Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Ophélie HELISSEN

Le 14 novembre 2022

Adaptations cardiovasculaires et régulation par le système nerveux autonome, dans un modèle de microgravité simulée chez la souris.

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :
I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par
Anne PAVY-LE TRAON et Constandina ARVANITIS

Jury

Mme Maura STRIGINI, Rapporteure
M. Jacques-Olivier FORTRAT, Rapporteur
Mme Emmanuelle VIDAL-PETIOT, Rapporteure
M. Mohamed Yassine MALLEM, Examinateur
Mme Anne PAVY-LE TRAON, Directrice de thèse
Mme Constandina ARVANITIS, Co-directrice de thèse
Mme Noélie DAVEZAC, Présidente

LE PRESENT TRAVAIL DE DOCTORAT

A ETE REALISEE AU SEIN DE :

L'EQUIPE DE RECHERCHE « **DETERMINANTS MOLECULAIRES ET CLINIQUES DE L'ARCHITECTURE CARDIAQUE** »

DE « **L'INSTITUT DES MALADIES METABOLIQUES ET CARDIOVASCULAIRES** » (UMR 1297, INSERM)

ET « L'**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER** »





FINANCE PAR :

LE « **CENTRE NATIONAL D'ETUDES SPATIALES** » (CNES) ET LA « **FONDATION DE FRANCE** »





REALISE EN COLLABORATION AVEC :

L'INSTITUT DES MATHEMATIQUES DE TOULOUSE

LES PLATEAUX DE PHENOTYPE ET DE MICROCHIRURGIE DU CREFRE (US006, TOULOUSE)

LE LABORATOIRE D'ANALYSE ET D'ARCHITECTURE DES SYSTEMES (LAAS, CNRS, TOULOUSE)

L'UFR STAPS DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

ET, LE LABORATOIRE DE SANTE INGENIERIE BIOLOGIE (SAINBIOSE, UMR 1059, INSERM, SAINT-ETIENNE)











Remerciements

A Mme **Maura Strigini**, Mme **Emmanuelle Vidal-Petiot** et Mr **Jacques-Olivier Fortrat** d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs.

A mes directrices de thèse, Mme **Anne Pavy-Le Traon** et Mme **Dina Arvanitis**, de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse, de m'avoir fait découvrir le monde du système nerveux autonome, de la pression intracrânienne, et du spatial. Vos connaissances en recherche clinique et expérimentale ont été complémentaires et très enrichissantes.

A Mr **Jean-Michel Sénard** et Mme **Céline Galès**, de m'avoir accueilli au sein de votre équipe.

A mes responsables au sein du CNES, Mme **Guillemette Gauquelin-Koch** et Mr **Jean-Luc Morel**, de m'avoir accordé le financement de thèse.

A l'équipe du LAAS, Mr **Christian Bergaud**, Mr **Ali Maziz**, Mr **Clément Cointe**, pour notre collaboration, pour le prêt et le développement des implants, pour votre curiosité scientifique et ces séances de recherche du nerf sympathique !

A Mr **Sébastien Déjean**, pour vos conseils, pour votre aide et tout le travail que vous avez effectué sur les données. Merci également à vos collaborateurs et à vos étudiants, **Lou-Anne**, **Célia**, **Dario**, et **Aurélie**, qui ont grandement participé dans l'avancée du projet.

A Mme **Laurence Vico** et Mme **Laura Peurrière** de SAINBIOSE, pour votre partage de connaissances et de techniques, notre collaboration, le prêt des cages de suspension provenant de l'équipe de Mme **Angèle Chopard**, grâce à qui nous avons pu réaliser toutes ces manipulations de suspension chez la souris.

A Mme **Sophie Le-Gonidec**, pour ton aide précieuse, ta confiance, ces échanges, ces conseils, ces astuces de microchirurgie, de télémétrie, et surtout tous ces essais avec les souris suspendues et la mesure de la pression intracrânienne.

A Mr **Denis Calise**, pour tous ces moments magiques au plateau de microchirurgie. A toutes ces connaissances, techniques, amour de la microchirurgie, que tu as partagé. A ces musiques, conversations, rires, Groot, et à ce nerf sympathique ! Merci d'avoir été là dans les moments difficiles.

A Mme **Christèle Segura**, pour la partie histologie et coupes des lames.

A l'équipe de **DSI**, et en particulier Mr **Yann Abeguilé**, qui nous a apporté leur aide précieuse, leur astuce, pour la mise au point des protocoles de télémétrie et l'analyse HRV chez la souris.

Aux services de **Phénotypage**, de **Zootechnie**, au **SBEA**, pour votre disponibilité et votre aide précieuse.

A Mr **Eric Schmidt**, pour nos réunions autour de la pression intracrânienne et du système autonome.

A Mr **Yann-Gaël Cirodde** et **Xavier Habib**, pour vos conseils et le don des sondes de mesure de la pression intracrânienne Sophysa.

Aux membres de mon comité de suivi de thèse, Mme **Laure Verret** et Mr **Arnaud Vanden-Bossche**, de m'avoir suivi durant toute ma thèse, pour votre écoute, votre disponibilité et tous vos conseils autant professionnels que personnels.

A tous les membres de l'équipe : **Fabien Despas, Véronique Pons, Céline Guilbaud-Frugier, Clément Karsenty, Antoine Deney, Hubert Delasnerie, Florie Perez, Maxime Beneyto, Camélia Djeddai, Sofia Zarifi**… pour nos échanges et votre aide.

A **Marie-Hélène Séguelas** et **Anne Mazars**, pour votre soutien et vos conseils, votre écoute, mais surtout, votre présence pour cette dernière ligne droite, vous m'avez beaucoup apporté. Nos repas, nos pauses, nos conversations, vous me manquerez.

A **Nicolas Pataluch** et **Silvia Arcucci**, pour nos parties de rire, nos courses à Pech David, nos sorties à l'Opéra ou autour d'un jeu de société, et surtout, pour votre soutien, vous avez toujours essayé de me boosté. Tous ces moments étaient précieux.

