor p53 (76). AhR is known to be particularly expressed in the brain (81), notably in the blood-brain barrier (BBB) (82) and is implicated in chronic neurodegenerative diseases and brain aging (83). The study of Cuartero et al. characterized the central role of AhR in stroke. They found that the induction of a stroke in mice increased the neuronal and global expression of AhR, and that knock-out of AhR would decrease the stroke volume. In addition, exposition to toxins like L-kynurenin increased the brain expression of AhR and the stroke volume (84). Interestingly, a study found that administration of AST-120, a chelator of uremic toxins such as IS, was associated with a reduction of long-term stroke rate of 10% and 26% at 3 and 5 years, respectively in CKD patients (85).

Recent data suggest that BBB dysfunction is associated with cognitive impairment in both neurodegenerative diseases (like Alzheimer's disease) (86,87) and chronic systemic diseases like hypertension (88) or diabetes mellitus (89). There is growing evidence that CKD is associated with BBB disruption (90,91). Our team recently demonstrated that CKD rats had an increased BBB permeability, correlated with serum IS levels and with cognitive impairment. Furthermore, IS overload induced even more important BBB permeability and cognitive impairment, as the genetical invalidation for AhR in mice, protected the mice for the BBB disruption induced by IS (91). BBB is an important mechanism occurring in the first days after stroke (92–94), but pre-existent BBB dysfunction secondary to uremic toxins accumulation could be important underlying mechanisms predisposing the neuronal cells to apoptosis and necrosis after stroke in CKD.

Neuroinflammation is an important mechanism occurring after a stroke, which can worsen the post-ischemic brain lesions (95). BBB is known to increase the inflammatory processes in the brain (96), notably after stroke (92). CKD is known to be associated with increased systemic inflammation and cytokine release (like IL-1b, IL-6 and TNF) in patients (97,98), which can contribute to increased neuroinflammation after a stroke. Particularly, IS seems to increase neuroinflammation in vitro and in vivo (73,74).

Furthermore, magnetic resonance imaging studies found that the CKD patients have a very high prevalence of both silent cerebral infarction and cerebral microbleeds: 31.8% and 25.6%, respectively; independently from hypertension (99,100), which could possibly be related with an impaired BBB. Interestingly, the presence of silent cerebral infarction is independently associated with the progression of CKD (101). In patients with ICH, cerebral microbleeds appear to be more frequent in patients with CKD (77% of the patients vs. 51% in the general population) (102). Cerebral microbleeds had also been demonstrated in mouse models of CKD, along with a decreased expression of Claudin 5, an important endothelial tight junction protein in the BBB (103).

Finally, ESKD impairs cerebral blood flow regulation. Patients with ESKD have decreased cerebral oxygenation due to anaemia (104). Haemodialysis sessions could impair further the cerebral oxygenation by decreasing cerebral perfusion pressure due notably to rapid ultrafiltration and osmolality variations (104). Indeed, haemodialysis sessions are associated with a reduction of 10% of the cerebral blood flow on average (105).

Traditional and specific risk factors of stroke susceptibility and severity in CKD are summarized in *Figure 1*.

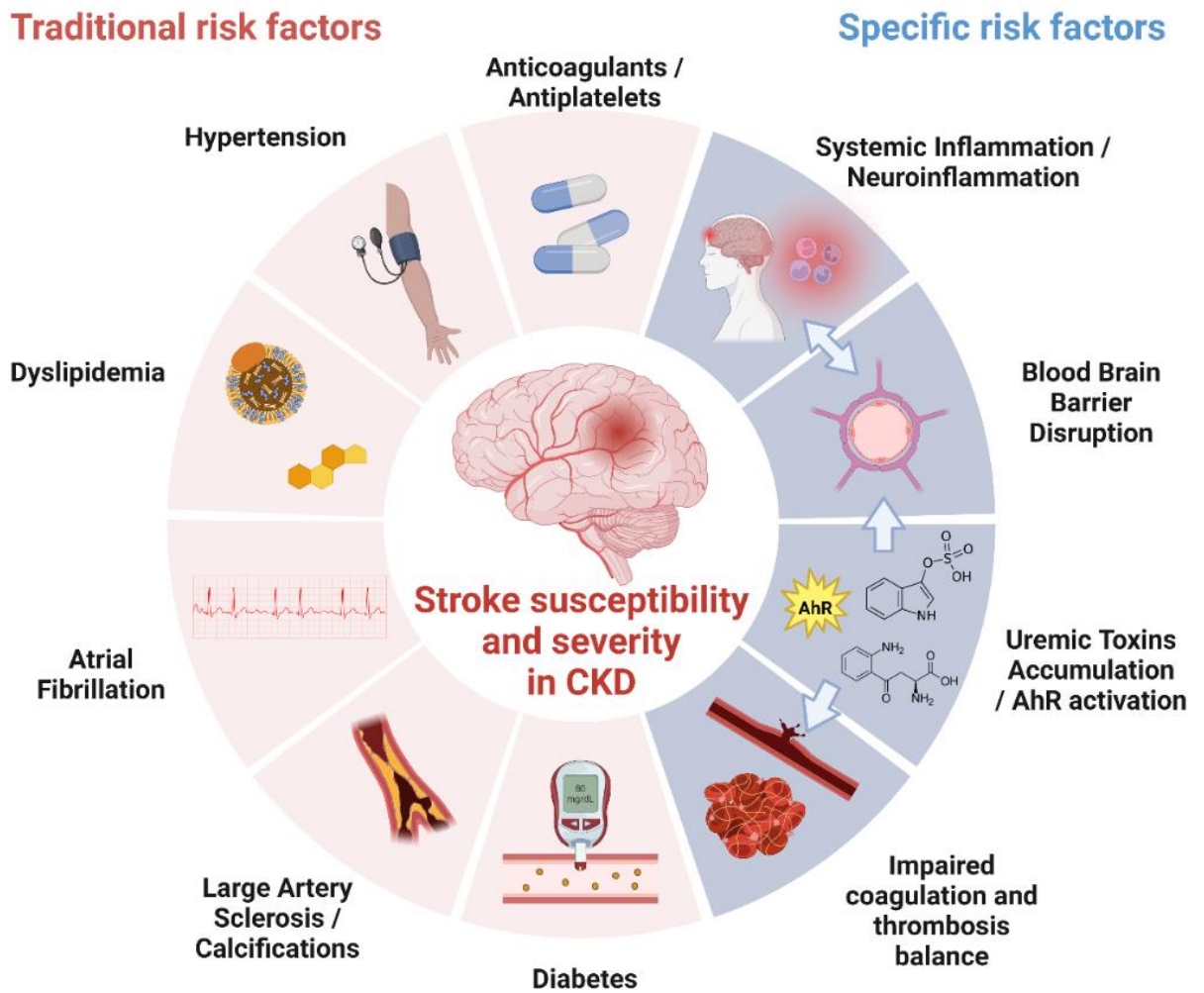


Figure 1: Traditional and specific risk factors of stroke susceptibility and severity in CKD.

Risk of Acute Kidney Injury (AKI) during a stroke and associated outcomes

Acute kidney injury is defined according to 2012 KDIGO guidelines by a rapid increase in serum creatinine or decrease of diuresis (106). It occurs in 5 to 23% of hospitalized patients (107,108), but its prevalence is very variable depending on the causes of hospitalization and patients' comorbidities. Recent meta-analyses highlighted that AKI has an incidence of 12% during a hospitalization for a stroke and is associated with an increased mortality after stroke and poor neurological outcome and mortality (10,109). The main risk factor of post-stroke AKI remains the baseline GFR (110). Urinary biomarkers like liver-type fatty-acid binding protein (LFABP), known to be rapidly excreted in the urine following tubular injury, were also found to be associated with both AKI and poor neurological outcome in patients with stroke (111). However, it remains unclear if AKI can have a specific influence on stroke outcomes per se, or if it is related to global severity in patients with stroke. As AKI is known to be an independent risk factor of mortality in hospitalized patients and in patients in critical care (112,113) and a risk factor of confusion and coma in critically ill patients (114).

Animal studies found that AKI can lead to an inflammatory state with production of pro-inflammatory cytokines like IL-6, IL-1b and oxygen free radicals (115). These cytokines' levels could be increased in the brain after AKI in mice (116). AKI is also associated with increased neuroinflammatory response with astrogliosis in the brain (116) and to increased BBB permeability by disrupting endothelial tight junctions (116,117), potentially worsening the post-ischemic lesions in stroke. At a lesser level than in CKD, AKI could also lead to an accumulation of IS in the blood and the brain (118,119), potentially associated with mortality (120).

Experimental data on stroke and kidney involvement

Experimental studies about the impact of kidney impairment on stroke outcomes are very scarce.

The study of Hénaut et al. conducted transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) in mice with CKD induced by a partial nephrectomy and control mice. CKD mice had a higher cerebral infarction volume and higher neurological impairment 24 hours after MCAO, as well as increased apoptosis and neuronal loss in the cortex and the striatum (121). CKD also promoted the recruitment of microglial cells and astrocytes, and the M1-polarization of microglia and macrophages in the brain, possibly through a decrease of AMP kinase (AMPk) phosphorylation and an increased activation of the NFkB pathway in the ischemic brain (121). The same team recently highlighted that metformin could prevent stroke damage in female mice with CKD, when given 5 weeks prior to stroke induction. Metformin is known as an activator of AMPk. Metformin improved post-ischemic neurological scores, reduced infarct volume, apoptosis and neuronal loss, enhanced AMPk activation and decreased microglial/macrophage M1-polarization in CKD mice, highlighting the importance of AMPk activation in stroke outcomes in these models (122). To note, metformin treatment was associated with better neurological outcome after stroke in diabetic patients with normal kidney function (123).

To date, only the work of Yates et al. in 2013 studied the impact of experimental AKI by bilateral renal artery occlusion on the prognostic of ischemic stroke modeled by MCAO in rats and found no influence of CKD on neurological severity or the volume of cerebral infarction (124).

Impact of kidney function on outcome after acute intravenous and/or endovascular treatments

A few studies specifically investigated the impact of kidney function on stroke treated with specific treatments of ischemic stroke i.e thrombolysis and thrombectomy. However, a large national registry study in the United States in 179 710 patients with acute stroke found that CKD patients were significantly less likely to receive both intravenous thrombolysis and endovascular thrombectomy, independently of other risk factors (125), which can contribute to the poorer outcome in CKD patients.

A retrospective study from Agrawal et al. found no difference in risk of ICH, mortality, and functional outcome at 3 months after thrombolysis, between patients with eGFR < 60 ml/min/1.73m² and patients with eGFR > 60 ml/min/1.73m², although limited by a small number of 74 patients (126). Another retrospective study by Lyrer et al. in 196 patients found that impaired kidney function is an independent predictor of poor outcome 3 months after intravenous thrombolysis (127). The study from Ovbiagele et al. in 44 410 patients, 34% of the patients treated by intravenous thrombolysis displayed CKD, the presence of CKD was not associated with risk-adjusted post-thrombolysis intra-cerebral haemorrhage (ICH) or severe systemic haemorrhage but was associated with worsened hospital mortality and unfavourable functional outcome (128). A large registry from the National Inpatient Sample in United States found that CKD is associated with an increased in post-stroke mortality and disability but these associations were independent from intravenous thrombolysis (129). A recent meta-analysis of 20 studies including 60 486 patients with an intravenous thrombolysis after ischemic stroke concluded that CKD was associated with a 40% increase in the risk of ICH, a 20% increase in mortality and a poorer functional neurological outcome at 3 months (130). There is no data nor recommendation specific for the post-thrombolysis management in ESKD patients. A survey of 122 nephrologists in the United Kingdom showed that 75% of the clinicians want to be involved in the decision of thrombolysis in ESKD patients, given the risk of ICH, and 76% would modify the dialysis prescription (avoiding heparins, limiting blood pump speeds, duration of dialysis and ultrafiltration rates) (29).

More recently, mechanical thrombectomy, allowing the reperfusion of the occluded artery, showed an improvement in the patients' prognosis after an ischemic stroke in the MR CLEAN, EXTEND-IA and SWIFT PRIME studies (131–133). Mechanical thrombectomy can be performed up to 24 hours after the first symptoms in expert interventional neuroradiology centers (134). To date, only five studies specifically focused on the impact of CKD on outcome after mechanical thrombectomy, their results were discordant (Table 1). None of these studies found an association between CKD and ICH. The study of Sutherland et al. found a negative impact of CKD on cerebral functional independence (defined as a modified Rankin Score < 3) after thrombectomy (135), while the studies of Laible et al. and Fandler-Höfler et al. did not (136,137). Three of these studies found a negative impact of CKD on mortality (135,136,138). Furthermore, the study of Fandler-Höfler et al. found an independent association of AKI during hospital stay and unfavourable outcome (135). The study of Diprose et al. found that contrast-induced AKI is a rare event but associated with an increased mortality in patients after stroke thrombectomy (139).

Study	Design	CKD & AKI rate in study population	Impact of CKD on			Impact of AKI
			ICH	Functional independence	3-month mortality	
<i>Laible M et al., 2017</i> (136)	Monocentric Prospective registry, 505 patients	CKD: 20.2%	No association (P=0.43)	No association (P=0.072)	Increased (OR 1.12; p=0.038)	-
<i>Diprose WK et al., 2019</i> (139)	Monocentric Prospective registry, 333 patients Focused on CA-AKI	CKD: 27.7% CA-AKI: 3.3%	-	-	-	Increased mortality (OR 4.68; P=0.04)
<i>Fandler-Höfler S et al., 2020</i> (137)	Monocentric Prospective registry, 465 patients	CKD: 31.8% AKI: 18.3%	No association (P>0.10)	No association (P=0.96)	-	Associated with unfavourable outcome (OR 3.03; p<0.001)
<i>Sutherland LJ et al., 2020</i> (135)	Monocentric Prospective registry, 378 patients	CKD: 31.0%	No association (P=0.77)	Decreased (OR 0.54; P=0.01)	Increased (OR 2.19; P=0.02)	-
<i>Osman M et al., 2021</i> (138)	Multicentric, Retrospective registry, 22 193 patients	CKD: 14.9%	No association (P=0.49)	Decreased (P<0.01)	Increased (OR 1.55; P<0.01)	-

Table 1: Summary of specific studies on impact of CKD and AKI after stroke thrombectomy

AKI: Acute Kidney Injury, CA-AKI: contrast-associated AKI, CKD: Chronic Kidney Disease, ICH: Intra-cerebral hemorrhage

Moreover, in a large retrospective study, mechanical thrombectomy can be complicated by the onset of AKI in 15.6% of cases, which was once again associated with poor outcome (140).

Conclusions

Traditional risk factors, although highly prevalent, insufficiently explain the high risk of stroke in CKD patients and its severity. CKD patients have less access to revascularisation techniques despite their worst prognosis. Even if CKD patients could benefit from specific treatments like thrombolysis and/or thrombectomy, their prognostic remain poorer than in patients with normal kidney function. Among the non-traditional risk factors of stroke, uremic toxins accumulation can lead to chronic cerebrovascular disease predisposing to stroke in CKD, notably by increasing the blood-brain barrier permeability and can impair coagulation and thrombosis mechanisms. Facing contradictories data in the literature and the absence of recommendations for stroke patients with kidney impairment, both preclinical and clinical studies are needed to specifically assess the impact of these non-traditional risk factors on the stroke incidence and outcomes, aiming to optimize and to identify potential therapeutic targets. AKI also appears as an important risk factor of complications and poor outcome after a stroke.

References

1. Kovesdy CP. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney Int Suppl.* 2022 Apr;12(1):7–11.
2. Tonelli M, Muntner P, Lloyd A, Manns BJ, Klarenbach S, Pannu N, et al. Risk of coronary events in people with chronic kidney disease compared with those with diabetes: a population-level cohort study. *Lancet Lond Engl.* 2012 Sep 1;380(9844):807–14.
3. Matsushita K, Ballew SH, Wang AYM, Kalyesubula R, Schaeffner E, Agarwal R. Epidemiology and risk of cardiovascular disease in populations with chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2022 Nov;18(11):696–707.
4. Mahmoodi BK, Gansevoort RT, Veeger NJGM, Matthews AG, Navis G, Hillege HL, et al. Microalbuminuria and risk of venous thromboembolism. *JAMA.* 2009 May 6;301(17):1790–7.
5. Massicotte-Azarniouch D, Bader Eddeen A, LazoLanger A, Molnar AO, Lam NN, McCallum MK, et al. Risk of Venous Thromboembolism in Patients by Albuminuria and Estimated GFR. *Am J Kidney Dis.* 2017 Dec;70(6):826–33.
6. Pedrinelli R. Microalbuminuria and endothelial dysfunction in essential hypertension. *The Lancet.* 1994 Jul;344(8914):14–8.
7. Stehouwer CDA, Smulders YM. Microalbuminuria and Risk for Cardiovascular Disease: Analysis of Potential Mechanisms. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Aug;17(8):2106–11.
8. Holzmann MJ, Aastveit A, Hammar N, Jungner I, Walldius G, Holme I. Renal dysfunction increases the risk of ischemic and hemorrhagic stroke in the general population. *Ann Med.* 2012 Sep;44(6):607–15.
9. Toyoda K, Ninomiya T. Stroke and cerebrovascular diseases in patients with chronic kidney disease. *Lancet Neurol.* 2014 Aug;13(8):823–33.
10. Zorrilla-Vaca A, Ziai W, Connolly ES, Geocadin R, Thompson R, Rivera-Lara L. Acute Kidney Injury Following Acute Ischemic Stroke and Intracerebral Hemorrhage: A Meta-Analysis of Prevalence Rate and Mortality Risk. *Cerebrovasc Dis Basel Switz.* 2018;45(1–2):1–9.
11. Seliger SL, Gillen DL, Longstreth WT, Kestenbaum B, Stehman-Breen CO. Elevated risk of stroke among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2003 Aug;64(2):603–9.
12. Ruilope LM, Zanchetti A, Julius S, McInnes GT, Segura J, Stolt P, et al. Prediction of cardiovascular outcome by estimated glomerular filtration rate and estimated creatinine clearance in the high-risk hypertension population of the VALUE trial. *J Hypertens.* 2007 Jul;25(7):1473–9.
13. Tonelli M, Jose P, Curhan G, Sacks F, Braunwald E, Pfeffer M. Proteinuria, impaired kidney function, and adverse outcomes in people with coronary disease: analysis of a previously conducted randomised trial. *BMJ.* 2006 Jun 17;332(7555):1426.
14. Ford I, Bezlyak V, Stott DJ, Sattar N, Packard CJ, Perry I, et al. Reduced glomerular filtration rate and its association with clinical outcome in older patients at risk of vascular events: secondary analysis. *PLoS Med.* 2009 Jan 20;6(1):e16.
15. Nakayama M, Metoki H, Terawaki H, Ohkubo T, Kikuya M, Sato T, et al. Kidney dysfunction as a risk factor for first symptomatic stroke events in a general Japanese population--the Ohasama study. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2007 Jul;22(7):1910–5.
16. Lee M, Saver JL, Chang KH, Liao HW, Chang SC, Ovbiagele B. Low glomerular filtration rate and risk of stroke: meta-analysis. *BMJ.* 2010 Sep 30;341:c4249.
17. MacWalter RS, Wong SYS, Wong KYK, Stewart G, Fraser CG, Fraser HW, et al. Does renal dysfunction predict mortality after acute stroke? A 7-year follow-up study. *Stroke.* 2002 Jun;33(6):1630–5.

18. Cherng YG, Lin CS, Shih CC, Hsu YH, Yeh CC, Hu CJ, et al. Stroke risk and outcomes in patients with chronic kidney disease or end-stage renal disease: Two nationwide studies. *PloS One*. 2018;13(1):e0191155.
19. Tonelli M, Karumanchi SA, Thadhani R. Epidemiology and Mechanisms of Uremia-Related Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2016 Feb 2;133(5):518–36.
20. Tollitt J, Allan SM, Chinnadurai R, Odudu A, Hoadley M, Smith C, et al. Does previous stroke modify the relationship between inflammatory biomarkers and clinical endpoints in CKD patients? *BMC Nephrol*. 2022 Dec;23(1):38.
21. Krishna PR, Naresh S, Krishna GSR, Lakshmi AY, Vengamma B, Kumar VS. Stroke in chronic kidney disease. *Indian J Nephrol*. 2009 Jan;19(1):5–7.
22. Wannamethee SG, Shaper AG, Perry IJ. Serum Creatinine Concentration and Risk of Cardiovascular Disease: A Possible Marker for Increased Risk of Stroke. *Stroke*. 1997 Mar;28(3):557–63.
23. Koren-Morag N, Goldbourt U, Tanne D. Renal dysfunction and risk of ischemic stroke or TIA in patients with cardiovascular disease. *Neurology*. 2006 Jul 25;67(2):224–8.
24. Arnson Y, Hoshen M, Berliner-Sendrey A, Reges O, Balicer R, Leibowitz M, et al. Risk of Stroke, Bleeding, and Death in Patients with Nonvalvular Atrial Fibrillation and Chronic Kidney Disease. *Cardiology*. 2020;145(3):178–86.
25. Masson P, Webster AC, Hong M, Turner R, Lindley RI, Craig JC. Chronic kidney disease and the risk of stroke: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2015 Jul;30(7):1162–9.
26. Shimizu Y, Maeda K, Imano H, Ohira T, Kitamura A, Kiyama M, et al. Chronic kidney disease and drinking status in relation to risks of stroke and its subtypes: the Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS). *Stroke*. 2011 Sep;42(9):2531–7.
27. Wetmore JB, Phadnis MA, Ellerbeck EF, Shireman TI, Rigler SK, Mahnken JD. Relationship between stroke and mortality in dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2015 Jan 7;10(1):80–9.
28. Koton S, Schneider ALC, Rosamond WD, Shahar E, Sang Y, Gottesman RF, et al. Stroke Incidence and Mortality Trends in US Communities, 1987 to 2011. *JAMA*. 2014 Jul 16;312(3):259.
29. Power A, Fogarty D, Wheeler DC. Acute Stroke Thrombolysis in End-Stage Renal Disease: A National Survey of Nephrologist Opinion. *Nephron Clin Pract*. 2013 Dec 12;124(3–4):167–72.
30. Sozio SM, Armstrong PA, Coresh J, Jaar BG, Fink NE, Plantinga LC, et al. Cerebrovascular Disease Incidence, Characteristics, and Outcomes in Patients Initiating Dialysis: The Choices for Healthy Outcomes in Caring for ESRD (CHOICE) Study. *Am J Kidney Dis*. 2009 Sep;54(3):468–77.
31. Aronow WS. Acute and chronic management of atrial fibrillation in patients with late-stage CKD. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2009 Apr;53(4):701–10.
32. Randhawa MS, Vishwanath R, Rai MP, Wang L, Randhawa AK, Abela G, et al. Association Between Use of Warfarin for Atrial Fibrillation and Outcomes Among Patients With End-Stage Renal Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2020 Apr 6;3(4):e202175.
33. Kumai Y, Kamouchi M, Hata J, Ago T, Kitayama J, Nakane H, et al. Proteinuria and clinical outcomes after ischemic stroke. *Neurology*. 2012 Jun 12;78(24):1909–15.
34. Yokota C, Minematsu K, Ito A, Toyoda K, Nagasawa H, Yamaguchi T. Albuminuria, but not metabolic syndrome, is a significant predictor of stroke recurrence in ischemic stroke. *J Neurol Sci*. 2009 Feb 15;277(1–2):50–3.
35. Li Z, Wang A, Cai J, Gao X, Zhou Y, Luo Y, et al. Impact of proteinuria and glomerular filtration rate on risk of ischaemic and intracerebral hemorrhagic stroke: a result from the Kailuan study. *Eur J Neurol*. 2015 Feb;22(2):355–60.

36. Rodríguez-Yáñez M, Castellanos M, Blanco M, Millán M, Nombela F, Sobrino T, et al. Micro- and macroalbuminuria predict hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Neurology*. 2006 Oct 10;67(7):1172–7.
37. Kelly DM, Pendlebury ST, Rothwell PM. Associations of Chronic Kidney Disease With Dementia Before and After TIA and Stroke: Population-Based Cohort Study. *Neurology*. 2022 Feb 15;98(7):e711–20.
38. Zhao LM, Huang JN, Qiu M, Ding LL, Zhan ZL, Ning J. Gliflozins for the prevention of stroke in diabetes and cardiorenal diseases: A meta-analysis of cardiovascular outcome trials. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Oct 1;100(39):e27362.
39. Zhou Z, Jardine MJ, Li Q, Neuen BL, Cannon CP, de Zeeuw D, et al. Effect of SGLT2 Inhibitors on Stroke and Atrial Fibrillation in Diabetic Kidney Disease: Results From the CREDENCE Trial and Meta-Analysis. *Stroke*. 2021 May;52(5):1545–56.
40. McMurray JJV, Wheeler DC, Stefánsson BV, Jongs N, Postmus D, Correa-Rotter R, et al. Effects of Dapagliflozin in Patients With Kidney Disease, With and Without Heart Failure. *JACC Heart Fail*. 2021 Nov;9(11):807–20.
41. Halimi JM. Les inhibiteurs du SGLT2 : une nouvelle ère pour nos patients. *Néphrologie Thérapeutique*. 2021 Jun;17(3):143–8.
42. Salah HM, Al'Aref SJ, Khan MS, Al-Hawwas M, Vallurupalli S, Mehta JL, et al. Effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors on cardiovascular and kidney outcomes-Systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Am Heart J*. 2021 Feb;232:10–22.
43. Kupferman JC, Matheson MB, Lande MB, Flynn JT, Furth S, Warady BA, et al. Increased history of ischemic stroke and decreased neurocognitive performance in children with chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2020 Jul;35(7):1315–21.
44. Ovbiagele B, Schwamm LH, Smith EE, Grau-Sepulveda MV, Saver JL, Bhatt DL, et al. Hospitalized hemorrhagic stroke patients with renal insufficiency: clinical characteristics, care patterns, and outcomes. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc*. 2014 Oct;23(9):2265–73.
45. Molshatzki N, Orion D, Tsabari R, Schwammenthal Y, Merzeliak O, Toashi M, et al. Chronic kidney disease in patients with acute intracerebral hemorrhage: association with large hematoma volume and poor outcome. *Cerebrovasc Dis Basel Switz*. 2011;31(3):271–7.
46. Flaherty ML, Kissela B, Khoury JC, Alwell K, Moomaw CJ, Woo D, et al. Carotid Artery Stenosis as a Cause of Stroke. *Neuroepidemiology*. 2013;40(1):36–41.
47. Arboix A, Alió J. Cardioembolic stroke: clinical features, specific cardiac disorders and prognosis. *Curr Cardiol Rev*. 2010 Aug;6(3):150–61.
48. Zanolli L, Mikhailidis DP. Narrative Review of Carotid disease and the kidney. *Ann Transl Med*. 2021 Jul;9(14):1210.
49. Ohara T, Kokubo Y, Toyoda K, Watanabe M, Koga M, Nakamura S, et al. Impact of chronic kidney disease on carotid atherosclerosis according to blood pressure category: the Suita study. *Stroke*. 2013 Dec;44(12):3537–9.
50. Song X, Li J, Hua Y, Wang C, Liu B, Liu C, et al. Chronic Kidney Disease is Associated with Intracranial Artery Stenosis Distribution in the Middle-Aged and Elderly Population. *J Atheroscler Thromb*. 2020 Mar 1;27(3):245–54.
51. Kong X, Jia X, Wei Y, Cui M, Wang Z, Tang L, et al. Association between microalbuminuria and subclinical atherosclerosis evaluated by carotid artery intima-media in elderly patients with normal renal function. *BMC Nephrol*. 2012 Jun 11;13:37.
52. Fathi R, Isbel N, Short L, Haluska B, Johnson D, Marwick TH. The effect of long-term aggressive lipid lowering on ischemic and atherosclerotic burden in patients with chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2004 Jan;43(1):45–52.

53. AbuRahma AF, Srivastava M, Chong B, Dean LS, Stone PA, Koszewski A. Impact of chronic renal insufficiency using serum creatinine vs glomerular filtration rate on perioperative clinical outcomes of carotid endarterectomy. *J Am Coll Surg.* 2013 Apr;216(4):525–32; discussion 532-533.
54. Avgerinos ED, Go C, Ling J, Makaroun MS, Chaer RA. Survival and long-term cardiovascular outcomes after carotid endarterectomy in patients with chronic renal insufficiency. *Ann Vasc Surg.* 2015 Jan;29(1):15–21.
55. Klarin D, Lancaster RT, Ergul E, Bertges D, Goodney P, Schermerhorn ML, et al. Perioperative and long-term impact of chronic kidney disease on carotid artery interventions. *J Vasc Surg.* 2016 Nov;64(5):1295–302.
56. Adil MM, Saeed F, Chaudhary SA, Malik A, Qureshi AI. Comparative Outcomes of Carotid Artery Stent Placement and Carotid Endarterectomy in Patients with Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc.* 2016 Jul;25(7):1721–7.
57. Miwa K, Koga M, Nakai M, Yoshimura S, Sasahara Y, Koge J, et al. Etiology and Outcome of Ischemic Stroke in Patients With Renal Impairment Including Chronic Kidney Disease: Japan Stroke Data Bank. *Neurology.* 2022 Apr 26;98(17):e1738–47.
58. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke.* 1991 Aug;22(8):983–8.
59. Pan Y, Jing J, Chen W, Wang Y, He Y. Association between impaired renal function and stroke outcome in patients with versus without atrial fibrillation. *Eur J Neurol.* 2018 Aug;25(8):1041–8.
60. Wang D, Liu M, Hao Z, Tao W. Association between reduced kidney function and clinical outcomes after ischaemic stroke with atrial fibrillation. *Eur J Neurol.* 2014;21(1):160–6.
61. Olesen JB, Lip GYH, Kamper AL, Hommel K, Køber L, Lane DA, et al. Stroke and bleeding in atrial fibrillation with chronic kidney disease. *N Engl J Med.* 2012 Aug 16;367(7):625–35.
62. Kumar S, de Lusignan S, McGovern A, Correa A, Hriskova M, Gatenby P, et al. Ischaemic stroke, haemorrhage, and mortality in older patients with chronic kidney disease newly started on anticoagulation for atrial fibrillation: a population based study from UK primary care. *BMJ.* 2018 14;360:k342.
63. Su X, Yan B, Wang L, Lv J, Cheng H, Chen Y. Oral Anticoagulant Agents in Patients With Atrial Fibrillation and CKD: A Systematic Review and Pairwise Network Meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2021 Nov;78(5):678-689.e1.
64. Pokorney SD, Black-Maier E, Hellkamp AS, Friedman DJ, Vemulapalli S, Granger CB, et al. Oral Anticoagulation and Cardiovascular Outcomes in Patients With Atrial Fibrillation and End-Stage Renal Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2020 Mar 24;75(11):1299–308.
65. Lefèvre S, Audrézet MP, Halimi JM, Longuet H, Bridoux F, Ecotièrre L, et al. Diagnosis and risk factors for intracranial aneurysms in autosomal polycystic kidney disease: a cross-sectional study from the Genkyst cohort. *Nephrol Dial Transplant.* 2022 Oct 19;37(11):2223–33.
66. Horowitz B, Miskulin D, Zager P. Epidemiology of hypertension in CKD. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2015 Mar;22(2):88–95.
67. Koye DN, Magliano DJ, Nelson RG, Pavkov ME. The Global Epidemiology of Diabetes and Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2018 Mar;25(2):121–32.
68. Gondouin B, Cerini C, Dou L, Sallée M, Duval-Sabatier A, Pletinck A, et al. Indolic uremic solutes increase tissue factor production in endothelial cells by the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Kidney Int.* 2013 Oct;84(4):733–44.
69. Kaw D, Malhotra D. Platelet dysfunction and end-stage renal disease. *Semin Dial.* 2006 Aug;19(4):317–22.
70. Liabeuf S, Pepin M, Franssen CFM, Viggiano D, Carriazo S, Gansevoort RT, et al. Chronic kidney disease and neurological disorders: are uraemic toxins the missing piece of the puzzle? *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2021 Dec 28;37(Suppl 2):ii33–44.

71. Assem M, Lando M, Grissi M, Kamel S, Massy ZA, Chillon JM, et al. The Impact of Uremic Toxins on Cerebrovascular and Cognitive Disorders. *Toxins*. 2018 Jul 22;10(7).
72. Watanabe K, Watanabe T, Nakayama M. Cerebro-renal interactions: impact of uremic toxins on cognitive function. *Neurotoxicology*. 2014 Sep;44:184–93.
73. Adesso S, Magnus T, Cuzzocrea S, Campolo M, Rissiek B, Paciello O, et al. Indoxyl Sulfate Affects Glial Function Increasing Oxidative Stress and Neuroinflammation in Chronic Kidney Disease: Interaction between Astrocytes and Microglia. *Front Pharmacol*. 2017;8:370.
74. Adesso S, Paterniti I, Cuzzocrea S, Fujioka M, Autore G, Magnus T, et al. AST-120 Reduces Neuroinflammation Induced by Indoxyl Sulfate in Glial Cells. *J Clin Med*. 2018 Oct 17;7(10).
75. Watanabe K, Sato E, Mishima E, Watanabe M, Abe T, Takahashi N, et al. Effect of uremic toxins on hippocampal cell damage: analysis in vitro and in rat model of chronic kidney disease. *Heliyon*. 2021 Feb;7(2):e06221.
76. Lano G, Burtey S, Sallée M. Indoxyl Sulfate, a Uremic Endotheliotoxin. *Toxins*. 2020 Apr 5;12(4):E229.
77. Sallée M, Dou L, Cerini C, Poitevin S, Brunet P, Burtey S. The aryl hydrocarbon receptor-activating effect of uremic toxins from tryptophan metabolism: a new concept to understand cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Toxins*. 2014 Mar 4;6(3):934–49.
78. Stinghen AEM, Pecoits-Filho R. Vascular damage in kidney disease: beyond hypertension. *Int J Hypertens*. 2011;2011:232683.
79. Lano G, Laforêt M, Von Kotze C, Perrin J, Addi T, Brunet P, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation and Tissue Factor Induction by Fluid Shear Stress and Indoxyl Sulfate in Endothelial Cells. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 31;21(7):E2392.
80. Tumor Z, Shimizu H, Enomoto A, Miyazaki H, Niwa T. Indoxyl Sulfate Upregulates Expression of ICAM-1 and MCP-1 by Oxidative Stress-Induced NF- κ B Activation. *Am J Nephrol*. 2010;31(5):435–41.
81. Juricek L, Coumoul X. The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Nervous System. *Int J Mol Sci*. 2018 Aug 24;19(9):E2504.
82. Dauchy S, Duthiel F, Weaver RJ, Chassoux F, Daumas-Duport C, Couraud PO, et al. ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *J Neurochem*. 2008 Dec;107(6):1518–28.
83. Ojo ES, Tischkau SA. The Role of AhR in the Hallmarks of Brain Aging: Friend and Foe. *Cells*. 2021 Oct 13;10(10):2729.
84. Cuartero MI, Ballesteros I, de la Parra J, Harkin AL, Abautret-Daly A, Sherwin E, et al. L-kynurenine/aryl hydrocarbon receptor pathway mediates brain damage after experimental stroke. *Circulation*. 2014 Dec 2;130(23):2040–51.
85. Sato E, Tanaka A, Oyama JI, Yamasaki A, Shimomura M, Hiwatashi A, et al. Long-term effects of AST-120 on the progression and prognosis of pre-dialysis chronic kidney disease: a 5-year retrospective study. *Heart Vessels*. 2016 Oct;31(10):1625–32.
86. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018 Mar;14(3):133–50.
87. Nation DA, Sweeney MD, Montagne A, Sagare AP, D’Orazio LM, Pachicano M, et al. Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nat Med*. 2019 Feb;25(2):270–6.
88. Katsi V, Marketou M, Maragkoudakis S, Didagelos M, Charalambous G, Parthenakis F, et al. Blood–brain barrier dysfunction: the undervalued frontier of hypertension. *J Hum Hypertens*. 2020 Oct;34(10):682–91.
89. Hoffman WH, Stamatovic SM, Andjelkovic AV. Inflammatory mediators and blood brain barrier disruption in fatal brain edema of diabetic ketoacidosis. *Brain Res*. 2009 Feb 13;1254:138–48.

90. Mazumder MK, Giri A, Kumar S, Borah A. A highly reproducible mice model of chronic kidney disease: Evidences of behavioural abnormalities and blood-brain barrier disruption. *Life Sci.* 2016 Sep 15;161:27–36.
91. Bobot M, Thomas L, Moyon A, Fernandez S, McKay N, Balasse L, et al. Uremic Toxic Blood-Brain Barrier Disruption Mediated by AhR Activation Leads to Cognitive Impairment during Experimental Renal Dysfunction. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2020 Jun 11;
92. Yang C, Hawkins KE, Doré S, Candelario-Jalil E. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019 Feb 1;316(2):C135–53.
93. Garrigue P, Giacomino L, Bucci C, Muzio V, Filannino MA, Sabatier F, et al. Single photon emission computed tomography imaging of cerebral blood flow, blood-brain barrier disruption, and apoptosis time course after focal cerebral ischemia in rats. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc.* 2016 Jan;11(1):117–26.
94. Garrigue P, Hache G, Bennis Y, Brige P, Stalin J, Pellegrini L, et al. Erythropoietin Pretreatment of Transplanted Endothelial Colony-Forming Cells Enhances Recovery in a Cerebral Ischemia Model by Increasing Their Homing Ability: A SPECT/CT Study. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2016 Nov;57(11):1798–804.
95. Anrather J, Iadecola C. Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurother J Am Soc Exp Neurother.* 2016 Oct;13(4):661–70.
96. Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci.* 2015 May;16(5):249–63.
97. Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2015;39(1–3):84–92.
98. Miranda AS, Cordeiro TM, dos Santos Lacerda Soares TM, Ferreira RN, Simões e Silva AC. Kidney–brain axis inflammatory cross-talk: from bench to bedside. *Clin Sci.* 2017 Jun 1;131(11):1093–105.
99. Shima H, Ishimura E, Naganuma T, Yamazaki T, Kobayashi I, Shidara K, et al. Cerebral microbleeds in predialysis patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2010 May;25(5):1554–9.
100. Shima H, Ishimura E, Naganuma T, Ichii M, Yamasaki T, Mori K, et al. Decreased kidney function is a significant factor associated with silent cerebral infarction and periventricular hyperintensities. *Kidney Blood Press Res.* 2011;34(6):430–8.
101. Kobayashi M, Hirawa N, Morita S, Yatsu K, Kobayashi Y, Yamamoto Y, et al. Silent brain infarction and rapid decline of kidney function in patients with CKD: a prospective cohort study. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2010 Sep;56(3):468–76.
102. Ovbiagele B, Wing JJ, Menon RS, Burgess RE, Gibbons MC, Sobotka I, et al. Association of Chronic Kidney Disease With Cerebral Microbleeds in Patients With Primary Intracerebral Hemorrhage. *Stroke.* 2013 Sep;44(9):2409–13.
103. Lau WL, Nunes ACF, Vasilevko V, Floriolli D, Lertpanit L, Savoj J, et al. Chronic Kidney Disease Increases Cerebral Microbleeds in Mouse and Man. *Transl Stroke Res.* 2019 May 4;
104. Sprick JD, Nocera JR, Hajjar I, O’Neill WC, Bailey J, Park J. Cerebral blood flow regulation in end-stage kidney disease. *Am J Physiol-Ren Physiol.* 2020 Nov 1;319(5):F782–91.
105. Polinder-Bos HA, García DV, Kuipers J, Elting JWJ, Aries MJH, Krijnen WP, et al. Hemodialysis Induces an Acute Decline in Cerebral Blood Flow in Elderly Patients. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2018 Apr;29(4):1317–25.
106. KDIGO. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Summary of Recommendation Statements. *Kidney Int Suppl.* 2013 Jan;3(1):5–14.

107. Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW. Acute Kidney Injury, Mortality, Length of Stay, and Costs in Hospitalized Patients. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Nov;16(11):3365–70.
108. Wang HE, Muntner P, Chertow GM, Warnock DG. Acute kidney injury and mortality in hospitalized patients. *Am J Nephrol*. 2012;35(4):349–55.
109. Huang Y, Wan C, Wu G. Acute kidney injury after a stroke: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Brain Behav*. 2020 Sep;10(9):e01722.
110. Grosjean F, Tonani M, Maccarrone R, Cerra C, Spaltini F, De Silvestri A, et al. Under-recognized post-stroke acute kidney injury: risk factors and relevance for stroke outcome of a frequent comorbidity. *Int Urol Nephrol*. 2019 Sep;51(9):1597–604.
111. Shimoyama T, Sato T, Sakamoto Y, Nagai K, Aoki J, Suda S, et al. Urinary biomarkers of kidney tubule injury, risk of acute kidney injury, and mortality in patients with acute ischaemic stroke treated at a stroke care unit. *Eur J Neurol*. 2020 Dec;27(12):2463–72.
112. Collister D, Pannu N, Ye F, James M, Hemmelgarn B, Chui B, et al. Health Care Costs Associated with AKI. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017 Nov 7;12(11):1733–43.
113. Hoste EAJ, Bagshaw SM, Bellomo R, Cely CM, Colman R, Cruz DN, et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med*. 2015 Aug;41(8):1411–23.
114. Siew ED, Fissell WH, Tripp CM, Blume JD, Wilson MD, Clark AJ, et al. Acute Kidney Injury as a Risk Factor for Delirium and Coma during Critical Illness. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Jun 15;195(12):1597–607.
115. Hoke TS, Douglas IS, Klein CL, He Z, Fang W, Thurman JM, et al. Acute renal failure after bilateral nephrectomy is associated with cytokine-mediated pulmonary injury. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2007 Jan;18(1):155–64.
116. Liu M, Liang Y, Chigurupati S, Lathia JD, Pletnikov M, Sun Z, et al. Acute kidney injury leads to inflammation and functional changes in the brain. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2008 Jul;19(7):1360–70.
117. Caillard P, Bennis Y, Six I, Bodeau S, Kamel S, Choukroun G, et al. The Role of Gut-Derived, Protein-Bound Uremic Toxins in the Cardiovascular Complications of Acute Kidney Injury. *Toxins*. 2022 May 11;14(5):336.
118. André C, Bennis Y, Titeca-Beauport D, Caillard P, Cluet Y, Kamel S, et al. Two rapid, accurate liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the quantification of seven uremic toxins: An application for describing their accumulation kinetic profile in a context of acute kidney injury. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2020 Sep 1;1152:122234.
119. Iwata K, Watanabe H, Morisaki T, Matsuzaki T, Ohmura T, Hamada A, et al. Involvement of indoxyl sulfate in renal and central nervous system toxicities during cisplatin-induced acute renal failure. *Pharm Res*. 2007 Apr;24(4):662–71.
120. Wang W, Hao G, Pan Y, Ma S, Yang T, Shi P, et al. Serum indoxyl sulfate is associated with mortality in hospital-acquired acute kidney injury: a prospective cohort study. *BMC Nephrol*. 2019 Dec;20(1):57.
121. Hénaut L, Grissi M, Brazier F, Assem M, Poirot-Leclercq S, Lenglet G, et al. Cellular and molecular mechanisms associated with ischemic stroke severity in female mice with chronic kidney disease. *Sci Rep*. 2019 Apr 23;9(1):6432.
122. Grissi M, Boudot C, Assem M, Candellier A, Lando M, Poirot-Leclercq S, et al. Metformin prevents stroke damage in non-diabetic female mice with chronic kidney disease. *Sci Rep*. 2021 Apr 2;11(1):7464.
123. Mima Y, Kuwashiro T, Yasaka M, Tsurusaki Y, Nakamura A, Wakugawa Y, et al. Impact of Metformin on the Severity and Outcomes of Acute Ischemic Stroke in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc*. 2016 Feb;25(2):436–46.