A **Nathalie Nasr**, pour ces conversations autour du baroréflexe et du système nerveux autonome, pour votre curiosité, vos questionnements qui m'ont aidé à m'améliorer.

A **Marc Kermorgant**, pour ce que tu m'as appris, pour nos travaux en commun, pour m'avoir aidé avec ces fameuses analyses HRS/BRS et cette mesure de la pression intracrânienne… Aussi, de m'avoir accepté dans ton bureau (même si c'était souvent imposé), de m'avoir toujours prêté conseil et oreille, pour nos apéros, nos visionnages, nos conversations. Tu me manqueras ! Yec'hed mat !

A mon responsable de master, Mr **Marc-Antoine Custaud**, de m'avoir donné goût à la physiologie spatiale !

A Mr **Yassine Mallem**, pour ce que vous avez fait pour moi, c'est en partie grâce à vous que j'écris cela aujourd'hui. Merci de m'avoir encadré pour mes projets de stage de Licence Professionnelle et de Master, pour toutes nos conversations et vos conseils, et surtout, votre curiosité scientifique. Vous êtes un mentor pour moi, merci.

A l'équipe NP3 d'Oniris à Nantes, Mr **Jean-Claude Desfontis**, Mme **Chantal Thorin**, Mr **Hervé Pouliquen**, de m'avoir accueilli chaleureusement lors de mes stages et pour vos encouragements. A **Alex Moinard**, à **Alexandra Marziou**, à **Yosra Doghri**, à **Sylvie Chauvin,** qui m'ont également beaucoup apporté, merci de m'avoir soutenu et d'avoir partagé toutes ces beaux moments.

Aux personnes rencontrées au sein de l'Institut : à **Lucille** G., à **Marie-K** S., à **Amandine** W., à **Honora** L., à **Léa** P., à **Mathieu** P., à **Déborah** C., à **Cyrielle** M.A., à **Laurent** M., à **Pénélope** V., à **Kévin** P., à **Valentin** S., à **Karina** F., à **Dorian** B., à **Yohann** S., à **Maximin** D., à **Loubna** K., à **Roberto** P., à **Florence** T., à **Christelle** M., à **Marc** J., **Xavier** S., à **William** O., à **Yannis** S.M., pour votre aide, conversations, pauses et rires !

A toute l'équipe du **PPD**, bureau des étudiants de l'institut, c'était une chouette expérience !

A **Rana** Z., merci pour ton soutien, tes conseils, nos apéros, ton sourire et ta folie de microchirurgienne. Merci à toi aussi **Natalia S**.

A **Vincent** A. et **Albéric** G., de m'avoir soutenu chaque jour, de m'avoir fait rire, conseillé et écouté. Vous êtes des amis précieux, ne changez pas.

A ces personnes qui m'entourent et qui sont très importantes pour moi, vous êtes les meilleurs. **Maxime** B., **Mattéo** M., **Alan** B., **Adrien** A., **Simon** C., **Théo** P., **Marc-Olivier** M., **Sébastien** V., **Philippe** F., **Marion** N., **Michelle** M., **Marjorie** A., **Estelle** G. Je vous aime.

A **ma famille**, à ma **maman**, à mon **papa**, à mon **frère**, à ma **sœur**, à mon **chat**. Vous êtes tout ce qui m'est le plus cher. Merci pour votre soutien et votre amour inconditionnel. Je suis si reconnaissante de partager ma vie avec vous. Merci également à mon **tonton** Didier. A vous, merci d'avoir cru en moi, et de m'avoir offert l'opportunité d'arriver jusqu'ici.

A **moi**, d'avoir réalisé cette aventure professionnelle et personnelle, de m'être surpassée, de m'avoir fait confiance, et d'avoir continué à avancer sans baisser les bras.

Aux **souris** qui ont participé au succès de cette étude.

Aux personnes que j'ai oublié de citer.

Résumé

La microgravité modifie l'homéostasie cardiovasculaire (CV), neurosensorielle, musculaire et osseuse et, de façon moins bien définie, la réponse immunitaire, le sommeil et les rythmes circadiens. En raison d'opportunités limitées de vols spatiaux, des expériences de simulation des effets de la microgravité sont menées sur Terre chez l'Homme et l'animal. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'adaptation CV et à sa régulation par le système nerveux autonome (SNA) dans un modèle murin de microgravité simulée, la suspension par le train arrière à -30°. La microgravité provoque une migration des fluides corporels vers la région thoraco-céphalique, aboutissant à une hypervolémie relative centrale. Au retour sur Terre, le déconditionnement du système CV se manifeste par une tachycardie et une intolérance orthostatique, reflétant une incapacité du système à réguler la pression artérielle (PA) en position debout. Malgré ces résultats, l'adaptation de la régulation CV par le SNA en microgravité reste mal comprise.

La première partie de cette thèse vise à étudier : 1) la cinétique de l'adaptation CV, en particulier la PA et la fréquence cardiaque (FC) à la microgravité simulée à court et long terme (5 jours), ainsi que l'effet des cycles jour/nuit et l'impact d'une courte re-suspension ; 2) la régulation du système CV par le SNA avec l'analyse de la variabilité de la FC et la sensibilité du baroréflexe 3) les conséquences au niveau cardiaque avec le phénotypage structurel et fonctionnel du cœur (échocardiographie et immunomarquage). Les principaux paramètres pouvant influencer les paramètres CV, tels que l'activité locomotrice, la température et la consommation hydrique ont été suivis.

Dans une seconde partie, nous avons cherché à étudier si l'hyperactivité sympathique rapportée en vol pouvait être liée à une augmentation de la pression intracrânienne (PIC). En effet, la migration des fluides pourrait provoquer une augmentation modérée de la PIC. De récents travaux ont montré qu'une augmentation modérée de la PIC entraîne une augmentation parallèle de l'activité du système nerveux sympathique (SNS) chez l'homme et l'animal. Nous faisons l'hypothèse que les variations de la PIC modulent l'activité du SNS, par un mécanisme réflexe intracrânien. D'une part, nous avons étudié les réponses initiales à l'inclinaison à -30° de la PIC, de la PA, de la FC et de la respiration, par des mesures invasives chez la souris anesthésiée.

D'autre part, nous avons utilisé la suspension du train arrière chez des souris C57BL6/J mâles, âgées de 18 à 20 semaines. Les souris ont été équipées d'implants télémétriques pour mesurer en continu la PA, la FC, l'activité locomotrice, la température centrale et sous-cutanée. Nous avons également cherché à mesurer directement la PIC et l'activité nerveuse sympathique rénale *in vivo* par télémétrie. L'enregistrement des paramètres a été réalisé ainsi : 3 jours de contrôle, 5 jours de suspension, 2 jours de récupération et 1 jour de re-suspension. En utilisant un marqueur d'activation neuronale, nous avons réalisé des études préliminaires pour identifier les structures cérébrales impliquées.

Nos résultats ont montré que 5 jours de suspension conduit à une bradycardie initiale les 24 premières heures de suspension, accompagnée d'une augmentation du gain du baroréflexe et de l'activité vagale. La FC revient aux valeurs basales avant la fin de la suspension, malgré la persistance d'une diminution drastique de l'activité. Concernant les modifications possibles de l'activité du SNS, une augmentation progressive de la PA est retrouvée après 72 heures de suspension pouvant refléter une augmentation de l’activité sympathique. Ces résultats contrastent avec une perturbation persistante des rythmes circadiens de la PA et de la FC pendant la suspension. La suspension entraîne également une diminution de la température. Les analyses structurelles du cœur ont révélé une hypertrophie du septum, sans modification fonctionnelle ou cellulaire.

Abstract

Microgravity alters cardiovascular, neuro-sensory, muscular and bone homeostasis, as well as other less defined changes in immune response, sleep and in circadian rhythm. Given the limited opportunities of spaceflight, ground-based experiments are substituted to understand the impact of microgravity in humans and animals. In this work we were interested in cardiovascular adaptation and its regulation by the autonomic nervous system (ANS) in a mouse model of simulated microgravity; hindlimb unloading (HU) at -30°. Certain elements are well known: microgravity induced a migration of body fluids toward the thoraco-cephalic region, resulting in hypovolemia by instigating neuro-hormonal and cardiovascular reflex mechanisms. Microgravity also leads to physical inactivity. Thus, upon returning to Earth, the deconditioning of CV system manifests as tachycardia and orthostatic intolerance. Despite these findings, the adaptation of CV regulation by the ANS in microgravity remains poorly understood.

The first part of this thesis aimed to study: 1) the kinetics of cardiovascular adaptation, in particular arterial blood pressure (ABP) and heart rate (HR) to simulated microgravity during short and long term (5 days), as well as the evolution with the day/light cycles and the impact of a subsequent short resuspension; 2) the regulation of cardiovascular system during HU by the ANS with HR variability analysis and baroreflex sensitivity (BRS) ; 3) the consequences at the cardiac level including structural and functional phenotyping of the heart by echocardiography and immunostaining. Also, locomotor activity, temperature, and fluid intake, were concurrently monitored.

In a second part of this thesis, we sought to study whether the sympathetic hyperactivity already reported in flight could be related to an increase in intracranial pressure (ICP). In fact, fluid migration could cause a moderate increase in ICP. Recent work has shown that a moderate increase in ICP leads to a parallel and reversible increase in the activity of the sympathetic nervous system (SNS) in humans and animals. We hypothesize that the variations of ICP could modulate SNS activity, through the intervention of an intracranial reflex mechanism.

We studied the initial responses to the inclination at -30° of the ICP, ABP, HR and respiration, with invasive measurement in anesthetized mice. On the other hand, we used HU

in male C57BL6/J mice, aged 18-20 weeks. Mice were fitted with telemetric implants in order to continuously measure ABP, HR, locomotor activity, central and subcutaneous temperature. We further sought to measure ICP and renal sympathetic nervous activity (RSNA) directly in vivo by telemetry. The recording of these parameters was carried out as follows: 3 days of baseline, 5 days of suspension, 2 days of recovery and 1 day of re-suspension. Using a neuronal activation marker for activity, we initiated preliminary studies to identify brain structures involved.

Our results showed that 5 days of HU led to significant bradycardia during the first 24 hours of suspension, accompanied by an increase in baroreflex gain and vagal activity. HR returned to baseline before the end of HU, despite the persistence of a drastic decrease in locomotor activity. Concerning the possible modifications of SNS activity, a progressive increase in ABP is found after 72 hours of HU, before returning to baseline values at the end of unloading. These results contrast with a persistent disruption of the circadian rhythms of ABP and HR during the HU. The unloading also leads to a decrease in the temperature. The structural analyses of the heart revealed hypertrophy of the cardiac septum, without functional or cellular modification.

« Le plus grand obstacle à la réussite est l'autocensure »