124. Yates RB, Sheng H, Sakai H, Kleven DT, DeSimone NA, Stafford-Smith M, et al. Lack of evidence for a remote effect of renal ischemia/reperfusion acute kidney injury on outcome from temporary focal cerebral ischemia in the rat. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2013 Feb;27(1):71–8.
125. Saber H, Khatibi K, Szeder V, Tateshima S, Colby GP, Nour M, et al. Reperfusion Therapy Frequency and Outcomes in Mild Ischemic Stroke in the United States. *Stroke*. 2020 Nov;51(11):3241–9.
126. Agrawal V, Rai B, Fellows J, McCullough PA. In-hospital outcomes with thrombolytic therapy in patients with renal dysfunction presenting with acute ischaemic stroke. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2010 Apr;25(4):1150–7.
127. Lyrer PA, Fluri F, Gisler D, Papa S, Hatz F, Engelter ST. Renal function and outcome among stroke patients treated with IV thrombolysis. *Neurology*. 2008 Nov 4;71(19):1548–50.
128. Ovbiagele B, Smith EE, Schwamm LH, Grau-Sepulveda MV, Saver JL, Bhatt DL, et al. Chronic kidney disease and bleeding complications after intravenous thrombolytic therapy for acute ischemic stroke. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2014 Nov;7(6):929–35.
129. Pana TA, Quinn J, Mohamed MO, Mamas MA, Myint PK. Thrombolysis in acute ischaemic stroke patients with chronic kidney disease. *Acta Neurol Scand*. 2021 Dec;144(6):669–79.
130. Malhotra K, Katsanos AH, Goyal N, Tayal A, Gensicke H, Mitsias PD, et al. Intravenous thrombolysis in patients with chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurology*. 2020 Jul 14;95(2):e121–30.
131. Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI, Pereira VM, et al. Stent-Retriever Thrombectomy after Intravenous t-PA vs. t-PA Alone in Stroke. *N Engl J Med*. 2015 Jun 11;372(24):2285–95.
132. Campbell BCV, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, et al. Endovascular Therapy for Ischemic Stroke with Perfusion-Imaging Selection. *N Engl J Med*. 2015 Mar 12;372(11):1009–18.
133. Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, et al. A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*. 2015 Jan 1;372(1):11–20.
134. Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, Bonafe A, Budzik RF, Bhuva P, et al. Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N Engl J Med*. 2018 Jan 4;378(1):11–21.
135. Sutherland LJ, Diprose WK, Wang MTM, Barber PA. Chronic Kidney Disease and Outcome Following Endovascular Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc*. 2020 Apr;29(4):104665.
136. Laible M, Möhlenbruch MA, Pfaff J, Jenetzky E, Ringleb PA, Bendszus M, et al. Influence of Renal Function on Treatment Results after Stroke Thrombectomy. *Cerebrovasc Dis*. 2017;44(5–6):351–8.
137. Fandler-Höfler S, Odler B, Kneihsl M, Wunsch G, Haidegger M, Poltrum B, et al. Acute and Chronic Kidney Dysfunction and Outcome After Stroke Thrombectomy. *Transl Stroke Res*. 2021 Oct;12(5):791–8.
138. Osman M, Sulaiman S, Alqahtani F, Harris AH, Hohmann SF, Alkhouli M. Association of Chronic Kidney Disease With In-Hospital Outcomes of Endovascular Stroke Interventions. *Cardiovasc Revascularization Med Mol Interv*. 2022 Jan;34:121–5.
139. Diprose WK, Sutherland LJ, Wang MTM, Barber PA. Contrast-Associated Acute Kidney Injury in Endovascular Thrombectomy Patients With and Without Baseline Renal Impairment. *Stroke*. 2019 Dec;50(12):3527–31.

140. Alqahtani F, Osman M, Harris AH, Hohmann SF, Alkhouli M. Mortality and functional outcomes of endovascular stroke therapy in the United States. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv.* 2021 Feb 15;97(3):470–4.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

Figure 1 was created with Biorender.com (2022). Adapted from “RiskFactorsofDementia” template. Retrieved from <https://app.biorender.com/biorender-templates>

Authors contribution

MB and GH performed the literature research.

MB made the figure and table.

MB wrote the initial draft of the manuscript.

All authors revised it critically and approved the final version of the manuscript.

Pour mieux comprendre la gravité des atteintes neurovasculaires au cours de la MRC et pour mieux appréhender les mécanismes impliqués, avec comme hypothèse principale la rupture de la BHE au cours des atteintes rénales en lien à l'accumulation des toxines urémiques, nous avons suivi le plan suivant :

1. Nous avons mis en place un modèle stable et reproductible de MRC chez le rat.
2. Nous avons évalué l'accumulation des toxines urémiques au sein de ce même modèle et son impact sur les atteintes neurocomportementales et la perméabilité de la BHE
3. Nous avons évalué les atteintes cérébrales et neurologiques au cours d'un modèle d'IRA chez la souris
4. Nous avons mis en place un modèle d'AVC chez le rat MRC et évalué l'impact de la MRC sur les atteintes neurologiques post-ischémiques.
5. Enfin, nous avons étudié dans une cohorte bicentrique l'impact des atteintes rénales aiguës et chroniques sur la taille et le pronostic chez les patients victimes d'AVC après thrombectomie mécanique (étude clinique RISOTTO).

Travaux originaux

1. Article 1 : Renal SPECT/CT with ^{99m}Tc -dimercaptosuccinic acid is a non-invasive predictive marker for the development of interstitial fibrosis in a rat model of renal insufficiency

Le préalable indispensable à notre travail était la mise en place d'un modèle de MRC suffisamment sévère pour permettre le développement d'insuffisance rénale chronique accompagnée d'accumulation de toxines urémiques.

1.1 Résultats principaux

L'insuffisance rénale était induite par un régime enrichi en adénine (ARD) à 0,25% et 0,5% pendant 28 jours. L'atteinte rénale était évaluée par dosages biochimiques et histologie rénale. L'atteinte parenchymateuse rénale était évaluée par imagerie isotopique SPECT/CT au ^{99m}Tc -DMSA à J0, J7, J14, J21, J28, J35, J49.

Par rapport aux animaux contrôles, les rats ARD ont développé une insuffisance rénale caractérisée par une augmentation de l'urée et de la créatinine sériques, une fibrose quantifiée par un marquage histologique au rouge sirius, et une atteinte tubulo-interstitielle rénale évaluée par analyse anatomopathologique sur coupe de rein, avec un effet dose-dépendant des concentrations d'adénine. La SPECT/CT au ^{99m}Tc -DMSA a montré une diminution significative de la fixation chez les rats ARD 0,25% et ARD 0,5% par rapport aux rats contrôles ($P=0,011$ et $P=0,0004$, respectivement). La fixation du ^{99m}Tc -DMSA à J28 était inversement corrélée à l'intensité du marquage par rouge sirius à J49, de façon significative ($r=0,89$, $P<0,0001$, $R^2=0,67$).

Au total, nous avons mis en place un modèle stable de MRC chez le rat s'accompagnant d'une atteinte rénale tubulo-interstitielle et fibrosante importante, garantissant la poursuite de nos travaux sur les atteintes cérébrales et neuro-vasculaires de la MRC.

La scintigraphie rénale au ^{99m}Tc -DMSA permet un suivi longitudinal de l'évolution des atteintes parenchymateuses et du risque de développement de fibrose, au cours de l'induction de la MRC par le régime enrichi en adénine chez le rat. Nous avons décrit que la réduction de la masse parenchymateuse rénale chez les rats ARD était inversement proportionnelle à la fibrose nouvellement formée dans le tissu rénal. Nos résultats suggèrent que la scintigraphie rénale au ^{99m}Tc -DMSA pourrait être un marqueur pronostic précoce et non-invasif du développement de la fibrose rénale chez le rat, et qui pourrait avoir son intérêt chez l'homme.

1.2 Publication

Bobot M, Hache G, Moyon A, Fernandez S, Balasse L, Daniel L, Garrigue P, Brige P, Chopinet S, Dignat-George F, Brunet P, Burtey S, Guillet B. Renal SPECT/CT with ^{99m}Tc - dimercaptosuccinic acid is a non-invasive predictive marker for the development of interstitial fibrosis in a rat model of renal insufficiency. Nephrol Dial Transplant. 2021 Apr 26;36(5):804-810 (2)

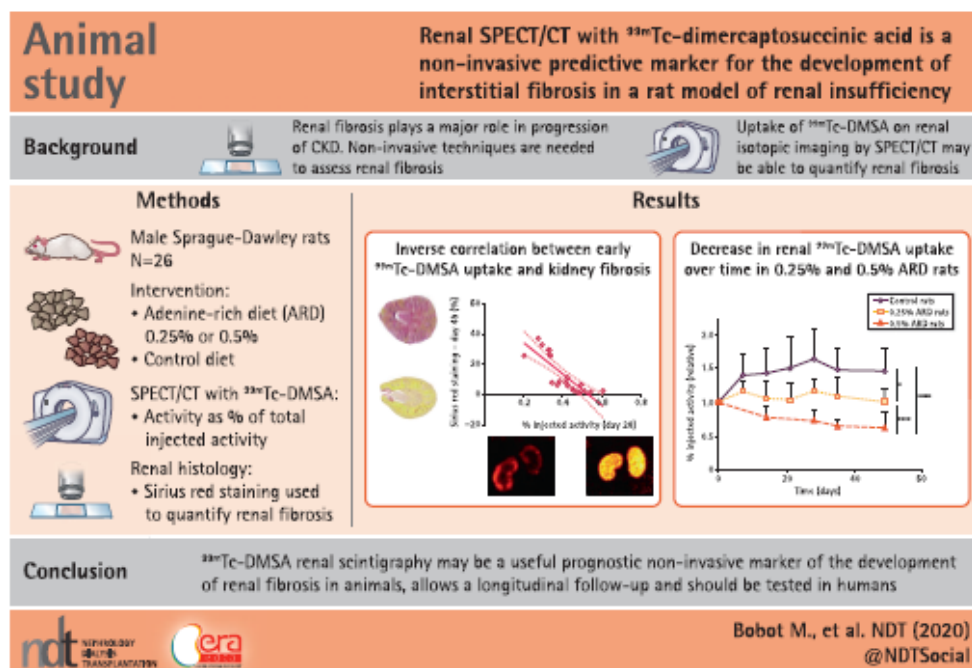
Renal SPECT/CT with ^{99m}Tc -dimercaptosuccinic acid is a non-invasive predictive marker for the development of interstitial fibrosis in a rat model of renal insufficiency

Mickaël Bobot^{1,2,3}, Guillaume Hache^{2,3,4}, Anaïs Moyon^{2,3,5}, Samantha Fernandez², Laure Balasse², Laurent Daniel^{3,6}, Philippe Garrigue^{2,3,5}, Pauline Brige^{2,7}, Sophie Chopinet^{2,7,8}, Françoise Dignat-George³, Philippe Brunet^{1,3}, Stéphane Burtey^{1,3} and Benjamin Guillet^{2,3,5}

¹Centre de Néphrologie et Transplantation Rénale, Hôpital de la Conception, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France, ²Centre Européen de Recherche en Imagerie Médicale, Aix-Marseille Université, Marseille, France ³C2VN, INSERM 1263, INRAE 1260, Aix-Marseille Université, Marseille, France, ⁴Pharmacie, Hôpital de la Timone, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France, ⁵Service de Radiopharmacie, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France, ⁶Laboratoire d'Anatomopathologie, Hôpital de la Timone, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France, ⁷Laboratoire d'Imagerie Interventionnelle Expérimentale, EA, 4264, Aix-Marseille Université, Marseille, France and ⁸Service de Chirurgie Digestive, Hôpital de la Timone, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

Correspondence to: Mickaël Bobot; E-mail: mickael.bobot@gmail.com

GRAPHICAL ABSTRACT



KEY LEARNING POINTS**What is already known about this subject?**

- Renal fibrosis plays a major role in the progression of chronic kidney disease (CKD) but, to date, histology remains the gold standard to assess fibrosis. Non-invasive techniques are needed for the assessment of renal parenchymal impairment and to perform longitudinal evaluation of renal structure in pre-clinical and clinical research. We evaluated renal isotopic imaging by single-photon emission computed tomography/computed tomography (SPECT/CT) with technetium-99m (^{99m}Tc)-dimercaptosuccinic acid (DMSA) to monitor renal impairment during CKD induced by an adenine-rich diet (ARD) in rats.

What this study adds?

- Our work reports that quantification of ^{99m}Tc -DMSA uptake assessed by SPECT/CT is inversely correlated to kidney fibrosis in ARD rats, allowing an early prediction of the development of fibrosis, while serum creatinine was not correlated with kidney fibrosis.

What impact this may have on practice or policy?

- SPECT/CT with ^{99m}Tc -DMSA allows a longitudinal follow-up of renal fibrosis in rats and could be a useful non-invasive predictive tool of the development of renal fibrosis in animals and patients.

ABSTRACT

Background. Chronic kidney disease (CKD) increases cardiovascular risk and mortality. Renal fibrosis plays a major role in the progression of CKD but, to date, histology remains the gold standard to assess fibrosis. Non-invasive techniques are needed to assess renal parenchymal impairment and to perform the longitudinal evaluation of renal structure. Thus we evaluated renal isotopic imaging by single-photon emission computed tomography/computed tomography (SPECT/CT) with technetium-99m (^{99m}Tc)-dimercaptosuccinic acid (DMSA) to monitor renal impairment during renal insufficiency in rats.

Methods. Renal insufficiency was induced by an adenine-rich diet (ARD) at 0.25 and 0.5% for 28 days. Renal dysfunction was evaluated by assaying biochemical markers and renal histology. Renal parenchymal impairment was assessed by SPECT/CT isotopic imaging with ^{99m}Tc -DMSA on Days 0, 7, 14, 21, 28, 35 and 49.

Results. Compared with controls, ARD rats developed renal dysfunction characterized by increased serum creatinine and blood urea nitrogen, fibrosis and tubulointerstitial damage in the kidneys, with a dose-dependent effect of the adenine concentration. ^{99m}Tc -DMSA SPECT-CT imaging showed a significant decrease in renal uptake over time in 0.25 and 0.5% ARD rats compared with control rats ($P = 0.011$ and $P = 0.0004$, respectively). ^{99m}Tc -DMSA uptake on Day 28 was significantly inversely correlated with Sirius red staining evaluated on Day 49 ($r = 0.89$, $P < 0.0001$, $R^2 = 0.67$).

Conclusions. ^{99m}Tc -DMSA renal scintigraphy allows a longitudinal follow-up of risk of renal fibrosis in rats. We found that the reduction of renal parenchyma in ARD rats is inversely proportional to newly formed fibrous tissue in the kidney. Our results suggest that ^{99m}Tc -DMSA renal scintigraphy may be a

useful non-invasive prognostic marker of the development of renal fibrosis in animals and should be tested in humans.

Keywords: adenine diet, chronic kidney disease, DMSA, rat model, renal fibrosis

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) increases cardiovascular risk and mortality and fibrosis is a tissue damage constantly observed in CKD. Kidney fibrosis results from maladaptive repair capacities after kidney damage [1] and plays a major role in the progression of CKD. The extent of fibrosis poorly correlates with renal dysfunction measured by glomerular filtration rate (GFR), especially due to hyperfiltration associated with the loss of nephron mass, which may underestimate the kidney injury [2]. However, early measurement of fibrosis has been reported as a predictor of disease progression [3]. It is thus crucial to evaluate early the extent of renal parenchymal damage. However, biopsies remain the only available means to specifically assess the extent of kidney fibrosis in clinical situations and post-mortem histology is the gold standard in pre-clinical research. Thus non-invasive approaches allowing repeated evaluations of the renal structure are still needed to characterize disease progression.

Single-photon emission computed tomography/computed tomography (SPECT) imaging of technetium-99m (^{99m}Tc)-dimercaptosuccinic acid (DMSA) renal uptake is a well-known imaging procedure performed to detect cortical abnormalities mainly related to urinary tract infection in children [4]. In pre-clinical studies, ^{99m}Tc -DMSA scintigraphy has been used as a

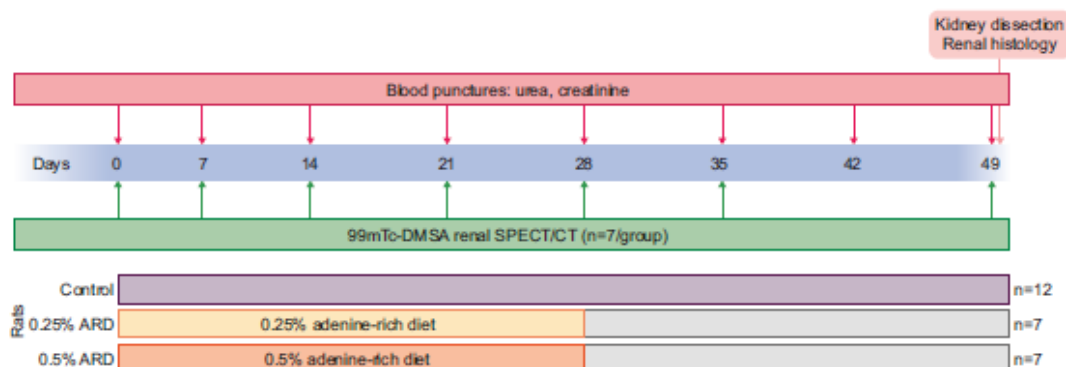


FIGURE 1: Experimental protocol.

valuable tool to evaluate parenchymal injury and is inversely correlated with markers of kidney function such as serum urea and creatinine and histopathological changes such as tubular and glomerular lesions [5]. However, a link between ^{99m}Tc -DMSA renal scintigraphy and fibrosis has not been reported so far. Thus we aimed to evaluate ^{99m}Tc -DMSA SPECT imaging to longitudinally monitor renal impairment appearance during renal insufficiency in rats induced by an adenine-rich diet (ARD).

MATERIALS AND METHODS

Protection of animals in research

All procedures using animals were approved by the institution's Animal Care and Use Committee (Project 15636-2018122710383826 VI, CE14 Aix-Marseille Université) and were conducted according to the European Union Directive 2010/63 and to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

CKD model

Rat experiments were conducted in 5-week-old male Sprague-Dawley rats (Envigo, Indianapolis, IN, USA). The animals were housed two per cage with enrichment and free access to food and water.

CKD was induced by subjecting 26 rats to an ARD at 0.25 and 0.5% [6] (Safe Nutrition, Augy, France) for 28 days ($n=7$ per ARD group, compared with 12 control rats). Food and water were provided *ad libitum*. We performed a longitudinal study by assessing the same animals during the entire study. The study protocol is summarized in Figure 1.

Blood sampling

The severity of CKD was assessed using classical biochemical markers (serum urea, creatinine). Blood samples were collected on Days 0, 7, 14, 21, 28, 42 and 49 by blood puncture after catheterization of the caudal vein under anaesthesia with 3% sevoflurane. The serum was extracted after centrifugation (2500 g, 15 min, 21°C).

^{99m}Tc -DMSA SPECT-CT imaging

DMSA was purchased from Currium (Paris, France) and radiolabeled with fresh ^{99m}TcO pertechnetate (Tekcis, Currium) according to the manufacturer's instructions. The radiochemical purity of ^{99m}Tc -DMSA was confirmed to be at least 95% by thin-layer chromatography.

Renal functional parenchyma was assessed by SPECT-CT on Days 0, 7, 14, 21, 28, 35 and 49 after injection of 20 MBq (100 μL) of ^{99m}Tc -DMSA through the tail vein under anaesthesia (isoflurane 3%, Iso-vet, Vêto Santé, Lempdes, France) in 21 rats ($n=7$ per group). Two hours after injection, SPECT/CT acquisition was performed under anaesthesia with isoflurane 3% using a NanoSPECT/CT^{PLUS} camera (Bioscan, Santa Barbara, CA, USA) and Nucline version 1.02 software (Mediso, Budapest, Hungary).

The analysis of SPECT/CT images was segmented, using CT scan on the kidneys only; the urinary pelvis was excluded. The activity of both kidneys was measured in megabecquerel in the anatomical three-dimensional region of interest with CT using VivoQuant version 3.5 software (Invivo, Boston, MA, USA). ^{99m}Tc -DMSA activity detected in the kidneys was expressed as a percentage of the total injected activity (%IA). The evolution of ^{99m}Tc -DMSA uptake was expressed as the percentage of the Day 0 value for each rat. Kidney size was measured by CT on Day 49 and expressed as the mean of the two sizes of the longest kidney axes.

Renal histology

At the end of the experiments, on Day 49, the rats were sacrificed and the kidneys were dissected, harvested and fixed in 4% formaldehyde for 48 h then kept in 70% ethanol before inclusion in paraffin. Anatomical pathology was performed after haematoxylin-eosin staining (H&E Staining kit ab245880, Abcam, Cambridge, UK) using optical microscopy (Ellipse Ni-E, Nikon, Tokyo, Japan). The tubular lesions were scored with a tubular injury score, as previously described by Wan *et al.* [7], by two experienced physicians blinded to the intervention. The renal fibrosis was quantified on full histological section after Sirius red staining (Direct Red 80 powder 365548-5-G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) using optical microscopy and semi-quantitative quantification (ImageJ version 1.51) [8]. A

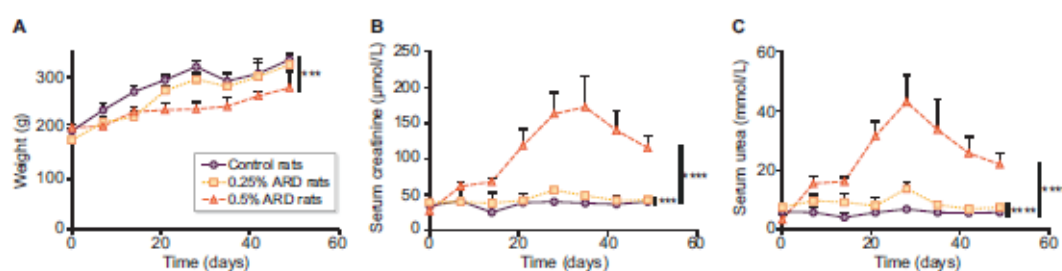


FIGURE 2: Weight and biological evaluation of rats fed a 0.25 and 0.5% ARD or controls. (A) Weight over time. (B) Serum creatinine over time. (C) Serum urea over time. ●: control rats; ■: 0.25% ARD rats; ▲: 0.5% ARD rats. ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

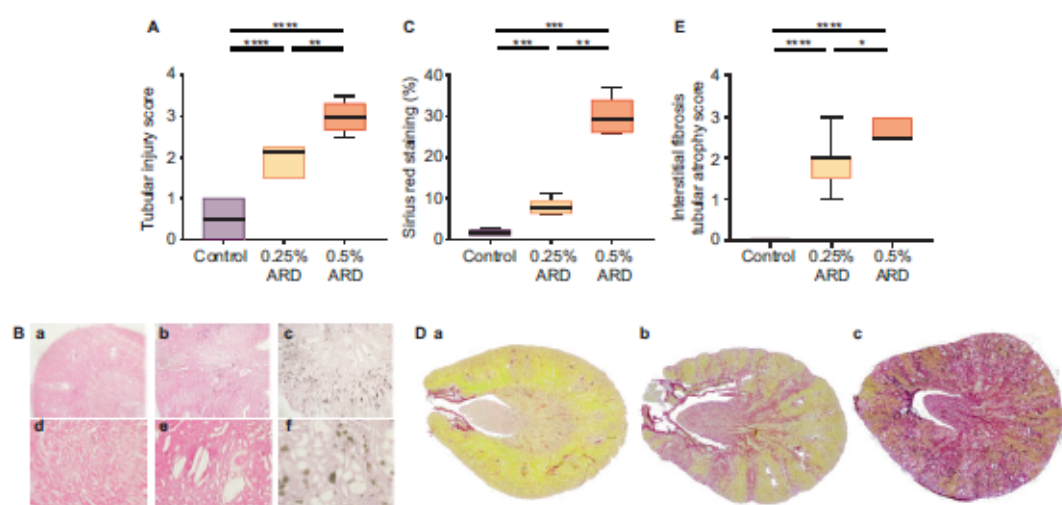


FIGURE 3: Renal histological evaluation of rats fed a 0.25 and 0.5% ARD and controls (Ctrl). (A) Tubular injury score after haematoxylin-eosin staining. (B) Renal histology in optical microscopy after haematoxylin-eosin staining in (a and d) control rats, (b and e) 0.25% ARD rats and (c and f) 0.5% ARD rats: (a–c) magnification $\times 20$, (d–f) magnification $\times 100$. (C) Sirius red staining. (D) Renal histology in optical microscopy after Sirius red staining on full histological section in (a) control rats, (b) 0.25% ARD rats and (c) 0.5% ARD rats. (E) IF/tubular injury score. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

semi-quantitative score of interstitial fibrosis (IF)/tubular atrophy (TA) inspired from the Banff 2017 classification [9] was also provided by two experienced physicians blinded to the experiment: 0, IF/tubular injury <5% of total histological section; 1, 5–25%; 2, 25–50% and 3, >50%.

Statistical analyses

Mean comparisons were done at each time point by Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test (for repeated values over time) and calculation of correlation by Spearman test and linear regression. We evaluated correlations between renal fibrosis (by Sirius red staining quantification and IF/TA score) on Day 49 and %IA at each time point and between renal fibrosis on Day 49 and biomarkers (urea and creatinine) at each time point. All tests were non-parametric and two-tailed. Statistical analysis was done using Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) and

GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, San Diego, Ca, USA) software. P-values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

The initial average weight of the rats was 190.2 ± 13.9 g. On Day 49, the average weight of the rats was 342.9 ± 14.1 g in the control group versus 322.4 ± 22.8 g in the 0.25% ARD group ($P = 0.25$) and 292.6 ± 27.1 g in the 0.5% ARD group ($P = 0.0002$). The weight evolution of the rats is presented in Figure 2A. The average weekly food consumption by rat was 168.1 ± 12.1 g in the control group versus 149.3 ± 10.1 g in the 0.25% ARD group ($P = 0.20$) and 92.0 ± 16.7 g in the 0.5% ARD group ($P < 0.0001$) ($n = 7$ per group). The mortality rate was not different between the groups: 1/13 in the control group, 1/8 in the 0.25% ARD group and 1/8 in the 0.5% ARD group ($P > 0.99$).

ARD-induced dose-dependent renal insufficiency

There was a significant increase in plasma creatinine over time in the 0.25% ARD group ($n = 7$; $P = 0.003$) and the 0.5% ARD group ($n = 7$; $P < 0.0001$) compared with the control group. On Day 28, the average creatinine level was $40.0 \pm 2.3 \mu\text{mol/L}$ in the control group versus $56.0 \pm 5.6 \mu\text{mol/L}$ in the 0.25% ARD group and $163.1 \pm 30.3 \mu\text{mol/L}$ in the 0.5% ARD group ($P = 0.0006$ and $P = 0.0006$, respectively; $n = 7$); serum creatinine levels were significantly higher in the 0.5% ARD than in the ARD 0.25% group ($P = 0.0006$) (Figure 2B). There was a significant increase in plasma urea over time in the 0.25% ARD group ($P < 0.0001$) and the 0.5% ARD group ($P < 0.0001$; $n = 7$) compared with the control group. On Day 28, the average urea level was $6.8 \pm 1.0 \text{ mmol/L}$ in the control group versus $13.8 \pm 2.0 \text{ mmol/L}$ in the 0.25% ARD group ($P = 0.0006$) and $43.1 \pm 9.0 \text{ mmol/L}$ in the 0.5% ARD group ($P = 0.0006$) ($n = 7$); serum urea levels were significantly higher in the 0.5% ARD group than in the ARD 0.25% group ($P = 0.0006$) (Figure 2C). Both serum urea and creatinine decreased after Day 35 in the ARD rats.

ARD-induced dose-dependent tubular damage and fibrosis

On Day 49, the average tubular injury score was 0.5 ± 0.4 in the control group ($n = 12$) versus 2.0 ± 0.4 in the 0.25% ARD group ($n = 7$; $P < 0.0001$) and 3.0 ± 0.4 in the 0.5% ARD group ($n = 7$; $P < 0.0001$). In addition, intratubular precipitation of

adenine crystals was observed in the 0.5% ARD group (Figure 3A and B). On Day 49, the average Sirius red staining per slide was $1.7 \pm 0.6\%$ in the control group ($n = 12$) versus $8.0 \pm 1.8\%$ in the 0.25% ARD group ($n = 6$; $P = 0.0001$) and $30.2 \pm 4.3\%$ in the 0.5% ARD group ($n = 6$; $P = 0.0001$) (Figure 3C and D). The average IF/TA score was 0.0 ± 0.0 in the control group ($n = 12$) versus 1.9 ± 0.6 in the 0.25% ARD group ($n = 7$; $P < 0.0001$) and 2.6 ± 0.2 in the 0.5% ARD group ($n = 7$; $P < 0.0001$) (Figure 3E).

On Day 49, the average kidney size was $22.5 \pm 1.0 \text{ mm}$ in the control group versus $21.1 \pm 0.9 \text{ mm}$ in the 0.25% ARD group ($P = 0.11$) and $21.3 \pm 1.0 \text{ mm}$ in the 0.5% ARD group ($P = 0.05$); kidney size was not different between the 0.25% and 0.5% ARD groups ($P = 0.76$).

ARD induces a dose-dependent decrease in $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA uptake over time

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA SPECT/CT imaging showed a significant decrease in renal uptake over time in rats fed with 0.25 and 0.5% ARD compared with control rats ($P = 0.011$ and $P < 0.0001$, respectively). On Day 0, the mean renal activity was $36.60 \pm 5.49\%$ IA. On Day 28, the relative $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA renal uptake was higher in the control group compared with the 0.25% ARD group [$156.9 \pm 41.9\%$ versus $117.0 \pm 17.7\%$ ($P = 0.02$)] and the 0.5% ARD group [$73.6 \pm 14.7\%$ ($P = 0.0006$)]; the relative renal uptake of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA was lower in the 0.5% ARD group compared with the 0.25% ARD group ($P = 0.0006$). On Day 49,

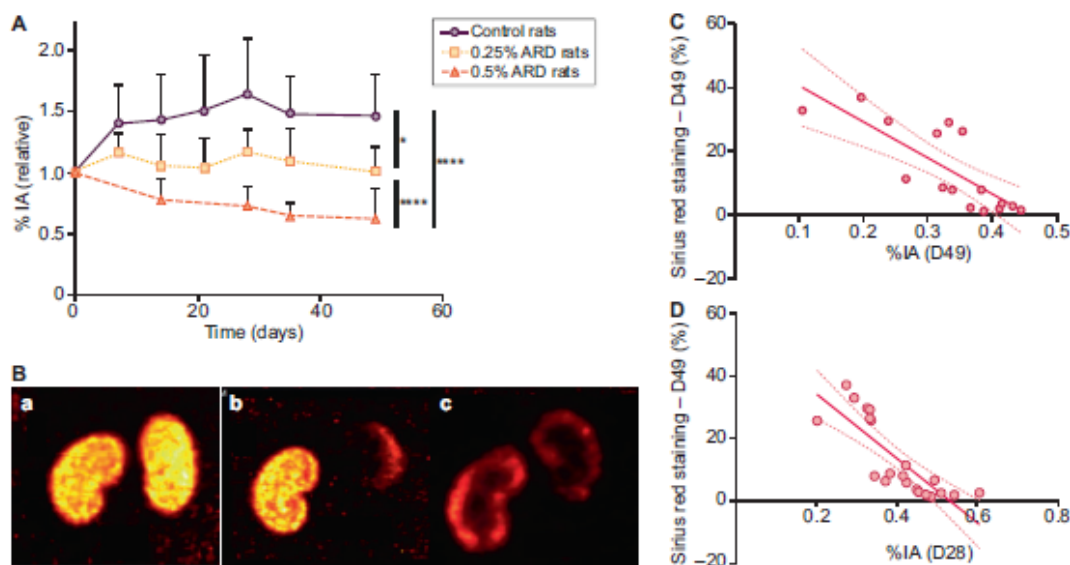


FIGURE 4: Renal SPECT/CT with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA of rats fed 0.25 and 0.5% ARD or controls. (A) Evolution of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA uptake over time. Results are expressed as a percentage of the Day 0 value for each rat. (B) Renal imaging with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA SPECT/CT. (C) Correlation between Sirius red staining at Day 49 and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA uptake at Day 49 ($r = -0.86$, $P = 0.0002$, $R^2 = 0.63$). (D) Correlation between Sirius red staining at Day 49 and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA uptake at Day 28 ($r = -0.89$, $P < 0.0001$, $R^2 = 0.67$), %IA. ●: control rats; ■: 0.25% ARD rats; ▲: 0.5% ARD rats. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

the relative ratio of renal activity to injected activity of DMSA was higher in the control group compared with the 0.25% ARD group [$137.7 \pm 25.1\%$ versus $101.0 \pm 20.2\%$ ($P = 0.02$)] and the 0.5% ARD group [$63.2 \pm 23.7\%$ ($P = 0.009$)]; the relative renal uptake of ^{99m}Tc -DMSA was higher in the 0.25% group than in the 0.5% ARD group ($P = 0.04$) (Figure 4A and B).

Early ^{99m}Tc -DMSA uptake is inversely correlated to kidney fibrosis

^{99m}Tc -DMSA uptake on Day 49 was significantly inversely correlated with Sirius red staining on Day 49 ($r = -0.86$, $P = 0.0002$, $R^2 = 0.63$) (Figure 4C). This association remained significant in the ARD groups ($r = -0.72$, $P = 0.02$, $R^2 = 0.38$). ^{99m}Tc -DMSA uptake on Day 49 was significantly inversely correlated with IF/TA score on Day 49 ($r = -0.78$, $P = 0.001$, $R^2 = 0.45$) (Supplementary data, Figure S1A). Creatinine on Day 49 was not correlated with Sirius red staining in the ARD groups ($r = 0.28$, $P = 0.43$, $R^2 = 0.13$). Serum urea and creatinine on Day 49 were not correlated with the IF/TA score in the ARD groups ($P = 0.13$ and $P = 0.25$, respectively).

^{99m}Tc -DMSA uptake was significantly inversely correlated with Sirius red staining at each time point since Day 7, except on Day 21 (Supplementary data, Table S1). ^{99m}Tc -DMSA uptake on Day 28 had the strongest correlation with Sirius red staining on Day 28 ($r = -0.89$, $P < 0.0001$, $R^2 = 0.67$) (Figure 4D). This association remained significant in the ARD groups ($r = -0.80$, $P = 0.001$, $R^2 = 0.57$). ^{99m}Tc -DMSA uptake on Day 28 was also significantly inversely correlated with the IF/TA score on Day 28 ($r = -0.61$, $P = 0.003$, $R^2 = 0.19$) (Supplementary data, Figure S1B). Serum creatinine on Day 28 was not correlated with Sirius red staining in the ARD groups ($r = 0.38$, $P = 0.18$, $R^2 = 0.19$) or with DMSA on Day 28 ($r = -0.01$, $P = 0.97$, $R^2 = 0.06$). Serum urea and creatinine on Day 28 were not correlated with the IF/TA score in the ARD groups ($P = 0.10$ and $P = 0.20$, respectively).

DISCUSSION

Induction of renal fibrosis and CKD by ARD is an established method [10]. We confirmed that the ARD model allows obtaining a persistent impairment of renal function, a tubulointerstitial histological impairment and collagen deposits indicating significant renal fibrosis. Interestingly, these impairments appeared in an adenine dose-dependent manner, with higher serum urea and creatinine and more important histologic damage in 0.5% ARD rats.

For the first time, we described an early decrease in renal ^{99m}Tc -DMSA uptake in the kidneys of ARD rats, highlighting progressive and chronic cortical scarring. ^{99m}Tc -DMSA accumulates in the kidneys by megalin/cubilin-mediated endocytosis in the proximal tubule [11], so its uptake will be reduced in various cases of tubular or interstitial damage. Here we confirmed that kidney fibrosis reduced functional renal parenchyma marked by ^{99m}Tc -DMSA. As illustrated by the correlation between ^{99m}Tc -DMSA quantification in kidney at Day 49 and Sirius red staining *ex vivo* in kidney collected on the same Day 49, along with the correlation between ^{99m}Tc -DMSA quantification in kidney IF/TA score at the same time point, we

found that the reduction of renal parenchyma is inversely proportional to newly formed fibrous tissue in the kidney. Interestingly, we reported a strong inverse correlation with significant linear regression between renal ^{99m}Tc -DMSA uptake at Day 28 and Sirius red staining of fibrosis at Day 49 and between ^{99m}Tc -DMSA uptake at Day 28 and IF/TA score at Day 49, although urea and creatinine values decreased after stopping the diet on Day 28. These observations suggest that ^{99m}Tc -DMSA SPECT/CT at Day 28 may be predictive of fibrosis at Day 49 in rats. In addition, we described no correlation between kidney fibrosis (evaluated by Sirius red staining and IF/TA score) and markers of kidney function, such as serum urea and creatinine, at Day 28 or Day 49, illustrating that serum urea and creatinine were not related or predictive of kidney fibrosis in this model. Moreover, no correlation was found between DMSA uptake and serum creatinine at the same time point, confirming that DMSA could not be used for renal function assessment [12]. The lack of blood urea nitrogen and creatinine degradation in ARD rats may be related to the loss of muscle mass rather than renal recovery [13]. Indeed, the animals with the highest renal insufficiency were also those that had gained the least weight. Finally, in our ARD rats, kidney size measured by CT was poorly altered, thus CT alone does not appear to be an effective test for assessing renal impairment.

To date in human clinical practice, ^{99m}Tc -DMSA renal scintigraphy is almost exclusively reserved for the evaluation of renal parenchymal scars after pyelonephritis in children [14]. Clinical studies are needed to confirm that ^{99m}Tc -DMSA SPECT/CT can be used as a non-invasive prognostic examination to predict permanent fibrosis lesions independent of current renal function. Thus ^{99m}Tc -DMSA SPECT/CT may be applied in CKD and other fields of nephrology. For example, in acute tubular necrosis, there is classically a dissociation between normalization of biological kidney function (evaluated by serum creatinine and estimated GFR) after kidney damage but an increased risk of CKD in the long term [15, 16], which is mainly due to maladaptive repair [17], leading to kidney fibrosis [1, 18]. In this case, ^{99m}Tc -DMSA SPECT/CT may be used as a non-invasive examination to identify patients with maladaptive repair who are at risk of developing CKD, as it was suggested in mice [19].

Recently interest in renal MRI in quantifying renal fibrosis during CKD has been suggested [20]. However, this method remains poorly accessible in clinical practice and expensive. Recently positron emission tomography/CT imaging with gallium-68 fibroblast activation protein, targeting fibroblastic activation leading to fibrosis, raised potential interest in cancer and idiopathic pulmonary fibrosis. Unfortunately this tracer is not available in clinical practice and has not been evaluated in kidney diseases. Thus there is no non-invasive method validated to predict the development of renal fibrosis. Repurposing ^{99m}Tc -DMSA SPECT/CT to predict kidney fibrosis may be a simple and inexpensive method.

In conclusion, this work reports that renal uptake of ^{99m}Tc -DMSA assessed by SPECT/CT is a non-invasive, early and predictive tool to assess the development of kidney fibrosis as observed in ARD rats. ^{99m}Tc -DMSA SPECT imaging allows a

longitudinal follow-up of renal fibrosis and could be a non-invasive prognostic marker in pre-clinical experimentation. As it is already widely available for molecular imaging in patients, we suggest that ^{99m}Tc -DMSA may help to identify patients at risk of developing kidney fibrosis.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at [ndt](http://ndt.oxfordjournals.org/) online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Plateforme de Biochimie, UMR 1149 Inserm, Université Paris Diderot, ERL CNRS 8252, Faculté de Médecine Site Bichat, Paris for performing biochemical tests.

FUNDING

This research was funded by the grant 'End-stage renal disease and dialysis' of the Société Française de Néphrologie, Dialyse et Transplantation in 2018.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

M.B., B.G., G.H., S.B., P.B. and F.D.G. designed the study. A.M., P.G., B.G., M.B., G.H., S.F. and L.B. performed the imaging. M.B., L.D., P.B., S.C. and G.H. performed the histological experiments and scoring. M.B., G.H., S.F., L.B., A.M., P.B., S.C. and P.G. were in charge of the animals and the ARD model. M.B. performed the statistical analysis, wrote the manuscript and made the figures. G.H., B.G. and S.B. critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None declared.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data underlying this article will be shared upon reasonable request to the corresponding author.

REFERENCES

1. Venkatasubramanian MA, Weinberg JM, Kriz W *et al*. Failed tubule recovery, AKI-CKD transition, and kidney disease progression. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 1765–1776

2. Magalhães P, Pejchinovski M, Markoska K *et al*. Association of kidney fibrosis with urinary peptides: a path towards non-invasive liquid biopsies? *Sci Rep* 2017; 7: 16915
3. Nicholson ML, McCulloch TA, Harper SJ *et al*. Early measurement of interstitial fibrosis predicts long-term renal function and graft survival in renal transplantation. *Br J Surg* 1996; 83: 1082–1085
4. Piepsz A, Colarinho P, Gordon I *et al*. Guidelines for ^{99m}Tc -DMSA scintigraphy in children. *Eur J Nucl Med* 2001; 28: BP37–BP41.
5. Fatemikia H, Seydelabadi M, Karimi Z *et al*. Comparison of ^{99m}Tc -DMSA renal scintigraphy with biochemical and histopathological findings in animal models of acute kidney injury. *Mol Cell Biochem* 2017; 434: 163–169
6. Bobot M, Thomas L, Moyon A *et al*. Uremic toxic blood-brain barrier disruption mediated by AhR activation leads to cognitive impairment during experimental renal dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2020; 31: 1509–1521
7. Wan X, Hou LJ, Zhang LY *et al*. IKK α is involved in kidney recovery and regeneration of acute ischemia/reperfusion injury in mice through IL10-producing regulatory T cells. *Dis Model Mech* 2015; 8: 733–742
8. Farris AB, Adams CD, Broussard N *et al*. Morphometric and visual evaluation of fibrosis in renal biopsies. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 176–186
9. Roufosse C, Simmonds N, Claessen-van Groningen M *et al*. A 2018 reference guide to the Banff classification of renal allograft pathology. *Transplantation* 2018; 102: 1795–1814
10. Diwan V, Brown L, Gobe GC. Adenine-induced chronic kidney disease in rats. *Nephrology (Carlton)* 2018; 23: 5–11
11. Weyer K, Nielsen R, Petersen SV *et al*. Renal uptake of ^{99m}Tc -dimercaptosuccinic acid is dependent on normal proximal tubule receptor-mediated endocytosis. *J Nucl Med* 2013; 54: 159–165
12. Durand E, Prigent A. Can dimercaptosuccinic acid renal scintigraphy be used to assess global renal function? *Eur J Nucl Med* 2000; 27: 727–730
13. Okada H, Kaneko Y, Yawata T *et al*. Reversibility of adenine-induced renal failure in rats. *Clin Exp Nephrol* 1999; 3: 82–88
14. Melis K, Vandevivere J, Hoekens C *et al*. Involvement of the renal parenchyma in acute urinary tract infection: the contribution of ^{99m}Tc -dimercaptosuccinic acid scan. *Eur J Pathol* 1992; 151: 536–539
15. Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int* 2012; 81: 442–448
16. Gallagher M, Cass A, Bellomo R *et al*. Long-term survival and dialysis dependency following acute kidney injury in intensive care extended follow-up of a randomized controlled trial. *PLoS Med* 2014; 11: e1001601
17. Ferencik DA, Bonventre JV. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat Rev Nephrol* 2015; 11: 264–276
18. Humphreys BD, Cantaluppi V, Porilla D *et al*. Targeting endogenous repair pathways after AKI. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27: 990–998
19. Kwak W, Jang HS, Bely T *et al*. Evaluation of kidney repair capacity using ^{99m}Tc -DMSA in ischemia/reperfusion injury models. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 406: 7–12
20. Bucharan CE, Mahmoud H, Cox EF *et al*. Quantitative assessment of renal structural and functional changes in chronic kidney disease using multiparametric magnetic resonance imaging. *Nephrol Dial Transplant* 2019; 35: 955–964

Received: 16.6.2020; Editorial decision: 17.11.2020

Supplementary Material

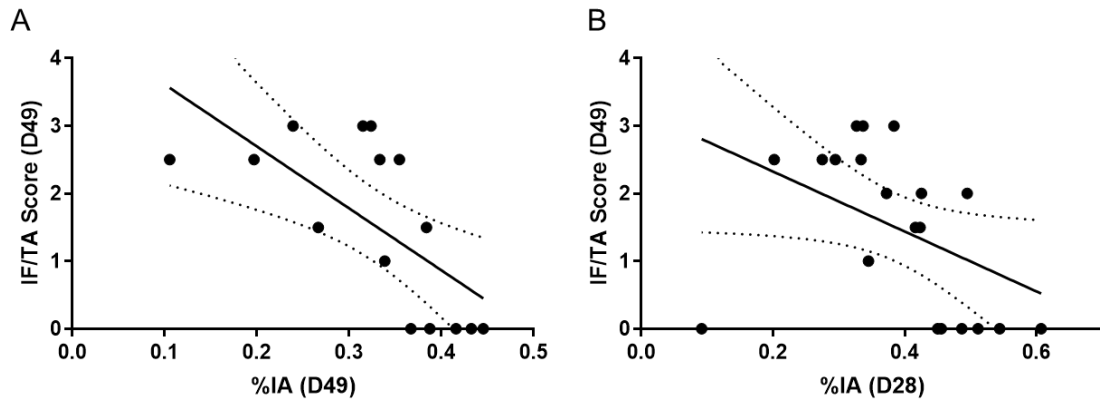
Supplementary Table 1:

Correlation	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 35	Day 49
<i>r</i>	0.14	-0.63	-0.48	-0.49	-0.89	-0.72	-0.86
<i>P</i>	0.59	0.02	0.03	0.09	<0.0001	0.0002	0.0002
<i>R</i> ²	ns	ns	ns	ns	0.67	0.49	0.63

Correlation between renal DMSA uptake at each time point and sirius red staining at Day 49

r: Spearman's correlation coefficient, *R*²: coefficient of determination (linear regression)

Supplementary Figure 1:



Correlation between interstitial fibrosis / tubular atrophy (IF/TA) score at Day 49 and (A) 99mTc-DMSA uptake at Day 49 ($r=-0.78$, $P=0.001$, $R^2=0.45$), and (B) 99mTc-DMSA uptake at Day 28 ($r=-0.61$, $P=0.003$, $R^2=0.19$), %IA: percentage of injected activity

2. Article 2 : Uremic Toxic Blood-Brain Barrier Disruption Mediated by AhR Activation Leads to Cognitive Impairment during Experimental Renal Dysfunction

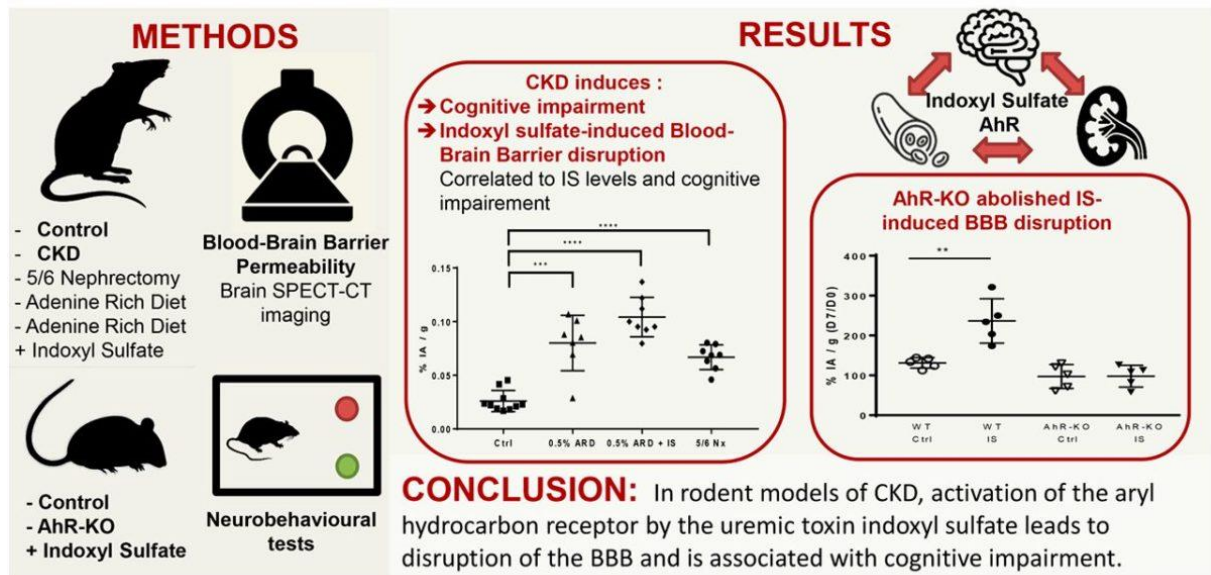
2.1 Résultats principaux

Pour caractériser l'implication des toxines urémiques dans les anomalies cérébrales et neurocomportementales dans trois modèles de rats atteints d'IRC, nous avons induit la MRC chez les rats par une alimentation enrichie en adénine à 0,5% selon les mêmes modalités que celles décrites dans le chapitre précédent ou par une néphrectomie des 5/6èmes. Nous avons évalué les déficits neurologiques par des tests neurocomportementaux et la perturbation de la barrière hémato-encéphalique par imagerie SPECT/CT cérébrale après injection de ^{99m}Tc -DTPA, marqueur de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique.

Dans les différents modèles de MRC, les animaux présentaient une accumulation sérique significative d'IS par rapport aux animaux contrôle, qui était associée à une activation d'AhR par le sérum des animaux. Chez les rats MRC, nous avons constaté des troubles cognitifs au cours du test de reconnaissance du nouvel objet (RNO), la tâche de localisation d'objets et le test de mémorisation sociale, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique associée à l'atteinte rénale. Nous avons constaté une corrélation significative entre la concentration cérébrale de ^{99m}Tc -DTPA et à la fois l'indice de discrimination du test de RNO et les concentrations d'IS dans le sérum. Lorsque nous avons ajouté de l'IS à l'eau de boisson de rats nourris avec un régime riche en adénine, nous avons constaté une augmentation des concentrations d'IS dans le sérum, associée à altération plus importante des fonctions cognitives et à une perméabilité accrue de la barrière hémato-encéphalique. Afin de caractériser la contribution de l'IS aux modifications comportementales et à la dysfonction de la BHE, nous avons développé un modèle de souris urémiques par administration chronique d'IS dans l'eau de boisson. Ces souris présentaient à la fois des augmentations de concentration sériques d'IS, de captation cérébrale en ^{99m}Tc -DTPA et des altérations comportementales dans les tests du RNO et de localisation d'objets. Les souris *AhR-knockout* étaient protégées contre les perturbations de la barrière hémato-encéphalique et les troubles cognitifs induits par l'IS.

Au total : l'activation d'AhR par l'IS, entraîne une perturbation de la barrière hémato-encéphalique associée à une atteinte cognitive dans plusieurs modèles animaux de maladie rénale chronique.

Uremic toxic brain blood barrier disruption mediated by AhR activation leads to cognitive impairment during experimental renal dysfunction



doi: 10.1681/ASN.2019070728

JASN
 JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY

Figure 10 : Abstract visuel de la publication

2.2 Publication

Bobot M, Thomas L, Moyon A, Fernandez S, McKay N, Balasse L, Garrigue P, Brige P, Chopinet S, Poitevin S, Cérini C, Brunet P, Dignat-George F, Burtey S, Guillet B, Hache G. Uremic Toxic Blood-Brain Barrier Disruption Mediated by AhR Activation Leads to Cognitive Impairment During Experimental Renal Dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2020 Jun 11:ASN.2019070728 (1)

Uremic Toxic Blood-Brain Barrier Disruption Mediated by AhR Activation Leads to Cognitive Impairment during Experimental Renal Dysfunction

Mickaël Bobot^{1,2,3}, Laurent Thomas^{2,3}, Anaïs Moyon^{2,3,4}, Samantha Fernandez², Nathalie McKay³, Laure Balasse², Philippe Garrigue^{1,2,3,4}, Pauline Brige^{2,5}, Sophie Chopinet^{2,5,6}, Stéphane Poitevin^{1,3}, Claire Céroni³, Philippe Brunet^{1,3}, Françoise Dignat-George³, Stéphane Burtey^{1,3}, Benjamin Guillet^{2,3,4} and Guillaume Hache^{2,3,7}

Due to the number of contributing authors, the affiliations are listed at the end of this article.

ABSTRACT

Background Uremic toxicity may play a role in the elevated risk of developing cognitive impairment found among patients with CKD. Some uremic toxins, like indoxyl sulfate, are agonists of the transcription factor aryl hydrocarbon receptor (AhR), which is widely expressed in the central nervous system and which we previously identified as the receptor of indoxyl sulfate in endothelial cells.

Methods To characterize involvement of uremic toxins in cerebral and neurobehavioral abnormalities in three rat models of CKD, we induced CKD in rats by an adenine-rich diet or by 5/6 nephrectomy; we also used AhR^{-/-} knockout mice overloaded with indoxyl sulfate in drinking water. We assessed neurologic deficits by neurobehavioral tests and blood-brain barrier disruption by SPECT/CT imaging after injection of ^{99m}Tc-DTPA, an imaging marker of blood-brain barrier permeability.

Results In CKD rats, we found cognitive impairment in the novel object recognition test, the object location task, and social memory tests and an increase of blood-brain barrier permeability associated with renal dysfunction. We found a significant correlation between ^{99m}Tc-DTPA content in brain and both the discrimination index in the novel object recognition test and indoxyl sulfate concentrations in serum. When we added indoxyl sulfate to the drinking water of rats fed an adenine-rich diet, we found an increase in indoxyl sulfate concentrations in serum associated with a stronger impairment in cognition and a higher permeability of the blood-brain barrier. In addition, non-CKD AhR^{-/-} knockout mice were protected against indoxyl sulfate-induced blood-brain barrier disruption and cognitive impairment.

Conclusions AhR activation by indoxyl sulfate, a uremic toxin, leads to blood-brain barrier disruption associated with cognitive impairment in animal models of CKD.

JASN 31: ●●●●●, 2020. doi: <https://doi.org/10.1681/ASN.2019070728>

Major adverse cardiovascular events and mortality are greatly increased in patients with CKD.¹ Recent observations highlight that patients with CKD have a higher risk of developing cognitive impairment.^{2–7} Cognitive impairment is frequent, appears early with CKD, and worsens parallel with the decline of the GFR. These disorders are compared with a form of early-onset vascular dementia^{3,8–10} but with limited cerebral structural damage because patients with CKD have minimal alteration of cerebral volumes

Received July 23, 2019. Accepted March 30, 2020.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Dr. Mickaël Bobot, Service de Néphrologie et Transplantation rénale, Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, Hôpital de la Conception, 147 boulevard Baille, Marseille, France, or Dr. Guillaume Hache, Center for Research in Cardiovascular and Nutrition, Aix Marseille University, 27 boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France. Email: mickael.bobot@ap-hm.fr or guillaume.hache@univ-amu.fr

Copyright © 2020 by the American Society of Nephrology

in magnetic resonance imaging, not correlated to cognitive impairment.¹¹ There is currently no treatment to improve cognitive disorders during CKD, and these disorders are only partly reversible after kidney transplantation,¹² especially in frail patients.¹³ This risk of developing cognitive impairment is generally explained by the high prevalence of both symptomatic and subclinical ischemic cerebrovascular lesions,^{14–18} white matter lesions, and microbleeds,^{15,19} and it could be worsened by significant alteration in cerebral oxygenation and blood flow in hemodialysis.²⁰ However, other potential mechanisms such as direct toxicity of uremic toxins or cerebral endothelial dysfunction could be involved.

In fact, plasmatic uremic toxin contents can rise from 10 to 100 times higher in patients with CKD than those seen in the general population. Among the uremic toxins, indole solutes belong to the family of uremic toxins bound to proteins and are difficult to purify by dialysis.¹⁴ The accumulation of indoles is associated with a higher risk of cardiovascular events²¹ and may play an important role in abnormalities of cognitive functions.^{22,23} Recently, Assem *et al.*²² implied that indoxyl sulfate (IS) could be a major player in the neurologic effect of kidney failure. Moreover, Lin *et al.*²⁴ highlighted a correlation between serum IS concentrations and cognitive disorders in patients on hemodialysis. Our team identified the receptor of IS in endothelial cells, aryl hydrocarbon receptor (AhR). AhR modulates many signaling pathways. Activation of AhR by IS causes endothelial dysfunction leading to a procoagulant state by inducing endothelial inflammation and an increase in oxidative stress.^{21,25–27} In addition, AhR is widely expressed in the central nervous system, and its activation has been shown to play a detrimental role in both cognitive function²⁸ and stroke-induced brain injury in mice with normal renal function.²⁹

Recent work suggests that blood-brain barrier (BBB) disruption is an important mechanism involved in acute and chronic neurodegenerative processes.³⁰ Particularly, BBB disruption may be an early biomarker of human cognitive dysfunction in patients without CKD.³¹ Surprisingly, the integrity of BBB in patients with CKD has been poorly explored, and few reports suggest BBB permeability in animal models.¹⁹ However, to date, no link between BBB disruption, IS accumulation, and cognitive impairment has been made in the context of CKD.

Thus, we challenged the hypothesis that neurocognitive disorders may be associated with IS-induced BBB disruption in rodent models of CKD.

METHODS

All procedures using animals were approved by the institution's Animal Care and Use Committee (Project #15636–2018122710383826 VI, CE14; Aix-Marseille Université), and they were conducted according to European Union Directive 2010/63 and to the National Institutes of Health

Significance Statement

Uremic toxicity may play a role in the elevated risk of developing cognitive impairment observed in patients with CKD. Some uremic toxins, such as indoxyl sulfate, are agonists of the transcription factor aryl hydrocarbon receptor (AhR). The authors found that cognitive impairment in three models of CKD in rats is correlated with serum levels of indoxyl sulfate as well as blood-brain barrier disruption as detected by SPECT/CT imaging. Using AhR^{-/-} knockout mice, the authors described for the first time that indoxyl sulfate-induced activation of AhR is responsible for blood-brain barrier disruption. These findings demonstrate that blood-brain barrier disruption seems to be an important mechanism involved in cognitive impairment in the context of CKD and that AhR may be a promising therapeutic target to prevent cognitive impairment in CKD.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Rat experiments were conducted in 5-week-old male Sprague-Dawley rats (Envigo). The animals were housed two per cage with enrichment and free access to food and water. The temperature and the humidity of the air were controlled and varied between 40% and 60%, respectively; a light cycle of 7–19 hours was carried out. Several daily passages of competent personnel were carried out in the animal facility to control the welfare of the animals and for the identification of the end points. The study protocol is summarized in Figure 1.

Mouse experiments were conducted with AhR knockout (AhR^{-/-}) mice (B6.129-Ahr^{tm1Bna/J})³² purchased from Jackson Laboratories and maintained as a breeding colony in the animal care facility at the Faculty of Medicine of Marseille. C57BL/6J mice were used as experimental controls. Genotypes were confirmed by PCR analysis of DNA from tail clippings.

Induction and Assessment of CKD

CKD was induced by subjecting the rats to an adenine-rich diet (ARD) at 0.25% and 0.5% (Safe Nutrition) for 28 days. We challenged a separate animal group of 0.5% ARD (0.5% ARD + IS) rats with IS by adding IS in the drinking water during day 14 (D14)–D28 (1 g of IS per liter of water).³³ IS was purchased as a potassium salt (Sigma-Aldrich); an equivalent concentration of KCl in drinking water was used as control.

In another separate animal group, after 4 weeks of 0.5% ARD diet, oral sorbent 8% AST-120 (Kureha) was added mixed with standard food following the protocol previously described³⁴ for another 4 weeks (D28–D46).

A second model of renal failure was obtained by 5/6 nephrectomy as described in the literature.³⁵ Briefly, ablation of the upper and lower poles of the left kidney was performed after subcostal laparotomy and clamping of the renal pedicle, and total right nephrectomy was performed 4 days later. The surgery was performed under anesthesia with 100 μ l 3% sevoflurane. Intraoperative analgesia was provided by 2 mg/ml ropivacaine subcutaneously, and postoperative analgesia was by injection of 0.05 mg/kg buprenorphine subcutaneously.³⁶ Postoperative pain was assessed using a grid of facial

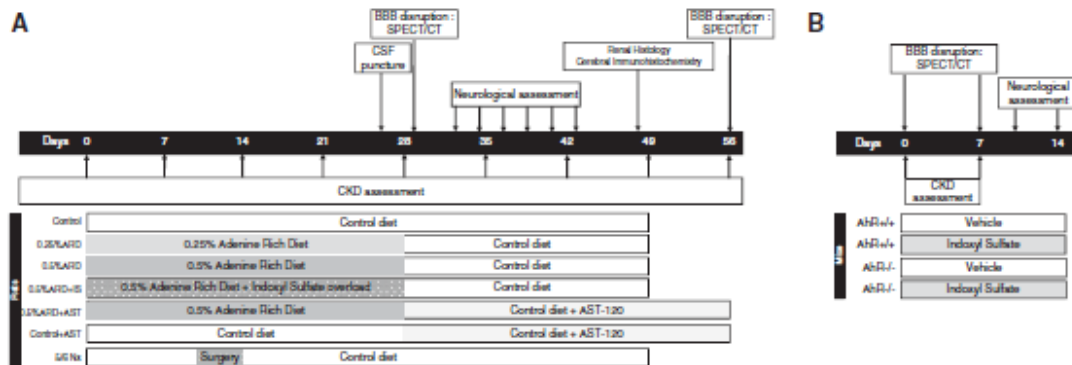


Figure 1. Experimental protocol of the study. Description and timing of the experiments conducted in (A) rats and (B) mice. 5/6 Nx, 5/6 nephrectomy; AhR^{+/+}, wild type; AhR^{-/-}, Aryl Hydrocarbon Receptor knock-out; BBB, blood-brain barrier; CSF, cerebro spinal fluid.

expressions validated in the rat.³⁷ In case of pain, another injection of 0.05 mg/kg buprenorphine was given on D1 and D2 postsurgery.

BP of the animals was measured at D28 with a rat-adapted monitor after a weekly habituation.

In mice, IS overload was given in drinking water (1 g/L) for the duration of the experiments (14 days). Food and water were provided *ad libitum*.

The severity of CKD was assessed using classic biochemical markers serum urea and creatinine. The serum levels of IS, indole acetic acid, and paracresyl sulfate were assessed by high performance liquid chromatography as previously described³⁸ (Shimadzu LC2 device). Blood samples were collected by catheterization of the caudal vein under anesthesia by 3% sevoflurane. The serum was extracted after centrifugation (2500 × g for 15 minutes at 21°C). Blood samples were stored at -80°C.

Aryl hydrocarbon receptor activating potential (AhR-AP) in serum was quantified by reporter-luciferase gene bioluminescence gene and expressed as percentage activation of FICZ (positive control)³⁹ on human HEPG2 cell culture.

After euthanasia, the kidneys were fixed in 4% formaldehyde for 48 hours and then, kept in 70% ethanol to be included in paraffin. The interstitial lesions were assessed with optic microscopy (station Ellipse Ni-E; Nikon) after hematoxylin-eosin staining according to the score described by Wan *et al.*⁴⁰ for each kidney by two trained physicians blinded to the interventions. Renal fibrosis was assessed by histochemical Sirius red staining. Quantification of Sirius red was performed using ImageJ 1.51 analysis software.

Central Nervous System Evaluation

Indoles and paracresyl sulfate levels in cerebrospinal fluid (CSF) of 0.5% ARD rats were measured by high performance liquid chromatography.³⁸ CSF samples were taken by stereotaxic puncture of magna cisterna at D28 using a specific stereotaxic device for rats under 3% sevoflurane anesthesia. CSF samples were stored at -80°C.

Neurobehavioral Tests

The behavioral tests used are all validated tests and widely used in the literature for the evaluation of neurologic deficits in rats.^{41,42} In order to avoid any influence of anesthesia, we had to allow animals to recover from SPECT-CT imaging for at least 3 days before performing neurobehavioral assessment.

The novel object recognition (NOR) test was used to evaluate exploratory behaviors, learning, and animal memory.^{43,44} Object recognition was measured by the difference between the exploration times of familiar objects and new objects in a given enclosure. In this work, we set up a protocol to characterize the learning performance in the short term and thus, the potential learning deficit.⁴⁵ The rats were placed in a 1 × 1 × 0.25-m arena. Different objects were used of different sizes, shapes, and colors. The test was conducted in three phases. (1) In the habituation phase, the day before the test the animals were placed in the southeast corner of the empty arena, and they were able to explore for 30 minutes. The arena was cleaned after each rat pass. (2) In the learning phase, on the day of the test two identical objects were placed in specific places in the arena, and the rats explored the space for 3 minutes. This sequence was repeated three times 30 minutes apart. (3) In the test phase, one of the familiar objects was replaced by a new object (same location). The animal explored the arena and the objects. The recognition time of each object was measured. Exploration is defined as the animal having its head <0.05 m around the object while looking at it, sniffing it, or touching it. Data were collected by video tracking software (Ethovision XT 8.5; Noldus). The total time of exploration of each object has been recorded. A discrimination index has been measured, which corresponds to the time spent exploring the new object in relation to the total exploration time $[(n-a)/(n+a)]$.

The object location (OL) task was performed to assess a rat's ability to recognize that an object that it had experienced before had changed location in order to explore a spatial

memory ability.⁴⁶ In the learning phase, the rat was exposed to objects, which were placed in the far corners of the arena. The animal was allowed to explore both objects during a sample phase of 3 minutes, and the amount of time of exploration of each object was recorded by the experimenter. This sequence was repeated three times 30 minutes apart. In the test phase, one object was placed in the same position as it had occupied in the sample phase; the second object was placed in the corner adjacent to the original position so that the two objects were in diagonal corners. Thus, both objects in the test phase were equally familiar, but one was in a new location. The position of the moved object was counterbalanced between rats. Intact OL memory is evidenced by subjects spending more time investigating the object in the new location.

The social memory test assessed cognition, namely the ability to recognize novel versus familiar animals, in rodent models of CNS disorders.⁴⁷ Over the course of multiple exposures, rodents will become habituated to intruders and no longer find them as interesting as a completely novel intruder. During testing, the subject was given four 1-minute exposures in its home cage to the same intruder 10 minutes apart. In the fifth trial, the subject encountered an entirely novel intruder. All test trials were videotaped and subsequently analyzed for total body investigation, anogenital investigation, perioral investigation, and body investigation.

The NOR and OL tests were performed in mice as previously described.⁴⁸ Briefly, all animals were handled for a week and then habituated to the empty arena for 25 min the day prior to the test. Then, the acquisition and test phases were separated by a 1-hour delay of retention time in both tests.

NOR Task

In the acquisition phase, duplicate objects were placed near two corners in the arena. Each subject was allowed a total of either 40 seconds of object investigation or 5 minutes in the arena. During the test (duration of 5 minutes), the animal was replaced in the arena and presented with objects in the same positions as at acquisition: one object was the third copy of the object used at acquisition, and the other was a novel object. Object positions and the objects used as novel or familiar were counterbalanced.

OL Task

In the acquisition phase, the mouse was allowed to investigate duplicate objects for 5 minutes. During the test (duration of 5 minutes), one object was placed in the same position that it had occupied at acquisition, whereas an identical object was placed in the corner diagonally opposite. The position of the moved object was counterbalanced between mice. Intact OL memory is evidenced by subjects spending more time investigating the object in the new location.

Isotopic Imaging

BBB permeability was assessed by SPECT-CT after injection of ^{99m}Tc-coupled diethylene-triamine-penta-acetic acid

(^{99m}Tc-DTPA) as previously described.⁴⁹ At D30, rats received, under anesthesia by 3% sevoflurane, an intravenous injection of 100 μ l of radioactive tracer (20 MBq) in isotonic and pyrogen-free solution; 30 minutes after injection, the SPECT-CT acquisition was done for 25 minutes under anesthesia with 3% sevoflurane using a Mediso NanoSpect camera and the Mediso Nucline 1.02 software. Activity was measured in the anatomic regions by the Invivo VivoQuant 3.5 and Invivo InvivoScope 2.00 reconstruction software. The cerebral acquisitions were placed on a three-dimensional cerebral atlas (CERMEP Living Imaging).⁵⁰ A quantitative index of BBB permeability was defined as the cerebral content of ^{99m}Tc-DTPA, expressed as a percentage of the total amount of injected activity and corrected per gram of brain tissue. In mice, brain activity was quantified as percentage of injected activity by gram of brain using the same process as for rats. We studied the evolution of BBB permeability between D0 and D7 and expressed the results as a percentage of activities D7/D0.

Statistical Analyses

Results are expressed in mean \pm SD. Mean comparisons were done by Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test (for repeated values over time), and calculation of correlation was by Spearman test and linear regression. All tests were non-parametric and bilateral. Statistical analysis was done using Microsoft Excel and GraphPad Prism 7.0 software; a *P* value of 0.05 was considered significant.

Ethics

This study was conducted following European Directive 2010/63/EU and the Declaration of Helsinki, and it was approved by local and national ethics committees and registered under the number APAFIS #15636.

RESULTS

The 0.5% ARD Induced Uremic Toxins Accumulation and AhR Activation

We confirmed the induction of CKD after 28 days of 0.5% ARD in rats by increases in both serum creatinine and urea (Supplemental Figure 1, Supplemental Material). At D0, the mean serum IS level was 20.0 ± 6.2 μ mol/L. There was a significant increase in IS over time compared with the control group occurring since D21 in the 0.25% ARD group ($n=8$; $P=0.007$) and since D7 in the 0.5% ARD group ($n=8$; $P=0.001$). At D35, IS level was higher in the 0.5% ARD group (68.4 ± 22.1 μ mol/L; $n=7$) compared with the control and 0.25% ARD group: 15.4 ± 11.1 μ mol/L ($n=8$; $P=0.00005$) and 44.6 ± 12.8 μ mol/L ($P=0.04$), respectively; the IS level was higher in the 0.25% ARD group than in the control group ($n=8$; $P=0.002$) (Figure 2A). The serum concentrations of indole acetic acid and paracresyl sulfate were not different in the three groups regardless of the time (data not shown).

At D0, the mean AhR activation by the rats' serum was $13.7\% \pm 8.3\%$ FICZ ($n=32$). Relative serum AhR activation relative to the J0 value as a function of time was significantly greater in the 0.5% ARD group ($n=8$) compared with the control group ($n=8$; $P=0.002$) and with the 0.25% ARD group ($n=8$; $P=0.02$) (Figure 2B). At D28, the relative AhR activation was significantly higher in 0.5% ARD group (244.0 ± 88.4 ; $n=8$) compared with control ($92.5\% \pm 37.7\%$; $n=8$; $P=0.005$) and with 0.25% group ($93.6\% \pm 50.5\%$; $n=8$; $P=0.002$). There was no significant difference between the control and 0.25% ARD groups ($P=0.33$) (Figure 2B).

ARD Induced Dose-Dependent Irreversible Tubular Lesion and Fibrosis

After hematoxylin-eosin staining, average tubular lesion score was 0.54 ± 0.44 in the control group ($n=13$) versus 1.86 ± 0.43 in the 0.25% ARD group ($n=7$; $P=0.00003$) and 2.93 ± 0.40 in the 0.5% ARD group ($n=7$; $P=0.00003$). In addition, intratubular precipitation of adenine crystals was observed in the 0.5% ARD group (Figure 2, C and D). After Sirius red staining, average staining percentage per slide was $1.84\% \pm 0.75\%$ in the control group ($n=13$) versus $7.69\% \pm 1.89\%$ in the 0.25% ARD group ($n=7$; $P=0.00003$) and $29.52\% \pm 4.27\%$ in the 0.5% ARD group ($n=7$; $P=0.00003$) (Figure 2, E and F).

Renal Failure Induced Neurobehavioral Alteration

The 0.5% ARD rats did not develop any somatosensitive or sensorimotor impairment (Supplemental Figure 2). The discrimination index of the NOR test was lower in the 0.5% ARD group than in the control group: 0.16 ± 0.28 versus 0.70 ± 0.29 ($n=7$; $P=0.008$) (Figure 3A). It was correlated with serum IS ($r=-0.70$; $P=0.01$; $R^2=0.62$) (Figure 3B). The discrimination index of the OL test was lower in the 0.5% ARD group than in the control group: -0.08 ± 0.11 versus 0.42 ± 0.06 ($n=6$; $P=0.003$) (Figure 3C). The sniffing time in the social memory test was higher in 0.5% ARD rats compared with control rats in trial 3: 18.8 ± 6.7 and 5.2 ± 2.2 seconds ($n=6$; $P=0.004$), respectively. It was also higher in trial 4: 15.7 ± 6.9 and 5.0 ± 4.2 seconds, respectively ($n=6$; $P=0.04$); however, it was not different between the two groups in trial 5 with the new encounter: 17.2 ± 8.3 and 8.5 ± 5.1 seconds ($n=6$; $P=0.14$) (Figure 3D).

BBB Permeability Was Increased in 0.5% ARD Rats

The cerebral content of ^{99m}Tc -DTPA, the imaging biomarker of BBB permeability, was significantly higher in the 0.5% ARD group compared with the control group: $0.086\% \pm 0.030\%$ and $0.026\% \pm 0.010\%$ IA/g, respectively ($n=7$; $P<0.001$) (Figure 4A).

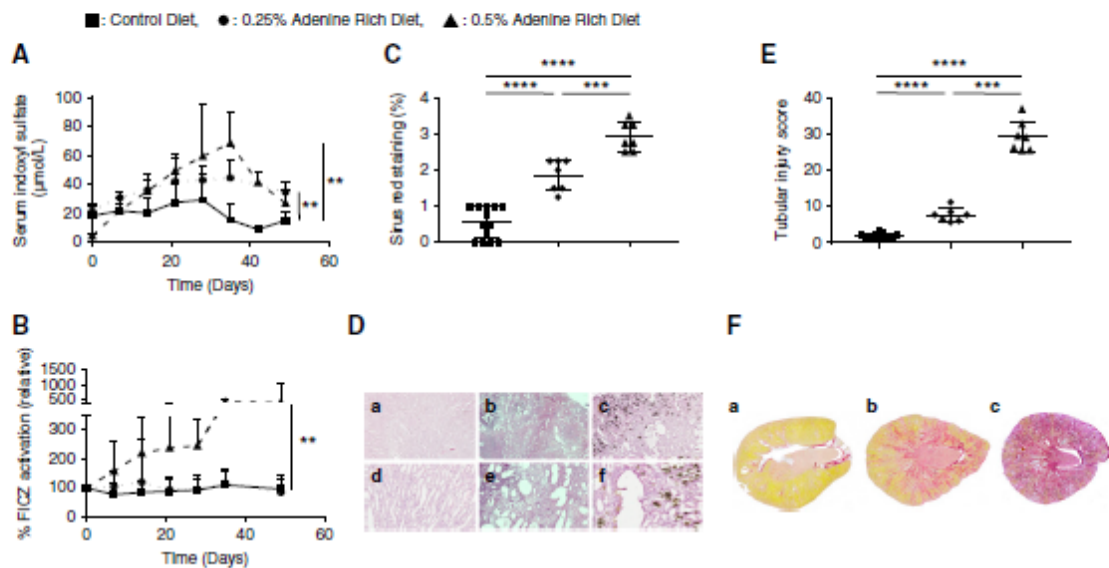


Figure 2. ARD induced dose-dependent irreversible tubular lesion and fibrosis; the 0.5% ARD induced uremic toxins accumulation and AhR activation. Biologic and histologic evaluation of control or 0.25% and 0.5% ARD rats. (A) Serum IS over time. (B) Relative AhR activation by the rats' serum (by percentage of FICZ). (C) Tubular injury score after hematoxylin-eosin staining. (D) Renal histology in optical microscopy after hematoxylin-eosin staining in (D, a and d) control rats, (D, b and e) 0.25% ARD rats, and (D, c and f) 0.5% ARD rats. Original magnification, $\times 20$ in D, a–c; $\times 100$ in D, d–f. (E) Sirius red staining. (F) Renal histology in optical microscopy after Sirius red staining on full histologic section in (F, a) control rats, (F, b) 0.25% ARD rats, and (F, c) 0.5% ARD rats. ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$.

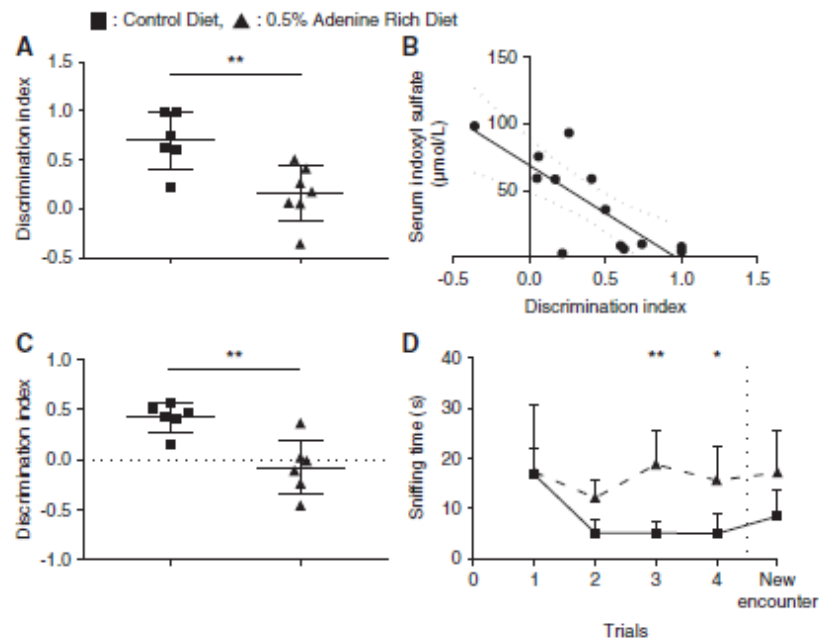


Figure 3. Renal failure induced neurobehavioral alteration. Neurobehavioral evaluation of control or 0.5% ARD rats. (A) Discrimination index of the NOR test. (B) Correlation between discrimination index of the NOR test and serum IS levels. (C) Discrimination index of the OL test. (D) Sniffing time in social recognition test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

The 5/6 Nephrectomy Induced Comparable Outcomes with 0.5% ARD on Kidney Function, Uremic Toxins Accumulation, AhR Activation, Neurobehavioral Impairment, and BBB Permeability in Rats

Mean serum creatinine levels were not different in 0.5% ARD and 5/6 nephrectomy groups at D28: 106.9 ± 18.2 versus 93.5 ± 17.7 $\mu\text{mol/L}$ ($n=8$; $P=0.19$); however, they were higher in these groups compared with the control group: 42.3 ± 9.7 $\mu\text{mol/L}$ ($n=8$; $P=0.0001$ and $P=0.00005$, respectively). Serum IS was significantly increased over time in the 5/6 nephrectomy group compared with the control group ($n=8$; $P < 0.001$) but not different from the 0.5% ARD group ($n=8$; $P=0.17$). At D28, serum IS in the 5/6 nephrectomy group was higher than in the control group: 85.7 ± 31.8 and 25.7 ± 18.2 $\mu\text{mol/L}$, respectively ($n=10$; $P < 0.001$); however, it was not different from the 0.5% ARD group: 64.8 $\mu\text{mol} \pm 28.1$ $\mu\text{mol/L}$ ($n=8$; $P=0.35$) (Figure 4B). The serum concentrations of indole acetic acid and paracresyl sulfate were not different in the three groups regardless of the time. The relative AhR activation in the 5/6 nephrectomy group was higher than in the control group: $255.1\% \pm 104.2\%$ and $90.4\% \pm 34.1\%$, respectively ($n=8$; $P=0.001$); however, it was not different from in the 0.5% ARD group: $244.0\% \pm 88.4\%$ ($n=8$; $P > 0.99$) (Figure 4C). The discrimination index of the NOR test tended to be decreased in the 5/6 nephrectomy group compared with the control group: 0.24 ± 0.64 and

0.70 ± 0.29 , respectively ($n=8$; $P=0.06$); also, it was not different from the 0.5% ARD group ($P=0.34$) (Figure 4D). Brain content of $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ was significantly higher in the 5/6 nephrectomy group than in the control group: $0.066\% \pm 0.012\%$ and $0.026\% \pm 0.009\%$ IA/g, respectively ($n=8$; $P=0.00005$) (Figure 4A).

BBB Permeability Was Correlated with Cognitive Impairment and Serum IS Levels

The cerebral fixation of $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ was inversely correlated with the discrimination index of NOR ($r=-0.90$; $P < 0.001$; $R^2=0.70$). This association remains significant in the ARD group ($r=-0.75$; $P=0.05$; $R^2=0.56$) (Figure 4E). $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ content was correlated with serum IS levels ($r=0.68$; $P=0.006$; $R^2=0.87$); this association remains significant in the ARD group ($r=0.82$; $P=0.01$; $R^2=0.76$) (Figure 4F).

IS Overload Increased Cognitive Impairment and BBB Disruption in 0.5% ARD Rats

The average weekly water intake per rat was not different between the two adenine groups ($n=8$; $P > 0.99$). At D28, serum creatinine levels were not different between ARD and ARD + IS groups: 124.5 ± 18.9 and 124.3 ± 11.1 $\mu\text{mol/L}$, respectively ($n=8$; $P=0.69$). Serum IS over time increased in the 0.5% ARD + IS group compared with the control group ($n=8$; $P=0.00003$) and with the 0.5% ARD group ($n=8$; $P < 0.001$).

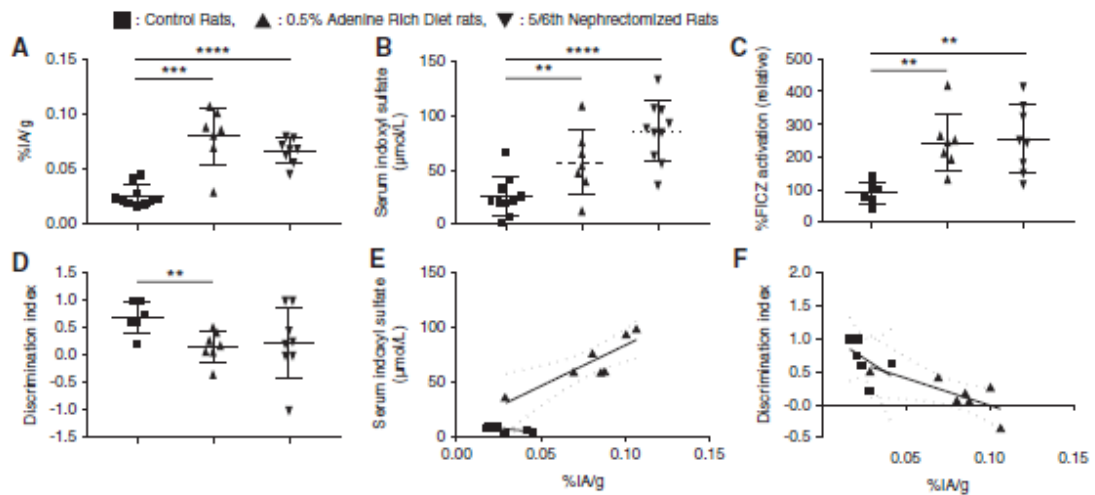


Figure 4. The 5/6 nephrectomy induced comparable outcomes with 0.5% ARD on kidney function, uremic toxins accumulation, AhR activation, neurobehavioral impairment, and BBB permeability in rats. Evaluation of the effects of CKD induced by 0.5% ARD or 5/6 nephrectomy in rats on (A) brain content of ^{99m}Tc -DTPA cerebral scintigraphy in percentage of injected activity per gram of brain (% IA/g). (B) Serum indoxyl levels at D28. (C) Relative AhR activation by the rats' serum (by percentage of FICZ) at D28. (D) Discrimination index of the NOR test. (E) Correlation between discrimination index of the NOR test and brain content in ^{99m}Tc -DTPA cerebral scintigraphy expressed as percentage of injected activity per gram of brain (% IA/g). (F) Correlation between serum IS levels and brain content in ^{99m}Tc -DTPA cerebral scintigraphy expressed as percentage of injected activity per gram of brain (% IA/g). ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

The IS level was higher in the 0.5% ARD + IS group compared with the control group (424.6 ± 95.4 and $25.7 \pm 18.2 \mu\text{mol/L}$, respectively; $n = 8$; $P = 0.0005$) and with the 0.5% ARD group ($64.8 \pm 28.1 \mu\text{mol/L}$; $n = 8$; $P = 0.00005$) (Figure 5A). The serum concentrations of indole acetic acid and serum paracresyl sulfate were not different in the three groups regardless of the time. The relative AhR activation was higher in the 0.5% ARD + IS group than in the control group ($1049.0\% \pm 355.5\%$ and $90.4\% \pm 34.1\%$, respectively; $n = 8$; $P < 0.001$) and higher than in the 0.5% ARD group ($244.0\% \pm 88.4\%$; $n = 8$; $P < 0.001$) (Figure 5B). The discrimination index of the NOR test was lower in the 0.5% ARD + IS group than in the control group (-0.65 ± 0.24 and 0.70 ± 0.29 , respectively; $n = 8$; $P = 0.002$) and lower than in the 0.5% ARD group ($P = 0.001$) (Figure 5C). Brain content of ^{99m}Tc -DTPA was higher in the 0.5% ARD + IS group than in the control group ($0.104\% \pm 0.018\%$ and $0.026\% \pm 0.009\%$ IA/g, respectively; $n = 8$; $P = 0.00005$) and higher than in the 0.5% ARD group ($n = 8$; $P = 0.05$) (Figure 5D).

IS Increased in CSF of 0.5% ARD Rats Challenged with IS

Compared with the control group, IS levels were not different in rats' CSF in the 0.5% ARD group (0.9 ± 1.3 and $3.7 \pm 4.5 \mu\text{mol/L}$, respectively; $n = 7$; $P = 0.10$), but they increased in the 0.5% ARD + IS group (5.1 ± 3.4 ; $n = 8$; $P = 0.001$) (Figure 5E). Paracresyl sulfate and indole acetic

acid levels were not detectable in the CSF of the three rat populations (data not shown).

Oral Sorbent AST-120 Treatment after ARD Decreased Serum Indoxyl Sulfate but Did Not Reverse BBB Dysfunction

AST-120 treatment after 0.5% ARD induced a significant decrease in serum IS level compared with control 0.5% ARD rats: 7.5 ± 3.7 versus $39.9 \pm 10.5 \mu\text{mol/L}$ ($n = 7$; $P = 0.04$), respectively (Figure 6A). Serum IS level remained higher in 0.5% ARD rats than in control rats: $5.5 \pm 1.4 \mu\text{mol/L}$ ($n = 7$; $P = 0.002$). There was no difference in brain content of ^{99m}Tc -DTPA between 0.5% ARD rats whether they were treated with AST-120 or not: $0.054\% \pm 0.001\%$ and $0.061\% \pm 0.005\%$ IA/g ($n = 7$; $P = 0.77$), respectively. Interestingly, brain content in ^{99m}Tc -DTPA remained higher in the 0.5% ARD rats than in the control rats: $0.015\% \pm 0.001\%$ IA/g ($n = 7-6$; $P = 0.0006$) (Figure 6B).

AhR Activation Was Involved in BBB Disruption and Cognitive Impairment

Compared with control AhR^{+/+} mice, the cerebral content of the ^{99m}Tc -DTPA ratio between D7 and D0 (D7/D0) was significantly higher after IS administration ($236\% \pm 56\%$ and $131\% \pm 13\%$, respectively; $n = 5$; $P = 0.008$) (Figure 7A). There was no difference in ^{99m}Tc -DTPA ratio D7/D0 between AhR^{-/-} mice whether they were supplemented with IS or

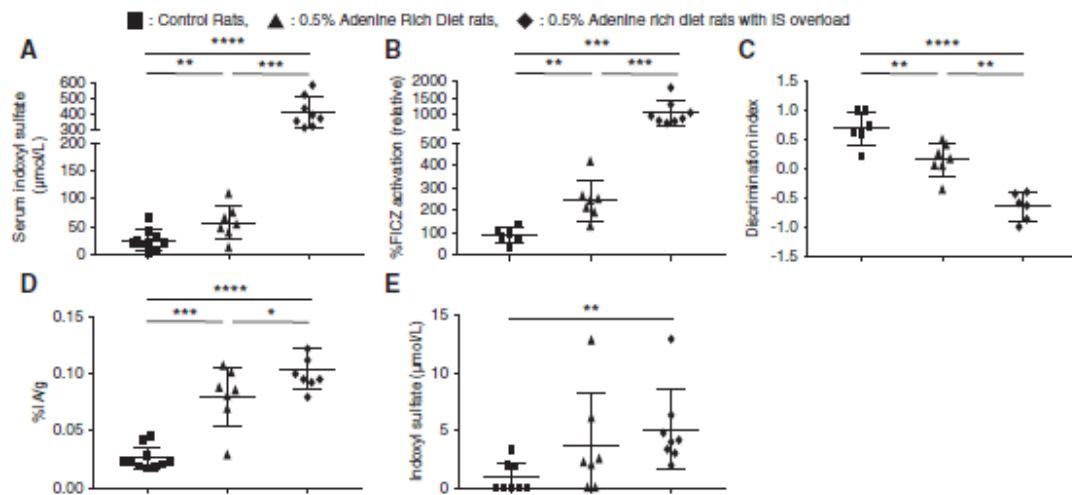


Figure 5. IS overload increased cognitive impairment and BBB disruption in 0.5% ARD rats. Evaluation of ARD rats with IS overload compared with control or 0.5% ARD rats. (A) Serum indoxyl levels at D28. (B) Relative AhR activation by the rats' serum (by percentage of FICZ) at D28. (C) Discrimination index of the NOR test. (D) Brain content of ^{99m}Tc -DTPA cerebral scintigraphy in percentage of injected activity by gram of brain (% IAVg). (E) IS levels in CSF. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$.

not ($97\% \pm 30\%$ versus $98\% \pm 27\%$; $n=5$; $P>0.99$). In wild-type mice, serum IS at D7 was higher after IS administration than in controls (34.6 ± 14.2 versus 19.8 ± 4.7 $\mu\text{mol/L}$; $n=5$; $P=0.04$). In AhR knockout mice, serum IS at D7 was higher after IS administration than in controls (41.5 ± 15.6 versus 15.9 ± 4.2 ; $n=5$; $P=0.002$) (Figure 7B). The discrimination index in the NOR test was lower in the wild-type mice submitted to IS challenge than in the control group: -0.14 ± 0.18 and 0.25 ± 0.24 , respectively ($n=5$; $P=0.03$). The discrimination index in the NOR test was not impaired in AhR $^{-/-}$ mice challenged with IS compared with AhR $^{-/-}$ control mice: 0.22 ± 0.17 and 0.19 ± 0.27 , respectively ($n=5$; $P>0.99$) (Figure 7C). The discrimination index in the OL test was lower in the AhR $^{+/+}$ mice submitted to IS challenge than in AhR $^{+/+}$ control mice: -0.17 ± 0.38 and 0.41 ± 0.19 , respectively ($n=5$; $P=0.01$). The discrimination index in the OL test was not impaired in AhR $^{-/-}$ mice challenged with IS compared with in AhR $^{-/-}$ control mice: 0.32 ± 0.22 and 0.25 ± 0.14 , respectively ($n=5$; $P=0.84$). (Figure 7D).