Thomas Pesquet

Table des matières

REMERCIEMENTS **3**

RESUME **6**

ABSTRACT **8**

LISTE DES ABREVIATIONS **16**

LISTE DES FIGURES **18**

LISTE DES ANNEXES **22**

INTRODUCTION **24**

POSITION DU PROBLEME ET OBJECTIFS DE L'ETUDE **26**

CHAPITRE I – LA MICROGRAVITE **28**

1. IMPACT DE LA MICROGRAVITE SUR LE CORPS HUMAIN 28

1.1. Modifications générales *28*

1.2. Modifications cardiovasculaires *31*

1.2.1. Gravité et système cardiovasculaire 31

1.2.2. Microgravité et redistribution des fluides corporels 32

2. MODELES DE SIMULATION A LA MICROGRAVITE 34

2.1. Modèles humains *34*

2.1.1. Le modèle d'alitement 35

2.1.2. Le modèle d'immersion 35

2.1.3. Vol parabolique 36

2.2. Modèles animaux *37*

CHAPITRE II - LE SYSTEME NERVEUX AUTONOME **40**

1. PHYSIOLOGIE DU SYSTEME NERVEUX AUTONOME 40

1.1. Organisation anatomique et fonctionnelle du système nerveux autonome *40*

1.1.1. Le système nerveux parasympathique 40

1.1.2. Le système nerveux sympathique 42

1.2. Régulation du système cardiovasculaire par le système nerveux autonome *44*

1.2.1. Contrôle du système cardiovasculaire par le SNA 44

1.2.2. Régulation centrale 46

a) Contrôle du cerveau antérieur 47

b) Contrôle du tronc cérébral 48

1.2.3. Réflexes périphériques 49

a) Baroréflexe artériel 49

b) Réflexe cardiopulmonaire 50

c) Chémoréflexe 50

1.2.4. Autres facteurs influençant le système nerveux autonome cardiovasculaire 52
a) Les rythmes circadiens 52
b) Stress psychologique 54
d) La pression intracrânienne 56
2. TECHNIQUES DE MESURES DE L'ACTIVITE NERVEUSE AUTONOME DU SYSTEME CARDIOVASCULAIRE 57
2.1. Les techniques de mesure directe 57
2.1.1. Microneurographie 57
2.2. Les techniques de mesure indirectes 59
2.2.1. Mesure des catécholamines plasmatiques 59
2.2.2. Analyse de la fonction des organes cibles du SNA 59
2.2.3. Analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque 60
2.2.4. Sensibilité du baroréflexe artériel 63
CHAPITRE III – LA MICROGRAVITE ET LE SYSTEME NERVEUX AUTONOME 64
CHAPITRE IV - LA MICROGRAVITE ET LES RYTHMES CIRCADIENS 67
CHAPITRE V – LA MICROGRAVITE ET LA PRESSION INTRACRANIENNE 69
1. LA PRESSION INTRACRANIENNE : DEFINITION 69
2. MODIFICATIONS PHYSIOLOGIQUES 70
3. MODIFICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES 71
4. MECANISMES DE REGULATION 72
4.1. Débit sanguin cérébral et pression de perfusion 72
4.2. Mécanismes compensatoires 72
5. LA MICROGRAVITE 74
METHODOLOGIE 75
PARTIE I. PROTOCOLE CHRONIQUE - REPONSES A LONG TERME 75
PARTIE II. PROTOCOLE AIGU - REPONSES A COURT TERME 77
MATERIELS ET METHODES 79
ANIMAUX 79
MODELE EXPERIMENTAL : SUSPENSION DU TRAIN ARRIERE A -30° 80
PARTIE I – PROTOCOLE CHRONIQUE 82
DESIGN DE L'ETUDE 82
MESURE DE VARIABLES PHYSIOLOGIQUES PAR RADIO-TELEMETRIE 83
1. CHIRURGIE D'IMPLANTATION 84
1.1. Anesthésie et analgésie 84
1.2. Mise en place du cathéter 84

1.3. Mise en place du corps et des électrodes de l'implant ... 86
2. ACQUISITION ET TRAITEMENT DES DONNEES TELEMETRIQUES ... 87
3. ANALYSES DES DONNEES TELEMETRIQUES ... 88
3.1. Modélisation informatique ... 88
3.1.1. Analyse descriptive ... 88
3.1.2. Étude des corrélations ... 88
4. ANALYSES DES RYTHMES CIRCADIENS ... 89
5. ANALYSE DE L'ACTIVITE INDIRECTE DU SYSTEME NERVEUX AUTONOME CARDIOVASCULAIRE ... 90
5.1. Analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque ... 90
5.1.1. Domaine temporel ... 90
5.1.2. Domaine fréquentiel ... 91
5.2. Analyse de la sensibilité du baroréflexe cardiaque ... 93
ANALYSES STATISTIQUES ... 94
ANALYSE STRUCTURELLE ET FONCTIONNELLE DU CŒUR PAR ECHOCARDIOGRAPHIE ... 95
ANALYSE DE LA COMPOSITION CORPORELLE PAR RMN A BAS-CHAMP ... 96
ANALYSE DES TISSUS ... 97
1. SACRIFICE ... 97
2. HISTOLOGIE ET IMMUNOHISTOCHIMIE ... 97
2.1. Cœur ... 97
2.1.1. Marquage des cardiomyocytes (WGA) ... 98
2.1.2. Marquage de la fibrose (Trichrome) ... 98
2.2. Cerveau ... 99
PARTIE II – PROTOCOLE AIGU ... 101
DESIGN DE L'ETUDE ... 101
ANESTHESIE ... 101
MESURE DE LA FREQUENCE CARDIAQUE ET DE LA FREQUENCE RESPIRATOIRE ... 101
MESURE DE LA PRESSION ARTERIELLE ... 102
MESURE DE LA PRESSION INTRACRANIENNE ... 102
MESURES DE L'ACTIVITÉ DU SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE AU NIVEAU DU NERF RENAL. ... 103
1. IMPLANTS ... 103
2. PROCEDURE CHIRURGICALE ... 104
ACQUISITION DES DONNEES ... 105
RESULTATS ... 107

PARTIE I – PROTOCOLE CHRONIQUE 107

(A) ETUDE DE L'ADAPTATION DU SYSTEME CARDIOVASCULAIRE ET AUTONOME DANS LE MODELE DE SUSPENSION DU TRAIN ARRIERE A -30° DE 5 JOURS CHEZ LA SOURIS MALE C57BL/6J 107