DISCUSSION

We report cognitive impairment associated with BBB permeability in three models of CKD in rats. We first highlighted neurobehavioral alterations in both 0.5% ARD and 5/6 nephrectomized rats. These animals did not develop sensory-motor impairment, but we showed impaired short-term learning performance in the NOR test, impaired spatial memory in the OL test, and impaired social memory, revealing an impaired cognitive function. This is consistent with clinical

reports about cognitive function in patients with CKD,^{3,8,9} without the somatosensorial or sensorimotor impairment, but to our knowledge, there are very few publications about cognitive dysfunction in animal models of CKD.^{51,52} For example, Mazumder *et al.*^{53,54} highlighted a decrease in cognitive function using a similar NOR paradigm in mice fed with 0.3% ARD. Interestingly, we showed a strong correlation with a significant linear regression between ^{99m}Tc -DTPA content in brain and discrimination index in NOR test. This statistical link suggests that the BBB leakage could contribute to cognitive dysfunction in CKD rats. Interestingly, there is an increasing literature highlighting a link between BBB disruption and cognitive dysfunction in various conditions, such as aging⁵⁵ and diabetes. Recently, Nation *et al.*³¹ suggested that BBB disruption may be a predictive marker of cognitive impairment in Alzheimer disease.

A few animal models of acute and chronic renal failure have shown BBB disruption in the setting of uremia,^{19,53,56} but underlying mechanisms remain unclear. In addition to ARD models, we performed 5/6 nephrectomy in rats in order to confirm that the BBB dysfunction and cognitive impairment described in ARD rats were the results of CKD and not of ARD by itself. Here, we report a strong correlation with a significant linear regression between IS in serum and ^{99m}Tc -DTPA in brain. This statistical link suggested that IS could contribute to BBB disruption. Thus, we challenged this hypothesis by an overload of IS in drinking water of 0.5% ARD rats. This induced a massive accumulation of IS in the serum in rats followed by an increase in BBB disruption compared with 0.5% ARD rats, suggesting a strong involvement of IS in BBB disruption. We challenged mice without CKD with IS in drinking

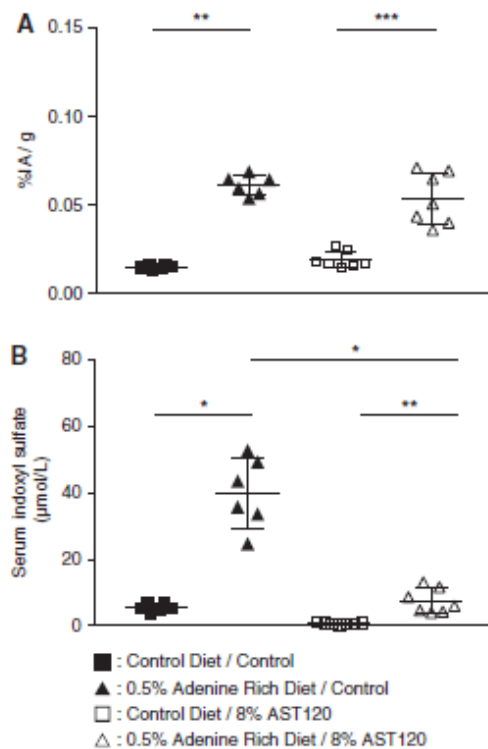


Figure 6. Oral sorbent AST-120 treatment after ARD decreased serum indoxyl sulfate but did not reverse BBB dysfunction in rats. Evaluation of a 4-week treatment with oral sorbent AST-120 after ARD in rats. (A) BBB dysfunction measured by brain content of ^{99m}Tc -DTPA cerebral scintigraphy expressed as percentage of injected activity per gram of brain (% IA/g). (B) Serum IS levels. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

water and confirmed that IS alone is sufficient to induce BBB disruption. The lack of increased BBB permeability in AhR^{-/-} mice challenged with IS validated the role of AhR in response to IS in BBB. Moreover, these experiments confirmed that IS-treated mice developed cognitive dysfunction in both the NOR test and the OL task, and these impairments were prevented in AhR^{-/-} mice. These results validate for the first time the involvement of the IS-AhR pathway in cognitive impairment and BBB dysfunction in the context of CKD.

Then, we confirmed that a 4-week uremic toxin sorbent AST-120 treatment decreased ARD-induced IS elevation in serum but did not resolve BBB permeability. These results suggest that the effect of CKD on BBB permeability impairment is persistent because CKD is established. These findings may be consistent with clinical outcomes because renal transplantation does not completely improve cognitive disorders in patients with CKD.¹²

Interestingly, we studied the activation of the AhR pathway by 0.5% ARD rats' serum *ex vivo* using AhR-AP, which

evaluates the overall load of AhR agonists in serum. We showed that 0.5% ARD rats' serum displayed a significant elevation of AhR-AP associated with IS elevation in serum, which is consistent with previous reports in human and mice.²⁶ Furthermore, the addition of IS in drinking water of 0.5% ARD rats increased their serum AhR-AP. These results are in favor of the involvement of IS-AhR in the vascular hypothesis of the development of cognitive disorders in CKD.³ Published data suggest a direct toxicity of IS in brain parenchyma,⁵⁷ especially oxidative stress, neuroinflammation, and apoptosis in neuron and astrocytes *in vitro* and *in vivo* in non-CKD mice. Moreover, 0.2% ARD in mice led to an increase in IS levels in brain,⁵⁸ and the authors suggested that this increase may be responsible for CKD-related cognitive decline. Unfortunately, cognitive function was not assessed in this model. Consistently, we demonstrated an increase in CSF levels of IS in 0.5% ARD rats challenged with IS in drinking water. This increase was associated with a higher cognitive impairment compared with 0.5% ARD rats. These results suggest a direct toxicity mediated by IS in CSF. However, we did not observe any increase in IS in CSF of ARD rats, which is not in favor of a potential direct toxicity of IS on brain tissue in this models. It is important to note that we showed a BBB dysfunction that was relatively moderate compared with the BBB breakdown that we previously described in other conditions, such as stroke⁴⁹ or subarachnoidal hemorrhage.⁵⁹ This suggests that IS could leak through BBB moderately. These results are in accordance with our hypothesis because BBB permeability is more impaired in ARD rats challenged with IS compared with ARD rats. Notwithstanding, we cannot rule out effectiveness of efflux transporters such as OAT. For example, IS is an OAT3 substrate, and OAT3 is expressed in the brain.⁶⁰

Thus, we suggest that IS-mediated BBB dysfunction and subsequent cognitive dysfunction resulted from endothelial toxicity through AhR activation. Uremic toxins have been reported to directly alter the integrity of both large- and small-vessel endothelial cells.⁶¹ To date, no data are available about IS toxicity in BBB models *in vitro*. However, IS decreased cerebral endothelial cell viability *in vitro* associated with a decrease in NO production and an increase in ROS production,⁶² highlighting an IS-induced oxidant stress on endothelial cells.⁶³ This is consistent with data reporting an AhR-mediated oxidative stress pathway in human vascular endothelial cells.⁶⁴ IS also induced increased TNF- α and IL-6 in mice serum *in vivo*⁵⁷ and in human central nervous system cells,⁶⁵ and it induced increased IL-6 expression in human vascular endothelial cells *in vitro*.⁶⁶ These results suggest a potential role of inflammatory cytokines as a mediator of IS effect. In addition, recent experiments highlight that uremia alters cell-to-cell junctions, leading to increased endothelial damage. Surprisingly, we did not show any decrease in tight junction proteins' expression in CKD rats' brains by western blot (Supplemental Figure 3). This may be explained by an alteration of phosphorylation and subcellular distribution of occludin, which increases the permeability of tight junctions without decreasing

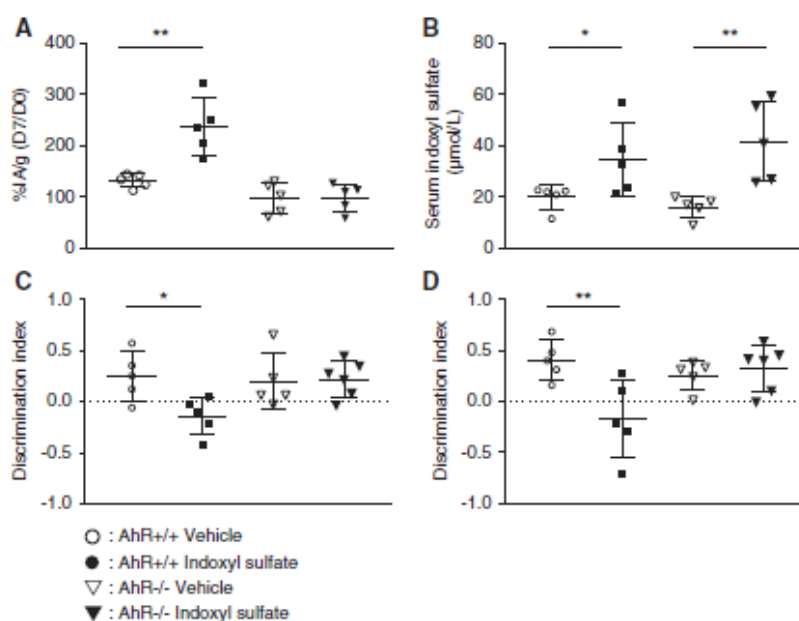


Figure 7. AhR activation was involved in indoxyl sulfate-induced BBB disruption and cognitive impairment in mice. (A) Relative brain content of ^{99m}Tc-DTPA cerebral scintigraphy in percentage of injected activity by gram of brain (%IA/g) in wild-type (AhR^{+/+}) and AhR knockout (AhR^{-/-}) mice at D7 compared with D0. (B) Serum IS in AhR^{+/+} and AhR^{-/-} mice at D7. (C) Relative AhR activation in vitro by the mice's serum expressed in percentage of the reference agonist FICZ. (D) Cognitive assessment by discrimination index in the NOR test and the OL test. **P*<0.05; ***P*<0.01.

protein expression.⁶⁷ Other junction proteins on BBB may also be involved. For example, Maciel *et al.*⁶⁸ demonstrated a significant decrease in VE-cadherin gene and protein expressions in endothelial cells treated with IS *in vitro*. Specific studies focusing on the characterization of the reorganization of junction proteins of BBB during CKD are needed.

Moreover, we did not find any change in serum indole acetic acid or paracresyl sulfate in our models. Velenosi *et al.*³⁴ reported an increase in serum pCS levels along with IS levels in rats fed with 0.7% ARD during 5 weeks. It is likely that our model induced milder CKD, but higher concentrations or duration of ARD would have resulted in severe weight loss and increased mortality.^{69,70} These results may not be incompatible with the behavioral cognitive assessment considered in our study with rats. To our knowledge, no other studies report indole acetic acid concentrations in rat CKD models. Finally, we did not assess other uremic toxins accumulation, like guanidino compounds, which may also have a direct neurotoxicity.⁷¹

In conclusion, we report for the first time in the literature the existence of a BBB permeability in three models of CKD in rats. The increased permeability of the BBB in animals with CKD is inversely correlated with cognitive performance and correlated with circulating IS levels. IS-induced activation of

AhR is a key phenomenon that may explain BBB disruption in the context of CKD.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ayano Konagai (Kureha Corporation, Tokyo, Japan) for providing AST-120. We also thank the Plateforme de Biochimie, Unité Mixte de Recherche 1149 Inserm, Université Paris Diderot, Equipe de Recherche Labellisée Centre Nationale pour la Recherche Scientifique 8252, Faculté de Médecine Site Bichat, Paris for performing biochemical tests.

The datasets used and/or analyzed during this study are available from the corresponding author on reasonable request.

M. Bobot, P. Brige, S. Burtey, F. Dignat-George, B. Guillet, and G. Hache designed the study; L. Balasse, M. Bobot, C. Céroni, S. Chopinet, S. Fernandez, P. Garrigue, G. Hache, N. McKay, A. Moyon, S. Poitevin, and L. Thomas carried out experiments; M. Bobot, B. Guillet, G. Hache, and L. Thomas analyzed the data; M. Bobot drafted the manuscript and the figures; S. Burtey, B. Guillet, and G. Hache revised it critically; and L. Balasse, M. Bobot, P. Brige, P. Brunet, S. Burtey, C. Céroni, S. Chopinet, F. Dignat-George, S. Fernandez, P. Garrigue, B. Guillet, G. Hache, N. McKay, A. Moyon, S. Poitevin, and L. Thomas read and approved the final manuscript.

DISCLOSURES

S. Burley reports personal fees from Otsuka, personal fees from Bayer, and personal fees from BMS outside the submitted work. All remaining authors have nothing to disclose.

FUNDING

This research was funded by Société Française de Néphrologie, Dialyse et Transplantation (French Society of Nephrology) grant end-stage renal disease and dialysis in 2018.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

This article contains the following supplemental material online at <http://jasn.asnjournals.org/lookup/suppl/doi:10.1681/ASN.2019070728/-/DCSupplemental>.

Supplemental Material.

Supplemental Figure 1. Clinical and biologic evaluation of control or 0.25% and 0.5% adenine-rich diet rats.

Supplemental Figure 2. Neurologic evaluation of rats fed with control or 0.5% adenine-rich diet.

Supplemental Figure 3. Western blot analysis of occludin, claudin-5, and zonula occludens-1 expressions in brains of control or 0.5% adenine-rich diet rats.

REFERENCES

- Gansevoort R, Correa-Rotter R, Hemmelgarn B, Jafar T, Heerspink H, Mann J, et al.: Chronic kidney disease and cardiovascular risk: Epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet* 382: 339–352, 2013
- Gaxatte C, Daroux M, Bloch J, Puisieux F, Deramecourt V, Boulanger E: [Cognitive impairment and chronic kidney disease: Which links?]. *Nephrol Ther* 7: 10–17, 2011
- Bugnacourt J-M, Godefroy O, Chillon J-M, Choukroun G, Massy Z: Cognitive disorders and dementia in CKD: The neglected kidney-brain axis. *J Am Soc Nephrol* 24: 353–363, 2013
- Yaffe K, Ackerson L, Kurella Tamura M, Le Blanc P, Kusek J, Sehgal A, et al.: Chronic Renal Insufficiency Cohort Investigators: Chronic kidney disease and cognitive function in older adults: Findings from the chronic renal insufficiency cohort cognitive study. *J Am Geriatr Soc* 58: 338–345, 2010
- Gupta A, Montgomery R, Bedros V, Lesko J, Mahnen J, Chakraborty S, et al.: Subclinical cognitive impairment and listing for kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 14: 567–575, 2019
- Burns C, Knopman D, Tupper D, Davey C, Slinin Y, Lakshminarayanan K, et al.: Prevalence and risk of severe cognitive impairment in advanced chronic kidney disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 73: 393–399, 2018
- Gesualdo G, Duarte J, Zazzetta M, Kusumoto L, Say K, Pavarini S, et al.: Cognitive impairment of patients with chronic renal disease on hemodialysis and its relationship with sociodemographic and clinical characteristics. *Dement Neuropsychol* 11: 221–226, 2017
- Krishnan A, Kiernan M: Neurological complications of chronic kidney disease. *Nat Rev Neurol* 5: 542–551, 2009
- Collins AJ, Foley RN, Herzog C, Chaves B, Gilbertson D, Ishani A, et al.: US renal data system 2010 annual data report. *Am J Kidney Dis* 57(1 Suppl 1): A8, e1–e526, 2011
- Seliger S, Siscovick D, Stehman-Breen C, Gillen D, Fitzpatrick A, Bleyer A, et al.: Moderate renal impairment and risk of dementia among older adults: The Cardiovascular Health Cognition study. *J Am Soc Nephrol* 15: 1904–1911, 2004
- Hartung E, Erus G, Jawad A, Laney N, Doshi J, Hooper S, et al.: Brain magnetic resonance imaging findings in children and young adults with CKD. *Am J Kidney Dis* 72: 349–359, 2018
- Chen H, Wen J, Qi R, Zhong J, Schoepf U, Varga-Szemes A, et al.: Re-establishing brain networks in patients with ESRD after successful kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 13: 109–117, 2018
- Chu N, Gross A, Shaffer A, Haugen C, Norman S, Xue Q-L, et al.: Frailty and changes in cognitive function after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 30: 336–345, 2019
- Ravera M, Busalino E, Paoletti E, Bellasi A, Di Lullo L, Fusaro M: Haemorrhagic and thromboembolic risk in CKD patients with non valvular atrial fibrillation: Do we need a novel risk score calculator? *Int J Cardiol* 274: 179–185, 2019
- Toyoda K, Ninomiya T: Stroke and cerebrovascular diseases in patients with chronic kidney disease. *Lancet Neurol* 13: 823–833, 2014
- Micozkadioglu H, Ozelsancak R, Giray S, Arlier Z: CKD is associated with recurrent ischemia but not with hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke patients. *Ren Fail* 36: 217–221, 2014
- Shima H, Ishimura E, Naganuma T, Ichii M, Yamasaki T, Mori K, et al.: Decreased kidney function is a significant factor associated with silent cerebral infarction and periventricular hyperintensities. *Kidney Blood Press Res* 34: 430–438, 2011
- Yao H, Takashima Y, Hashimoto M, Uchino A, Yuzuriha T: Subclinical cerebral abnormalities in chronic kidney disease. *Contrib Nephrol* 179: 24–34, 2013
- Lau W, Nunes A, Vasilevko V, Fiorioli D, Letpanit L, Savo J, et al.: Chronic kidney disease increases cerebral microbleeds in mouse and man. *Transl Stroke Res* 11: 122–134, 2020
- Polinder-Bos H, Elting J, Aries M, Garcia D, Willemsen A, van Laar P, et al.: Changes in cerebral oxygenation and cerebral blood flow during hemodialysis - a simultaneous near-infrared spectroscopy and positron emission tomography study. *J Cereb Blood Flow Metab* 40: 328–340, 2020
- Dou L, Sallée M, Cerini C, Poitevin S, Gondouin B, Jourde-Chiche N, et al.: The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J Am Soc Nephrol* 26: 876–887, 2015
- Azem M, Lando M, Grissi M, Kamel S, Massy Z, Chillon J-M, et al.: The impact of uremic toxins on cerebrovascular and cognitive disorders. *Toxins (Basel)* 10: E303, 2018
- Singh A, Pecoits-Filho R: Vascular damage in kidney disease: Beyond hypertension. *Int J Hypertens* 2011: 232683, 2011
- Lin Y-T, Wu P-H, Liang S-S, Mubanga M, Yang Y-H, Hsu Y-L, et al.: Protein-bound uremic toxins are associated with cognitive function among patients undergoing maintenance hemodialysis. *Sci Rep* 9: 20388, 2019
- Gondouin B, Cerini C, Dou L, Sallée M, Duval-Sabatier A, Plešnick A, et al.: Indolic uremic solutes increase tissue factor production in endothelial cells by the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Kidney Int* 84: 733–744, 2013
- Dou L, Poitevin S, Sallée M, Addi T, Gondouin B, McKay N, et al.: Aryl hydrocarbon receptor is activated in patients and mice with chronic kidney disease. *Kidney Int* 93: 986–999, 2018
- Kalachalama V, Shashar M, Alousi F, Shivanna S, Rijal K, Belghasem M, et al.: Uremic solute-aryl hydrocarbon receptor-tissue factor axis associates with thrombosis after vascular injury in humans. *J Am Soc Nephrol* 29: 1063–1072, 2018
- Latchney S, Hein A, O'Banion M, DiCicco-Bloom E, Opanashuk L: Deletion or activation of the aryl hydrocarbon receptor alters adult hippocampal neurogenesis and contextual fear memory. *J Neurochem* 125: 430–445, 2013
- Cuartero M, Ballesteros I, de la Parra J, Harkin A, Abautret-Daly A, Sherwin E, et al.: L-kynurenine/aryl hydrocarbon receptor pathway

- mediates brain damage after experimental stroke. *Circulation* 130: 2040–2051, 2014
30. Sweeney M, Zhao Z, Montagne A, Nelson A, Zlokovic B: Blood-brain barrier: From physiology to disease and back. *Physiol Rev* 99: 21–78, 2019
 31. Nation D, Sweeney M, Montagne A, Sagare A, D'Orazio L, Pachicano M, et al.: Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nat Med* 25: 270–276, 2019
 32. Schmidt J, Su G, Reddy J, Simon M, Bradfield C: Characterization of a murine Ahr null allele: Involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6731–6736, 1996
 33. Akiyama Y, Kikuchi K, Saigusa D, Suzuki T, Takeuchi Y, Mishima E, et al.: Indoxyl sulfate down-regulates SLCO4C1 transporter through up-regulation of GATA3. *PLoS One* 8: e66518, 2013
 34. Velenosi T, Hennop A, Feere D, Tieu A, Kucey A, Kyriacou P, et al.: Untargeted plasma and tissue metabolomics in rats with chronic kidney disease given AST-120. *Sci Rep* 6: 22526, 2016
 35. Griffin K, Picken M, Bidani A: Method of renal mass reduction is a critical modulator of subsequent hypertension and glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 4: 2023–2031, 1994
 36. Flecknell P: Rodent analgesia: Assessment and therapeutics. *Vet J* 232: 70–77, 2018
 37. Sotocinal S, Sorge R, Zaloum A, Tuttle A, Martin L, Wieskopf J, et al.: The rat grimace scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain* 7: 55, 2011
 38. Calaf R, Cerini C, Génovésio C, Verhaeghe P, Jourde-Chiche N, Bergé-Lefranc D, et al.: Determination of uremic solutes in biological fluids of chronic kidney disease patients by HPLC assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879: 2281–2286, 2011
 39. Wincent E, Amini N, Luecke S, Glatz H, Bergman J, Crescenzi C, et al.: The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J Biol Chem* 284: 2690–2696, 2009
 40. Wan X, Hou L-J, Zhang L-Y, Huang W-J, Liu L, Zhang Q, et al.: IKK α is involved in kidney recovery and regeneration of acute ischemia/reperfusion injury in mice through IL-10-producing regulatory T cells. *Dis Model Mech* 8: 733–742, 2015
 41. Liu S, Zhen G, Meloni B, Campbell K, Winn H: Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials (1st edition). *J Exp Stroke Transl Med* 2: 2–27, 2009
 42. Schallert T, Leasure J, Kolb B: Experience-associated structural events, subependymal cellular proliferative activity, and functional recovery after injury to the central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1513–1528, 2000
 43. Pellegrini L, Bemis Y, Velly L, Grandvuillemin I, Pisano P, Bruder N, et al.: Erythropoietin protects newborn rat against sevoflurane-induced neurotoxicity. *Paediatr Anaesth* 24: 749–759, 2014
 44. Bartolini L, Casamenti F, Pepeu G: Arbacetam restores object recognition impaired by age, scopolamine, and nucleus basalis lesions. *Pharmacol Biochem Behav* 53: 277–283, 1996
 45. Ennacour A, Delacour J: A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1. Behavioral data. *Behav Brain Res* 31: 47–59, 1988
 46. Hattiangady B, Mishra V, Kodali M, Shuai B, Rao X, Shetty A: Object location and object recognition memory impairments, motivation deficits and depression in a model of Gulf War illness. *Front Behav Neurosci* 8: 78, 2014
 47. Coutellier L, Beski S, Ardestani P, Saw N, Shamloo M, Npas4: A neuronal transcription factor with a key role in social and cognitive functions relevant to developmental disorders. *PLoS One* 7: e46604, 2012
 48. Barker G, Warburton E: Object-in-place associative recognition memory depends on glutamate receptor neurotransmission within two defined hippocampal-cortical circuits: A critical role for AMPA and NMDA receptors in the hippocampus, perirhinal, and prefrontal cortices. *Cereb Cortex* 25: 472–481, 2015
 49. Garrigue P, Giacomino L, Bucci C, Muzio V, Filannino M, Sabatier F, et al.: Single photon emission computed tomography imaging of cerebral blood flow, blood-brain barrier disruption, and apoptosis time course after focal cerebral ischemia in rats. *Int J Stroke* 11: 117–126, 2016
 50. Lancelot S, Roche R, Slimen A, Bouillot C, Levigoureux E, Langlois J-B, et al.: A multi-atlas based method for automated anatomical rat brain MRI segmentation and extraction of PET activity. *PLoS One* 9: e109113, 2014
 51. Fujisaki K, Tsuruya K, Yamato M, Toyonaga J, Noguchi H, Nakano T, et al.: Cerebral oxidative stress induces spatial working memory dysfunction in uremic mice: Neuroprotective effect of tempol. *Nephrol Dial Transplant* 29: 529–538, 2014
 52. Hanyama N, Fujisaki K, Yamato M, Eriguchi M, Noguchi H, Torisu K, et al.: Improvement in spatial memory dysfunction by telmisartan through reduction of brain angiotensin II and oxidative stress in experimental uremic mice. *Life Sci* 113: 55–59, 2014
 53. Mazumder M, Giri A, Kumar S, Borah A: A highly reproducible mice model of chronic kidney disease: Evidence of behavioural abnormalities and blood-brain barrier disruption. *Life Sci* 161: 27–36, 2016
 54. Mazumder M, Paul R, Bhattacharya P, Borah A: Neurological sequel of chronic kidney disease: From diminished Acetylcholinesterase activity to mitochondrial dysfunctions, oxidative stress and inflammation in mice brain. *Sci Rep* 9: 3097, 2019
 55. Montagne A, Barnes S, Sweeney M, Halliday M, Sagare A, Zhao Z, et al.: Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* 85: 296–302, 2015
 56. Liu M, Liang Y, Chigurupati S, Lathia J, Pletnikov M, Sun Z, et al.: Acute kidney injury leads to inflammation and functional changes in the brain. *J Am Soc Nephrol* 19: 1360–1370, 2008
 57. Adesso S, Magnus T, Cuzzocrea S, Campolo M, Rissiek B, Paciello O, et al.: Indoxyl sulfate affects glial function increasing oxidative stress and neuroinflammation in chronic kidney disease: Interaction between astrocytes and microglia. *Front Pharmacol* 8: 370, 2017
 58. Sato E, Saigusa D, Mishima E, Uchida T, Miura D, Morikawa-Ichinose T, et al.: Impact of the oral adsorbent AST-120 on organ-specific accumulation of uremic toxins: LC-MS/MS and MS imaging techniques. *Toxins (Basel)* 10: 19, 2017
 59. Lagier D, Tonon D, Garrigue P, Guillet B, Giacomino L, Martin J-C, et al.: Thromboxane-prostaglandin receptor antagonist, terutroban, prevents neurovascular events after subarachnoid haemorrhage: A nanoSPECT study in rats. *Crit Care* 23: 42, 2019
 60. Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H: Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem* 272: 18526–18529, 1997
 61. Jourde-Chiche N, Dou L, Cerini C, Dignat-George F, Brunet P: Vascular incompetence in dialysis patients—protein-bound uremic toxins and endothelial dysfunction. *Semin Dial* 24: 327–337, 2011
 62. Singhen A, Chillon J-M, Massy Z, Boullier A: Differential effects of indoxyl sulfate and inorganic phosphate in a murine cerebral endothelial cell line (bEnd.3). *Toxins (Basel)* 6: 1742–1760, 2014
 63. Dou L, Jourde-Chiche N, Faure V, Cerini C, Berland Y, Dignat-George F, et al.: The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J Thromb Haemost* 5: 1302–1308, 2007
 64. Watanabe I, Tatebe J, Namba S, Koizumi M, Yamazaki J, Morita T: Activation of aryl hydrocarbon receptor mediates indoxyl sulfate-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Circ J* 77: 224–230, 2013
 65. Adesso S, Patemiti I, Cuzzocrea S, Fujioka M, Autore G, Magnus T, et al.: AST-120 reduces neuroinflammation induced by indoxyl sulfate in glial cells. *J Clin Med* 7: 365, 2018
 66. Adelbieke Y, Yisimiyili M, Ng H-Y, Saito S, Nishijima F, Niwa T: Indoxyl sulfate induces IL-6 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells through OAT3-mediated uptake and activation of Ahr/NF- κ B pathway. *Nephron, Exp Nephrol* 128: 1–8, 2014

67. Kawedia J, Jiang M, Kulkarni A, Waechter H, Matlin K, Pauletti G, et al.: The protein kinase A pathway contributes to Hg²⁺-induced alterations in phosphorylation and subcellular distribution of occludin associated with increased tight junction permeability of salivary epithelial cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 326: 829–837, 2008
68. Maciel R, Cunha R, Busato V, Franco C, Gregório P, Dolenga C, et al.: Uremia impacts VE-cadherin and ZO-1 expression in human endothelial cell-to-cell junctions. *Toxins (Basel)* 10: 404, 2018
69. Diwan V, Brown L, Gobe G: Adenine-induced chronic kidney disease in rats. *Nephrology (Carlton)* 23: 5–11, 2018
70. Diwan V, Mistry A, Gobe G, Brown L: Adenine-induced chronic kidney and cardiovascular damage in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 68: 197–207, 2013
71. D'Hooge R, Pei Y, Marescau B, De Deyn P: Convulsive action and toxicity of uremic guanidino compounds: Behavioral assessment and relation to brain concentration in adult mice. *J Neuro Sci* 112: 96–105, 1992

AFFILIATIONS

¹Centre de Néphrologie et Transplantation Rénale, Hôpital de la Conception, Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

²Centre Européen de recherche en Imagerie Médicale, Aix Marseille Université, Centre National de la Recherche Scientifique, Marseille, France

³Centre de Recherche en Cardiovasculaire et Nutrition, Aix Marseille Université, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, Marseille, France

⁴Service de Radiopharmacie, Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

⁵Laboratoire d'Imagerie Interventionnelle Expérimentale, Aix-Marseille Université, Marseille, France

⁶Service de Chirurgie générale et transplantation hépatique, Hôpital de la Timone, Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

⁷Pharmacie, Hôpital de la Timone, Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

Supplementary Data

Supplementary material and methods

Protein extraction

Whole brains were immediately frozen at -80°C after being harvested. Brains were lysed in ice cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, pH 7.4) containing protease inhibitors (Complete mini, Roche Diagnostics France, Meylan, France). Lysates were incubated for 2 hours at 4°C with stirring. Then, lysates were sonicated for 1 minute and kept on ice for another minute between each pulse; this procedure was repeated 3 times. Then, lysates were centrifuged at 10 000 g during 10 minutes and supernatants were collected. Protein concentrations were measured with the Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination (BCA1, Sigma Aldrich, France).

Western blot analysis

Thirty µg of total protein from lysates were loaded on 4-12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide electrophoretic gel, and transferred onto a polyvinylidenedifluoride membrane. Nonspecific binding was blocked by immersing the membrane in 5% non-fat dry milk in TBST (20 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) for 2 hour, with gentle shaking. After saturation, the membrane was incubated overnight at 4°C with a primary antibody directed against occludin (1:1000 dilution; 33-1500, Fisher Scientific, Illkirch, France), claudin-5 (1:750 dilution; SAB4502981, Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) or zonula occludens-1 (1:750 dilution; 61-7300, Fisher Scientific, Illkirch, France) and actin (loading control, 1:1000 dilution; D6A8, Cell Signalling, Yvelines, France). After washing with TBST, membrane was further incubated with the secondary peroxidase-conjugated antibody (Beckman Coulter, Marseille, France) at a 1:2000 dilution for 1 hour at room temperature. Membranes were washed with TBS and revealed by chemoluminescence (ECL Western blotting substrate, Pierce, Courtaboeuf, France) and the gel image was captured using the Syngene GBox (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Densitometry analyses of chemiluminescence staining were performed with the software *geneSys* (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) and results were normalized with values obtained with actin.

Neurobehavioral test

The modified neurological severity score (mNSS) was used to evaluate the neurological function of animals through several previously described tests. This score ranges from 0 to 18, with 0 representing the absence of neurological deficit and 18 being the maximum deficit. This test was carried out on D29. The foot-fault test was used to evaluate the sensitivomotor function of animals. The rats were invited to walk on a horizontal scale of 77 bars. The bars were spaced two centimetres (cm) apart. A computer-assisted system (Locotronic, Bioseb®) records the wrong steps (passage of a paw between two bars). The animals were habituated to walk the ladder and three rungs of the ladder were removed during the

evaluation. We measured the number of faults and the time required to cross the entire corridor. The animals performed this test on D29.

We used the adhesive removal test² to determine the effects of brain damage on sensory-motor behaviour. The adhesive paper was placed so that it surrounds the paw of the animal which is subsequently placed in a cage. We measured the latency to realize the presence of the adhesive paper, and the time taken to remove it (in seconds). Each animal was tested four times, twice with the adhesive placed on each foreleg. After each pass, the cage was cleaned. The test ended when the animal removes the adhesive from its paw or the three minutes have elapsed. The somatosensory deficits were graded on a score of 0 to 5 (as described by Moubarik et al.³ with slight modifications): [0: the animals do not feel the attached adhesive and do not remove it; 1: the animals feel the adhesive but cannot remove it within 3 minutes; 2: the animals remove the adhesive between 2 and 3 minutes; 3: the animals removing the adhesive between 1 and 2 minutes; 4: the animals removing the adhesive between 10 and 60 seconds; 5: animals removing the adhesive between 0 and 10 seconds]. This test was carried out at D29.

Supplementary results

Impact of adenine rich diet on weight, food consumption and blood pressure in rats

The weight curves of the rats are presented in **Supplementary Figure 1A**. Average weekly food consumption by rat was 168.1 ± 12.1 g in the control group vs. 149.3 ± 10.1 g in the 0.25% ARD group ($P=0.20$) and 92.0 ± 16.7 g in the 0.5% ARD group ($n=8$; $P<0.0001$). At D28, both systolic and diastolic blood pressures were higher in the 0.5% ARD group than in the control group: 157.3 ± 11.6 mmHg and 130.0 ± 9.9 mmHg respectively ($n=6$; $P=0.004$) and 97.8 ± 13.6 mmHg and 80.5 mmHg ± 10.2 mmHg ($n=6$; $P=0.026$), respectively.

Adenine rich diet induced dose dependent biological CKD phenotypes

There was a significant increase in plasma creatinine over time compared with the control group in the 0.5% ARD group ($n=8$; $P=0.0004$) but not in the 0.25% ARD group ($n=8$; $P=0.64$). At day 28, the average creatinine was 39.5 ± 3.0 $\mu\text{mol/L}$ in the control group vs. 55.5 ± 5.4 $\mu\text{mol/L}$ in the 0.25% ARD group and 157.8 ± 31.9 $\mu\text{mol/L}$ in the 0.5% ARD group ($P=0.048$ and $P<0.0001$, respectively; $n=8$). There was a significant increase in plasma urea over time compared to the control group in the 0.5% ARD group ($P=0.0002$) but not in the 0.25% ARD group ($n=8$; $P=0.81$). At day 28, the average urea was 6.7 ± 1.0 mmol/L in the control group vs. 13.7 ± 1.9 mmol/L in the 0.25% ARD group ($P=0.043$) and 42.1 ± 8.8 mmol/L in the 0.5% ARD group ($P<0.0001$); $n=8$ (**Supplementary Figure 1B, 1C**).

Renal failure did not induced sensorimotor nor somato-sensorial impairment

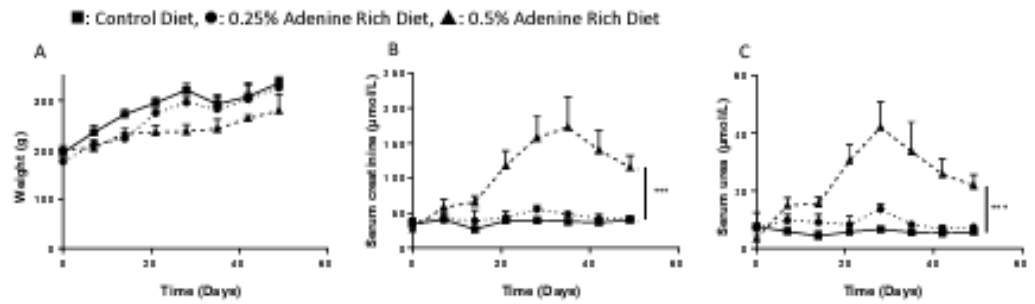
The mNSS score was not different between the control and 0.5% ARD groups (**Supplementary Figure 2A**). The number of faults and the crossing time at the foot-fault test were not different between the control and 0.5% ARD groups (**Supplementary Figures 2B, 2C**). The ART score was not different between the control and 0.5% ARD groups for the right and left paws (**Supplementary Figure 2D**).

0.5% ARD did not modify the expression of tight junction proteins, occludine, claudin5 and ZO-1 in rat brains compared to control (**Supplementary Figure 3**).

Supplementary references

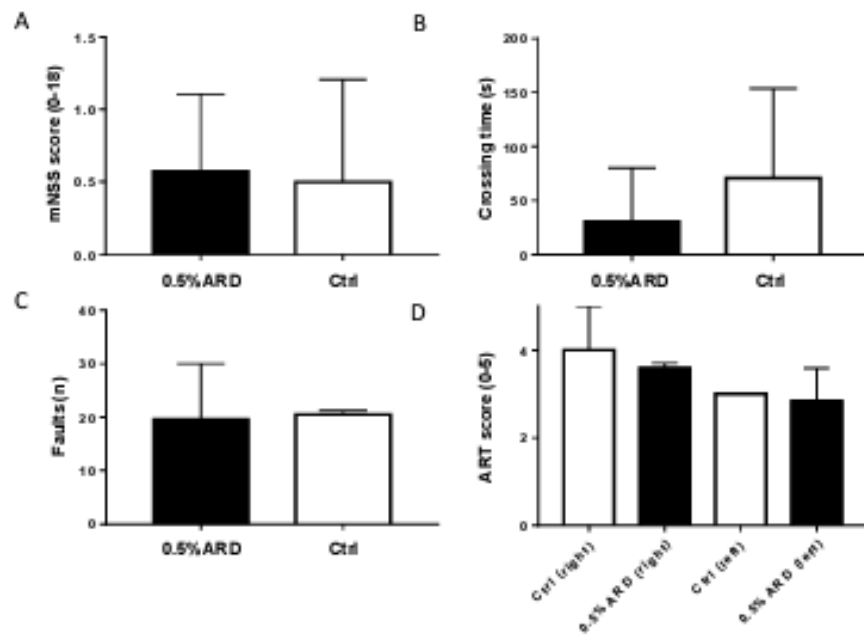
1. Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M: Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32: 1005–1011, 2001
2. Schallert T, Upchurch M, Wilcox RE, Vaughn DM: Posture-independent sensorimotor analysis of inter-hemispheric receptor asymmetries in neostriatum. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18: 753–759, 1983
3. Moubarik C, Guillet B, Youssef B, Codaccioni J-L, Piercecchi M-D, Sabatier F, Lionel P, Dou L, Foucault-Bertaud A, Velly L, Dignat-George F, Pisano P: Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke. *Stem Cell Rev.* 7: 208–220, 2011

Supplementary Figure 1



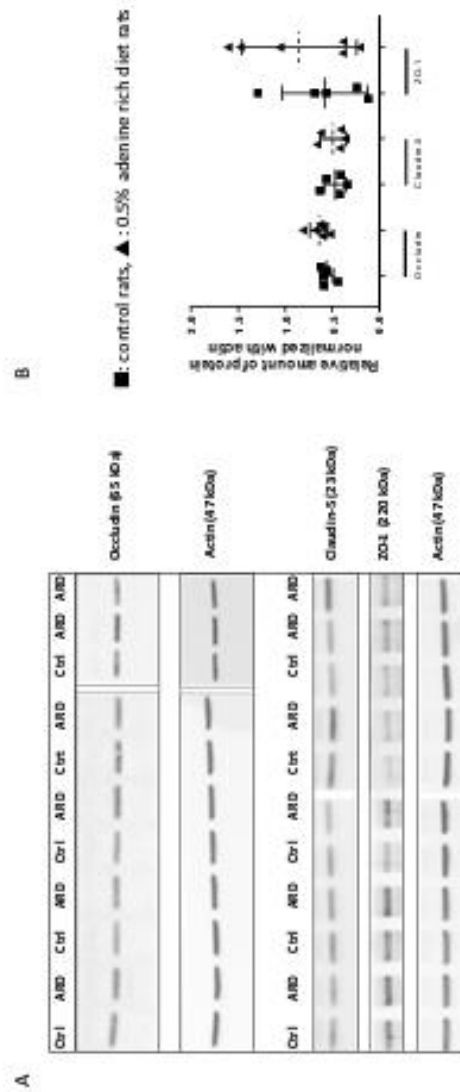
Suppl Figure 1: Clinical and biological evaluation of control or 0.25% and 0.5% Adenine Rich Diet rats. (A) Weight variation over time, (B) Serum creatinine over time, (C) Serum urea over time, ***: $P < 0.001$

Supplementary Figure 2



Suppl figure 2: Neurological evaluation of rats fed with control (Ctrl) or 0.5% Adenine Rich Diet (ARD) (A) mNSS score, (B) Crossing time during Foot-Fault Test, (C) Number of faults during Foot-Fault Test, (D) Adhesive Removal Test (ART) score

Supplementary Figure 3



Suppl figure 3: Western blot analysis of occludin, claudin-5 and zonula occludens-1 (ZO-1) expressions in brains of control or 0.5% adenine rich diet (ARD) rats. (A) representative blots, (B) relative quantification.

3. Conséquences neurologiques de l'insuffisance rénale aiguë

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire CORAKID (*COmmon and RAre Kidney Diseases*), INSERM UMR_S1155, Hôpital Tenon, Paris, Sorbonne Université, au cours d'une année de mobilité universitaire.

L'objectif du projet est de mettre en évidence l'influence de l'insuffisance rénale aiguë (IRA) sur les atteintes cérébrales, dans un modèle pré-clinique chez la souris et de déterminer s'il existe une altération de la perméabilité de la BHE après une IRA, et les mécanismes impliqués dans cette altération.

3.1 Méthodologie

Tous les animaux sont des souris mâles C57Bl/6J fournis par l'éleveur Janvier®. Ils sont livrés à l'âge de 7 semaines. Une période d'acclimatation de 2-3 semaines est respectée avant le début des procédures. Les animaux sont donc soumis aux procédures à l'âge de 9-10 semaines.

Les nuisances seront réduites au maximum grâce à l'utilisation de mesures de raffinement appropriées. Les animaux sont hébergés dans des cages ventilées à une température de 21-22°C avec un cycle jour/nuit 7h/19h. Le bien-être des animaux est assuré par un enrichissement de leur environnement. Les animaux étaient observés et pesés quotidiennement pendant toute la durée du protocole.

Ischémie rénale

L'ischémie rénale était réalisée selon la procédure RIRI, incluant un nouveau système de clampage développé par le laboratoire CORAKID, à l'aide d'un fil de suture (2.0, polyester) et d'une tubulure d'1mm de diamètre en plastique souple décrit par Verney *et al.* (153) (**Annexe 1**). Ce système permet de clamer le pédicule vasculaire rénal sur un animal vigile avec une température corporelle normale. Cette procédure permet de réduire la variabilité liée à l'hypothermie secondaire à une anesthésie profonde. Le déroulement de la procédure était le suivant :

(1) Analgésie - Anesthésie : les animaux recevaient une injection sous-cutanée de buprénorphine (0,05mg/kg) 30 minutes avant l'anesthésie. Les souris étaient anesthésiées par administration d'un mélange de kétamine (100mg/kg) et de xylazine (10mg/kg) par voie intra-péritonéale. Le flanc gauche est rasé tandis que le flanc droit est épilé pour la mesure du DFG. Les deux flancs étaient ensuite désinfectés à la bétadine.

1. Néphrectomie : la souris était placée en décubitus latéral gauche sur une plaque thermostatée à 37°C. Le rein droit était exposé grâce à une incision du flanc droit au niveau dorsal, postérieurement au volet costal. La veine et l'artère rénales ainsi que l'uretère étaient ligaturés puis le rein est excisé. La plaie était recousue (plan musculaire puis plan cutané) avec du fil de soie 4.0.

3. Pose du clamp immédiatement après la néphrectomie :

a. La souris était placée en décubitus latéral droit. Incision longitudinale de 2cm débutant sous le rebord costal gauche vers la queue, 3mm latéralement à la ligne des épineuses, en regard de la loge du rein gauche. Le rein gauche était sorti avec traction sur la graisse péri-rénale.

b. Libération du pédicule rénal, par écartement de la graisse et des séreuses à la pince mousse. Le fil et les tubes sont passés autour du pédicule vasculaire et les tubes placés de part et d'autre du pédicule, à son contact, de sorte que les extrémités du fil ressortent vers la face ventrale.

c. Incision latérale gauche à 1cm de l'émergence de la queue, passage de deux fils de suture parallèles, à la portion caudale de l'incision (futurs points de fixation du cathéter). Tunnelisation sous-cutanée du cathéter de sorte que l'extrémité souple arrive au contact du pédicule rénal, et que la partie solide ressorte de l'incision caudale à partir de sa languette. Fixation de la portion solide du cathéter à la peau de la souris.

d. Passage des deux extrémités libres du fil dans le cathéter de sorte qu'ils ressortent par la portion solide. Blocage des fils en fermant le cathéter avec son bouchon.

e. Fermeture du plan cutané. Souris replacée en cage pour le réveil, avec nourriture humidifiée et eau dans une couveuse à 32°C jusqu'au réveil complet puis à 28°C pendant 24h.

Après chirurgie, les animaux étaient hébergés dans une couveuse à 32°C jusqu'au réveil complet puis à 28°C pendant 24h.

4. Ischémie : l'ischémie est réalisée 24h après la pose du clamp.

a. Induction d'une anesthésie générale gazeuse dans une boîte d'induction : air 2L/min, débit 2L/min et isoflurane 2 à 3L/min pendant 1 minute.

b. Une fois sédaturée, la souris était placée sur une plaque thermostatée à 37°C. La partie solide du cathéter était maintenue pour éviter tout mouvement par rapport à la souris, le bouchon du cathéter est retiré et les fils tirés de sorte à fermer le clamp sous bonne tension. Plusieurs durées d'ischémie rénale ont été testées au préalable pour identifier l'intensité d'IRA associée à une atteinte neurologique suffisante pour la suite de nos expériences. Une fois en tension, le bouchon était replacé en maintenant la tension jusqu'à ce que le bouchon soit bien en place.

c. La souris était replacée dans la couveuse à 34°C pendant la durée souhaitée d'ischémie, pour éviter une baisse de la température corporelle.

d. Deux minutes avant la fin de l'ischémie, nouvelle anesthésie générale gazeuse selon le protocole ci-dessus. Le clamp était desserré à la fin du temps d'ischémie en enlevant le bouchon du cathéter, en repoussant les fils puis en refermant le bouchon. La souris est replacée dans sa cage, dans la couveuse à 28°C.

Les animaux ayant eu la procédure complète sont dénommés RIRI, suivi de la durée d'ischémie (ex : RIRI20 pour une IRA avec une ischémie de 20 minutes).

Les animaux du groupe contrôle n'ont eu que la procédure d'anesthésie. Les animaux du groupe ischémie-reperfusion sans néphrectomie (IR) n'auront pas la procédure de néphrectomie.

De la buprénorphine à 0,05 mg/kg était administrée par voie sous-cutanée 6-8h, 24h, 36h et 48h après chirurgie (pour les animaux gardés plus de 24h après ischémie), afin de prévenir et d'atténuer la douleur péri-opératoire.

Jusqu'au réveil complet de l'animal, les animaux étaient hébergés dans une couveuse à 32°C. Cette température est ensuite abaissée à 28°C pendant 24-48h selon l'état général des animaux.

Evaluation du débit de filtration glomérulaire par mesure de la clairance plasmatique de la sinistrine couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC)

Il est indispensable de pouvoir mesurer le débit de filtration glomérulaire (DFG), pour évaluer la gravité de l'altération de la fonction rénale dans au cours des modèles murins d'insuffisance rénale aiguë ou chronique, notamment du fait de la variabilité inhérente à notre modèle. La technique que nous utilisons est celle de la mesure de la clairance de la sinistrine couplée au FITC par voie-transdermique, mise au point par la société MediBeacon® (154). Le déroulement de la mesure du DFG est le suivant :

1. Installation du capteur Medibeacon®

La souris est anesthésiée à l'isoflurane 2% et placée sur un plateau chauffant avec un masque pour le maintien de l'anesthésie. La caméra miniature Medibeacon® est collée sur la peau à l'aide d'un patch double-face. La caméra est protégée à l'aide d'un sparadrap tissé disposé autour de l'animal. L'enregistrement en continu de la fluorescence débute dès que le capteur est posé. Afin de mesurer le bruit de fond, un enregistrement de 5 minutes est nécessaire avant l'injection IV de la Sinistrine.

2. Préparation et injection de la Sinistrine

La Sinistrine-FITC est diluée à la dose de 20 mg/mL dans du PBS 1x. Elle était injectée dans le sinus rétro-orbitaire à l'aide d'une seringue à insuline 26G à la dose de 75mg/kg. Le volume nécessaire de sinistrine-FITC est ajusté à 100µl avec du sérum physiologique.

3. Mesure du DFG

Après l'injection de sinistrine, l'animal était placé dans une cage individuelle pendant 2 heures dans la couveuse à 28°C. Cet isolement est nécessaire car les autres animaux pourraient abîmer ou arracher la caméra.

Après 2 heures, l'animal était de nouveau anesthésié très légèrement à l'isoflurane 1,5% pour faciliter l'enlèvement du sparadrap et de la caméra. L'animal était ensuite replacé dans sa cage d'origine, avec sa fratrie, dans la couveuse à 28°C.

Cette procédure était effectuée à J1 soit au lendemain de l'ischémie-reperfusion rénale. Cette technique repose sur la mesure de la quantité de fluorescence émise par un traceur exogène dans la circulation dermique au cours du temps. Ce traceur est la sinistrine conjuguée au fluorescéine-isothiocyanate (FITC). La décroissance de la fluorescence dans

la circulation dépend donc directement de la capacité de filtration du rein. Le système de mesure se compose d'un détecteur de fluorescence miniaturisé qui est collé sur la peau du dos d'animaux conscients et se déplaçant librement.

Evaluation neuro-comportementale

L'atteinte neurologique des animaux était évaluée selon le score de gravité neurologique mini neurological severity score (mNSS), un des scores les plus utilisés en évaluation neurocomportementale et validé chez la souris (155). Il permet d'évaluer les atteintes somato-sensitives, sensorimotrices, l'équilibre, les réflexes et l'existence de mouvements anormaux. Le score mNSS a l'avantage d'être simple et de nécessiter peu de matériel. L'évaluation était réalisée à J-1, J0, J1 et J2 de l'ischémie, dans une enceinte, située dans une pièce calme dédiée du laboratoire (***Annexe 2 et 3***).

Evaluation de la perméabilité de la BHE

- Par quantification du Bleu Evans

Le protocole de quantification cérébrale du Bleu Evans était inspiré de celui décrit par Radu & Chernoff (119). Les cerveaux étaient incubés dans 200 µL de formamide dans une étuve à 56°C pendant 24h afin d'extraire le Bleu Evans du tissu. Le mélange formamide/Bleu Evans était centrifugé puis l'absorbance était mesurée par spectrophotométrie (lecteur de plaques Tecan Infinite M Plex, logiciel d'analyse Tecan i-control 2.0) et exprimée en densité optique rapportée au poids du cerveau (%OD/g).

- Par imagerie isotopique cérébrale

Le générateur à base de TiO₂ GalliaPharm® de Eckert & Ziegler (Allemagne) a été élué avec du HCl 0,1N (5mL). La réaction de complexation du ⁶⁸Ga a été réalisée à un chauffage conventionnel à 90/95 °C pendant 10 min ou à RT pendant 10 min avec la trousse Technescan® 20 mg de DTPA diluée dans un tampon acétate 2M (Hospira, 50 µL pour 1mL de ⁶⁸Ga³⁺).

Les souris étaient injectées par voie intraveineuse (cathéter de la veine caudale) avec 3 à 7 MBq de traceur ⁶⁸Ga-DTPA dans 100 µL de PBS.

Les imageries TEP/tomodensitométrie (CT) du corps entier des souris injectées avec le ⁶⁸Ga-DTPA ont été réalisées sous anesthésie générale par l'appareil PET/CT nanoScan (Mediso Medical Imaging Systems Ltd., Budapest, Hongrie) en utilisant un lit multiple (3 souris simultanément) 30 minutes après l'injection. L'anesthésie a été induite et maintenue par l'administration d'un mélange d'isoflurane (1,5-2,5%) et d'oxygène. L'acquisition de CT a eu lieu immédiatement après l'acquisition PET en utilisant la même position de lit.

Les fichiers de TEP et de CT ont été fusionnés et convertis en images de valeur d'absorption standardisée (SUV) à l'aide du logiciel Nucline 2.03 (Mediso Medical Imaging Systems, Hongrie). Les images ont été analysées (**Annexe 4**) et la quantification a été faite en utilisant une technique de ROI dans la le cœur et le cerveau. L'activité du DTPA est exprimée en ratio cerveau/cœur et la captation cérébrale en pourcentage de la radioactivité totale injectée par souris par gramme (%IA/g).

Injection de Bleu Evans et mise à mort par perfusion intra-cardiaque sous anesthésie générale

Pour mettre en évidence l'existence d'une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, le test au Bleu Evans est la méthode de référence (118). La diffusion intra-parenchymateuse cérébrale de Bleu Evans était évaluée sur cerveau total par spectrophotométrie. Pour ce faire une injection de Bleu Evans d'une dose poids de 100µL par 10g de Bleu Evans (dilué à 5 mg/mL dans du PBS 1X filtré) en rétro-orbitaire après anesthésie halogénée à l'Isoflurane (induction 5%, entretien 2,5%). Les animaux seront placés dans une couveuse à 28°C. A 30 minutes de l'injection de Bleu Evans une anesthésie générale par injection intra-péritonéale d'un mélange Kétamine/Xylazine (kétamine 44mg/kg, Xylazine 8mg/kg) sera réalisée, puis une perfusion intra-cardiaque au NaCl 0,9% (visant à laver les vaisseaux cérébraux des hématies et du Bleu Evans). Le cerveau était ensuite récupéré pour analyse de la perméabilité de la BHE après la mort des animaux.

Immuno-histochimie cérébrale

Une partie des cerveaux des animaux ont été fixés dans le paraformaldéhyde à 4% puis transférés dans des solutions de sucrose à 10% puis 30% puis congelés à -80°C, afin de réaliser une analyse en immunofluorescence sur coupes histologiques de 6µm d'épaisseur. Les anticorps fluorescents utilisés étaient : un anticorps anti-NeuN pour le marquage neuronal (1/100, rabbit, Thermofisher®), un anticorps anti-GFAP pour le marquage astrocytaire (1/200, rabbit, Cell Signaling®), un anticorps anti-Vimentine pour le marquage des astrocytes activés et des vaisseaux (1/500, rabbit, Abcam®), un anticorps anti-IBA1 pour le marquage microglial (1/200, rabbit, Genetex®) et un anticorps anti-CD163 pour le marquage de la microglie activée et des macrophages péri-vasculaires (1/250, rat, Thermofisher®), et pour les protéines de jonctions serrées endothéliales un anticorps anti-occludine (1/400, rabbit, Thermofisher®) et anti-ZO-1 (1/100, rabbit, Thermofisher®). Les images ont été acquises avec le microscope Olympus BX51 et le logiciel AnalySIS® FIVE 5.0 et analysées avec le logiciel ImageJ 1.53t (NIH, USA).

Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type (standard). Les comparaisons de médianes ont été réalisées par test de Mann-Whitney et test de Kruskal-Wallis (pour les valeurs répétées dans le temps ou la comparaison de plusieurs groupes). Tous les tests étaient non paramétriques et bilatéraux. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant les logiciels Microsoft® Excel et GraphPad® Prism 8.0; un risque α inférieur à 0,05 était considéré significatif.

Ces travaux ont été réalisés en suivant la directive européenne 2010/63/EU, les recommandations de la déclaration d'Helsinki et sont approuvés par le comité d'éthique local de Sorbonne Université et soumis pour approbation au ministère de la recherche de de l'enseignement supérieur, et enregistré sous le numéro APAFiS #38341.

Le plan expérimental de nos expériences est présenté en **Figure 11**.

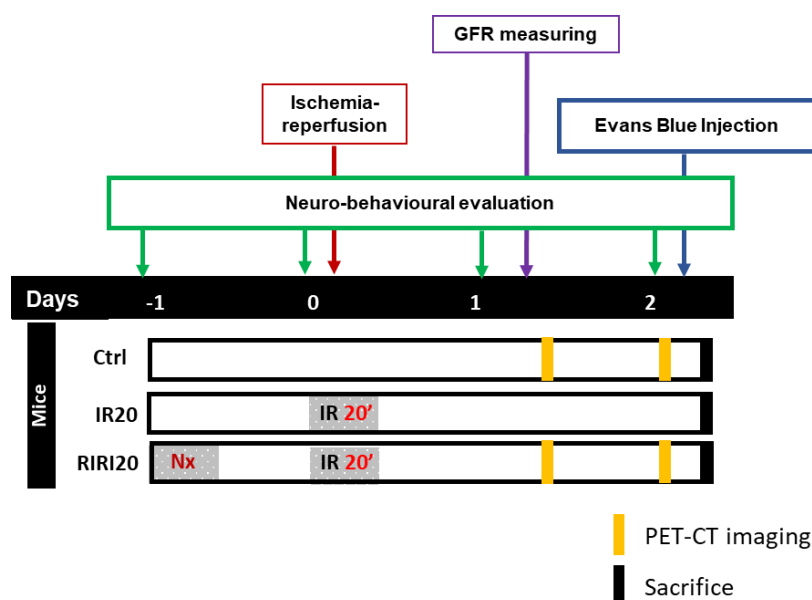


Figure 11 : Plan expérimental. Ctrl : Souris contrôle. IR20 : Ischémie-reperfusion rénale unilatérale de 20 minutes sans néphrectomie. RIRI20 : Ischémie-reperfusion rénale de 20 minutes après néphrectomie controlatérale. GFR : Débit de filtration glomérulaire. Nx : Néphrectomie. IR : Ischémie-reperfusion.

3.2 Résultats

L'évolution du poids des animaux est présentée dans la **Figure 12A**. Le DFG moyen mesuré à J1 était de $0,21 \pm 0,26$ g dans le groupe RIRI20, $0,94 \pm 0,13$ g dans le groupe contrôle et $0,75 \pm 0,18$ g dans le groupe IR20 ($p < 0,0001$, et $p = 0,0007$), respectivement (**Figure 12B**).

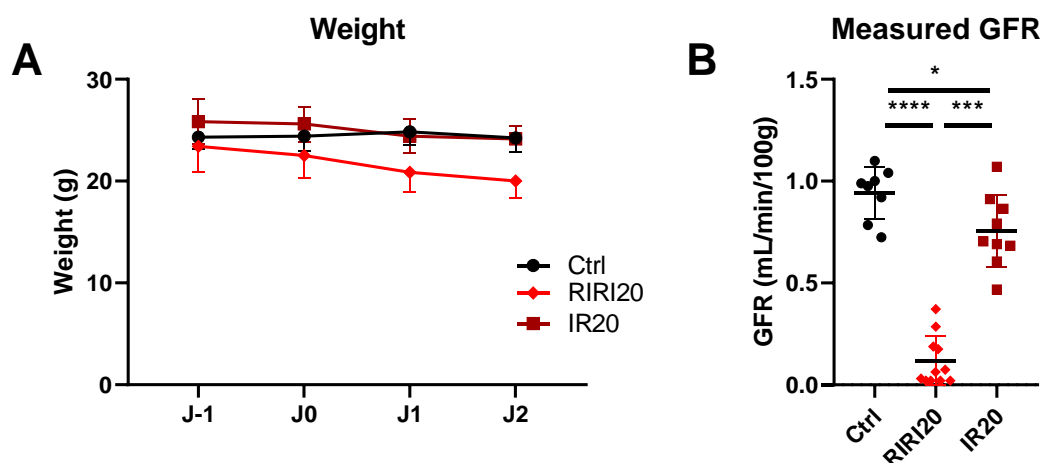


Figure 12 : A : Evolution du poids des animaux. B : Débit de filtration glomérulaire (Glomerular Filtration Rate - GFR) mesuré à J1. * : $p < 0,05$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$

Evaluation neurologique

A J-1 et J0 (après la néphrectomie pour les groupes RIRI) les animaux n'avaient aucun déficit neurologique évalué par le mNSS. Plusieurs temps d'ischémie rénale ont été évalués (0, 10, 17 et 20 minutes) après néphrectomie controlatérale, ou sans avec 20 minutes d'ischémie (IR20). Seuls les animaux du groupe RIRI20 présentaient une atteinte neurologique significative à J1 et J2 par rapport aux animaux contrôle : A J1 $2,5 \pm 4,4$ vs $0,0 \pm 0,0$, $p = 0,0005$ et à J2 $1,2 \pm 1,9$ vs $0,1 \pm 0,3$, $p = 0,009$. Les animaux du groupe IR20 ne présentaient pas d'atteinte neurologique plus importante que les animaux du groupe contrôle à J1 ni à J2 ($p > 0,99$ et $p = 0,59$, respectivement). L'évolution du score mNSS était différente entre les groupes contrôle, RIRI20 et IR20 ($p = 0,03$) (**Figure 13**).

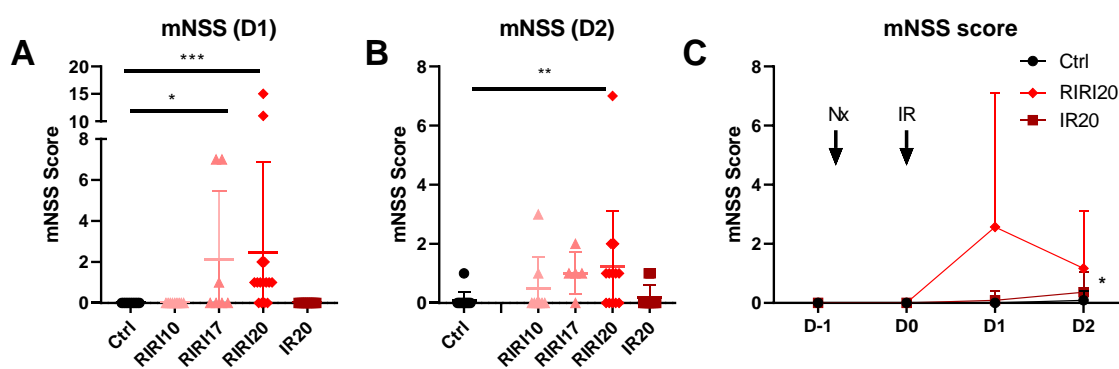


Figure 13 : Evaluation neurologique des animaux. A & B : Evolution du score mini Neurological Severity Score (mNSS) en fonction de différents temps d'ischémie, avec ou sans néphrectomie à J1 (A) et J2 (B). C : Evolution du score mNSS en fonction du temps entre les groupes contrôle (Ctrl) et ischémie reperfusion de 20 minutes avec (RIRI20) ou sans néphrectomie (IR20). Nx : Néphrectomie. IR : Ischémie-reperfusion rénale. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$

Quantification de la perméabilité de la BHE par au Bleu Evans

Le poids moyen des hémisphères cérébraux dans les groupes Contrôle, RIRI20 et IR20 était de $0,195 \pm 0,022$ g, $0,195 \pm 0,041$ et $0,195 \pm 0,019$ respectivement, et n'étaient pas différents ($p=0,92$ et $p=0,97$) (**Figure 14A**).

La quantification de la densité optique de Bleu Evans tendait à être plus importante dans le groupe RIRI20 que dans le groupe contrôle $2,39 \pm 0,86$ DO/g vs. $1,78 \pm 0,66$ ($p=0,10$) et plus importante que dans le groupe IR20 $1,11 \pm 0,43$ ($p=0,0006$) (**Figure 14B**).

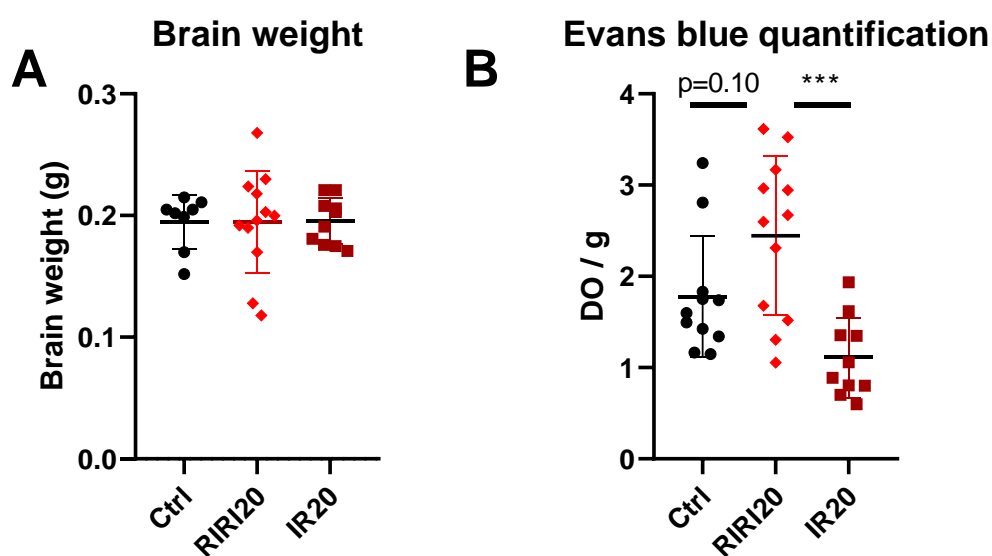


Figure 14 : Evaluation de la perméabilité de la BHE. A & B : Evolution du score mini Neurologic Severity Score (mNSS) en fonction de différents temps d'ischémie, avec ou sans néphrectomie à J1 (A) et J2 (B). **C :** Evolution du score mNSS en fonction du temps entre les groupes contrôle (Ctrl) et ischémie reperfusion de 20 minutes avec (RIRI20) ou sans néphrectomie (IR20).
Nx : Néphrectomie. IR : Ischémie-reperfusion rénale. *** : $p < 0,001$

Quantification de la perméabilité de la BHE par TEP au ^{68}Ga -DTPA

Les animaux du groupe RIRI20 présentait une fixation cérébrale du ^{68}Ga -DTPA plus importante que les animaux du groupe contrôle à J1 : $1,68 \pm 0,23$ vs. $0,77 \pm 0,54$ %AI/g, $p=0,004$, ainsi qu'à J2 : $1,90 \pm 0,38$ vs. $0,93 \pm 0,38$ %AI/g, $p=0,009$ (**Figure 15A**).

Les animaux du groupe RIRI présentait une fixation cardiaque du ^{68}Ga -DTPA plus importante que les animaux du groupe contrôle à J1 : $8,96 \pm 1,86$ %IA/g vs. $3,27 \pm 1,74$ %AI/g, $p=0,0006$, ainsi qu'à J2 : $8,72 \pm 1,95$ % IA/g vs. $5,25 \pm 2,14$ %AI/g, $p=0,02$, reflet de la radioactivité circulante (**Figure 15B**). De fait, les ratios des fixations cardiaques / cérébrales n'étaient pas différentes dans les deux groupes (**Figure 15C**). Cependant, il existait une augmentation du rapport des fixations cérébrale / cardiaque du DTPA entre

J1 et J2 dans le groupe RIRI20, par rapport au groupe DTPA $1,124 \pm 0,30$ vs. $0,81 \pm 0,17$ %AI/g, $p=0,03$ (Figure 15D).

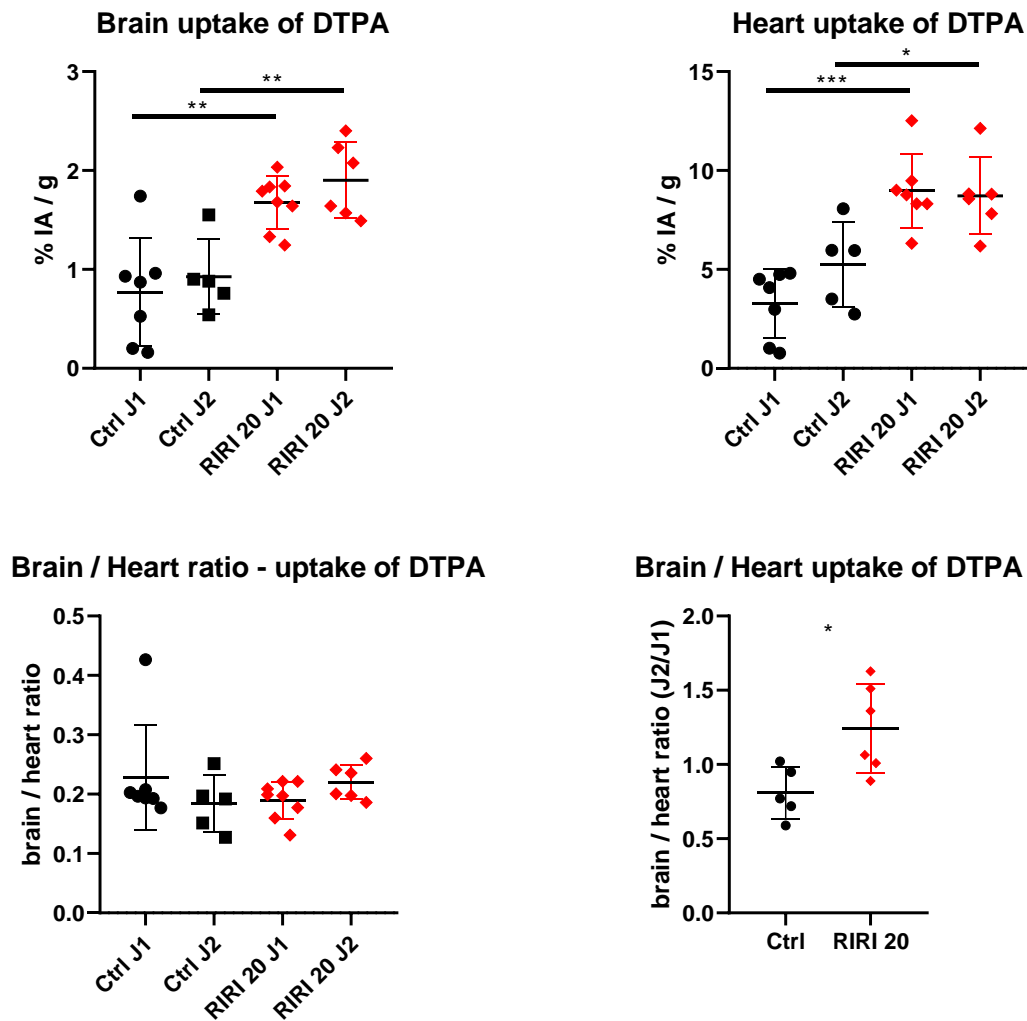


Figure 15 : Quantification de la perméabilité de la BHE par imagerie TEP-CP au ^{68}Ga -DTPA.
*A : Quantification de l'activité cérébrale du ^{68}Ga -DTPA rapportée à la radioactivité injectée dans les groupes contrôle et RIRI20. B : Quantification de l'activité cardiaque du ^{68}Ga -DTPA rapportée à la radioactivité injectée dans les groupes contrôle et RIRI20. C : Rapports des activités cérébrale sur cardiaque (valeurs absolues). D : Rapports des activités cérébrale sur cardiaque, exprimés en rapports des valeurs relatives de J2 par rapport à J1. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$*

Immunohistochimie cérébrale

Les cerveaux des animaux dans le groupe IR20 présentaient des plages d'astrocytose avec des zones de marquage GFAP et Vimentine plus intenses que chez les animaux du groupe contrôle (Figure 16B & 16C). L'intensité du marquages NeuN n'était pas différente entre les deux groupes (Figure 16A). Le marquage IBA1 retrouvait davantage de microglie ramifiée dans le groupe contrôle et davantage de microglie amiboïde dans le groupe IR20 (Figure 16D). Le marquage CD163 n'était mis en évidence dans aucun des cerveaux des groupes (Figure 16E).

Ctrl

RIRI20

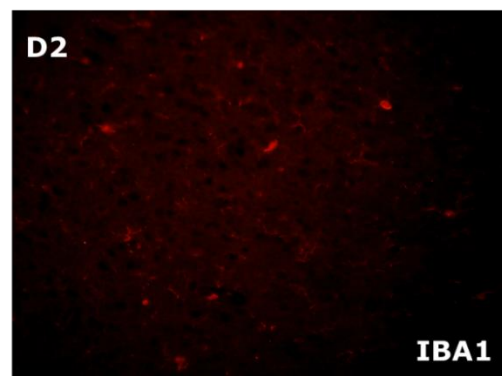
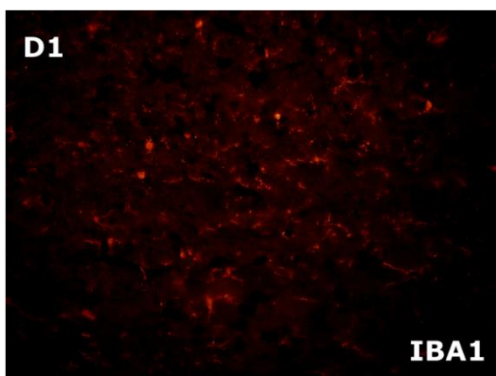
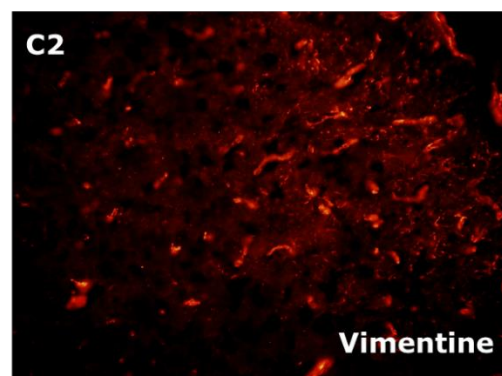
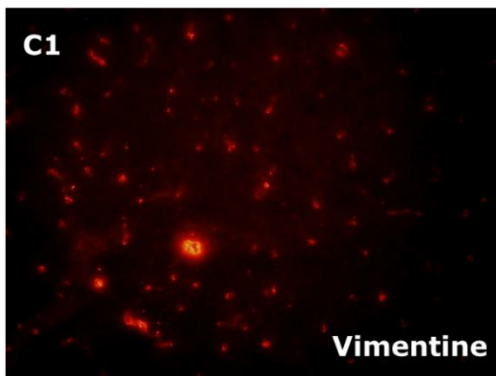
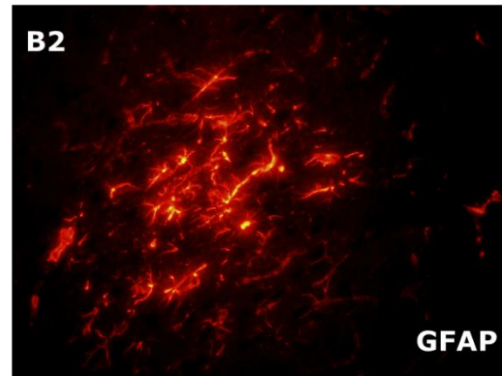
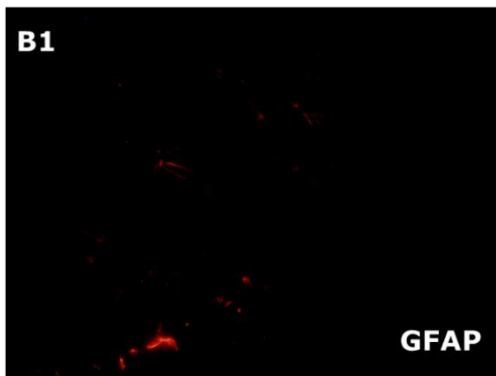
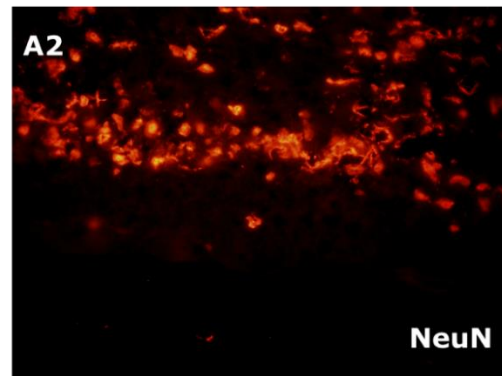
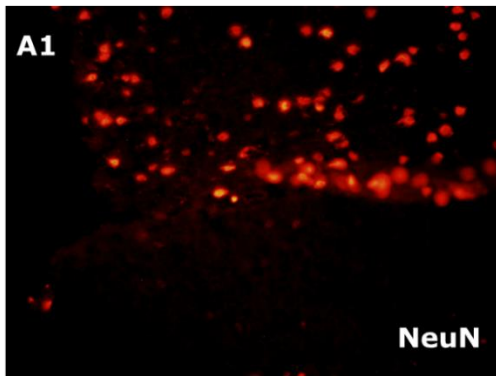


Figure 16 : Immunomarquages cérébraux en immunofluorescence dans les groupes contrôle (1) et RIRI20 (2). A : Marquage neuronal anti-NeuN. B : Marquage astrocytaire anti-GFAP. C : Marquage des astrocytes activés et des structures vasculaires anti-Vimentine. D : Marquage microglial anti-IBA1. E : Marquage de la microglie activée et des macrophages anti-CD163. Grossissement x40.

Concernant l'expression cérébrale des protéines de jonctions serrées endothéliales, l'expression de l'Occludine n'étaient pas différente dans les deux groupes, mais l'expression vasculaire de ZO-1 semblait diminuée dans le groupe RIRI20 (**Figure 17**).

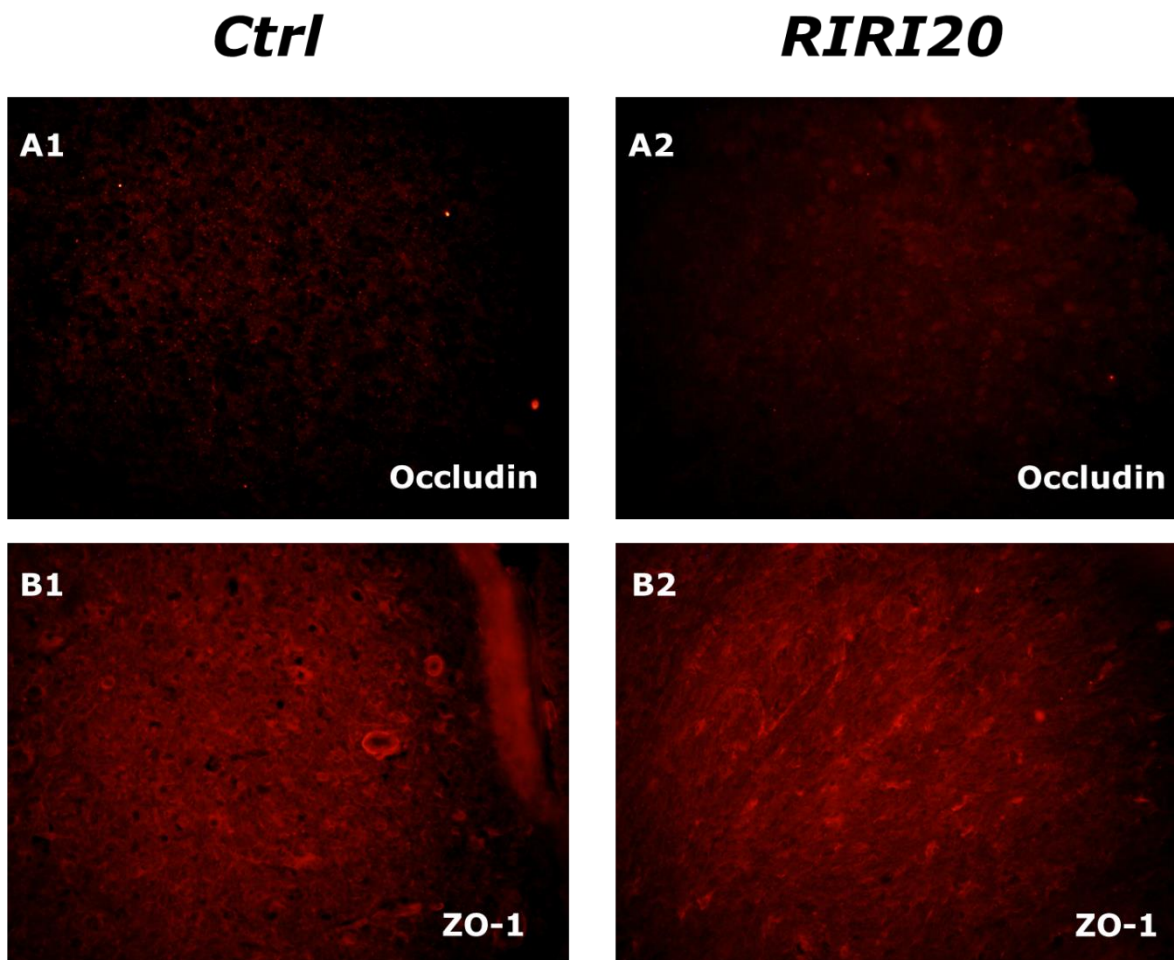


Figure 17 : Immunomarquages cérébraux des protéines de jonctions serrées en immunofluorescence dans les groupes contrôle (1) et RIRI20 (2). A : Marquage anti-Occludine. B : Marquage anti-ZO-1. Grossissement x40.

3.3 Conclusions

L'IRA chez la souris est associée à des atteintes neurologiques précoces, contrairement à l'ischémie-reperfusion rénale seule. Cela confirme que l'effet observé sur les atteintes neurologiques n'est pas dépendant des phénomènes d'ischémie reperfusion mais bien spécifique de l'insuffisance rénale aiguë.

Cette atteinte neurologique est en lien avec une rupture de la BHE survenant dans les deux premiers jours suivant l'IRA, comme nous l'avons confirmé à travers deux techniques complémentaires d'évaluation de la perméabilité de la BHE. Son mécanisme précis, notamment son lien avec l'accumulation des toxines urémiques en cas d'IRA reste à déterminer et feront l'objet de la suite de nos travaux.

L'IRA semble induire une astrocytose au niveau cérébral, et une modification du phénotype microglial. Ces phénomènes observés sont potentiellement être secondaires à une augmentation des processus neuro-inflammatoires consécutivement à la rupture de la BHE. Ces processus inflammatoires restent à caractériser dans notre modèle pour mieux comprendre la physiopathologie des atteintes cérébrales post-IRA, ainsi que l'éventuelle réversibilité de ces atteintes neurologiques à plus long terme après résolution de l'IRA et amélioration de la fonction rénale.

4. Impact de la MRC sur la sévérité des AVC

– Approche pré-clinique

L'objectif de ces travaux est de mettre en évidence une sévérité neurologique accrue au cours de la MRC après modélisation d'un AVC par occlusion de l'artère cérébrale moyenne (OACM) chez le rat, et d'en élucider ses mécanismes.

Les animaux étaient soumis à un modèle de MRC utilisé était le régime enrichi en Adénine à 0,5%, comme lors de nos précédentes expériences chez le rat (cf. chapitres 1 et 2) et comparés à des animaux contrôle. Après modélisation de l'AVC, nous avons évalué à la fois les déficits neurologiques par des atteintes neurocomportementales et en imagerie SPECT/CT permettant d'évaluer la rupture de la BHE, l'apoptose neuronale et le flux sanguin cérébral. Nous présentons ici les résultats préliminaires de ce projet encore en cours.

4.1 Méthodologie

Les expériences ont été réalisées sur des rats mâles Sprague-Dawley. Les animaux ont été commandés (Envigo®) à l'âge de cinq semaines. Les animaux ont été hébergés deux par cage avec enrichissement et libre accès à la nourriture et à l'eau. La température de l'animalerie a été constamment gardée à $22\pm 2^\circ\text{C}$, l'humidité de l'air variait entre 40 et 60%, un cycle lumineux 7h-19h a été effectué. Plusieurs passages quotidiens de personnel compétent étaient effectués dans l'animalerie pour contrôler le bien-être des animaux et l'identification des points limites.

Induction et évaluation de l'insuffisance rénale

L'insuffisance rénale était provoquée en soumettant les rats à un régime riche en adénine à 0,5% (Safe Nutrition®) pendant 28 jours, selon les modalités décrites précédemment (1,2). La nourriture et l'eau étaient fournies à volonté.

La sévérité de l'insuffisance rénale était évaluée en utilisant les marqueurs biochimiques classiques (urée et créatininémie). Les prélèvements sanguins étaient réalisés par cathétérisation de la veine caudale sous anesthésie par Sevoflurane 3%. Le sérum était extrait après centrifugation (2500G, 15 minutes, 21°). Les prélèvements biologiques étaient conservés à -80°C .

Occlusion de l'artère cérébrale moyenne

L'OACM se déroulait en accord avec les recommandations de raffinement IMPROVE (156). La procédure a eu lieu sous anesthésie halogénée au Sevoflurane (induction 8%, Entretien 3%, O₂/Air 30%/70%), après intubation oro-trachéale et mise sous ventilation mécanique assistée (ventilateur pour rats Anestheo®). Les paramètres de ventilation étaient contrôlés par gazométrie artérielle (prélèvement artériel caudal). Le rat était placé sur une plaque chauffante durant la procédure. L'antalgie per opératoire était assurée par Ropivacaine 2mg/mL 100µL en irrigation et l'analgésie post opératoire par une injection de Buprenorphine 0,05 mg/kg SC.

La technique d'OACM utilise un filament calibré pour occlure l'artère cérébrale moyenne, fabriqué à base de fil de nylon sur lequel est coulé un embout de silicone de 41mm de large et 15mm de longueur. Le filament est introduit par la carotide externe puis remonte via la carotide interne jusqu'à l'occlusion sélective de l'artère cérébrale moyenne (**Annexes 5 et 6**) (157). Il s'agit d'un modèle maîtrisé par notre équipe qui a donné lieu à plusieurs publications (158,159). L'incision est suturée puis le rat extubé et réveillé. Le filament est laissé en place 70 minutes, puis sous brève anesthésie (Sevoflurane 3%), il est retiré permettant d'induire la phase de reperfusion. La longueur et la largeur de l'embout nécessaires pour occlure l'artère cérébrale moyenne des rats de 250 à 300g ont été préalablement mesurées après réalisation d'angioscanners cérébraux chez des rats ayant subi une OACM avec le filament laissé en place (**Annexe 7**).

Les animaux subissant la procédure d'OACM étaient comparés à des rats subissant une procédure « Sham » dans chaque groupe, consistant aux mêmes étapes décrites précédemment, sans ligature ni cautérisation des artères du cou, ni introduction de filament.

Evaluation neuro-comportementale

Les tests comportementaux mis en place sont tous des tests validés et largement utilisés dans la littérature pour l'évaluation des déficits neurologiques induit le modèle OACM chez le rat (160,161).

Le score mNSS permet d'évaluer la fonction neurologique des animaux grâce à plusieurs tests précédemment décrits également chez le rat (162). Ce score varie de 0 à 18, 0 représentant l'absence de déficit neurologique et 18 le déficit maximal. Ce test était effectué à J1, J3, J7 et J14 après l'OACM (**Annexes 2 et 3**).

Le foot-fault test a été utilisé pour évaluer la fonction sensitivomotrice des animaux. Les rats doivent marcher sur une échelle horizontale de 77 barreaux. Les barreaux sont espacés de deux centimètres (cm) les uns des autres. Un système assisté par ordinateur (Locotronic, Bioseb®) enregistre les pas fautifs (passage d'une patte entre

deux barreaux). Les animaux ont été habitués à marcher sur l'échelle à trois reprises les jours précédant l'OACM. Après le passage de chaque rat, l'appareil est nettoyé. Les jours du test, trois barreaux de l'échelle sont enlevés afin d'augmenter la difficulté. Les paramètres mesurés sont le nombre de fautes et le temps nécessaire pour traverser la totalité du corridor. Les animaux ont effectué ce test à J1, J3, J7 et J14 après l'OACM (*Annexe 8*).

Le test du retrait de l'adhésif adapté au rat (163) permet de déterminer les effets des lésions cérébrales sur le comportement sensori-moteur. Ce papier est placé de sorte qu'il entoure la patte de l'animal qui est par la suite placé dans une cage. Les paramètres mesurés sont le temps que l'animal met avant de se rendre compte de la présence du papier adhésif, et le temps nécessaire pour l'enlever (en secondes). Chaque animal est testé quatre fois, deux fois avec l'adhésif placé sur chaque patte antérieure. Chaque test durait trois minutes au maximum. Après chaque passage, la cage est nettoyée. Le test se termine quand l'animal enlève l'adhésif de sa patte ou bien que les trois minutes se sont écoulées. Les déficits somatosensitifs étaient gradés sur un score de 0 à 5 (comme décrit par Moubarik *et al.* (164) avec de légères modifications) : [0: les animaux ne ressentent pas l'adhésif attaché et ne l'enlèvent pas; 1: les animaux ressentent l'adhésif mais ne parviennent pas à l'enlever dans les 3 minutes; 2: les animaux enlèvent l'adhésif entre 2 et 3 minutes; 3: les animaux enlèvent l'adhésif entre 1 et 2 minutes; 4: les animaux enlèvent l'adhésif entre 10 et 60 secondes; 5: les animaux enlèvent l'adhésif entre 0 et 10 secondes]. Ce test a été effectué à J1, J3, J7 et J14 après OACM.