PUBLICATION D'UN ARTICLE 107

RESUME DE L'ARTICLE 107

(B) RESULTATS COMPLEMENTAIRES - TELEMETRIE 134

ANALYSE DE LA REPONSE IMMEDIATE UNE HEURE APRES LA SUSPENSION 134

ANALYSE DE LA REPONSE IMMEDIATE QUELQUES HEURES APRES LA SUSPENSION 138

ANALYSE DE LA SUSPENSION ET DE LA RE-SUSPENSION 140

REPONSE IMMEDIATE 140

REPONSE APRES 24 HEURES DE SUSPENSION ET DE RE-SUSPENSION 142

Paramètres hémodynamiques et physiologiques 142

Paramètres du SNA cardiovasculaire 144

ETUDE DE LA CORRELATION ENTRE LES VARIABLES MESUREES 146

CORRELOGRAMME 146

(C) ETUDE DES VARIATIONS DE LA PRESSION INTRACRANIENNE 148

MESURE DE LA PRESSION DE LA VEINE JUGULAIRE SUPERIEURE PAR TELEMETRIE 148

MESURE DE LA PRESSION INTRACRANIENNE PAR TELEMETRIE 151

Mise au point de la procédure chirurgicale 151

Essai de mesure de la PIC sur des souris implantées 152

Exemple pour une souris. 153

(D) IMPACT DE LA SUSPENSION A L'ECHELLE DES TISSUS 158

ANALYSE DE LA COMPOSITION CORPORELLE 158

ANALYSE STRUCTURELLE ET FONCTIONNELLE DU CŒUR PAR ECHOCARDIOGRAPHIE 160

Analyse de la structure 160

Analyse de la fonction 162

Fonction systolique 162

Fonction diastolique 163

ANALYSES IMMUNOHISTOCHIMIQUES 165

Cœur 165

Aire des cardiomyocytes 165

Fibrose 167

Cerveau 168

Activation neuronale 168

PARTIE II – PROTOCOLE AIGU 170

(E) ETUDE DES REPONSES IMMEDIATES A LA SUSPENSION 170

ACQUISITIONS DES PARAMETRES DE MANIERE INVASIVE 170

RESULTATS COMPLEMENTAIRES 173

MESURE DE L'ACTIVITE DIRECTE DU SNA 175

TEST DES IMPLANTS POUR LA MESURE DE L'ACTIVITE NERVEUSE PARASYMPATHIQUE CHEZ LA SOURIS ANESTHESIEE. 176

DESIGN DE NOUVEAUX IMPLANTS POUR LA MESURE DE L'ACTIVITE NERVEUSE 179

DISCUSSION 181

MODELE EXPERIMENTAL 181

MESURE DES PARAMETRES CV EN CONTINU PAR RADIO-TELEMETRIE 185

MESURE INDIRECTE ET DIRECTE DE L'ACTIVITE DU SNA 187

ADAPTATION CV DANS LE MODELE DE SUSPENSION CHEZ LA SOURIS 190

REPONSES DYNAMIQUES A LA SUSPENSION ET A LA RECUPERATION 191

IMPACT DES CYCLES LUMIERE/OBSCURITE ET VARIATIONS DES RYTHMES CIRCADIENS 195

LIMITES DU MODELE ET DES ANALYSES 200

EFFETS DE LA SUSPENSION SUR LE CŒUR 202

MICROGRAVITE SIMULEE, REDISTRIBUTION LIQUIDIENNE ET PIC 205

CONCLUSION 211

PERSPECTIVES 214

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES. 218

ANNEXE I 238

ANNEXE II 251

Liste des abréviations

- **AC** : Autorégulation cérébrale
- **ACh** : Acétylcholine
- **ADH** : Hormone antidiurétique
- **APM** : Acide phosphomolybdique
- **APT** : Acide phosphotungstique
- **AVP** : Arginine-vasopressine
- **CRH :** Corticotropine
- **CV** : Cardiovasculaire
- **DAPI** : 4',6-diamidino-2-phénylindole
- **DI** : Dry immersion – Immersion sèche
- **DSC** : Débit sanguin cérébral
- **FC** : Fréquence cardiaque
- **HDT** : Head-down tilt – Alitement tête déclive
- **HF** : High frequency
- **HPA :** Hypothalamic-pituitary-adrenal
- **IO** : Intolérance orthostatique
- **LCR** : Liquide céphalo-rachidien
- **LF** : Low frequency
- **MVCR** : Médulla ventrocentrale rostrale - RCLM
- **MVLR** : Médulla ventrolatérale rostrale - RVLM
- **NAV** : Nœud atrioventriculaire
- **NPV** : Noyau paraventriculaire
- **NSC** : Noyaux suprachiasmatiques
- **NTS** : Noyau du tractus solitaire
- **OCT** : Tomographie par cohérence optique (Optical coherence tomography)
- **ONSD** : Diamètre de la gaine du nerf optique (Optic nerve sheath diameter)
- **PA** : Pression artérielle
- **PAD** : Pression artérielle diastolique
- **PAM** : Pression artérielle moyenne
- **PAS** : Pression artérielle systolique

- **PIC** : Pression intracrânienne
- **PIO** : Pression intraoculaire
- **PNA** : Peptide natriurétique atrial
- **PPC** : Pression de perfusion cérébrale
- **PVC** : Pression veineuse centrale
- **RMSSD** : Root-mean square differences of successive R-R intervals
- **RSNA** : Renal sympathetic nerve activity
- **RVLM** : Médulla ventrolatérale rostrale
- **RCLM** : Médulla ventrolatérale caudale
- **RVC** : Résistance vasculaire cérébrale
- **SANS** : Syndrome neuro-oculaire associé aux vols spatiaux (Spaceflight-associated neuro-ocular syndrome)
- **SBR** : Sensibilité du baroréflexe artériel
- **SDNN** : Standard deviation of all normal R-R intervals
- **SGP** : Substance grise périaqueducale
- **SNA** : Système nerveux autonome
- **SNC** : Système nerveux central
- **SNP** : Système nerveux parasympathique
- **SNS** : Système nerveux sympathique
- **VFC** : Variabilité de la fréquence cardiaque
- **WGA** : Wheat Germ Agglutinin