Le test de reconnaissance d'un nouvel objet (RNO) est utilisé pour évaluer les comportements exploratoires, l'apprentissage et la mémoire des animaux (165,166). La reconnaissance d'objet est mesurée par la différence entre le temps d'exploration d'objets familiers et de nouveaux objets dans une enceinte déterminée. Dans ce travail, nous avons mis en place un protocole permettant de caractériser les performances d'apprentissages à court terme, et donc le déficit d'apprentissage potentiel⁴⁸. Les rats ont été placés dans une arène de 1x1x0.250m. Différents objets ont été utilisés, de tailles, formes et couleurs différentes. Le test se déroule en trois phases : 1/ Phase d'habituation : la veille du test, les animaux ont été placés dans le coin sud-est de l'arène vide et ont pu l'explorer pendant 30 minutes. L'arène est nettoyée après chaque passage de rat. 2/ Phase d'apprentissage : le jour du test, deux objets identiques sont déposés à des places déterminées dans l'arène, et les rats explorent l'espace pendant trois minutes. Cette séquence est répétée trois fois, à 30 minutes d'intervalle. 3/ Phase de test : un des objets familiers est remplacé par un nouvel objet (même emplacement). L'animal explore l'arène et les objets. Le temps de reconnaissance de chaque objet est mesuré. Les rats étaient déposés dans le coin Sud-Est de l'arène. Le nouvel objet est placé alternativement soit à gauche soit à droite. Après chaque passage, l'arène et les objets étaient nettoyés. L'exploration est définie comme l'animal ayant sa tête à moins de 0.05m autour de l'objet tout en le regardant, le flairant ou en le touchant. Les rats étaient filmés et les données étaient relevées par un logiciel de suivi de trajectoire ; Ethovision XT 8.5 – Noldus®. Le temps total d'exploration de chaque

objet a été relevé. Un indice de discrimination a été mesuré, il correspond au temps passé à explorer le nouvel objet par rapport au temps total d'exploration $[(n-a)/(n+a)]$. Les rats ont été testés à J10 après l'OACM (**Annexe 9**).

Imagerie Isotopique

La rupture de la BHE était évaluée par SPECT-CT cérébrale 30 minutes après injection d'acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA) couplé au ^{99m}Tc à J2 post OACM (**Annexe 4**). L'apoptose neuronale était évaluée par SPECT-CT cérébrale 90 minutes après injection d'Annexine-V couplée au ^{99m}Tc à J3 post OACM, comme décrit précédemment (1,158). L'évaluation de la perfusion cérébrale par SPECT/CT 60 minutes après injection de hexamethylpropyleneamine oxime (HMPAO) couplée au ^{99m}Tc à J14 post OACM permet d'évaluer la zone ischémique définitive, c'est un marqueur validé en clinique et en expérimentation animale (167).

Les animaux recevaient, sous anesthésie au Sevoflurane 3%, une injection intraveineuse de maximum 100 μL de radiotracer (10-30 MBq selon les radiotraceurs) en solution isotonique stérile et apyrogène. Le volume injecté était expérience-dépendant en fonction de l'efficacité du radiomarquage. Une personne habilitée à travailler avec des radioéléments était en charge des animaux, des injections jusqu'aux manipulations pré- et post-imagerie. 30 minutes à 2 heures (selon le traceur utilisé) après injection, l'acquisition SPECT/CT est réalisée pour une durée totale de 25 minutes, sous anesthésie par Sevoflurane 3% (Caméra Mediso® NanoSpect et logiciel Mediso® Nucline 1.02). L'activité était mesurée dans les régions anatomiques par le logiciel de reconstruction Invicro® VivoQuant 3.5 et Invicro® InvivoScope 2.00. Les acquisitions cérébrales étaient recalées sur un atlas cérébral 3D (Copyright CERMEP – Imagerie du vivant 2012). All rights reserved (168) – **Annexe 10**).

L'activité cérébrale des radiotraceurs est exprimée en rapport de concentration d'activité cérébrale sur l'activité totale injectée par gramme de tissu cérébral (%AI/g).

Plan expérimental

Les trois étapes de notre plan expérimental sont résumées sur la **Figure 18**. Quatre groupes d'animaux ont été comparés, selon qu'ils aient été soumis à un régime enrichi en Adénine à 0,5% ou à un régime contrôle, et qu'ils aient eu une procédure d'OACM (groupes Adénine/OACM et Contrôle/OACM) ou une procédure Sham (groupes Adénine/Sham et Contrôle/Sham).

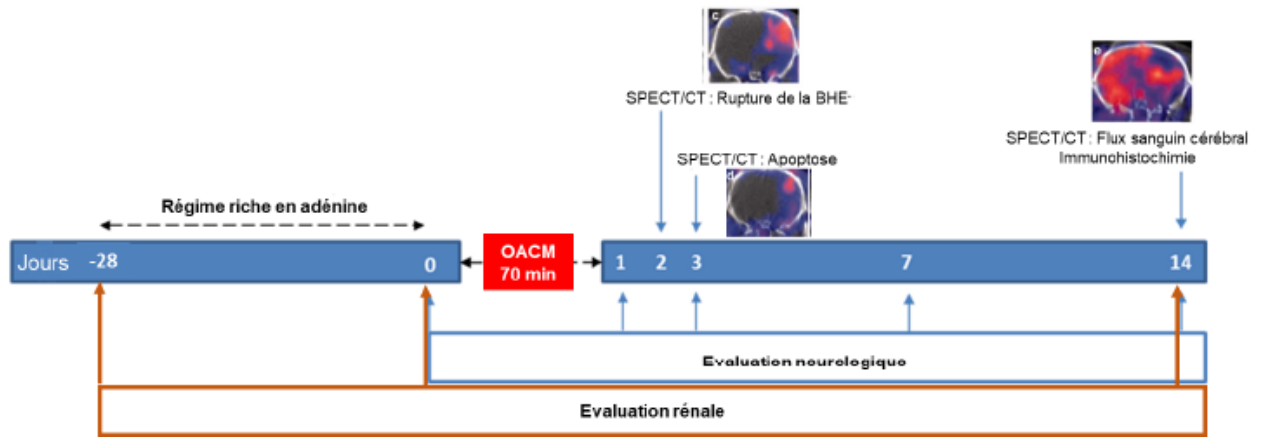


Figure 18 : Plan expérimental. BHE : Barrière-hémato-encéphalique. OACM : Occlusion de l'artère cérébrale moyenne.

Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type (standard). Les comparaisons de médianes ont été réalisées par test de Mann-Whitney et test de Kruskal-Wallis (pour les valeurs répétées dans le temps ou la comparaison de plusieurs groupes). Tous les tests étaient non paramétriques et bilatéraux. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant les logiciels Microsoft® Excel et GraphPad® Prism 8.0; un risque α inférieur à 0,05 était considéré significatif.

Ethique

Ces travaux ont été réalisés en suivant la directive européenne 2010/63/EU, les recommandations de la déclaration d'Helsinki et sont approuvés par le comité d'éthique local d'Aix-Marseille Université et le ministère de la recherche de de l'enseignement supérieur, et enregistré sous le numéro APAFiS #15636.

4.2 Résultats préliminaires

La mortalité après une OACM de 70 minutes était de 11,5% dans le groupe Contrôle/OACM et de 20,8% dans le groupe Adénine/OACM.

Évaluation l'impact de la MRC sur les atteintes neurologiques après OACM

A J1 post OACM, le score mNSS n'était pas différent à J1 post-OACM entre les groupes Contrôle/OACM et Adénine/OACM : $3,6 \pm 2,9$ vs $6,0 \pm 2,5$ ($p=0,27$). Le score mNSS était le plus élevé dans le groupe Adénine/OACM ($6,0 \pm 4,5$) et était plus élevé que dans le

groupe Adénine/Sham : $0,6 \pm 0,5$ ($p=0,003$). Au cours du temps, il n'y avait pas de différence significative entre l'évolution des scores mNSS des 4 groupes (**Figure 18A**).

Le nombre de fautes au foot-fault test était plus important à J1 post OACM dans le groupe Adénine 0,5%/OACM : $45,3 \pm 25,7$ que dans le groupe Contrôle/OACM : $18,7 \pm 9,7$ ($p=0,0024$) et que dans le groupe Adénine 0,5%/Sham (tendance, $p=0,06$) (**Figure 18B**). Le temps de traversée n'était pas différent entre les groupes au cours du temps (**Figure 18C**).

A J1 post-OACM, le score du TRA était plus faible dans le groupe adénine/OACM pour la patte droite $1,0 \pm 0,0$ vs $2,7 \pm 1,3$ ($p=0,001$) et la patte gauche $1,0 \pm 1,2$ vs $3,0 \pm 1,1$ ($p=0,002$) par rapport au groupe Contrôle/OACM. Les jours suivants l'OACM, le score du TRA restait plus faible dans le groupe Adénine/OACM par rapport au groupe contrôle/OACM ($p=0,004$ pour la patte droite, $p=0,11$ pour la patte gauche) (**Figures 18D et E**).

L'indice de discrimination du test RNO était plus bas à J10 chez les rats contrôle/OACM que chez les rats Contrôle/Sham : $0,20 \pm 0,34$ vs. $0,70 \pm 0,29$ ($p=0,02$), mais nous n'avons pas mis en évidence de différence dans le groupe adénine 0,5%/OACM ($p=0,44$), par rapport aux rats Adénine/Sham. L'indice de discrimination n'était pas différent entre les rats Contrôle/OACM et Adénine/OACM (**Figure 18F**).

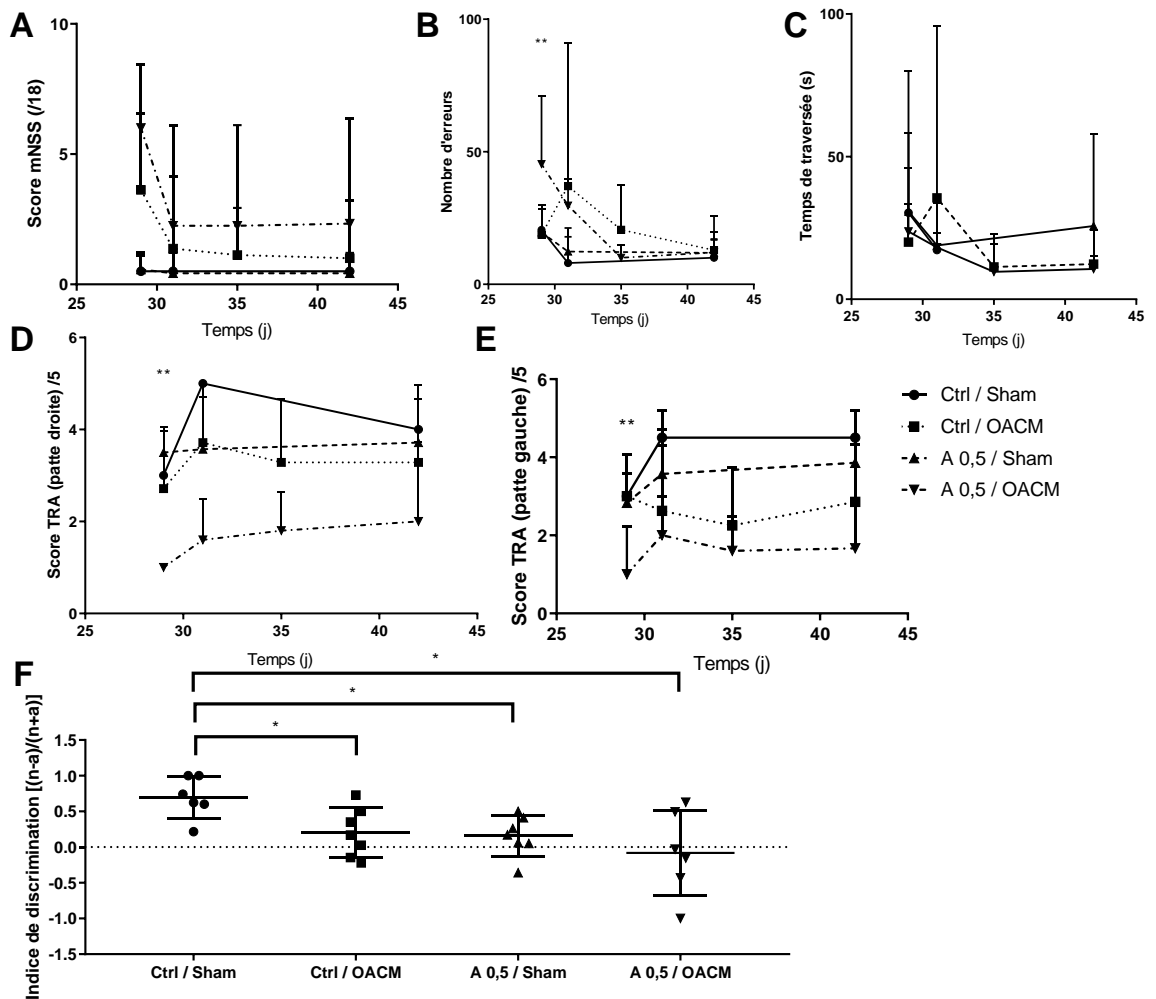


Figure 19 : Résultats des tests neuro-comportementaux après OACM. A : Score mNSS. B : Nombre d'erreurs au foot-fault test. C : Temps de traversée de l'échelle au foot-fault test. D et E : Score au test de retrait de l'adhésif (TRA) sur les pattes antérieures droites et gauche. F : Indice de discrimination du test de reconnaissance du nouvel objet. Ctrl : régime contrôle. A0,5 : Régime adénine 0,5%, * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$

Évaluation l'impact de l'IRC sur la rupture de la BHE, la perfusion cérébrale, l'activation apoptotique après OACM

La fixation dans l'hémisphère cérébral droit du DTPA à J2 post-OACM était plus importante dans le groupe Adénine/OACM que dans le groupe Contrôle/OACM : $0,117 \%AI/g \pm 0,014$ vs. $0,024 \%AI/g \pm 0,005$ ($p=0,0016$). Comparés aux rats non ischémiés (procédure sham), la fixation du DTPA n'était pas différente à J2 post-OACM chez les rats Contrôle/OACM : $0,024 \%AI/g \pm 0,005$ vs. $0,027 \%AI/g \pm 0,011$ ($p=0,63$), mais était augmentée chez les rats Adénine/OACM : $0,117 \%AI/g \pm 0,014$ vs. $0,082 \%AI/g \pm 0,026$ ($p=0,01$) (**Figure 19**).

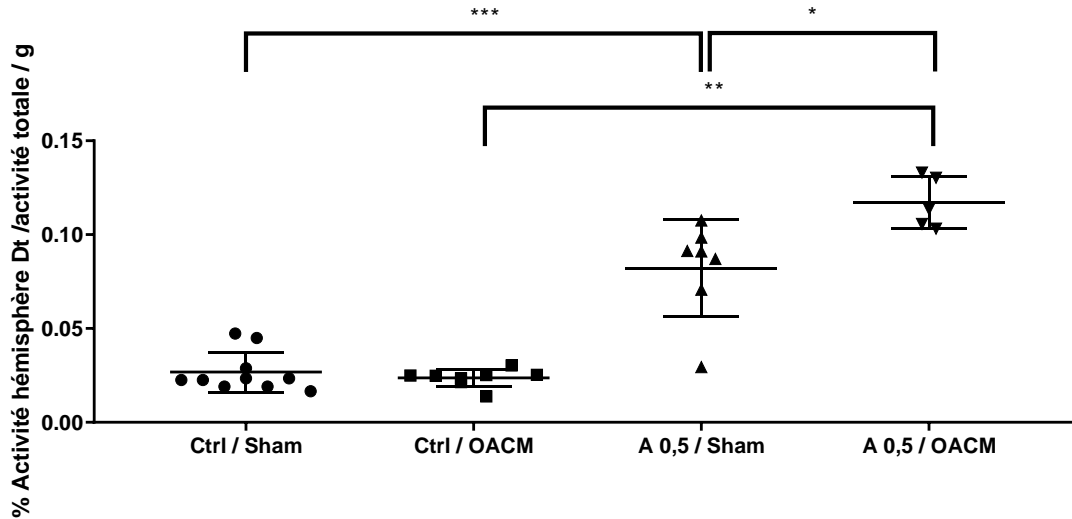


Figure 20 : Rupture de la barrière hémato-encéphalique post-intervention évaluée par l'activité dans l'hémisphère cérébral droit du ^{99m}Tc -DTPA rapportée à l'activité injectée par SPECT-CT selon le régime des rats. Ctrl : régime contrôle. A0,5 : Régime adénine 0,5%, * : $p < 0,05$; ** : $p > 0,01$; *** : $p < 0,001$

La fixation dans l'hémisphère cérébral droit de l'Annexine V à J3 post-OACM était plus importante dans le groupe Adénine/OACM que dans le groupe Contrôle/OACM : $0,065 \text{ \%AI/g} \pm 0,020$ vs. $0,017 \text{ \%AI/g} \pm 0,001$ (tendance, $p = 0,057$) (**Figure 20**).

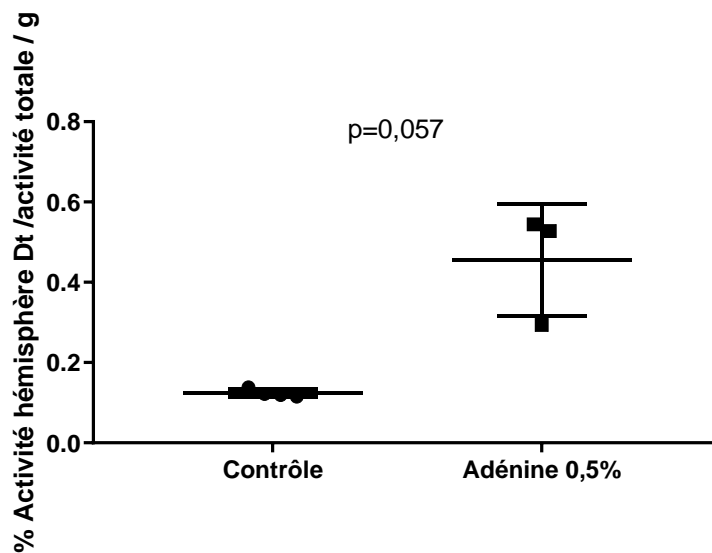


Figure 21 : Apoptose cérébrale post-intervention évaluée par l'activité du ^{99m}Tc -Annexine V dans l'hémisphère cérébral droit rapportée à l'activité injectée par SPECT-CT selon le régime des rats.

La fixation dans l'hémisphère cérébral droit de l'HMPAO à J14 post-OACM n'était pas différente entre les groupes Adénine/OACM et Contrôle/OACM : $0,67 \text{ \%AI/g} \pm 0,14$ vs. $0,63 \text{ \%AI/g} \pm 0,07$ ($p = 0,88$). La fixation de l'HMPAO n'était pas différente entre les

groupes Contrôle/OACM et Contrôle/Sham ($p=0,07$) ni entre les groupes Adénine.

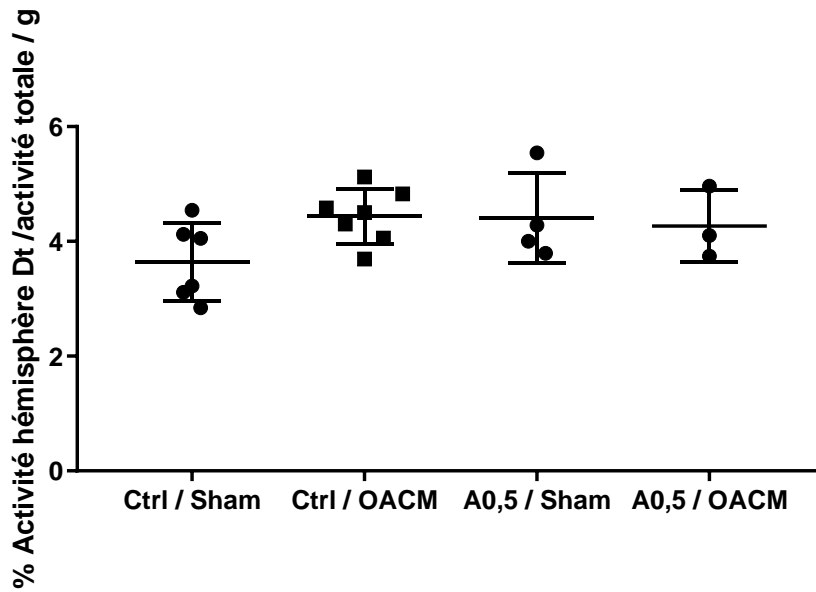


Figure 22 : Flux sanguin cérébral post-intervention évalué par l'activité dans l'hémisphère cérébral droit du ^{99m}Tc -HMPAO rapportée à l'activité injectée par SPECT-CT selon le régime des rats. Ctrl : régime contrôle. A0,5 : Régime adénine 0,5%

4.3 Conclusions

Nos résultats préliminaires mettent en évidence que les rats insuffisants rénaux présentent après OACM des déficits neurologiques précoces plus importants, une augmentation de la rupture de la BHE et une tendance à l'augmentation de l'apoptose cérébrale. La perméabilité de la BHE pourrait prédisposer à l'augmentation de la sévérité des AVC observée dans notre modèle.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués restent encore à caractériser dans la suite de notre projet toujours en cours.

5. Evaluation de l'impact de la fonction rénale sur la taille et le pronostic des AVC ischémiques après thrombectomie chez l'homme



Cette dernière partie s'intéresse l'impact pronostique de la MRC et de l'IRA, sur la taille et la sévérité des AVC ischémiques traités par thrombectomie chez l'homme. En complément de nos travaux chez l'animal, cette étude a pour but de mieux comprendre l'influence des atteintes rénales à la fois aiguës et chroniques dans la physiopathologie de l'AVC à l'heure des traitements spécifiques endovasculaires. Il n'existe pas à l'heure actuelle d'étude multicentrique s'intéressant spécifiquement à cet aspect.

Cette étude clinique **RISOTTO** (Renal Impact on Stroke Outcomes after Thrombectomy and Thrombolysis) est le fruit d'une collaboration avec les médecins des équipes de radiologie et de neuroradiologie de l'Hôpital de la Timone (Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille) et du CHU de Nice.

5.1 Méthodologie

L'étude **RISOTTO** est une étude épidémiologique de cohorte comparative, multicentrique, rétrospective.

Le recrutement des patients était fait de façon rétrospective chez des patients ayant présenté un AVC ischémique pris en charge par un centre référent aux Centres Hospitaliers Universitaires de Marseille et Nice. Le recueil de données était réalisé par les médecins participants à cette étude au moyen d'une base de données sécurisée. Les données étaient hébergées par l'Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille (AP-HM).

Objectifs

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer sur une large cohorte nationale de patients ayant présenté un AVC ischémique à la phase aiguë l'impact d'une altération du DFG estimé inférieur à 60 ml/min sur la taille des AVC ischémiques (volume d'infarctissement) évaluée par le Score ASPECTS (*Alberta Stroke Program Early CT Score* (169)).

Les objectifs secondaires étaient : de mettre en évidence une corrélation entre la fonction rénale (évaluée par le DFG estimé) et la taille des AVC ischémiques évaluée par le score ASPECTS, et d'évaluer dans cette cohorte l'impact de la fonction rénale sur la sévérité initiale, l'efficacité et la tolérance de la thrombectomie, la mortalité et les déficits neurologiques à 3 mois.

Critères de jugement et suivi

Le critère de jugement principal était la mesure de la volumétrie des lésions d'AVC avec calcul du Score ASPECTS Global sur l'imagerie IRM initiale. Ces paramètres étaient évalués par un neuroradiologue expert en aveugle de la fonction rénale. Le score ASPECTS était calculé sur 10 points selon l'étendue de l'AVC ischémique, en utilisant 2 coupes axiales de référence :

- Toit des ventricules (3 zones)
- Coupes visualisant les noyaux gris centraux (6 points)

Pour 1 zone infarctée, soustraction d'1 point. Plus le score est faible, plus le volume d'infarctissement cérébral est important.

Le volume de l'AVC initial était également quantifié en mL. En IRM séquence de diffusion, le ratio entre le coefficient de diffusion apparent (ADC) de la zone ischémisée et l'ADC d'une zone en "miroir" controlatérale était également calculé. Les atteintes microvasculaires de la substance blanche étaient évaluées par l'échelle de Fazekas, de 0 à 3.

La gravité neurologique était évaluée à H0 et H24 par l'échelle NIHSS (*National Institutes of Health Stroke Scale*). A 3 mois, le pronostic neurologique était évalué par le score de Rankin modifié (mRS) de 0 à 6, ainsi que la survie.

L'insuffisance rénale aiguë était définie selon les critères KDIGO 2012 (10), la MRC selon les critères KDIGO 2012 (170) et l'IRC par une MRC associée à un débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe) $< 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$, selon la formule CKD-Epi. Le DFGe basal était recueilli à l'entrée de l'hospitalisation en l'absence d'IRA, ou maximum 3 mois auparavant, si disponible.

Les caractéristiques démographiques et les comorbidités suivantes étaient recueillies : HTA (selon la définition HAS 2016), diabète (définition HAS 2014), dyslipidémie, tabagisme actif, Antécédent d'AVC ou d'accident ischémique transitoire (AIT), coronaropathie, ACFA, AOMI, obésité (indice de masse corporelle $> 30 \text{ kg/m}^2$).

Critères d'inclusion / de non-inclusion

Étaient inclus les patients de plus de 18 ans ayant présenté un AVC à la phase aiguë (ayant bénéficié d'une imagerie dans les 24 premières heures suivant l'apparition du

déficit) pris en charge par thrombectomie mécanique par un centre référent AVC (CHUs de Marseille et Nice) associé ou non à une thrombolyse intra-veineuse. N'étaient pas inclus les patients dont la fonction rénale n'était pas évaluée ou ayant présenté un AVC hémorragique.

Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type (standard). Les comparaisons ont été réalisées par test t de Student ou test de Mann-Whitney selon applicabilité pour les variables continues, par test du Chi-2 ou teste de Fisher selon applicabilité. Tous les tests étaient bilatéraux. L'analyse multivariée était réalisée par régression logistique descendante, les variables associées à un $p < 0,20$ en analyse univariée étaient incluses dans le modèle. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant les logiciels Microsoft® Excel et SAS JMP® Pro 14.0; un risque α inférieur à 0,05 était considéré significatif.

Aspects réglementaires et éthiques

Cette étude est menée conformément à la méthodologie de référence MR 004, elle fait l'objet d'une déclaration au Portail d'Accès aux Données de Santé de l'AP-HM sous la référence *PADS19-310* en date du 16/10/2019, d'une promotion par l'AP-HM, et a reçu l'avis favorable du Comité d'Ethique d'Aix-Marseille Université le 2 avril 2020 (ref. n°2020-02-04-02).

5.2 Résultats

Deux-cent quatre-vingt-seize patients ayant fait un AVC par occlusion d'un gros tronc artériel intracrânien pris en charge par thrombectomie ont été inclus dans les CHU de Marseille et Nice entre avril 2018 et janvier 2022.

Les caractéristiques initiales des patients sont présentées dans le **Tableau 1**. Les patients étaient des hommes pour 49,3% d'entre eux, et d'un âge moyen de 70 ± 15 ans. L'HTA était l'antécédent le plus fréquemment retrouvé (53% des patients). 63 patients (22,8%) avaient un DFGe < 60 ml/min/1,73 m², alors que seulement 12 (5,1%) avaient une notion de MRC connue auparavant, seuls 8 patients avaient un DFGe < 30 et 2 patients avaient un DFG < 15 ml/min/1,73m². Quarante-huit patients (19,6%) ont présenté un épisode d'IRA pendant le séjour, dont majoritairement des IRA légères KDIGO 1.

Les patients ayant un DFG < 60 mL/min/1,73m² (groupe IRC) étaient plus âgés : $80,2 \pm 8,8$ ans vs. $66,6 \pm 14,4$ ans, $p < 0,0001$; présentaient une prévalence plus importante de l'HTA (71,4% vs. 47,4%, $p = 0,0008$), de l'ACFA (36,5% vs. 22,1%, $p = 0,021$) une incidence de l'IRA plus importante (30,4% vs. 16,0%, $p = 0,017$) et une prévalence plus faible du

tabagisme (6,4% vs. 23,5%, p=0,003)) et de l'obésité (1,6% vs. 15,0%, p=0,004), que les patients ayant un DFG > 60 ml/min/1,73m².

L'IRC était associé à des AVC de plus faible volume : 15,2 ± 19,2 mL vs. 30,5 ± 37,5 mL, p=0,002 ; avec un score ASPECTS plus haut (7,6 ± 1,7 vs. 6,7 ± 1,8, p=0,003), pour la même gravité initiale (score NIHSS 9,2 ± 7,0 vs. 10,1 ± 7,7, p=0,404) par rapport aux patients non-IRC, ainsi qu'à davantage d'échecs de la thrombectomie (12,7% vs. 3,8, p=0,008). Le taux de transformations hémorragiques n'était pas différent dans les deux groupes (24,2% vs. 35,9%, p=0,087). A 3 mois, l'IRC n'était pas associée à un moins bon pronostic neurologique (mRS 3-6 : 51,6% vs. 42,2%, p=0,193), mais à était associée à une mortalité accrue : 24,2% vs. 9,5%, p=0,004.

	Population totale (n=296)	Non-IRC (n=213)	IRC (n=63)	p
Données démographiques et antécédents				
Age, ans	69,7 ± 14,9	66,6 ± 14,4	80,2 ± 8,8	<0,0001
Sexe masculin	136 (49,3)	110 (51,6)	26 (41,3)	0,147
HTA	146 (52,9)	101 (47,4)	45 (71,4)	0,0008
Diabète	49 (17,8)	36 (16,9)	13 (20,6)	0,496
Dyslipidémie	86 (31,1)	66 (31,0)	30 (31,8)	0,909
Tabagisme	54 (19,6)	50 (23,5)	4 (6,4)	0,003
Antécédent d'AVC/AIT	39 (14,1)	27 (12,7)	12 (19,1)	0,202
Coronaropathie	34 (12,3)	28 (13,2)	6 (9,5)	0,442
ACFA	70 (25,4)	47 (22,1)	23 (36,5)	0,021
AOMI	12 (4,4)	7 (3,3)	5 (7,9)	0,112
Obésité	33 (12,0)	32 (15,0)	1 (1,6)	0,004
Données initiales				
TAS (mmHg)	152 ± 25	149 ± 24	163 ± 27	0,0003
TAD (mmHg)	84 ± 17	83 ± 12	83 ± 20	0,861
FC (bpm)	81 ± 19	81 ± 17	81 ± 22	0,985
Glycémie (g/L)	1,28 ± 0,41	1,37 ± 0,41	1,36 ± 0,42	0,863
HbA1c (%)	6,0 ± 1,0	6,0 ± 1,1	6,0 ± 0,9	0,241
Données rénales				
Notion de MRC	12 (5,1)	1 (0,6)	11 (22,9)	<0,0001
Créatinine (µmol/L)				
- J1	82,7 ± 28,6	72,6 ± 16,3	117,0 ± 34,8	<0,0001
- Pire valeur	102,9 ± 65,6	88,0 ± 40,4	149,3 ± 100,5	<0,0001
Urée (mmol/L)				
- J1	6,66 ± 2,82	5,83 ± 1,99	9,45 ± 3,41	<0,0001
- Pire valeur	9,58 ± 5,31	8,54 ± 4,70	12,87 ± 5,87	<0,0001
DFGe basal (ml/min/1,73m ²)				
- CKD-Epi	77,0 ± 22,7	86,0 ± 16,2	46,4 ± 12,4	<0,0001
- MDRD	76,6 ± 30,1	89,0 ± 27,2	47,8 ± 12,1	<0,0001
IRA Durant le séjour	48 (19,6)	30 (16,0)	17 (30,4)	0,017
- KDIGO 1	34 (13,9)	21(11,3)	12 (21,4)	
- KDIGO 2	4 (1,6)	2 (1,1)	2 (3,6)	

- KDIGO 3	7 (2,9)	5 (2,7)	2 (3,6)	
Données neurologiques initiales				
NIHSS initial	17,0 ± 5,6	17,3 ± 5,5	16,5 ± 6,1	0,326
Territoire				
- Artère cérébrale moyenne	255 (92,4)	199 (93,4)	56 (88,9)	0,233
- Tandem	13 (6,9)	12 (8,3)	1 (2,3)	0,168
- Tronc basilaire	15 (5,4)	11 (5,2)	4 (6,4)	0,712
Taille de l'AVC initial :				
- ASPECTS	6,9 ± 1,8	6,7 ± 1,8	7,6 ± 1,7	0,003
- Volume AVC (mL)	27,3 ± 35,0	30,5 ± 37,5	15,2 ± 19,2	0,002
- Ratio ADC	0,69 ± 0,09	0,69 ± 0,09	0,70 ± 0,09	0,582
Fazekas	1,1 ± 0,9	1,0 ± 0,8	1,7 ± 0,8	<0,0001
Evolution et prise en charge initiales				
Thrombolyse	154 (55,8)	124 (58,2)	30 (47,6)	0,137
Délai de thrombectomie (minutes)	37 ± 25	36 ± 25	46 ± 29	0,096
Succès de la recanalisation	260 (94,2)	205 (96,2)	55 (87,3)	0,008
NIHSS à 24h	9,9 ± 7,5	10,1 ± 7,7	9,2 ± 7,0	0,404
Delta NIHSS (H24/H0)	7,0 ± 7,4	7,2 ± 7,8	6,9 ± 6,5	0,777
NIHSS ≤ 8	132 (49,8)	101 (48,8)	31 (53,5)	0,531
Transformation hémorragique	91 (33,1)	76 (35,9)	15 (24,2)	0,087
Evolution à 3 mois				
mRS	2,5 ± 2,0	2,4 ± 1,8	3,0 ± 2,2	0,051
mRS 0-2	145 (55,6)	115 (57,8)	30 (48,4)	0,193
Décès	34 (12,9)	19 (9,5)	15 (24,2)	0,004

Tableau 1 : Caractéristiques initiales et évolution de la population d'étude en fonction de leur DFG basal. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type, ou n (%). ACFA : arythmie complète par fibrillation auriculaire, ADC : coefficient de diffusion apparente, AIT : Accident Ischémique Transitoire, AOMI : Artériopathie oblitérante des membres inférieurs, ASPECTS : Alberta Stroke Program Early CT Score, DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé, FC : Fréquence cardiaque : HTA : hypertension artérielle, IRA : Insuffisance rénale aiguë, MRC : Maladie rénale chronique, KDIGO : Score Kidney Disease / Improving Global Outcome, mRS : modified Rankin Scale, NIHSS : National Institutes of Health Stroke Scale, TAD : Tension artérielle diastolique, TAS : Tension artérielle systolique.

Les patients présentant une IRA étaient plus âgés (73,8 ± 13,9 ans vs. 68,7 ± 14,7 ans, p=0,025), étaient plus souvent des hommes (62,5% vs. 46,7%, p=0,049), présentaient une prévalence plus importante de l'HTA (70,8% vs. 49,2%, p=0,007) du diabète (29,2% vs. 14,7%, p=0,018), de l'ACFA (p=0,014), ainsi que de l'IRC plus importante (36,2% vs. 19,9%, p=0,017) que les patients n'ayant pas présenté d'IRA.

L'IRA était associé à une gravité neurologique initiale plus importante : NIHSS $18,8 \pm 5,2$ vs. $16,7 \pm 5,7$, $p=0,014$, par rapport aux patients sans IRA, tandis que la taille de l'AVC initial était similaire : Score ASPECTS $7,3 \pm 1,9$ vs. $6,8 \pm 1,8$, $p=0,254$. Le taux de transformations hémorragiques n'était pas différent dans les deux groupes (35,4% vs. 29,3%, $p=0,404$). A 3 mois, l'IRA était associée à un moins bon pronostic neurologique (mRS 3-6 : 64,6% vs. 39,4%, $p=0,002$) ainsi qu'à une mortalité accrue : 25,0% vs. 8,4%, $p=0,003$).

	Population totale (n=296)	Pas d'IRA (n=197)	IRA (n=48)	p
Données démographiques et antécédents				
Age, ans	69,7 ± 14,9	68,7 ± 14,7	73,8 ± 13,9	0,025
Sexe masculin	136 (49,3)	92 (46,7)	30 (62,5)	0,049
HTA	146 (52,9)	91 (49,2)	34 (70,8)	0,007
Diabète	49 (17,8)	29 (14,7)	14 (29,2)	0,018
Dyslipidémie	86 (31,1)	65 (33,0)	15 (31,2)	0,817
Tabagisme	54 (19,6)	42 (21,3)	5 (10,4)	0,085
Antécédent d'AVC/AIT	39 (14,1)	31 (15,7)	7 (14,6)	0,843
Coronaropathie	34 (12,3)	23 (11,7)	7 (14,6)	0,582
ACFA	70 (25,4)	44 (22,3)	19 (39,6)	0,014
AOMI	12 (4,4)	11 (5,6)	1 (2,1)	0,314
Obésité	33 (12,0)	27 (13,7)	5 (10,4)	0,544
Données initiales				
TAS (mmHg)	152 ± 25	150 ± 23	161 ± 31	0,034
TAD (mmHg)	84 ± 17	83 ± 16	85 ± 18	0,354
FC (bpm)	81 ± 19	81 ± 18	82 ± 21	0,842
Glycémie (g/L)	1,28 ± 0,41	1,32 ± 0,36	1,55 ± 0,50	0,004
HbA1c (%)	6,0 ± 1,0	5,9 ± 0,6	6,5 ± 1,8	0,034
Données rénales				
Notion de MRC	12 (5,1)	6 (3,8)	6 (15,8)	0,006
Créatinine (µmol/L)				
- J1	82,7 ± 28,6	77,9 ± 24,2	104,8 ± 39,3	<0,0001
- Pire valeur	102,9 ± 65,6	86,7 ± 34,8	168,2 ± 110,2	<0,0001
Urée (mmol/L)				
- J1	6,66 ± 2,82	6,35 ± 2,45	8,33 ± 3,79	0,001
- Pire valeur	9,58 ± 5,31	8,44 ± 3,35	14,50 ± 8,42	<0,0001
DFGe basal (ml/min/1,73m ²)				
- CKD-Epi	77,0 ± 22,7	79,3 ± 21,7	67,3 ± 25,9	0,005
- MDRD	76,6 ± 30,1	82,1 ± 30,8	70,4 ± 30,3	0,021
DFGe < 60 ml/min/1,73m ²	63 (22,8)	39 (19,9)	17 (36,2)	0,017
DFGe < 30 ml/min/1,73m ²	8 (2,9)	4 (2,0)	4 (8,5)	0,048
DFGe < 15 ml/min/1,73m ²	2 (0,7)	2 (1,0)	0 (0,0)	0,487

Données neurologiques initiales				
NIHSS initial	17,0 ± 5,6	16,7 ± 5,7	18,8 ± 5,2	0,014
Territoire				
- Artère cérébrale moyenne	255 (92,4)	185 (93,9)	44 (91,7)	0,573
- Tandem	13 (6,9)	10 (7,8)	1 (3,3)	0,386
- Tronc basilaire	15 (5,4)	10 (5,1)	1 (2,1)	0,369
Taille de l'AVC initial :				
- ASPECTS	6,9 ± 1,8	6,8 ± 1,8	7,3 ± 1,9	0,254
- Volume AVC (mL)	27,3 ± 35,0 0,69 ± 0,09	26,4 ± 33,7 0,69 ± 0,10	27,2 ± 39,4 0,69 ± 0,09	0,930 0,981
- Ratio ADC				
Fazekas	1,1 ± 0,9	1,1 ± 0,8	1,3 ± 1,1	0,177
Evolution et prise en charge initiales				
Thrombolyse	154 (55,8)	113 (57,4)	23 (47,9)	0,238
Délai de thrombectomie (minutes)	37 ± 25	40 ± 29	37 ± 21	0,551
Succès de la recanalisation	260 (94,2)	187 (94,9))	44 (91,7)	0,383
NIHSS à 24h	9,9 ± 7,5	9,3 ± 7,6	11,4 ± 8,3	0,107
Delta NIHSS (H24/H0)	7,0 ± 7,4	7,2 ± 7,3	7,5 ± 8,5	0,912
NIHSS ≤ 8	132 (49,8)	100 (52,9)	20 (41,7)	0,531
Transformation hémorragique	91 (33,1)	57 (29,3)	17 (35,4)	0,404
Evolution à 3 mois				
mRS	2,5 ± 2,0	2,2 ± 1,8	3,3 ± 2,0	0,002
mRS 0-2	145 (55,6)	114 (60,6)	17 (35,4)	0,002
Décès	34 (12,9)	16 (8,4)	12 (25,0)	0,003

Tableau 2 : Caractéristiques initiales et évolution de la population d'étude en fonction de la survenue d'une IRA pendant le séjour. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type, ou n (%). ACFA : arythmie complète par fibrillation auriculaire, ADC : coefficient de diffusion apparente, AIT : Accident Ischémique Transitoire, AOMI : Artériopathie oblitérante des membres inférieurs, ASPECTS : Alberta Stroke Program Early CT Score, DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé, FC : Fréquence cardiaque : HTA : hypertension artérielle, IRA : Insuffisance rénale aiguë, MRC : Maladie rénale chronique, mRS : modified Rankin Scale, NIHSS : National Institutes of Health Stroke Scale, TAD : Tension artérielle diastolique, TAS : Tension artérielle systolique.

En analyse univariée, les facteurs associés à un mauvais pronostic neurologique à 3 mois (mRS 3 à 6) étaient l'âge ($p < 0,0001$), l'HTA ($p = 0,0005$), le diabète ($p = 0,018$), l'AOMI ($p = 0,033$) et la survenue d'une IRA durant le séjour ($p = 0,002$). L'IRC n'était pas associée à un plus mauvais pronostic à 3 mois. En analyse multivariée, les facteurs de risque indépendants de mauvais pronostic neurologique étaient l'âge (OR : 1,04 [1,01-1,07], $p = 0,0005$), le sexe masculin (OR : 1,79 [1,001-3,20], $p = 0,049$) et la survenue d'une IRA pendant le séjour (OR : 2,16 [1,05-4,46], $p = 0,036$) (**Tableau 3**).

	mRS 0-2 (n=153)	mRS 3-6 (n=125)	P (univarié)	OR (multivarié)	p (multivarié)
Age	67,3 ± 14,1	74,3 ± 12,9	<0,0001	1,04 [1,01-1,07]	0,0005
Sexe masculin	66 (43,1)	68 (54,4)	0,061	1,79 [1,001-3,20]	0,049
HTA	66 (43,1)	80 (64,0)	0,0005	1,54 [0,85-2,80]	0,153
Diabète	20 (13,1)	30 (24,0)	0,018	1,66 [0,79-3,52]	0,182
AOMI	3 (2,0)	9 (7,2)	0,033	3,60 [0,88-14,70]	0,074
DFGe < 60 ml/min/1,73m ²	30 (20,7)	32 (27,6)	0,193	1,48 [0,72-3,02]	0,288
IRA durant le séjour	17 (13,0)	31 (29,5)	0,002	2,16 [1,05-4,46]	0,036

Tableau 3 : Facteurs de risque de mauvais pronostic neurologique à 3 mois (MRS 3-6) en analyse univariée et multivariée. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type, ou n (%). AOMI : Artériopathie oblitérante des membres inférieurs, DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé, HTA : hypertension artérielle, IRA : Insuffisance rénale aiguë, mRS : modified Rankin Scale.

En analyse univariée, les facteurs associés à la mortalité à 3 mois étaient l'âge ($p < 0,0001$), l'HTA ($p = 0,0002$), le diabète ($p = 0,029$), le DFGe < 60 ml/min/1,73m² (44,1% vs. 20,5%, $p = 0,003$) et la survenue d'une IRA durant le séjour (42,9% v. 17,1%, $p = 0,001$). En analyse multivariée, les facteurs de risque indépendants de mortalité étaient l'HTA (OR : 3,77 [1,19-11,93], $p = 0,024$), et l'AOMI (OR : 4,21 [1,02-17,45], $p = 0,047$) (**Tableau 4**). Cependant ces résultats restent à pondérer par le faible taux d'évènements dans cette étude ($n = 40$).

	Survivants (n=241)	Décédés (n=40)	P (univarié)	OR (multivarié)	p (multivarié)
Age	69,2 ± 14,0	77,5 ± 11,3	<0,0001	1,02 [0,98-1,07]	0,276
HTA	116 (48,1)	32 (80,0)	0,0002	3,77 [1,19-11,93]	0,024
Diabète	38 (15,8)	12 (30,0)	0,029	1,77 [0,66-1,80]	0,259
AOMI	8 (3,3)	4 (10,0)	0,053	4,21 [1,02-17,45]	0,047
DFGe < 60 ml/min/1,73m ²	47 (20,5)	15 (44,1)	0,003	1,61 [0,62-4,15]	0,328
IRA durant le séjour	36 (17,1)	12 (42,9)	0,001	2,47 [0,96-6,35]	0,059

Tableau 4 : Facteurs de risque de mortalité à 3 mois en analyse univariée et multivariée. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type, ou n (%). AOMI : Artériopathie oblitérante des membres inférieurs, DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé, HTA : hypertension artérielle, IRA : Insuffisance rénale aiguë.

5.3 Conclusions

Dans notre cohorte bicentrique, l'IRC était associée à des lésions ischémiques initiales de taille moins importante pour une gravité neurologique équivalente, cependant les patients IRC vont présenter davantage d'échecs de recanalisation, et un risque accru de décès à 3 mois chez les patients ayant présenté un AVC ischémique après thrombectomie. Les patients IRC présentaient davantage d'atteinte de la microvascularisation de la substance blanche. L'IRC n'apparaît pas comme associée au risque de transformation hémorragique post-procédure, contrairement à la thrombolyse seule (171), ni comme un facteur de risque indépendant de mortalité, ni de mauvais pronostic fonctionnel neurologique à 3 mois. Les patients IRC semblent donc bénéficier de la thrombectomie et l'IRC ne doit pas être une contre-indication à cette technique.

L'IRA est quant à elle associée à une gravité neurologique initiale plus importante et à un pronostic fonctionnel péjoratif et à une mortalité accrue à 3 mois, et apparaît comme un facteur de risque indépendant de mauvais pronostic.

Discussion et perspectives

Le résultat principal de ce travail de thèse est la mise en évidence l'existence d'une perméabilité accrue de la BHE à travers plusieurs modèles expérimentaux de MRC chez le rongeur, corrélée avec l'accumulation de l'IS et à l'altération des performances cognitives. L'exposition à des concentrations importantes d'IS (pour une fonction rénale équivalente) aggrave cette perméabilité et ces atteintes cognitives, alors que l'inactivation d'AhR semble protéger de la perméabilité de la BHE induite par l'IS. Notre travail au cours de l'IRA est également novateur. Il apporte des arguments expérimentaux en faveur de l'existence d'une encéphalopathie urémique en situation d'IRA. La rupture de la BHE paraît être également un mécanisme important dans les atteintes cérébrales post-IRA.

Nous avons choisi le modèle de MRC par régime enrichi en adénine comme modèle principal car il s'agit d'un modèle validé de MRC, avec développement progressif de l'atteinte rénale et sa mise en œuvre permet d'éviter le stress chirurgical qui peut perturber l'évaluation neurocomportementale. Nous avons toutefois pu confirmer que les atteintes neurocomportementales et la perméabilité de la BHE étaient comparables entre les animaux ARD et les animaux ayant subi une néphrectomie des 5/6^{èmes}, un autre modèle expérimental validé de MRC chez le rat. Ces résultats permettent de confirmer que les atteintes décrites sont bien associées à la MRC et non spécifique d'un modèle en particulier. De plus, la mise en évidence d'atteintes comparables chez des souris non MRC après surcharge en IS apportée par l'eau de boisson permet d'illustrer la contribution spécifique de l'IS dans les atteintes décrites ; l'absence d'atteinte comportementale et de perméabilité de la BHE chez les souris AhR-KO surchargées en IS valide l'implication de la voie IS-AhR dans la genèse de ces atteintes et permet de proposer AhR comme cible thérapeutique innovante pour prévenir les atteintes neuro-vasculaires au cours de la MRC. Des études de modulation pharmacologique d'AhR, notamment par l'emploi d'antagoniste comme le 6,2',4'-triméthoxyflavone (TMF) (172) ou le CH223191 (173) dans notre modèle permettraient de valider AhR comme cible pharmacologique pertinente. La modélisation de l'IRA par la technique du RIRI chez la souris a été choisie car bien maîtrisée par l'équipe de CORAKID, et permettant de réaliser des ischémies vigiles (153) limitant ainsi la quantité de sédation administrée aux animaux, qui pourrait également perturber les évaluations neuro-comportementales.

Nous avons choisi une approche combinant l'évaluation neuro-comportementale et imagerie isotopique de la BHE, du fait de la maîtrise de ces outils dans notre unité (158,159). De plus l'imagerie cérébrale au ^{99m}Tc-DTPA permet probablement une analyse plus fine la perméabilité de la BHE que la quantification de la fuite de Bleu Evans, de quantifier cette perméabilité par région cérébrale et surtout une le suivi longitudinal des animaux, ce qui n'est pas possible avec la quantification du Bleu Evans (qui nécessite le

sacrifice des animaux). Nous n'avons pas retrouvé de région cérébrale plus particulièrement touchée par cette rupture de la BHE au cours de nos modèles de MRC, ce qui semble être plutôt en faveur d'un phénomène diffus. La principale limite de cette modalité est que le DTPA est quasi-exclusivement éliminé par les reins (174) et donc en cas d'insuffisance rénale son accumulation dans une région (comme le cerveau) pourrait refléter en partie l'accumulation dans le secteur vasculaire du fait d'une moindre élimination rénale du radiotracer. Dans nos modèles de MRC, la surcharge en IS chez les rats Adénine a montré une altération encore plus importante de la perméabilité de la BHE en SPECT/CT pour des fonctions rénales équivalentes aux rats Adénine seule, en défaveur d'un artefact aspécifique lié au défaut d'élimination rénale. Cette hypothèse a également été écartée par des travaux de notre équipe consécutifs à notre publication, en proposant une analyse du ratio cerveau/muscle facial reflétant la concentration de DTPA circulante. De même, l'injection d'IS était associée à une augmentation de la perméabilité de la BHE chez la souris non MRC. Enfin, dans notre modèle d'IRA, l'activité cérébrale du DTPA rapportée à l'activité cardiaque (reflet de la radioactivité circulante) augmentait dans le temps chez les souris RIRI, alors qu'elle restait stable chez les souris contrôle.

Nous sommes les premiers à avoir mis en évidence le lien entre atteintes neurocomportementales, rupture de la BHE et IS/AhR en contexte de MRC. D'autres études ultérieures ont retrouvé un lien entre IS et atteinte neuro-comportementale. Les travaux de Watanabe *et al.* ont montré une augmentation des lésions de pycnose dans les neurones de l'hippocampe chez les rats MRC (régime adénine) ainsi qu'une altération des capacités d'apprentissage comme la mémoire de travail (62). *In vitro*, l'incubation avec à la fois un mélange de toxines urémiques et de l'IS, étaient associées à une diminution de la viabilité des neurones hippocampiques de souris (62). Les travaux de Karbowska *et al.* chez le rat non insuffisant rénal chez qui de l'IS était administré oralement, ont montré que les animaux ayant reçu de l'IS présentaient des altérations neurocomportementales comme des comportements anxio-dépressifs, une diminution de l'activité locomotrice et exploratoire, une altération de la coordination motrice et de la mémoire spatiale par rapport aux rats contrôle. Par ailleurs chez ces animaux, il existait une accumulation de l'IS particulièrement importante dans le tronc cérébral. Une diminution des concentrations cérébrales des neurotransmetteurs comme la noradrénaline, la sérotonine et la dopamine était observée chez ces animaux, majoritairement dans le tronc cérébral (49).

Notre hypothèse est que cette rupture de la BHE est secondaire à une dysfonction endothéliale au niveau cérébrale. En effet la toxicité endothéliale de l'IS est désormais bien établie (16,175). Le caractère diffus de l'atteinte cérébrale de la BHE en imagerie SPECT/CT et la faible quantité d'IS retrouvée dans le LCR par rapport à l'accumulation importante de celui-ci dans nos modèles plaide en faveur d'un processus d'origine plutôt vasculaire. Cela reste toutefois à démontrer spécifiquement au sein de l'endothélium cérébral, notamment par des approches OMICS qui permettraient d'identifier les différents contributeurs à la dysfonction endothéliale cérébrale dans ce contexte.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la rupture de la BHE au cours de la MRC ne sont à l'heure actuelle pas élucidées. Nous n'avons pas mis en évidence de modification cérébrale de l'expression des protéines des jonctions serrées endothéliales (Occludine, Claudine et ZO-1) dans nos modèles de MRC, mais une altération subcellulaire de l'adressage à la membrane endothéliale de ces protéines sans altération de leur expression ne peut pas être exclue, comme cela a pu être décrit au cours de dysfonctions de la BHE (176,177). Dans notre modèle d'IRA il semblerait exister une diminution de l'expression endothéliale cérébrale de ZO-1, pouvant participer à une augmentation de la perméabilité de la BHE au niveau intercellulaire. Cela reste à confirmer par une quantification de cette expression dans le cerveau en immunohistochimie ou par Western-Blot. Il est également possible que les mécanismes transcellulaires d'efflux soient altérés, notamment sous l'influence d'AhR (178).

Il est également possible qu'une dysfonction ou une apoptose podocytaire participe à ce phénomène, comme le suggère l'accumulation du récepteur PDGFR- β dans le LCR de nos animaux soumis au régime Adénine à 0,5% par rapport aux animaux contrôle (**Figure 23** - *non publié*). (179). L'altération des podocytes est un mécanisme commun aux pathologies neurovasculaires et neurodégénératives (180). Ce mécanisme semble notamment prépondérant dans l'altération de la BHE au cours de la Maladie d'Alzheimer (129). La forme membranaire de PDGFR- β est nécessaire au recrutement des péricytes en réponse à une altération de la BHE, et semble également impliquée dans la perméabilité vasculaire, notamment après AVC. En effet, les travaux de Shen *et al.* ont retrouvé que les souris PDGFR β -KO présentent un œdème cérébral vasogénique, des altérations neurologiques importantes, ainsi qu'une diminution de l'expression des jonctions serrées endothéliales après modélisation d'un AVC.

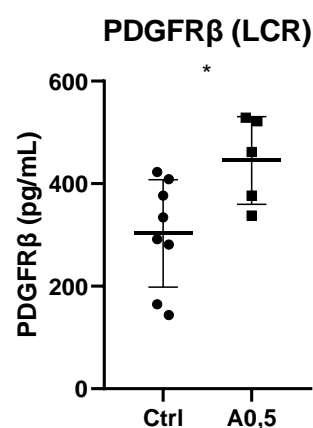


Figure 23 : Dosage du (PDGFR- β) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des rats contrôle et adénine. Ctrl : régime contrôle. A0,5 : Régime adénine 0,5%, * : $p < 0,05$

De nombreux travaux ont rapporté un lien entre rupture de la BHE et processus neuro-inflammatoires dans le contexte d'agression cérébrale, notamment en cas d'AVC (181). Dans nos modèles de MRC, ce lien reste à préciser. Plusieurs travaux ont rapporté l'augmentation chronique des processus inflammatoires systémiques dans les modèles murins de MRC (182) ainsi que chez l'homme (183), la MRC conduisant à l'augmentation des concentrations circulantes de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1b, l'IL6 et le TNF α (184). Les travaux d'Adesso *et al.* ont rapporté un lien entre IS et neuroinflammation chez la souris, potentiellement réversible sous AST-120 (61,63). L'IRA est également responsable d'une augmentation des taux sériques d'IL-1b et d'IL-6 chez la souris (87), bien que ces cytokines n'aient pas été retrouvées dans le cerveau des animaux après IRA dans les travaux de Liu *et al.* (88). Dans notre modèle d'IRA, nous n'observons pour le moment que des preuves indirectes des mécanismes neuro-inflammatoires comme la modification du phénotype microglial (avec un aspect amiboïde, signant une transition vers une forme activée de la microglie, sans expression du marqueur CD163 en faveur de la différenciation en cellules phagocytaires) et le recrutement astrocytaire. Il est probable que notre évaluation cérébrale ait été trop précoce (à 48h post-IRA), et que les phénomènes neuro-inflammatoires s'installent plus à distance de l'IRA. Des phénomènes similaires d'astrocytose ont été mis en évidence dans un autre modèle d'IRA par ischémie rénale bilatérale par Liu *et al.* (88) et dans des modèles de MRC par Mazumder *et al.* chez la souris après régime enrichi en adénine (51).

Si AhR est particulièrement exprimé dans le cerveau (66), son rôle en pathologie humaine semble complexe. En effet l'activation cérébrale d'AhR semble pouvoir être à la fois bénéfique ou néfaste en fonction des ligands d'AhR impliqués et des pathologies. Les ligands exogènes comme les toxines seraient capables d'accélérer le vieillissement cérébral, tandis que les ligands endogènes semblent la ralentir (185). L'activation d'AhR par des ligands endogènes semble protectrice dans la maladie de Parkinson et l'atrophie multi-systématisée ; alors que son activation par des toxines exogènes, notamment les kynurénines, semble aggraver l'atteinte neuronale au cours de la maladie d'Alzheimer et la chorée de Huntington (185). Par ailleurs il a été montré que l'expression d'AhR était augmentée dans le cerveau après une agression cérébrale aiguë comme un traumatisme crânien chez le rat (186).

AhR est notamment exprimé de façon importante dans la BHE chez l'homme (187). Une étude *in vitro* sur des capillaires cérébraux de rat a montré que l'activation d'AhR par la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine augmentait l'activité des transporteurs d'efflux et l'expression de la P-gp (178), il est alors possible que l'effet de l'activation d'AhR au sein de la BHE soit différent en fonction de son ligand, ou que l'augmentation de l'expression des protéines d'efflux puisse être un mécanisme de protection de la BHE en cas de rupture.

Notre étude clinique RISOTTO chez l'homme est la première étude multicentrique à s'intéresser spécifiquement à l'impact de l'insuffisance rénale aiguë et chronique sur la taille des AVC après thrombectomie. Elle apporte des résultats novateurs. Premièrement,

les patients porteurs d'une IRC vont développer des lésions ischémiques initiales de moindre taille, pour une sévérité initiale et à 3 mois similaires à des patients non-IRC présentant des lésions ischémiques plus étendues. Cependant l'IRC apparait comme un facteur de risque indépendant de mortalité à 3 mois. Cela peut s'expliquer par une augmentation de la croissance ischémique dans les premiers jours post-AVC chez les patients IRC, ou par une sensibilité neuronale accrue. L'IRA apparait elle comme un facteur de risque majeur de mortalité et de mauvais pronostic neurologique, confirmant nos résultats pré-cliniques chez la souris. De plus, l'existence de lésions vasculaires de la substance blanche au cours de la MRC, préexistantes aux AVC et signant un trouble de la microvascularisation, est un argument indirect en faveur d'une rupture chronique de la BHE qui pourrait être un facteur expliquant le mauvais pronostic observé.

Cette rupture « chronique » de la BHE pourrait ainsi prédisposer à la particulière gravité des AVC chez les patients porteurs d'un MRC, en augmentant la sensibilité des neurones à l'ischémie, ou en perturbant les mécanismes de régulation inflammatoire dans le cerveau. Cela reste à caractériser dans la suite de nos travaux. Les travaux de Cuartero *et al.* chez la souris non-MRC ont montré que la modélisation d'un AVC par OACM induisait une augmentation de l'expression neuronale globale et nucléaire d'AhR. Après OACM, l'inhibition d'AhR à la fois pharmacologique par le TMF et par inactivation génétique était neuroprotectrice, alors que l'exposition à la L-kynurénine augmentait l'expression cérébrale d'AhR et augmentait le volume de l'AVC (188). L'implication de l'activation d'AhR sur la sévérité de l'AVC dans le contexte de la MRC reste cependant à évaluer, ce qui fera également l'objet de nos recherches futures.

Ainsi nous sommes les premiers à rapporter la dysfonction de la BHE comme un mécanisme important des atteintes cognitives au cours de la MRC, sous l'influence de l'activation d'AhR par l'IS. Les atteintes neurocognitives au cours de la MRC font l'objet d'un récent intérêt croissant et le réseau de recherche européen CONNECT a récemment été mis en place sur cette thématique (34,37). Notre travail permet de mieux comprendre la physiopathologie d'une préoccupation fréquente et pour laquelle aucun traitement efficace n'existe actuellement. Si ces résultats se confirment chez l'homme au cours de notre étude BREIN (en cours), AhR, l'IS ou leurs précurseurs pourraient constituer des pistes thérapeutiques intéressantes pour améliorer le pronostic neurologique des patients MRC, et potentiellement exercer un effet protecteur neurovasculaire.

Perspectives pré-cliniques

Nos résultats nous ouvrent de nombreuses perspectives, qui s'articuleront autour de 3 axes.

1- Axe AVC

Nous allons tout d'abord poursuivre nos travaux sur la caractérisation du phénotype des AVC au cours de la MRC, pour expliquer la gravité accrue des AVC observée à la fois lors de nos expériences préliminaires avec notre modèle d'OACM chez le rat et chez les patients au sein de notre étude RISOTTO. Dans notre étude clinique rétrospective bicentrique, l'IRC était en effet associée à des lésions ischémiques cérébrales initiales de taille moins importante pour une gravité neurologique équivalente. Les patients IRC présentaient cependant davantage d'échecs de recanalisation lors de la thrombectomie, et un risque accru de décès à 3 mois. Les patients IRC présentaient davantage d'atteinte de la microvascularisation de la substance blanche. La perméabilité antérieure de la BHE au cours de la MRC pourrait participer à l'aggravation des atteintes neurologiques observées dans notre modèle d'OACM. Elle pourrait être responsable d'une susceptibilité accrue à l'apoptose neuronale et à la croissance ischémique au décours des processus ischémiques cérébraux et ainsi expliquer que des lésions ischémiques initiales moins étendues puissent être responsables d'atteintes neurologiques plus graves au cours de la MRC chez l'animal et chez l'homme.

Notre modèle d'OACM reste à raffiner chez les animaux MRC, et nos données à compléter pour mieux caractériser ces atteintes, notamment au niveau de l'apoptose neuronale et des atteintes histologiques cérébrales post-AVC et en particulier, la participation de l'axe IS-AhR dans ces atteintes. Une modulation d'AhR par des agonistes et des antagonistes pharmacologiques pourraient également nous permettre de mieux préciser son rôle dans l'AVC au cours de la MRC, voire d'envisager des pistes thérapeutiques protectrices innovantes.

2- Axe Mécanistique / Neuro-inflammation

Nous prévoyons de mieux caractériser les processus mécanistiques moléculaires sous-tendant cette altération de la BHE, ainsi que ses conséquences notamment en termes de neuro-inflammation. Nous étudierons notamment l'expression cérébrale et dans le liquide céphalo-rachidien des cytokines pro-inflammatoires, et d'étudier les modifications microgliales et astrocytaires au cours de la MRC en immunohistochimie, ainsi qu'en TEP/CT cérébrale en utilisant de nouveaux radiotraceurs d'activation microgliale comme le ^{18}F -DPA714 (189).

Nous étudierons également l'altération structurelle de la BHE en microscopie électronique, et nous approfondirons l'étude de l'expression des protéines jonctions inter-cellulaires endothéliales comme l'Occludine, la Claudine 5, et ZO-1 ou des jonctions adhérentes comme la VE-Cadhérine au cours de la MRC. Les modifications structurelles et fonctionnelles des péricytes, ainsi que des jonctions péricytes/endothélium sont également des pistes physiopathologiques à étudier. Des modèles de BHE *in vitro* (190)

pourraient également nous permettre d'identifier plus précisément les mécanismes d'augmentation de perméabilité suite à l'exposition aux toxines urémiques.

Cela nous permettrait d'identifier des stratégies protectrices ciblant l'atteinte de la BHE et la neuroinflammation, pour limiter la progression des troubles cognitifs au cours de la MRC.

3- Axe IRA / Neurotoxicité médicamenteuse

Nous prévoyons enfin de poursuivre nos travaux sur les atteintes cérébrales au décours de l'IRA en collaboration avec le laboratoire CORAKID.

Nous allons tout d'abord étudier l'implication de la voie IS-AhR dans les atteintes neurologiques en évaluant l'accumulation sanguine des toxines urémiques dont l'IS, au cours de nos modèles d'IRA, ainsi que l'effet de l'inhibition des effets de l'IS. Plusieurs stratégies d'inhibition sont envisageables, comme soumettre les animaux à un régime appauvri en tryptophane (191), l'administration digestive d'inhibiteurs aspécifiques des précurseurs de l'IS comme l'AST-120 (22) ou spécifiques comme les Molecularly Imprinted Polymers ciblant le tryptophane ou l'indole (192), ou encore l'utilisation d'animaux invalidés pour AhR, comme nous l'avons fait dans notre modèle de MRC (1).

Nous allons par ailleurs évaluer l'impact de la dysfonction de la BHE en contexte d'IRA sur la modulation de la neurotoxicité médicamenteuse. En effet la rupture de la BHE induite par l'IRA pourrait augmenter la pénétration cérébrale de molécules potentiellement neurotoxiques, indépendamment de l'accumulation sanguine de celles-ci. Pour cela nous allons évaluer l'accumulation cérébrale après IRA de molécules utilisées en pratique clinique passant peu la barrière hémato-encéphalique en situation non pathologique et de métabolisme d'élimination majoritairement hépatique, comme par exemple la Domperidone, un antiémétique (193-196) ou la Vinblastine, un vinca-alcaloïde anticancéreux de type poison du fuseau (194,197). Nous pourrions alors étudier l'expression endothéliale des pompes d'efflux médicamenteuses de la BHE comme la P-gp. Cela pourra également être évalué en contexte de MRC.

Enfin, nous évaluerons l'impact neurologique de l'IRA à plus long terme, et la potentielle réversibilité de la rupture de la BHE, après amélioration de la fonction rénale, pour évaluer si l'IRA induit des lésions cérébrales irréversibles et prédispose à une altération neuro-cognitive à plus long terme. Pour cela, nous réaliserons l'évaluation neuro-comportementale plus à distance de l'agression rénale et de la perméabilité de la BHE en imagerie isotopique d'animaux contrôle et ayant subi une IRA selon le modèle décrit précédemment.

Perspectives cliniques

Nous allons tenter de confirmer nos résultats précliniques chez l'homme au sein de l'étude clinique **BREIN** (Blood-BRain Barrier Evaluation In Nephrology – ClinicalTrials.gov : [NCT04328415](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04328415)), visant à évaluer l'existence d'une perméabilité accrue de la BHE au cours de la MRC chez l'homme et son lien aux performances cognitives et à l'accumulation des toxines urémiques.

La perméabilité de la BHE (critère de jugement principal) sera quantifiée par scintigraphie SPECT/CT cérébrale au ^{99m}Tc -DTPA par un médecin nucléaire en aveugle des autres données, les performances cognitives seront évaluées par une batterie de tests cognitifs (test MoCA (évaluant l'atteinte cognitive globale (198) et adapté au dépistage des troubles cognitifs légers ou débutants) le test des portes (mémoire visuelle (199)), test de Stroop (attention et résistance à l'interférence (200)), inventaire de Beck (composante dépressive (201)), auto-questionnaire des difficultés cognitives et plaintes mnésiques de McNair), et l'accumulation sérique des toxines urémiques ainsi que l'activation d'AhR par le sérum seront mesurées (**Figure 24**). L'étude prévoit un recrutement de 30 participants : 15 patients IRCT en hémodialyse sans antécédent neurologique ni psychiatrique, ni traitement psychotrope, et 15 volontaires sains appariés en âge (± 5 ans), sexe et niveau d'études à un patient. Cette étude est financée par l'Appel d'Offre Recherche Clinique Jeune Chercheur AP-HM 2019 et promue par l'AP-HM. Les inclusions ont débuté en décembre 2020 et nous attendons la fin de celles-ci pour début 2023.

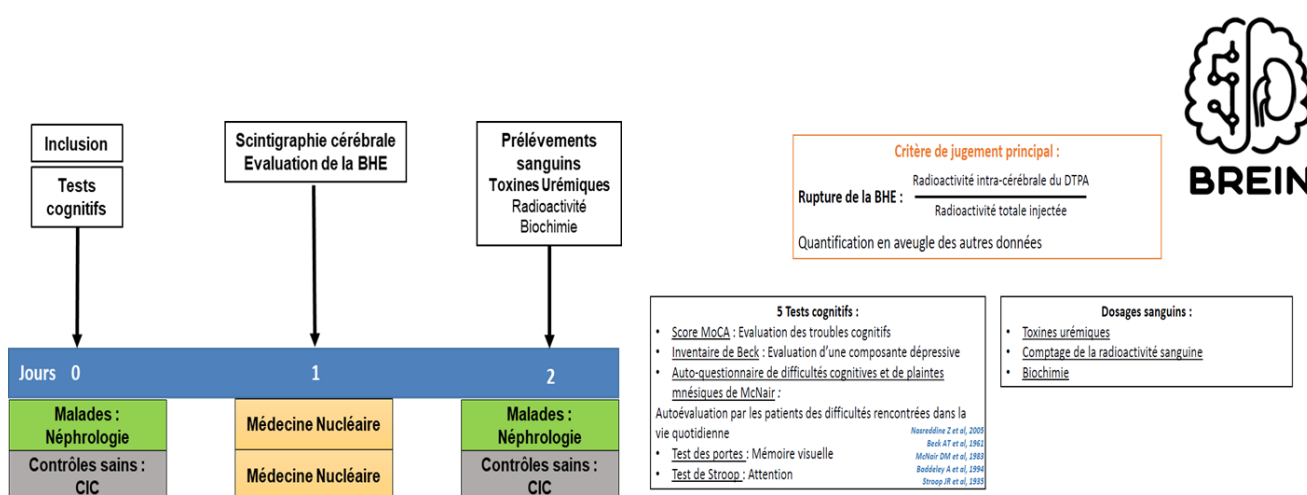


Figure 24 : Déroulé de l'étude BREIN

Conclusion

L'accumulation d'Indoxyl Sulfate induit une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique dans plusieurs modèles de MRC chez le rongeur. La rupture de la BHE est corrélée aux atteintes cognitives.

Cela doit être confirmé chez l'homme

L'augmentation de la perméabilité de la BHE pourrait jouer un rôle majeur dans l'altération des performances cognitives et la sévérité des AVC au cours de la MRC.

Il s'agit également d'une piste physiopathologique dans l'encéphalopathie au cours de l'IRA.

Bibliographie

1. Bobot M, Thomas L, Moyon A, Fernandez S, McKay N, Balasse L, et al. Uremic Toxic Blood-Brain Barrier Disruption Mediated by AhR Activation Leads to Cognitive Impairment during Experimental Renal Dysfunction. *J Am Soc Nephrol JASN*. 11 juin 2020;
2. Bobot M, Hache G, Moyon A, Fernandez S, Balasse L, Daniel L, et al. Renal SPECT/CT with ^{99m}Tc-dimercaptosuccinic acid is a non-invasive predictive marker for the development of interstitial fibrosis in a rat model of renal insufficiency. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 26 avr 2021;36(5):804-10.
3. Bugnicourt JM, Godefroy O, Chillon JM, Choukroun G, Massy ZA. Cognitive disorders and dementia in CKD: the neglected kidney-brain axis. *J Am Soc Nephrol JASN*. févr 2013;24(3):353-63.
4. Seliger SL, Gillen DL, Longstreth WT, Kestenbaum B, Stehman-Breen CO. Elevated risk of stroke among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int*. août 2003;64(2):603-9.
5. Tonelli M, Karumanchi SA, Thadhani R. Epidemiology and Mechanisms of Uremia-Related Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2 févr 2016;133(5):518-36.
6. Dou L, Poitevin S, Sallée M, Addi T, Gondouin B, McKay N, et al. Aryl hydrocarbon receptor is activated in patients and mice with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 22 janv 2018;
7. Nongnuch A, Panorchan K, Davenport A. Brain-kidney crosstalk. *Crit Care Lond Engl*. 5 juin 2014;18(3):225.
8. Kovesdy CP. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney Int Suppl*. avr 2022;12(1):7-11.
9. Olié V, Cheddani L, Stengel B, Gabet A, Grave C, Blacher J, et al. Prévalence de la maladie rénale chronique en France, Esteban 2014–2016. *Néphrologie Thérapeutique*. déc 2021;17(7):526-31.
10. KDIGO. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Summary of Recommendation Statements. *Kidney Int Suppl*. janv 2013;3(1):5-14.
11. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int*. mai 2003;63(5):1934-43.

12. Rosner MH, Reis T, Husain-Syed F, Vanholder R, Hutchison C, Stenvinkel P, et al. Classification of Uremic Toxins and Their Role in Kidney Failure. *Clin J Am Soc Nephrol*. déc 2021;16(12):1918-28.
13. Tonelli M, Muntner P, Lloyd A, Manns BJ, Klarenbach S, Pannu N, et al. Risk of coronary events in people with chronic kidney disease compared with those with diabetes: a population-level cohort study. *Lancet Lond Engl*. 1 sept 2012;380(9844):807-14.
14. Brydges CR, Fiehn O, Mayberg HS, Schreiber H, Dehkordi SM, Bhattacharyya S, et al. Indoxyl sulfate, a gut microbiome-derived uremic toxin, is associated with psychic anxiety and its functional magnetic resonance imaging-based neurologic signature. *Sci Rep*. 25 oct 2021;11(1):21011.
15. Dou L, Sallée M, Cerini C, Poitevin S, Gondouin B, Jourde-Chiche N, et al. The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J Am Soc Nephrol JASN*. avr 2015;26(4):876-87.
16. Lano G, Burtey S, Sallée M. Indoxyl Sulfate, a Uremic Endotheliotoxin. *Toxins*. 5 avr 2020;12(4):E229.
17. Jourde-Chiche N, Burtey S. Accumulation of protein-bound uremic toxins: the kidney remains the leading culprit in the gut-liver-kidney axis. *Kidney Int*. juin 2020;97(6):1102-4.
18. Stinghen AEM, Pecoits-Filho R. Vascular damage in kidney disease: beyond hypertension. *Int J Hypertens*. 2011;2011:232683.
19. Gondouin B, Cerini C, Dou L, Sallée M, Duval-Sabatier A, Pletinck A, et al. Indolic uremic solutes increase tissue factor production in endothelial cells by the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Kidney Int*. oct 2013;84(4):733-44.
20. Kolachalama VB, Shashar M, Alousi F, Shivanna S, Rijal K, Belghasem ME, et al. Uremic Solute-Aryl Hydrocarbon Receptor-Tissue Factor Axis Associates with Thrombosis after Vascular Injury in Humans. *J Am Soc Nephrol JASN*. 17 janv 2018;
21. Dou L, Jourde-Chiche N, Faure V, Cerini C, Berland Y, Dignat-George F, et al. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J Thromb Haemost JTH*. juin 2007;5(6):1302-8.
22. Yamaguchi J, Tanaka T, Inagi R. Effect of AST-120 in Chronic Kidney Disease Treatment: Still a Controversy? *Nephron*. 2017;135(3):201-6.
23. Gaxatte C, Daroux M, Bloch J, Puisieux F, Deramecourt V, Boulanger E. [Cognitive impairment and chronic kidney disease: which links?]. *Nephrol Ther*. févr 2011;7(1):10-7.
24. Yaffe K, Ackerson L, Kurella Tamura M, Le Blanc P, Kusek JW, Sehgal AR, et al. Chronic kidney disease and cognitive function in older adults: findings from the chronic renal insufficiency cohort cognitive study. *J Am Geriatr Soc*. févr 2010;58(2):338-45.

25. Gupta A, Montgomery RN, Bedros V, Lesko J, Mahnken JD, Chakraborty S, et al. Subclinical Cognitive Impairment and Listing for Kidney Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 19 mars 2019;CJN.11010918.
26. Burns CM, Knopman DS, Tupper DE, Davey CS, Slinin YM, Lakshminarayan K, et al. Prevalence and Risk of Severe Cognitive Impairment in Advanced Chronic Kidney Disease. *J Gerontol Ser A*. 2 mars 2018;73(3):393-9.
27. Gesualdo GD, Duarte JG, Zazzetta MS, Kusumota L, Say KG, Pavarini SCI, et al. Cognitive impairment of patients with chronic renal disease on hemodialysis and its relationship with sociodemographic and clinical characteristics. *Dement Neuropsychol*. sept 2017;11(3):221-6.
28. Graham JE, Rockwood K, Beattie BL, Eastwood R, Gauthier S, Tuokko H, et al. Prevalence and severity of cognitive impairment with and without dementia in an elderly population. *Lancet Lond Engl*. 21 juin 1997;349(9068):1793-6.
29. Krishnan AV, Kiernan MC. Neurological complications of chronic kidney disease. *Nat Rev Neurol*. oct 2009;5(10):542-51.
30. Xu H, Garcia-Ptacek S, Trevisan M, Evans M, Lindholm B, Eriksdotter M, et al. Kidney Function, Kidney Function Decline, and the Risk of Dementia in Older Adults: A Registry-Based Study. *Neurology*. 15 juin 2021;96(24):e2956-65.
31. Berger I, Wu S, Masson P, Kelly PJ, Duthie FA, Whiteley W, et al. Cognition in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. déc 2016;14(1):206.
32. Hartung EA, Erus G, Jawad AF, Laney N, Doshi JJ, Hooper SR, et al. Brain Magnetic Resonance Imaging Findings in Children and Young Adults With CKD. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2018;72(3):349-59.
33. Chen X, Kong J, Pan J, Huang K, Zhou W, Diao X, et al. Kidney damage causally affects the brain cortical structure: A Mendelian randomization study. *EBioMedicine*. oct 2021;72:103592.
34. Pépin M, Ferreira AC, Arici M, Bachman M, Barbieri M, Bumblyte IA, et al. Cognitive disorders in patients with chronic kidney disease: specificities of clinical assessment. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 28 déc 2021;37(Suppl 2):ii23-32.
35. Horowitz B, Miskulin D, Zager P. Epidemiology of hypertension in CKD. *Adv Chronic Kidney Dis*. mars 2015;22(2):88-95.
36. Koye DN, Magliano DJ, Nelson RG, Pavkov ME. The Global Epidemiology of Diabetes and Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. mars 2018;25(2):121-32.
37. Liabeuf S, Pepin M, Franssen CFM, Viggiano D, Carriazo S, Gansevoort RT, et al. Chronic kidney disease and neurological disorders: are uraemic toxins the missing piece of the puzzle? *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 28 déc 2021;37(Suppl 2):ii33-44.

38. Dobre M, Gaussoin SA, Bates JT, Chonchol MB, Cohen DL, Hostetter TH, et al. Serum Bicarbonate Concentration and Cognitive Function in Hypertensive Adults. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 6 avr 2018;13(4):596-603.
39. Imenez Silva PH, Unwin R, Hoorn EJ, Ortiz A, Trepiccione F, Nielsen R, et al. Acidosis, cognitive dysfunction and motor impairments in patients with kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 28 déc 2021;37(Supplement_2):ii4-12.
40. Polinder-Bos HA, García DV, Kuipers J, Elting JWJ, Aries MJH, Krijnen WP, et al. Hemodialysis Induces an Acute Decline in Cerebral Blood Flow in Elderly Patients. *J Am Soc Nephrol JASN*. avr 2018;29(4):1317-25.
41. Joshee P, Wood AG, Wood ER, Grunfeld EA. Meta-analysis of cognitive functioning in patients following kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 1 juill 2018;33(7):1268-77.
42. Chen HJ, Wen J, Qi R, Zhong J, Schoepf UJ, Varga-Szemes A, et al. Re-Establishing Brain Networks in Patients with ESRD after Successful Kidney Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 06 2018;13(1):109-17.
43. Chu NM, Gross AL, Shaffer AA, Haugen CE, Norman SP, Xue QL, et al. Frailty and Changes in Cognitive Function after Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol JASN*. févr 2019;30(2):336-45.
44. Palmer S, Vecchio M, Craig JC, Tonelli M, Johnson DW, Nicolucci A, et al. Prevalence of depression in chronic kidney disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Kidney Int*. juill 2013;84(1):179-91.
45. Hedayati SS, Gregg LP, Carmody T, Jain N, Toups M, Rush AJ, et al. Effect of Sertraline on Depressive Symptoms in Patients With Chronic Kidney Disease Without Dialysis Dependence: The CAST Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 21 nov 2017;318(19):1876.
46. Haruyama N, Fujisaki K, Yamato M, Eriguchi M, Noguchi H, Torisu K, et al. Improvement in spatial memory dysfunction by telmisartan through reduction of brain angiotensin II and oxidative stress in experimental uremic mice. *Life Sci*. 15 sept 2014;113(1-2):55-9.
47. Fujisaki K, Tsuruya K, Yamato M, Toyonaga J, Noguchi H, Nakano T, et al. Cerebral oxidative stress induces spatial working memory dysfunction in uremic mice: neuroprotective effect of tempol. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. mars 2014;29(3):529-38.
48. Mazumder MK, Giri A, Kumar S, Borah A. A highly reproducible mice model of chronic kidney disease: Evidences of behavioural abnormalities and blood-brain barrier disruption. *Life Sci*. 15 sept 2016;161:27-36.
49. Karbowska M, Hermanowicz JM, Tankiewicz-Kwedlo A, Kalaska B, Kaminski TW, Nosek K, et al. Neurobehavioral effects of uremic toxin–indoxyl sulfate in the rat model. *Sci Rep*. déc 2020;10(1):9483.

50. Li LC, Chen WY, Chen JB, Lee WC, Chang CC, Tzeng HT, et al. The AST-120 Recovers Uremic Toxin-Induced Cognitive Deficit via NLRP3 Inflammasome Pathway in Astrocytes and Microglia. *Biomedicines*. 17 sept 2021;9(9):1252.
51. Mazumder MK, Paul R, Bhattacharya P, Borah A. Neurological sequel of chronic kidney disease: From diminished Acetylcholinesterase activity to mitochondrial dysfunctions, oxidative stress and inflammation in mice brain. *Sci Rep*. 28 févr 2019;9(1):3097.
52. Yu YH, Kim SW, Park DK, Song HY, Kim DS, Gil HW. Altered Emotional Phenotypes in Chronic Kidney Disease Following 5/6 Nephrectomy. *Brain Sci*. 30 juin 2021;11(7):882.
53. Watanabe K, Watanabe T, Nakayama M. Cerebro-renal interactions: impact of uremic toxins on cognitive function. *Neurotoxicology*. sept 2014;44:184-93.
54. Yeh YC, Huang MF, Liang SS, Hwang SJ, Tsai JC, Liu TL, et al. Indoxyl sulfate, not p-cresyl sulfate, is associated with cognitive impairment in early-stage chronic kidney disease. *NeuroToxicology*. mars 2016;53:148-52.
55. Lin YT, Wu PH, Liang SS, Mubanga M, Yang YH, Hsu YL, et al. Protein-bound uremic toxins are associated with cognitive function among patients undergoing maintenance hemodialysis. *Sci Rep*. 31 déc 2019;9(1):20388.
56. Sato E, Tanaka A, Oyama JI, Yamasaki A, Shimomura M, Hiwatashi A, et al. Long-term effects of AST-120 on the progression and prognosis of pre-dialysis chronic kidney disease: a 5-year retrospective study. *Heart Vessels*. oct 2016;31(10):1625-32.
57. De Deyn PP, Vanholder R, Eloot S, Glorieux G. Guanidino compounds as uremic (neuro)toxins. *Semin Dial*. août 2009;22(4):340-5.
58. D'Hooge R, Pei YQ, Marescau B, De Deyn PP. Convulsive action and toxicity of uremic guanidino compounds: behavioral assessment and relation to brain concentration in adult mice. *J Neurol Sci*. oct 1992;112(1-2):96-105.
59. Malhotra R, Persic V, Zhang W, Brown J, Tao X, Rosales L, et al. Tryptophan and Kynurenine Levels and Its Association With Sleep, Nonphysical Fatigue, and Depression in Chronic Hemodialysis Patients. *J Ren Nutr*. juill 2017;27(4):260-6.
60. Assem M, Lando M, Grissi M, Kamel S, Massy ZA, Chillon JM, et al. The Impact of Uremic Toxins on Cerebrovascular and Cognitive Disorders. *Toxins*. 22 juill 2018;10(7).
61. Adesso S, Magnus T, Cuzzocrea S, Campolo M, Rissiek B, Paciello O, et al. Indoxyl Sulfate Affects Glial Function Increasing Oxidative Stress and Neuroinflammation in Chronic Kidney Disease: Interaction between Astrocytes and Microglia. *Front Pharmacol*. 2017;8:370.
62. Watanabe K, Sato E, Mishima E, Watanabe M, Abe T, Takahashi N, et al. Effect of uremic toxins on hippocampal cell damage: analysis in vitro and in rat model of chronic kidney disease. *Heliyon*. févr 2021;7(2):e06221.

63. Adesso S, Paterniti I, Cuzzocrea S, Fujioka M, Autore G, Magnus T, et al. AST-120 Reduces Neuroinflammation Induced by Indoxyl Sulfate in Glial Cells. *J Clin Med*. 17 oct 2018;7(10).
64. Sato E, Saigusa D, Mishima E, Uchida T, Miura D, Morikawa-Ichinose T, et al. Impact of the Oral Adsorbent AST-120 on Organ-Specific Accumulation of Uremic Toxins: LC-MS/MS and MS Imaging Techniques. *Toxins*. 28 déc 2017;10(1):19.
65. Oshima N, Onimaru H, Matsubara H, Uchida T, Watanabe A, Takechi H, et al. Uric acid, indoxyl sulfate, and methylguanidine activate bulbospinal neurons in the RVLM via their specific transporters and by producing oxidative stress. *Neuroscience*. 24 sept 2015;304:133-45.
66. Juricek L, Coumoul X. The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Nervous System. *Int J Mol Sci*. 24 août 2018;19(9):E2504.
67. Assefa EG, Yan Q, Gezahegn SB, Salissou MTM, He S, Wu N, et al. Role of Resveratrol on Indoxyl Sulfate-Induced Endothelial Hyperpermeability via Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR)/Src-Dependent Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 27 nov 2019;2019:1-15.
68. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl*. mars 2012;2(1):2.
69. Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, Abulfaraj M, Alqahtani F, Koulouridis I, et al. World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. sept 2013;8(9):1482-93.
70. Hoste EAJ, Bagshaw SM, Bellomo R, Cely CM, Colman R, Cruz DN, et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med*. août 2015;41(8):1411-23.
71. Nisula S, Kaukonen KM, Vaara ST, Korhonen AM, Poukkanen M, Karlsson S, et al. Incidence, risk factors and 90-day mortality of patients with acute kidney injury in Finnish intensive care units: the FINNAKI study. *Intensive Care Med*. mars 2013;39(3):420-8.
72. Wang HE, Muntner P, Chertow GM, Warnock DG. Acute kidney injury and mortality in hospitalized patients. *Am J Nephrol*. 2012;35(4):349-55.
73. Gaudry S, Hajage D, Schortgen F, Martin-Lefevre L, Pons B, Boulet E, et al. Initiation Strategies for Renal-Replacement Therapy in the Intensive Care Unit. *N Engl J Med*. 14 juill 2016;375(2):122-33.
74. Gaudry S, Hajage D, Martin-Lefevre L, Lebbah S, Louis G, Moschietto S, et al. Comparison of two delayed strategies for renal replacement therapy initiation for severe acute kidney injury (AKIKI 2): a multicentre, open-label, randomised, controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 3 avr 2021;397(10281):1293-300.
75. King JD, Kern MH, Jaar BG. Extracorporeal Removal of Poisons and Toxins. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 6 sept 2019;14(9):1408-15.

76. Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int.* mars 2012;81(5):442-8.
77. Cooper JD, Lazarowitz VC, Arieff AI. Neurodiagnostic abnormalities in patients with acute renal failure. *J Clin Invest.* juin 1978;61(6):1448-55.
78. Medani SA, Kheir AEM, Mohamed MB. Acute kidney injury in asphyxiated neonates admitted to a tertiary neonatal unit in Sudan. *Sudan J Paediatr.* 2014;14(2):29-34.
79. Ahmed M, Sriganesh K, Vinay B, Umamaheswara Rao GS. Acute kidney injury in survivors of surgery for severe traumatic brain injury: Incidence, risk factors, and outcome from a tertiary neuroscience center in India. *Br J Neurosurg.* 2015;29(4):544-8.
80. Robba C, Banzato E, Rebora P, Iaquaniello C, Huang CY, Wieggers EJA, et al. Acute Kidney Injury in Traumatic Brain Injury Patients: Results From the Collaborative European NeuroTrauma Effectiveness Research in Traumatic Brain Injury Study. *Crit Care Med.* janv 2021;49(1):112-26.
81. Siew ED, Fissell WH, Tripp CM, Blume JD, Wilson MD, Clark AJ, et al. Acute Kidney Injury as a Risk Factor for Delirium and Coma during Critical Illness. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 juin 2017;195(12):1597-607.
82. André C, Bennis Y, Titeca-Beauport D, Caillard P, Cluet Y, Kamel S, et al. Two rapid, accurate liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the quantification of seven uremic toxins: An application for describing their accumulation kinetic profile in a context of acute kidney injury. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1 sept 2020;1152:122234.
83. Caillard P, Bennis Y, Six I, Bodeau S, Kamel S, Choukroun G, et al. The Role of Gut-Derived, Protein-Bound Uremic Toxins in the Cardiovascular Complications of Acute Kidney Injury. *Toxins.* 11 mai 2022;14(5):336.
84. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, et al. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol JASN.* juill 2012;23(7):1258-70.
85. Wang W, Hao G, Pan Y, Ma S, Yang T, Shi P, et al. Serum indoxyl sulfate is associated with mortality in hospital-acquired acute kidney injury: a prospective cohort study. *BMC Nephrol.* déc 2019;20(1):57.
86. Iwata K, Watanabe H, Morisaki T, Matsuzaki T, Ohmura T, Hamada A, et al. Involvement of indoxyl sulfate in renal and central nervous system toxicities during cisplatin-induced acute renal failure. *Pharm Res.* avr 2007;24(4):662-71.
87. Hoke TS, Douglas IS, Klein CL, He Z, Fang W, Thurman JM, et al. Acute renal failure after bilateral nephrectomy is associated with cytokine-mediated pulmonary injury. *J Am Soc Nephrol JASN.* janv 2007;18(1):155-64.