Liste des figures

- **Figure 1.** Différentes phases d'adaptation des systèmes physiologiques lors des vols spatiaux.
- **Figure 2.** Principaux effets physiologiques d'une exposition à long terme à la microgravité.
- **Figure 3.** Schématisation de la répartition des liquides de l'organisme et de la pression artérielle, avant vol en position debout (1 G), à la phase initiale et au cours du vol après adaptation (0 G), et lors du retour sur terre (1 G).
- **Figure 4.** Schéma représentant les analogues des vols spatiaux les plus utilisés chez l'Homme, comparés à (a) la posture debout à 1 G.
- **Figure 5.** Trajectoire typique d'un vol parabolique composé des phases consécutives de 20 secondes de gravité normale (1 G), d'hypergravité (1.5 – 1.8 G) et de microgravité (0 G).
- **Figure 6.** Modèle de suspension du train arrière chez le rongeur.
- **Figure 7.** Organisation du système nerveux parasympathique.
- **Figure 8.** Organisation du système nerveux sympathique.
- **Figure 9.** Innervation du cœur et de la glande surrénale par le système nerveux autonome.
- **Figure 10.** Zones centrales de contrôle autonome et niveaux d'interaction.
- **Figure 11.** Contrôle de l'hypotension par le baroréflexe artériel.
- **Figure 12.** Représentation de l'ajustement des réponses ventilatoires et circulatoires par le chemoréflexe.
- **Figure 13.** Horloge circadienne et contrôle de la pression artérielle.
- **Figure 14**. Voies de réponse au stress chez l'homme par le biais du système nerveux autonome et du système endocrinien.
- **Figure 15.** Figure représentant l'enregistrement d'un signal de l'activité nerveuse sympathique et de la pression artérielle.
- **Figure 16.** Schéma d'un tracé d'électrocardiogramme.
- **Figure 17.** Réponses cardiovasculaires suggérées en condition de microgravité réelle et simulée.
- **Figure 18.** Equilibre physiologique donnant la constante de la pression intracrânienne.

- **Figure 19.** Changement posturaux et variations de la pression intracrânienne.
- **Figure 20.** Courbe théorique d'autorégulation cérébrale.
- **Figure 21.** Schéma récapitulatif des procédures expérimentales du protocole chronique.
- **Figure 22.** Schéma récapitulatif des procédures expérimentales du protocole aigu.
- **Figure 23.** Protocole de microgravité simulée chez la souris
- **Figure 24.** Composition de l'implant HD-X11 (DSI)
- **Figure 25.** Schéma de l'implantation du cathéter pour la mesure de la pression artérielle grâce à l'implant télémétrique (HD-X11, DSI) chez la souris.
- **Figure 26.** Extrait d'un enregistrement des données télémétriques.
- **Figure 27.** Analyse de la rythmicité circadienne par la méthode cosinor.
- **Figure 28.** Protocole standardisé pour l'analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque chez la souris implantée d'un capteur télémétrique.
- **Figure 29.** Schéma représentant l'estimation de la sensibilité du baroréflexe par la méthode des séquences.
- **Figure 30.** Schéma de la coupe sagittale des cerveaux de souris adultes et régions anatomiques.
- **Figure 31.** Schéma de l'implant utilisé pour la mesure directe de l'activité nerveuse parasympathique au niveau du nerf vague.
- **Figure 33.** Design expérimental de l'étude.
- **Figure 34.** Variations immédiates des variables hémodynamiques et physiologiques avant et après 15, 30 et 60 minutes de suspension.
- **Figure 35.** Variations immédiates des index fréquentiels et temporels de la variabilité de la fréquence cardiaque, avant et après 15, 20 et 30 minutes de suspension.
- **Figure 36.** Adaptation immédiate des variables hémodynamiques et physiologiques après 15, 30, 60 minutes, 2 heures, 4 heures et 6 heures de suspension.
- **Figure 37.** Variations immédiates des variables hémodynamiques avant et après la suspension et la re-suspension.
- **Figure 38.** Variations sur 24 heures des variables hémodynamiques et physiologiques à la suspension et à la re-suspension.
- **Figure 39.** Variations sur 24 heures des index de la variabilité de la fréquence cardiaque à la suspension et à la re-suspension

- **Figure 40.** Corrélogramme des variables quantitatives.
- **Figure 41.** Extrait d'un enregistrement normal et anormal des signaux de pression mesurés par télémétrie.
- **Figure 42.** Extrait d'un tableau des valeurs de la pression veineuse mesurée par radiotélémétrie chez les souris vigile pendant le protocole expérimental de microgravité.
- **Figure 43.** Variations de la pression veineuse avant (C-3 à C-1), pendant (S1 à S5 ; S+1) et après la suspension (R+1 et R+2).
- **Figure 44.** Chirurgie d'implantation du cathéter de pression pour la mesure de la pression intracrânienne.
- **Figure 45.** Design expérimental des essais réalisés chez la souris inclinée à -30° pour la mesure de la pression intracrânienne à l'aide de l'implant télémétrique.
- **Figure 46.** Variations de la fréquence cardiaque, de la température sous-cutanée et de la pression intracrânienne, avant, pendant et après l'inclinaison à -30°.
- **Figure 47.** Variations moyennes de la température sous-cutanée et de la pression intracrânienne mesurée par télémétrie chez la souris.
- **Figure 48.** Extrait de signaux de la pression intracrânienne et de la fréquence cardiaque enregistrés par télémétrie chez la souris.
- **Figure 49.** Extrait de l'enregistrement du signal de pression de l'implant lorsqu'il est position à 0° et à -45° sur le récepteur de télémétrie.
- **Figure 50.** Schéma de l'inclinaison du cathéter de l'implant télémétrique et des modifications de pression probable.
- **Figure 51.** Analyse de la composition corporelle, avant et après 1 ou 5 jours de suspension.
- **Figure 52.** Analyse de la structure cardiaque avant et après la suspension de 5 jours.
- **Figure 53.** Analyse de la fonction systolique avant et après la suspension de 5 jours.
- **Figure 54.** Analyse de la fonction diastolique avant et après la suspension de 5 jours.
- **Figure 55.** Marquage par immunofluorescence des cœurs de souris contrôle et de souris suspendues pendant 5 jours.
- **Figure 56.** Quantification de l'aire des cardiomyocytes des cœurs de souris contrôle et de souris suspendues pendant 5 jours.