88. Liu M, Liang Y, Chigurupati S, Lathia JD, Pletnikov M, Sun Z, et al. Acute kidney injury leads to inflammation and functional changes in the brain. *J Am Soc Nephrol JASN*. juill 2008;19(7):1360-70.
89. Fuquay R, Renner B, Kulik L, McCullough JW, Amura C, Strassheim D, et al. Renal ischemia-reperfusion injury amplifies the humoral immune response. *J Am Soc Nephrol JASN*. juin 2013;24(7):1063-72.
90. Adrogué HJ, Madias NE. Hyponatremia. *N Engl J Med*. 25 mai 2000;342(21):1581-9.
91. Giuliani C, Peri A. Effects of Hyponatremia on the Brain. *J Clin Med*. 28 oct 2014;3(4):1163-77.
92. Ali F, Tayeb O, Attallah A. II. Plasma and brain catecholamines in experimental uremia: Acute and chronic studies. *Life Sci*. nov 1985;37(19):1757-64.
93. Adachi N, Lei B, Deshpande G, Seyfried FJ, Shimizu I, Nagaro T, et al. Uraemia suppresses central dopaminergic metabolism and impairs motor activity in rats. *Intensive Care Med*. oct 2001;27(10):1655-60.
94. Jeppsson B, Freund HR, Gimmon Z, James JH, von Meyenfeldt MF, Fischer JE. Blood-brain barrier derangement in uremic encephalopathy. *Surgery*. juill 1982;92(1):30-5.
95. van Spronsen FJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ. Brain dysfunction in phenylketonuria: is phenylalanine toxicity the only possible cause? *J Inher Metab Dis*. févr 2009;32(1):46-51.
96. de Oliveira J, Farias HR, Streck EL. Experimental evidence of tyrosine neurotoxicity: focus on mitochondrial dysfunction. *Metab Brain Dis*. oct 2021;36(7):1673-85.
97. Sun H, Frassetto L, Benet LZ. Effects of renal failure on drug transport and metabolism. *Pharmacol Ther*. janv 2006;109(1-2):1-11.
98. Blanco V, Hernandorena C, Scibona P, Belloso W, Musso C. Acute Kidney Injury Pharmacokinetic Changes and Its Impact on Drug Prescription. *Healthcare*. 14 janv 2019;7(1):10.
99. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Artico M. Development of the blood-brain barrier: A historical point of view. *Anat Rec B New Anat*. janv 2006;289B(1):3-8.
100. Ahn SI, Kim Y. Human Blood-Brain Barrier on a Chip: Featuring Unique Multicellular Cooperation in Pathophysiology. *Trends Biotechnol*. août 2021;39(8):749-52.
101. Mahringer A, Ott M, Reimold I, Reichel V, Fricker G. The ABC of the blood-brain barrier - regulation of drug efflux pumps. *Curr Pharm Des*. 2011;17(26):2762-70.
102. Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic BV. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell*. 19 nov 2015;163(5):1064-78.

103. Ando Y, Okada H, Takemura G, Suzuki K, Takada C, Tomita H, et al. Brain-Specific Ultrastructure of Capillary Endothelial Glycocalyx and Its Possible Contribution for Blood Brain Barrier. *Sci Rep.* déc 2018;8(1):17523.
104. Geldenhuys WJ, Mohammad AS, Adkins CE, Lockman PR. Molecular determinants of blood-brain barrier permeation. *Ther Deliv.* 2015;6(8):961-71.
105. Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature.* oct 2006;443(7112):700-4.
106. Navarro R, Compte M, Álvarez-Vallina L, Sanz L. Immune Regulation by Pericytes: Modulating Innate and Adaptive Immunity. *Front Immunol.* 2016;7:480.
107. Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature.* 25 nov 2010;468(7323):557-61.
108. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 1 janv 2006;7(1):41-53.
109. Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci.* mai 2015;16(5):249-63.
110. Vainchtein ID, Molofsky AV. Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. *Trends Neurosci.* mars 2020;43(3):144-54.
111. Abdullahi W, Tripathi D, Ronaldson PT. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1 sept 2018;315(3):C343-56.
112. Koh SXT, Lee JKW. S100B as a marker for brain damage and blood-brain barrier disruption following exercise. *Sports Med Auckl NZ.* mars 2014;44(3):369-85.
113. Gaillard PJ, de Boer ABG, Breimer DD. Pharmacological investigations on lipopolysaccharide-induced permeability changes in the blood-brain barrier in vitro. *Microvasc Res.* janv 2003;65(1):24-31.
114. Kang C, You Y, Ahn HJ, Park JS, Jeong W, Min JH, et al. Blood-brain barrier disruption as a cause of various serum neuron-specific enolase cut-off values for neurological prognosis in cardiac arrest patients. *Sci Rep.* 9 févr 2022;12(1):2186.
115. Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer.* janv 2020;20(1):26-41.
116. Böttcher C, Schlickeiser S, Sneeboer MAM, Kunkel D, Knop A, Paza E, et al. Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nat Neurosci.* janv 2019;22(1):78-90.
117. Petito CK, Morgello S, Felix JC, Lesser ML. The Two Patterns of Reactive Astrocytosis in Postischemic Rat Brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* nov 1990;10(6):850-9.

118. Guo L, Fernandez R, Sakamoto A, Cornelissen A, Paek KH, Lee PJ, et al. Vascular Permeability Assay in Human Coronary and Mouse Brachiocephalic Arteries. *Bio-Protoc.* 20 oct 2018;8(20):e3048.
119. Radu M, Chernoff J. An in vivo Assay to Test Blood Vessel Permeability. *J Vis Exp.* 16 mars 2013;(73):50062.
120. Natarajan R, Northrop N, Yamamoto B. Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-Dextran Extravasation as a Measure of Blood-Brain Barrier Permeability. *Curr Protoc Neurosci.* 10 avr 2017;79:9.58.1-9.58.15.
121. Lorberboym M, Blankenberg FG, Sadeh M, Lampl Y. In vivo imaging of apoptosis in patients with acute stroke: correlation with blood-brain barrier permeability. *Brain Res.* 4 août 2006;1103(1):13-9.
122. Heye AK, Culling RD, Valdés Hernández M del C, Thrippleton MJ, Wardlaw JM. Assessment of blood–brain barrier disruption using dynamic contrast-enhanced MRI. A systematic review. *NeuroImage Clin.* 2014;6:262-74.
123. Skogseid IM, Nordby HK, Urdal P, Paus E, Lilleaas F. Increased serum creatine kinase BB and neuron specific enolase following head injury indicates brain damage. *Acta Neurochir (Wien).* sept 1992;115(3-4):106-11.
124. Tiainen M, Roine RO, Pettilä V, Takkunen O. Serum Neuron-Specific Enolase and S-100B Protein in Cardiac Arrest Patients Treated With Hypothermia. *Stroke.* déc 2003;34(12):2881-6.
125. Rech TH, Vieira SRR, Nagel F, Brauner JS, Scalco R. Serum neuron-specific enolase as early predictor of outcome after in-hospital cardiac arrest: a cohort study. *Crit Care Lond Engl.* 2006;10(5):R133.
126. Cheng F, Yuan Q, Yang J, Wang W, Liu H. The Prognostic Value of Serum Neuron-Specific Enolase in Traumatic Brain Injury: Systematic Review and Meta-Analysis. *Ai J, éditeur. PLoS ONE.* 4 sept 2014;9(9):e106680.
127. Deye N, Nguyen P, Vodovar N, Sadoune M, Collet C, Voicu S, et al. Protein S100B as a reliable tool for early prognostication after cardiac arrest. *Resuscitation.* nov 2020;156:251-9.
128. Thelin EP, Jeppsson E, Frostell A, Svensson M, Mondello S, Bellander BM, et al. Utility of neuron-specific enolase in traumatic brain injury; relations to S100B levels, outcome, and extracranial injury severity. *Crit Care.* déc 2016;20(1):285.
129. Nation DA, Sweeney MD, Montagne A, Sagare AP, D’Orazio LM, Pachicano M, et al. Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nat Med.* févr 2019;25(2):270-6.
130. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol.* mars 2018;14(3):133-50.

131. Kortekaas R, Leenders KL, van Oostrom JCH, Vaalburg W, Bart J, Willemsen ATM, et al. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol.* févr 2005;57(2):176-9.
132. Morris GP, Clark IA, Vissel B. Inconsistencies and Controversies Surrounding the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol Commun.* déc 2014;2(1):135.
133. Prasad S, Sajja RK, Naik P, Cucullo L. Diabetes Mellitus and Blood-Brain Barrier Dysfunction: An Overview. *J Pharmacovigil.* juin 2014;2(2):125.
134. Hoffman WH, Stamatovic SM, Andjelkovic AV. Inflammatory mediators and blood brain barrier disruption in fatal brain edema of diabetic ketoacidosis. *Brain Res.* 13 févr 2009;1254:138-48.
135. Dehondt JD, Holay Q, Brohee S, Mourre H, Hak JF, Osman O, et al. Diabetes is an Independent Growth Factor of Ischemic Stroke During Reperfusion Phase Leading to Poor Clinical Outcome. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc.* juill 2022;31(7):106477.
136. Katsi V, Marketou M, Maragkoudakis S, Didagelos M, Charalambous G, Parthenakis F, et al. Blood-brain barrier dysfunction: the undervalued frontier of hypertension. *J Hum Hypertens.* oct 2020;34(10):682-91.
137. Foulquier S, Namsolleck P, Van Hagen BT, Milanova I, Post MJ, Blankesteyn WM, et al. Hypertension-induced cognitive impairment: insights from prolonged angiotensin II infusion in mice. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens.* oct 2018;41(10):817-27.
138. Hurwitz AA, Berman JW, Lyman WD. The role of the blood-brain barrier in HIV infection of the central nervous system. *Adv Neuroimmunol.* janv 1994;4(3):249-56.
139. Kealy J, Greene C, Campbell M. Blood-brain barrier regulation in psychiatric disorders. *Neurosci Lett.* mai 2020;726:133664.
140. Lecoffre C, de Peretti C, Gabet A, Grimaud O, Woimant F, Giroud M, et al. L'accident vasculaire cérébral en France : patients hospitalisés pour AVC en 2014 et évolutions 2008-2014. *Bull Epidémiologique Hebdomadair.* 2017;(n°. 5):84-94.
141. Lecoffre C, de Peretti C, Gabet A, Grimaud O, Woimant F, Giroud M, et al. Mortalité par accident vasculaire cérébral en France en 2013 et évolutions 2008-2013. *Bull Epidémiologique Hebdomadair.* 2017;(n°. 5):95-100.
142. Allain S, Naouri D, de Peretti C. En France, les AVC sont plus fréquents, plus graves et moins souvent pris en charge en unité spécialisée pour les personnes les plus modestes. *DREES Etudes Résultats.* 2022;(1219).
143. Saver JL. Time Is Brain—Quantified. *Stroke.* janv 2006;37(1):263-6.
144. Emberson J, Lees KR, Lyden P, Blackwell L, Albers G, Bluhmki E, et al. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis

with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *The Lancet*. nov 2014;384(9958):1929-35.

145. HAS. « Accident vasculaire cérébral (AVC) : prise en charge précoce » - Recommandations de bonne pratique. mai 2009;
146. Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI, Pereira VM, et al. Stent-Retriever Thrombectomy after Intravenous t-PA vs. t-PA Alone in Stroke. *N Engl J Med*. 11 juin 2015;372(24):2285-95.
147. Campbell BCV, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, et al. Endovascular Therapy for Ischemic Stroke with Perfusion-Imaging Selection. *N Engl J Med*. 12 mars 2015;372(11):1009-18.
148. Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, et al. A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*. 1 janv 2015;372(1):11-20.
149. Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, Bonafe A, Budzik RF, Bhuva P, et al. Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N Engl J Med*. 4 janv 2018;378(1):11-21.
150. Fischer U, Kaesmacher J, Strbian D, Eker O, Cognard C, Plattner PS, et al. Thrombectomy alone versus intravenous alteplase plus thrombectomy in patients with stroke: an open-label, blinded-outcome, randomised non-inferiority trial. *The Lancet*. juill 2022;400(10346):104-15.
151. Lansberg MG, Albers GW, Wijman CAC. Symptomatic intracerebral hemorrhage following thrombolytic therapy for acute ischemic stroke: a review of the risk factors. *Cerebrovasc Dis Basel Switz*. 2007;24(1):1-10.
152. An SJ, Kim TJ, Yoon BW. Epidemiology, Risk Factors, and Clinical Features of Intracerebral Hemorrhage: An Update. *J Stroke*. 31 janv 2017;19(1):3-10.
153. Verney C, Legouis D, Placier S, Migeon T, Bonnin P, Buob D, et al. Anaesthesia-Induced Transcriptomic Changes in the Context of Renal Ischemia Uncovered by the Use of a Novel Clamping Device. *Int J Mol Sci*. 11 sept 2021;22(18):9840.
154. Schreiber A, Shulhevich Y, Geraci S, Hesser J, Stsepankou D, Neudecker S, et al. Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. sept 2012;303(5):F783-788.
155. Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautam SC, Xu YX, et al. Intraatrial transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. sept 2000;20(9):1311-9.
156. Percie du Sert N, Alfieri A, Allan SM, Carswell HV, Deuchar GA, Farr TD, et al. The IMPROVE Guidelines (Ischaemia Models: Procedural Refinements Of in Vivo Experiments). *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. nov 2017;37(11):3488-517.

157. Canazza A, Minati L, Boffano C, Parati E, Binks S. Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies. *Front Neurol.* 2014;5:19.
158. Garrigue P, Giacomino L, Bucci C, Muzio V, Filannino MA, Sabatier F, et al. Single photon emission computed tomography imaging of cerebral blood flow, blood-brain barrier disruption, and apoptosis time course after focal cerebral ischemia in rats. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc.* janv 2016;11(1):117-26.
159. Garrigue P, Hache G, Bennis Y, Brige P, Stalin J, Pellegrini L, et al. Erythropoietin Pretreatment of Transplanted Endothelial Colony-Forming Cells Enhances Recovery in a Cerebral Ischemia Model by Increasing Their Homing Ability: A SPECT/CT Study. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* nov 2016;57(11):1798-804.
160. Schallert T, Leasure JL, Kolb B. Experience-associated structural events, subependymal cellular proliferative activity, and functional recovery after injury to the central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* nov 2000;20(11):1513-28.
161. Liu S, Zhen G, Meloni BP, Campbell K, Winn HR. RODENT STROKE MODEL GUIDELINES FOR PRECLINICAL STROKE TRIALS (1ST EDITION). *J Exp Stroke Transl Med.* 1 janv 2009;2(2):2-27.
162. Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke.* avr 2001;32(4):1005-11.
163. Schallert T, Upchurch M, Wilcox RE, Vaughn DM. Posture-independent sensorimotor analysis of inter-hemispheric receptor asymmetries in neostriatum. *Pharmacol Biochem Behav.* mai 1983;18(5):753-9.
164. Moubarik C, Guillet B, Youssef B, Codaccioni JL, Piercecchi MD, Sabatier F, et al. Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke. *Stem Cell Rev.* mars 2011;7(1):208-20.
165. Pellegrini L, Bennis Y, Velly L, Grandvuillemin I, Pisano P, Bruder N, et al. Erythropoietin protects newborn rat against sevoflurane-induced neurotoxicity. *Paediatr Anaesth.* juill 2014;24(7):749-59.
166. Bartolini L, Casamenti F, Pepeu G. Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine, and nucleus basalis lesions. *Pharmacol Biochem Behav.* févr 1996;53(2):277-83.
167. Heiss WD. Radionuclide imaging in ischemic stroke. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* nov 2014;55(11):1831-41.
168. Lancelot S, Roche R, Slimen A, Bouillot C, Levigoureux E, Langlois JB, et al. A multi-atlas based method for automated anatomical rat brain MRI segmentation and extraction of PET activity. *PloS One.* 2014;9(10):e109113.

169. Pexman JH, Barber PA, Hill MD, Sevick RJ, Demchuk AM, Hudon ME, et al. Use of the Alberta Stroke Program Early CT Score (ASPECTS) for assessing CT scans in patients with acute stroke. *AJNR Am J Neuroradiol.* sept 2001;22(8):1534-42.
170. Levin A, Stevens PE. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward. *Kidney Int.* janv 2014;85(1):49-61.
171. Malhotra K, Katsanos AH, Goyal N, Tayal A, Gensicke H, Mitsias PD, et al. Intravenous thrombolysis in patients with chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurology.* 14 juill 2020;95(2):e121-30.
172. Murray IA, Flaveny CA, DiNatale BC, Chairó CR, Schroeder JC, Kusnadi A, et al. Antagonism of Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling by 6,2',4'-Trimethoxyflavone. *J Pharmacol Exp Ther.* janv 2010;332(1):135-44.
173. Zhao B, DeGroot DE, Hayashi A, He G, Denison MS. CH223191 Is a Ligand-Selective Antagonist of the Ah (Dioxin) Receptor. *Toxicol Sci.* oct 2010;117(2):393-403.
174. Nankivell BJ, Fawdry RM, Harris DC. Assessment of glomerular filtration rate in small animals by intraperitoneal 99mTc DTPA. *Kidney Int.* févr 1992;41(2):450-4.
175. Sallée M, Dou L, Cerini C, Poitevin S, Brunet P, Burtsey S. The aryl hydrocarbon receptor-activating effect of uremic toxins from tryptophan metabolism: a new concept to understand cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Toxins.* 4 mars 2014;6(3):934-49.
176. Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS.* déc 2012;9(1):23.
177. Kawedia JD, Jiang M, Kulkarni A, Waechter HE, Matlin KS, Pauletti GM, et al. The protein kinase A pathway contributes to Hg²⁺-induced alterations in phosphorylation and subcellular distribution of occludin associated with increased tight junction permeability of salivary epithelial cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther.* sept 2008;326(3):829-37.
178. Wang X, Hawkins BT, Miller DS. Aryl hydrocarbon receptor-mediated up-regulation of ATP-driven xenobiotic efflux transporters at the blood-brain barrier. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* févr 2011;25(2):644-52.
179. Shen J, Xu G, Zhu R, Yuan J, Ishii Y, Hamashima T, et al. PDGFR- β restores blood-brain barrier functions in a mouse model of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* août 2019;39(8):1501-15.
180. Lendahl U, Nilsson P, Betsholtz C. Emerging links between cerebrovascular and neurodegenerative diseases—a special role for pericytes. *EMBO Rep [Internet].* 5 nov 2019 [cité 12 oct 2022];20(11). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embr.201948070>

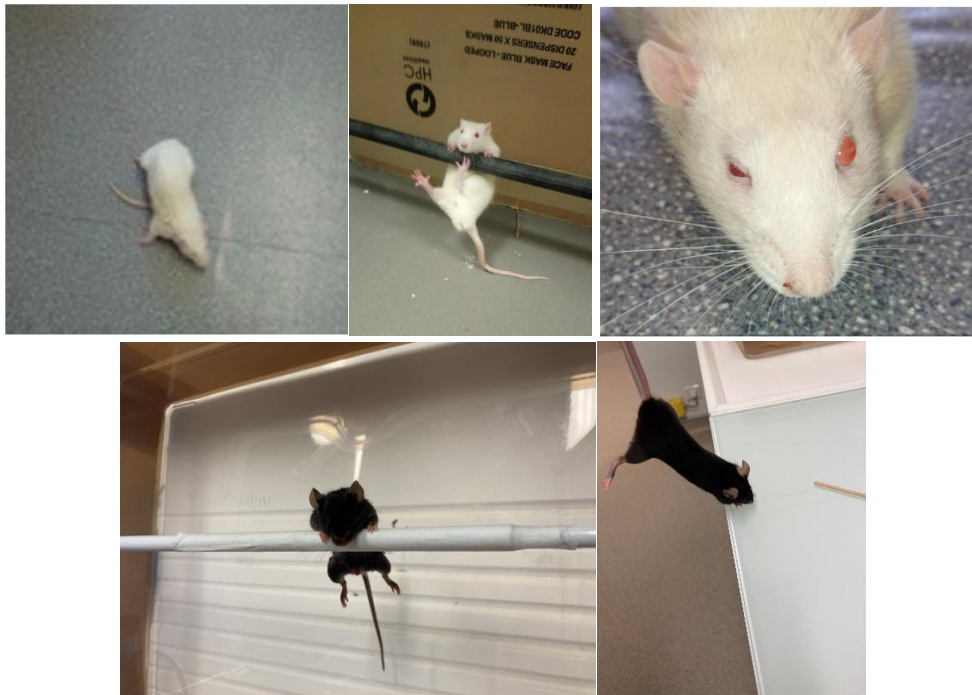
181. Yang C, Hawkins KE, Doré S, Candelario-Jalil E. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1 févr 2019;316(2):C135-53.
182. Makhloufi C, Crescence L, Darbousset R, McKay N, Massy ZA, Dubois C, et al. Assessment of Thrombotic and Bleeding Tendency in Two Mouse Models of Chronic Kidney Disease: Adenine-Diet and 5/6th Nephrectomy. *TH Open.* avr 2020;04(02):e66-76.
183. Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2015;39(1-3):84-92.
184. Miranda AS, Cordeiro TM, dos Santos Lacerda Soares TM, Ferreira RN, Simões e Silva AC. Kidney-brain axis inflammatory cross-talk: from bench to bedside. *Clin Sci.* 1 juin 2017;131(11):1093-105.
185. Ojo ES, Tischkau SA. The Role of AhR in the Hallmarks of Brain Aging: Friend and Foe. *Cells.* 13 oct 2021;10(10):2729.
186. Xu K, Yang Z, Shi R, Luo C, Zhang Z. Expression of aryl hydrocarbon receptor in rat brain lesions following traumatic brain injury. *Diagn Pathol.* déc 2016;11(1):72.
187. Dauchy S, Dutheil F, Weaver RJ, Chassoux F, Daumas-Duport C, Couraud PO, et al. ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *J Neurochem.* déc 2008;107(6):1518-28.
188. Cuartero MI, Ballesteros I, de la Parra J, Harkin AL, Abautret-Daly A, Sherwin E, et al. L-kynurenine/aryl hydrocarbon receptor pathway mediates brain damage after experimental stroke. *Circulation.* 2 déc 2014;130(23):2040-51.
189. Coda AR, Anzilotti S, Boscia F, Greco A, Panico M, Gargiulo S, et al. In vivo imaging of CNS microglial activation/macrophage infiltration with combined [18F]DPA-714-PET and SPIO-MRI in a mouse model of relapsing remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* janv 2021;48(1):40-52.
190. Sivandzade F, Cucullo L. In-vitro blood-brain barrier modeling: A review of modern and fast-advancing technologies. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* oct 2018;38(10):1667-81.
191. Barba C, Benoit B, Bres E, Chanon S, Vieille-Marchiset A, Pinteaur C, et al. A low aromatic amino-acid diet improves renal function and prevent kidney fibrosis in mice with chronic kidney disease. *Sci Rep.* 28 sept 2021;11(1):19184.
192. Okishima A, Koide H, Hoshino Y, Egami H, Hamashima Y, Oku N, et al. Design of Synthetic Polymer Nanoparticles Specifically Capturing Indole, a Small Toxic Molecule. *Biomacromolecules.* 8 avr 2019;20(4):1644-54.
193. Ferrier J. Domperidone as an unintended antipsychotic. *Can Pharm J Rev Pharm Can.* mars 2014;147(2):76-7.

194. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest.* 1 juin 1996;97(11):2517-24.
195. Dan Y, Murakami H, Koyabu N, Ohtani H, Sawada Y. Distribution of domperidone into the rat brain is increased by brain ischaemia or treatment with the P-glycoprotein inhibitor verapamil. *J Pharm Pharmacol.* mai 2002;54(5):729-33.
196. Heykants J, Knaeps A, Meuldermans W, Michiels M. On the pharmacokinetics of domperidone in animals and man. I. Plasma levels of domperidone in rats and dogs. Age related absorption and passage through the blood brain barrier in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1981;6(1):27-36.
197. van Asperen J, Schinkel AH, Beijnen JH, Nooijen WJ, Borst P, van Tellingen O. Altered pharmacokinetics of vinblastine in Mdr1a P-glycoprotein-deficient Mice. *J Natl Cancer Inst.* 17 juill 1996;88(14):994-9.
198. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bédirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, et al. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc.* avr 2005;53(4):695-9.
199. Baddeley A. Working Memory: The Interface between Memory and Cognition. *J Cogn Neurosci.* 1992;4(3):281-8.
200. Stroop JR. Studies of interference in serial verbal reactions. *J Exp Psychol.* déc 1935;18(6):643-62.
201. Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry.* juin 1961;4:561-71.

ANNEXES



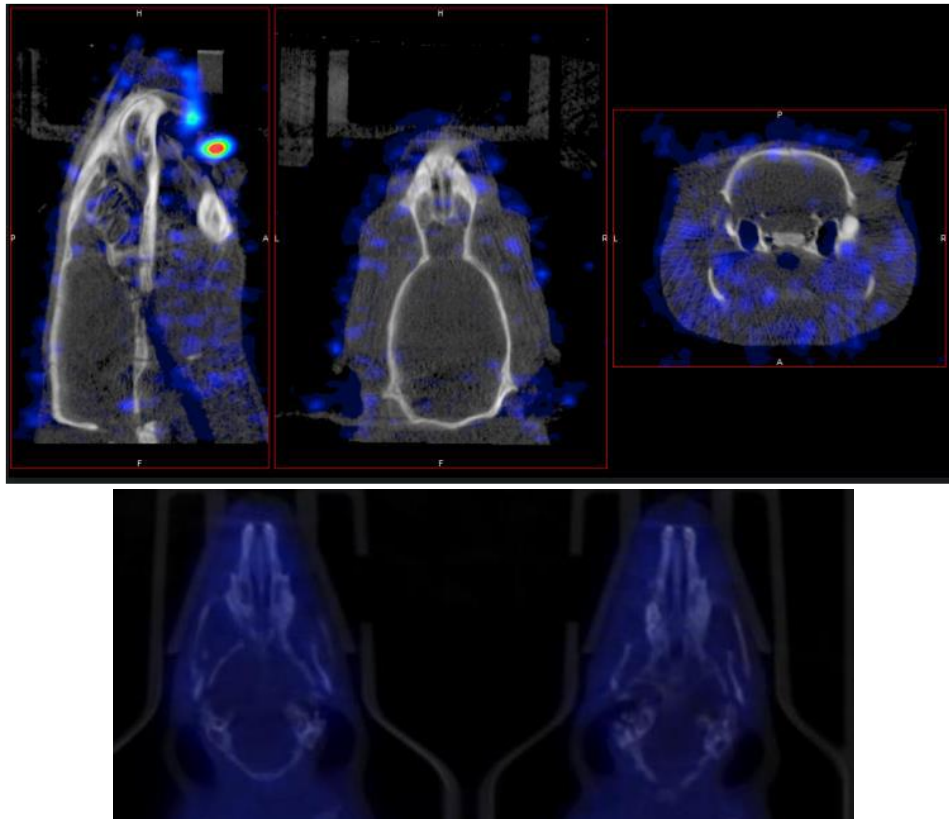
Annexe 1 : Souris porteuses de clamps RIRI



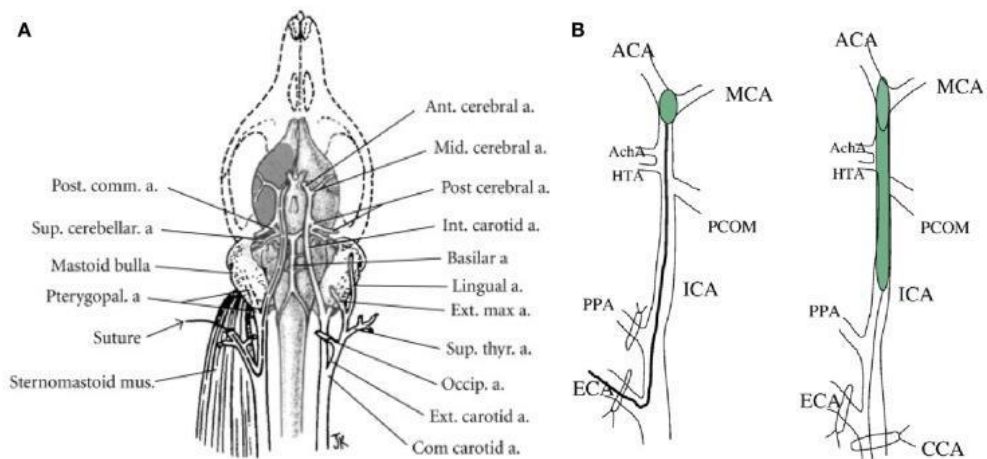
Annexe 2 : Test mNSS chez le rat et la souris

Modified neurological severity score point (mNSS)	
Motor functions	Score
<u>Raising rat by tail</u>	
Flexion of forelimb	1
Flexion of hindlimb	1
Head moved > 10° to vertical axis within 30 sec	1
<u>Placing rat on floor</u>	
Normal walk	0
Inability to walk straight	1
Circles toward paretic side	2
Falls down to paretic side	3
<u>Sensory tests</u>	
Placing test (visual and tactile test)	1
Proprioceptive test (deep sensation, pushing paw against table edge to stimulate limb muscles)	1
<u>Beam balance tests (normal=0, maximum=6)</u>	
Balances with steady posture	0
Grasps side of beam	1
Hugs beam and 1 limb falls down from beam	2
Hugs beam and 2 limbs falls down from beam, or spins on beam (>60 sec)	3
Attempts to balance on beam but falls off (>40 sec)	4
Attempts to balance on beam but falls off (>20 sec)	5
Falls off, no attempt to balance or hang on to beam (<20 sec)	6
<u>Reflex absence and abnormal movements</u>	
Pinna reflex (head shake when auditory meatus is touched)	1
Corneal reflex (eye blink when cornea is lightly touched with cotton)	1
Startle reflex (motor responses to a brief noise)	1
Seizures, myoclonus, myodystony	1
Maximum points	18

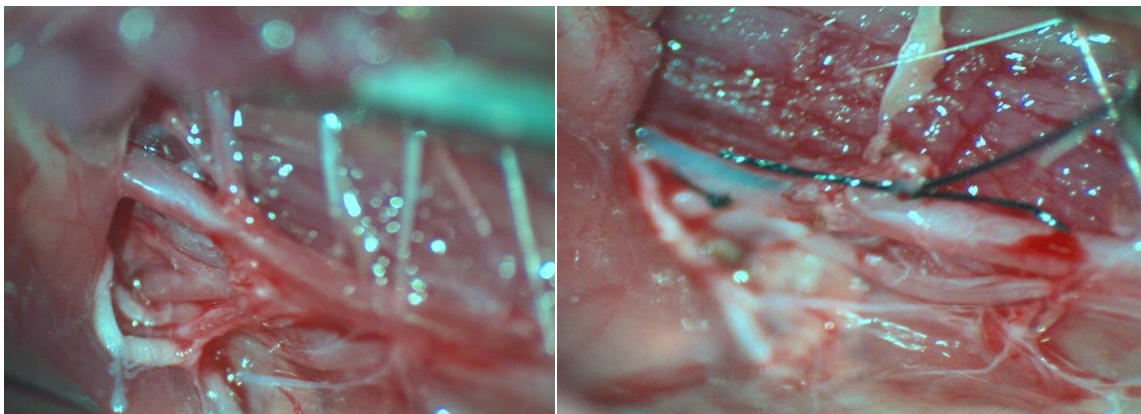
Annexe 3 : Grille du score mNSS – selon Chen et al., 2001 (162)



Annexe 4 : SPECT/CT cérébrale au ^{99m}Tc-DTPA chez le rat et la souris



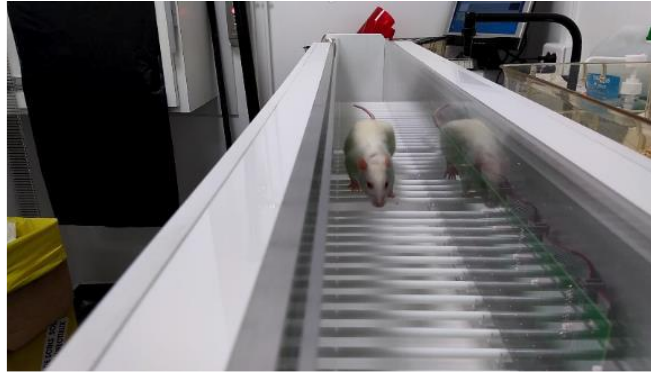
Annexe 5 : Schéma anatomique récapitulant la procédure d'OACM (Canazza et al., 2014 (157))



Annexe 6 : Chirurgie de l'OACM. A) Dissection des artères du cou. B) Filament introduit dans l'artère carotide interne



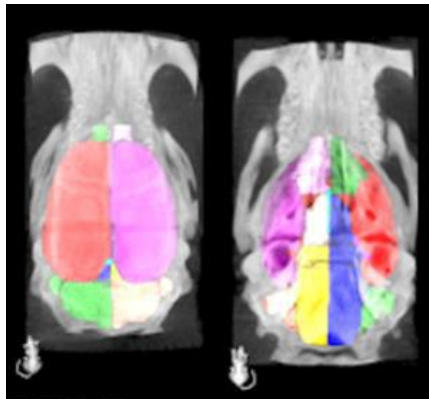
Annexe 7 : Angioscanner cérébral chez le rat. Cercle vert : arrêt du flux correspondant à l'extrémité du filament (marqué en rouge) à la naissance de l'artère cérébrale moyenne



Annexe 8 : Foot-fault test



Annexe 9 : Test de reconnaissance du nouvel objet



Annexe 10 : Atlas cérébral utilisé pour la quantification de la radioactivité en SPECT chez le rat

Abréviations

ACFA : Arythmique Complète par Fibrillation Auriculaire
ADC : Coefficient de diffusion apparent
AIT : Accident ischémique transitoire
AOMI : Artériopathie oblitérante des membres inférieurs
AhR : Aryl hydrocarbon Receptor
ASPECTS : Alberta Stroke Program Early CT Score
AVC : Accident Vasculaire Cérébral
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
BREIN : Blood BRein barrier Evaluation In Nephrology
DFG : Débit de Filtration Glomérulaire
DFGe : Débit de Filtration Glomérulaire estimé
DMSA : Acide Di-Mercapto-Succinique
DTPA : Acide Diéthylène-Triamine-Penta-Acétique
NF-kB : Facteur nucléaire Kappa-B
FC : Fréquence cardiaque
FITC : IsoThioCyanate de Fluorescéine
HMPAO : Moxa-Méthyl-Propyl-AmineOxime
HTA : Hypertension Artérielle
IRA : Insuffisance Rénale Aiguë
IRC : Insuffisance Rénale Chronique
IS : Indoxyl Sulfate
KDIGO : Kidney Disease: Improving Global Outcomes
mNSS : Modified Neurologic Severity Score
MRC : Maladie Rénale Chronique
mRS : Modified Rankin Scale
OACM : Occlusion de l'Artère Cérébral Moyenne
NaCl : Chlorure de sodium
NIHSS : National Institutes of Health Stroke Scale
OR : Odds ratio
P-gp : Glycoprotéine P
PBS : Tampon de Phosphate Salin
RISOTTO : Renal Impact on Stroke Outcomes after Thrombectomy and Thrombolysis
RNO : Reconnaissance du Nouvel Objet
SPECT/CT : Tomographie par Emission Monophotonique couplée au scanner
Tc : Technétium
TAD : Tension artérielle systolique
TAS : Tension artérielle diastolique
TEP/CT : Tomographie par Emission de Positions couplée au scanner
TRA : Test du Retrait de l'Adhésif

Soutiens et Prix

Ces travaux ont obtenu les bourses et prix suivants :

- 2018 : **Bourse IRCT-Dialyse de la Société Francophone de Néphrologie Dialyse et Transplantation (SFNDT)**
- 2019 : **Appel d'Offre Recherche Clinique Junior AP-HM** pour l'étude BREIN
- 2019 : **Prix de la communication – European Renal Association**
- 2020 : **Prix Claude Martin de l'Association des PU-PH de Marseille – Médaille d'argent**
- 2021 : **Prix de la SFNDT**
- 2022 : **Bourse d'aide à la Mobilité Hospitalo-Universitaire des Hôpitaux de Marseille Phoceo**
- 2022 : **Prix Jeune Chercheur – Gabriel Richet de la Fondation du Rein**

Remerciements

Au Professeur Benjamin GUILLET : Un grand merci pour ton accueil au CERIMED, ton encadrement, tes excellents conseils et ton expertise, ainsi que ta sympathie et ta bienveillance durant ma thèse. C'est un vrai plaisir de pouvoir continuer à travailler avec toi à développer cette thématique passionnante au sein de notre équipe de recherche.

Au Docteur Guillaume HACHE : Merci pour m'avoir initié à la recherche et à l'esprit scientifique lors de mon Master 2. Merci pour ton encadrement et de ton aide précieuse au cours de ces années, et de m'avoir apporté ton expertise et ta rigueur, qui nous a permis de mener à bien ce très beau projet scientifique et nous ouvre encore plein de belles perspectives.

Au Professeur Stéphane BURTEY : Merci de m'avoir inspiré sur la voie de la recherche en néphrologie dès le début de mon internat et la grande qualité de ton enseignement. Je suis très heureux d'avoir toujours pu compter sur ton avis d'une grande pertinence en médecine comme en recherche, et que tu présides mon jury de thèse.

Au Docteur Pierre GALICHON : Merci pour toutes tes bonnes idées, de m'avoir accueilli à Tenon et de m'avoir permis d'explorer les atteintes neurologiques au cours de l'insuffisance rénale aiguë, d'avoir accueilli ce projet et mes idées avec toujours beaucoup d'enthousiasme, et de me faire le plaisir de juger l'ensemble mon travail.

Au Professeur Sophie LIABEUF et au Professeur Lara ZAFRANI : Merci de me faire l'honneur d'avoir accepté de juger mon travail et d'en être les rapportrices.

A notre équipe de recherche au sein du C2VN et du CERIMED : Samantha FERNANDEZ, Laure BALASSE, Philippe GARRIGUE, Ahlem BOUHLEL, Pauline BRIGE, Anthony COPPOLA, Vincent VIDAL et Michel SKANDALOVSKI. Heureux de rejoindre l'équipe !

A l'équipe de CORAKID INSERM 1155 à Tenon ayant participé à ce projet : au Dr Juliette HADCHOUËL, Sandrine PLACIER, Liliane LOUEDEC, Perrine FRERE, Marie-Christine VERPONT, Aurélie PRIGNON, et toutes les incroyables personnes que j'ai pu y rencontrer. Merci de votre accueil, j'ai passé une excellente année avec vous à Paris, et j'ai hâte de poursuivre nos collaborations.

A mes co-thésards et voisins de bureau à Marseille et Paris : Anaïs MOYON, Oriane NACHAR, Béatrice LOUIS, Vincent NAIL, Cyril MOUSSEAU, Justine SERRE, Sarah DROUIN et Chloé SAMSON.

Au centre de Néphrologie et Transplantation Rénale de l'Hôpital de la Conception, aux médecins, internes, IDE et AS m'ayant soutenu depuis le début. Une pensée particulière aux médecins du service qui m'ont vu grandir et m'ont fait aimer la néphrologie : Le Pr Valérie MOAL, le Pr Bertrand DUSSOL, le Dr Thomas ROBERT, le Dr Marion SALLEE, le Dr Tristan LEGRIS, le Dr Dammar BOUCHOUAREB. A mes collègues le Dr Justine SOLIGNAC, le Dr Maxence TAILLAR, le Dr Pierre-Antonin RIGON, le Dr Julie BRUNO, le Dr Romain VIAL et le Dr Marion GULLY.

Au Professeur Philippe BRUNET : Merci pour votre confiance et de votre soutien. Merci de m'avoir guidé durant ces années avec bienveillance et gentillesse. Vos bons conseils ont été décisifs dans mes choix professionnels. C'est une vraie fierté de rejoindre votre équipe. Je vous en suis très reconnaissant. Soyez assuré de mon profond respect.

Au Professeur Yvon BERLAND : Merci Monsieur pour votre soutien bienveillant depuis le début de mon internat, ainsi que dans ma carrière universitaire. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Au Professeur Noémie JOURDE-CHICHE : Tu as été un modèle pour moi dès mes débuts en néphrologie. Merci pour la grande qualité de ton enseignement, ta gentillesse et ton soutien. Je suis très fier d'être ton élève. Travailler avec toi chaque jour est un réel plaisir.

Merci aux patients et aux volontaires d'avoir accepté de participer à l'étude BREIN avec enthousiasme, et particulièrement à Julien FARAUT pour son aide plus que précieuse pour les inclusions. A l'équipe de médecine nucléaire du Pr Eric GUEDJ et au Dr Sandra GONZALEZ pour avoir rendu cette étude possible.

Au Pr Laurent SUISSA, au Dr Emilie DOCHE et au Dr Jean-François HAK, pour votre aide indispensable dans l'étude RISOTTO et leurs très bons conseils.

Au Professeur Laurent PAPAZIAN et au Dr Jean-Marie FOREL, ainsi qu'à toute l'équipe médicale et paramédicale de la Réanimation DRIS. J'ai passé une superbe année en réanimation à vos côtés dont je garderai un excellent souvenir, merci pour votre sympathie et tout ce que vous m'avez appris. Je suis très heureux que nous gardions un lien fort.

A la direction du C2VN, au Professeur Marie-Christine ALESSI et au Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE. Merci pour votre accueil.

A la faculté des Sciences Médicales et Paramédicales Aix-Marseille et à la CME de l'AP-HM pour m'avoir fait confiance.

A ma famille, pour votre incroyable soutien tout au long de mes études, je ne serai jamais arrivé jusqu'ici sans vous. Je vous dois énormément.

A Sophie : Pour ton soutien au quotidien. Pour me rendre heureux. A notre futur petit Bobinet. Merci pour tout.

Je t'aime.

Résumé

La maladie rénale chronique (MRC) est associée à une altération précoce des fonctions cognitives dont la physiopathologie est mal comprise. La MRC est également un facteur de risque majeur de survenue et de sévérité des accidents vasculaires cérébraux (AVC). Les patients avec une MRC sont exposés à des concentrations importantes de toxines urémiques. Le risque d'événements cardiovasculaires est corrélé à l'accumulation de ces toxines. Par ailleurs, l'insuffisance rénale aiguë (IRA) est également associée à des troubles neurologiques à type de confusion dont les mécanismes sont mal compris.

L'objectif de ces travaux est de caractériser les atteintes neurologiques au cours de la MRC, mais également les atteintes neurovasculaires, du fait que notre équipe a rapporté que certaines toxines comme l'indoxyl sulfate (IS) activent aryl hydrocarbon receptor (AhR), entraînant une dysfonction endothéliale, pour expliquer la susceptibilité aux AVC et aux troubles cognitifs au cours de la MRC.

Nous avons montré que la MRC était associée à une altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE) dans plusieurs modèles de MRC chez le rongeur, en lien avec l'altération des performances cognitives et l'accumulation d'IS. L'inactivation du gène AhR protégeait de l'augmentation de la perméabilité de la BHE induite par l'IS.

Ces observations précliniques sont en cours d'évaluation chez l'homme pour confirmer l'existence d'une perméabilité accrue de la BHE dans la MRC, au cours de l'étude BREIN chez des patients MRC et des volontaires sains (inclusions en cours).

Nous avons par la suite observé après modélisation d'un AVC, que la sévérité des lésions était augmentée chez les rats MRC avec des atteintes neurologiques précoces plus importantes que les animaux contrôles, et une rupture de la BHE plus importante.

Parallèlement nous avons évalué l'impact de la fonction rénale sur la taille et le pronostic des AVC après thrombectomie chez l'homme et observé que la MRC et l'IRA étaient associées à la gravité de l'AVC chez les patients.

Enfin après modélisation d'une IRA par ischémie-reperfusion chez la souris, nous avons observé des atteintes neurologiques précoces et une perméabilité de la BHE accrue par rapport aux animaux contrôles.

Mots clés : Maladie Rénale Chronique, Accident Vasculaire Cérébral, Toxines urémiques, Barrière hémato-encéphalique, Aryl hydrocarbon Receptor, Atteinte cognitive, Insuffisance Rénale Aiguë, Imagerie.

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is associated with early impairment of cognitive functions and its pathophysiology is poorly understood. CKD is also a major risk factor for the occurrence and severity of stroke. Patients with CKD are exposed to high concentrations of uremic toxins. The risk of cardiovascular events is correlated with the accumulation of these toxins. In addition, acute kidney injury (AKI) is associated with neurological disorders such as confusion, the mechanisms of which are also poorly understood.

The objective of this work is to characterize the neurological impairment during CKD, but also neurovascular impairment, as our team has reported that certain toxins such as indoxyl sulfate (IS) activate aryl hydrocarbon receptor (AhR), leading to endothelial dysfunction, to explain the susceptibility to stroke and cognitive disorders during CKD.

We demonstrated that CKD is associated with blood-brain barrier (BBB) impairment in several rodent models of CKD, in relation to impaired cognitive performance and IS accumulation. Invalidation of the AhR gene protected against the IS-induced increase in BBB permeability.

These preclinical observations are being evaluated in humans to confirm the existence of increased BBB permeability in CKD, in the BREIN study in CKD patients and healthy volunteers (inclusions in progress).

We then observed that after modelling a stroke, the severity of the lesions was increased in CKD rats, with greater early neurological damage than in control animals, and greater BBB disruption.

In parallel, we evaluated the impact of kidney function on the size and prognosis of stroke after thrombectomy in humans and observed that CKD and AKI were associated with stroke severity in patients.

Finally, after modelling ischaemia-reperfusion AKI in mice, we observed early neurological damage and higher BBB permeability compared to control animals.

Keywords: Chronic Kidney Disease, Stroke, Uremic toxins, Blood-brain barrier, Aryl hydrocarbon Receptor, Cognitive impairment, Acute Kidney Injury, Imaging