- **Figure 57.** Visualisation et quantification de la fibrose des cœurs de souris contrôle et de souris suspendues pendant 5 jours.
- **Figure 58.** Visualisation de l'activation neuronale des cerveaux de souris contrôle et de souris suspendues.
- **Figure 59.** Images des lames de cerveau (250 µm) de souris contrôle (à gauche) et de souris suspendues pendant 1 jour (à droite).
- **Figure 60.** Schéma d'une souris inclinée à -30°.
- **Figure 61.** Design expérimental du protocole aigu.
- F**igure 62.** Variations de la pression intracrânienne et artérielle, de la fréquence cardiaque et de la température avant, pendant et après l'inclinaison à -30° chez la souris anesthésiée.
- **Figure 63.** Tracé représentant les variations de pression intracrânienne, pression artérielle, fréquence cardiaque et respiration, chez une souris avant, pendant et après l'inclinaison à -30°.
- **Figure 64.** Processus d'enregistrement des données télémétriques de l'activité nerveuse.
- **Figure 65.** Extrait de deux enregistrements de l'activité nerveuse vagale, mesurée au niveau du nerf vague par télémétrie chez la souris anesthésiée.
- **Figure 66.** Mise en évidence du signal et de l'activité nerveuse ainsi que des artéfacts cardiaques.
- **Figure 67.** Focus sur la zone d'intérêt et la présence de bruit de fond.
- **Figure 68.** Focus sur la zone d'intérêt et la présence d'activité électrique intense.
- **Figure 69.** Design du nouvel implant pour la mesure de l'activité nerveuse chez la souris.
- **Figure 70.** Synthèse des adaptations initiales et prolongées pendant et après l'exposition à la microgravité simulée chez la souris.

Liste des annexes

- **Annexe 1.** Kermorgant M, Nasr N, Czosnyka M, Arvanitis DN, Hélissen O, Senard J-M and Pavy-Le Traon A (2020) – **Impacts of Microgravity Analogs to Spaceflight on Cerebral Autoregulation.** Front. Physiol. 11:778. doi: 10.3389/fphys.2020.00778
- **Annexe 2.** Kermorgant M, Sadegh A, Geeraerts T, Varenne F, Liberto J, Roubelat F-P, Bataille N, Bareille M-P, Beck A, Godard B, Golemis A, Nasr N, Arvanitis DN, Hélissen O, Senard J-M, Pavy-Le Traon A and Soler V (2021) – **Effects of Venoconstrictive Thigh Cuffs on Dry Immersion-Induced Ophthalmological Changes.** Front. Physiol. 12:692361. doi: 10.3389/fphys.2021.692361

INTRODUCTION

Introduction

Lors des vols spatiaux, différents facteurs représentés par la microgravité, les radiations cosmiques mais aussi l'isolement, le confinement et les changements de l'alternance lumière/obscurité, vont conditionner l'adaptation de l'organisme à ce nouvel environnement. De ce fait, la microgravité entraine des modifications des systèmes physiologiques, telles que des modifications cardio-vasculaires, neurosensorielles, musculaires et osseuses (Hargens and Richardson, 2009a; Iwase et al., 2020; Custaud et al., 2022). D'autres modifications, moins bien connues, comme des modifications immunologiques, du sommeil et des rythmes circadiens sont aussi rapportées (Tanaka et al., 2017; Marshall-Goebel et al., 2019; Jirak et al., 2022).

Le système cardiovasculaire (CV) est particulièrement concerné par la microgravité. En effet, l'absence de gravité entraine initialement la perte des gradients de pression hydrostatique, provoquant une répartition homogène des fluides sur l'ensemble de l'organisme et une migration de ces fluides vers la région thoraco-céphalique, également appelé le « fluid shift » (Hargens and Richardson, 2009b; Gallo et al., 2020). Il est considéré que ces facteurs sont responsables d'une hypervolémie relative centrale, qui aboutit, par la mise en jeu de mécanismes réflexes CV et neurohormonaux, à une hypovolémie vraie (Gallo et al., 2020). En outre, la durée du vol, la microgravité et le confinement, entrainent ainsi un déconditionnement à la gravité terrestre, lié également à l'inactivité physique et l'absence des contraintes gravitaires sur l'appareil locomoteur (Tanaka et al., 2017; Goswami et al., 2021). Ainsi, au retour sur Terre, le déconditionnement du système CV se manifeste par une tachycardie et une intolérance orthostatique (IO) traduisant une incapacité du système à réguler la pression artérielle (PA) en position debout. De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes probablement multifactoriels de l'IO : hypovolémie, augmentation de la distensibilité veineuse, et notamment troubles de la régulation CV par le système nerveux autonome (SNA) (Zhang et al., 2008; Hargens and Richardson, 2009b; Otsuka et al., 2018; Chouchou et al., 2020).

Le SNA joue un rôle clé dans l'adaptation posturale à la gravité. Malgré ces constatations, l'adaptation de la régulation CV par le SNA en microgravité reste mal connue (Mandsager et al., 2015). Certains travaux ont pu montrer une altération de la sensibilité du baroréflexe artériel (SBR) pendant et après le vol spatial (Eckberg et al., 2010; Hughson et al., 2018). De plus, plusieurs études ont montré l'existence de modifications de l'activité du SNA en microgravité, avec une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique (SNS) et une diminution de l'activité du système nerveux parasympathique (SNP) (Cox et al., 2002; Ertl et al., 2002; Mandsager et al., 2015). (Cox et al., 2002; Ertl et al., 2002; Mandsager et al., 2015). Cependant, l'origine, notamment centrale, de cette modification de l'activité sympathique reste méconnue. Egalement, des modifications de la variabilité de rythme cardiaque (VFC), des modifications de la PA et de la fréquence cardiaque (FC), accompagnées d'altérations des rythmes circadiens pour les vols de longue durée, ont été rapportées (Guo et al., 2014; Yamamoto et al., 2015; Otsuka et al., 2018). Ainsi des modifications de la rythmicité circadienne sont illustrées par une perte des variations rythmiques de la FC, une réduction des différences jour/nuit, après 5 jours d'alitement à -6° chez des volontaires sains (Solbiati et al., 2021).

Position du problème et objectifs de l'étude

Etant données les opportunités limitées des vols spatiaux, des expériences de simulation des effets de la microgravité chez l'Homme et chez l'animal sont réalisées sur Terre. Ces modèles de simulation, autrement appelé « analogues », permettent d'étudier plus précisément l'adaptation des différents systèmes physiologiques à la microgravité, et de mettre au point des moyens préventifs pour les astronautes, appelés les « contre-mesures » (Hargens and Richardson, 2009b; Watenpaugh, 2016).

Le modèle animal le plus communément utilisé pour simuler les effets de la microgravité est le modèle de suspension du train arrière à -30° chez le rongeur (« hindlimb suspension », « hindlimb unloading »). Ce modèle est largement admis par la communauté scientifique, et est décrit comme un modèle fidèle aux modifications musculo-squelettiques et CV retrouvées en microgravité chez l'astronaute (Globus and Morey-Holton, 2016). Bien que plusieurs études aient porté sur l'étude du déconditionnement CV, notamment chez le rat, la cinétique précise de l'adaptation CV pendant et après la suspension, et de sa régulation par le SNA, a beaucoup moins été étudiée notamment chez la souris. Egalement, peu de travaux portent sur les rythmes circadiens des paramètres CV en microgravité réelle et simulée. De plus, les résultats de la littérature sont controversés, pouvant être expliqués par les différences de point de mesure, le modèle utilisé et la durée par exemple. La transposition du modèle animal à l'Homme peut être aussi discutée.

C'est dans ce sens que la première partie de cette thèse était consacrée à l'étude, chez la souris suspendue par le train arrière à -30°, de : 1) la cinétique de l'adaptation CV, en particulier de la PA et de la FC, à la microgravité simulée à court et long terme (5 jours), ainsi que l'évolution avec les cycles jour/nuit et l'impact d'une nouvelle sollicitation par une courte re-suspension ; 2) la régulation CV par le SNA, par l'analyse de la VFC et de la SBR ; 3) les conséquences de la microgravité simulée au niveau cardiaque sur l'analyse structurelle et fonctionnelle du cœur, par échocardiographie et immunohistochimie.

Pour répondre à ces objectifs, le modèle de suspension du train arrière a été utilisé chez des souris C57BL6/J mâles, âgées de 18 à 20 semaines. Les souris ont été équipées d'implants télémétriques afin de mesurer les variations de la PA et de la FC, en continu et en temps réel. Les principaux paramètres pouvant influer les paramètres CV comme l'activité locomotrice, la température sous-cutanée et centrale, la masse et la composition corporelle, ainsi que les apports alimentaires et hydriques, ont été mesurés. L'enregistrement de ces paramètres a été réalisé de la manière suivante : 3 jours de contrôle, 5 jours de suspension, 2 jours de récupération et 1 jour de re-suspension.

Dans la seconde partie de cette thèse, nous avons cherché à étudier si l'hyperactivité sympathique, rapportée en vol spatial, pouvait être liée à une augmentation de la pression intracrânienne (PIC). Lors des vols de longue durée, la migration des fluides vers la partie thoraco-céphalique ainsi que le défaut de drainage veineux, favoriseraient l'apparition de modifications neuro-ophtalmiques (tels que le syndrome neuro-ophtalmique associé aux vols spatiaux, SANS), dont les mécanismes précis font l'objet d'investigations récentes, suggérant une augmentation modérée de la PIC (Zhang and Hargens, 2018; Petersen et al., 2019; Lee et al., 2020; Wojcik et al., 2020). Egalement, de récents travaux ont montré qu'une augmentation modérée de la PIC entraîne une augmentation parallèle de l'activité du SNS chez l'homme et l'animal (Guild et al., 2018; Schmidt et al., 2018; Marina et al., 2020a). C'est pourquoi, nous avons voulu tester l'hypothèse selon laquelle les variations de la PIC modulent l'activité du SNS, par l'intervention d'un mécanisme réflexe intracrânien.

Ainsi, nous avons cherché à étudier les réponses initiales à l'inclinaison à -30° avec des mesures directes et invasives chez la souris anesthésiée, de la PIC, de la PA, de la FC, de la respiration, et de l'activité nerveuse sympathique et vagale au niveau du nerf rénal (RSNA, « Renal Sympathetic Nerve Activity ») et du nerf vague, respectivement. Nous avons également cherché à mesurer les variations directes de la PIC et de l'activité du SNA de manière chronique par télémétrie. En utilisant un marqueur d'activation neuronale, nous avons réalisé des études préliminaires afin d'identifier les structures cérébrales impliquées dans le mécanisme réflexe intracrânien.

Chapitre I – La microgravité

L'espace est un environnement unique, exposant les astronautes à des conditions extrêmes. La microgravité prolongée, le confinement et l'isolement, les radiations cosmiques, les modifications de l'alternance lumière obscurité vont contribuer à un état de stress pour le corps humain. En effet, la microgravité challenge la physiologie conduisant à une adaptation des différents systèmes physiologiques, notamment musculo-squelettique, sensori-moteur, endocrinien et CV (Hughson et al., 2018; Roy-O'Reilly et al., 2021; Custaud et al., 2022).

1. Impact de la microgravité sur le corps humain

1.1. Modifications générales

En fonction des systèmes concernés, l'adaptation à la microgravité survient à des niveaux et des temps différents, qui peuvent aller de quelques jours, à quelques semaines voire à plusieurs mois (Graebe et al., 2004; Iwase et al., 2020). Les astronautes sont confrontés à trois périodes d'adaptation physiologique liée au changement de gravité (FIGURE 1) :

- L'adaptation initiale, correspondant à l'entrée et aux premiers jours d'apesanteur
- L'adaptation prolongée, correspondant à une exposition à plus long-terme (jusqu'à plusieurs mois)
- La réadaptation à la gravité au retour sur Terre

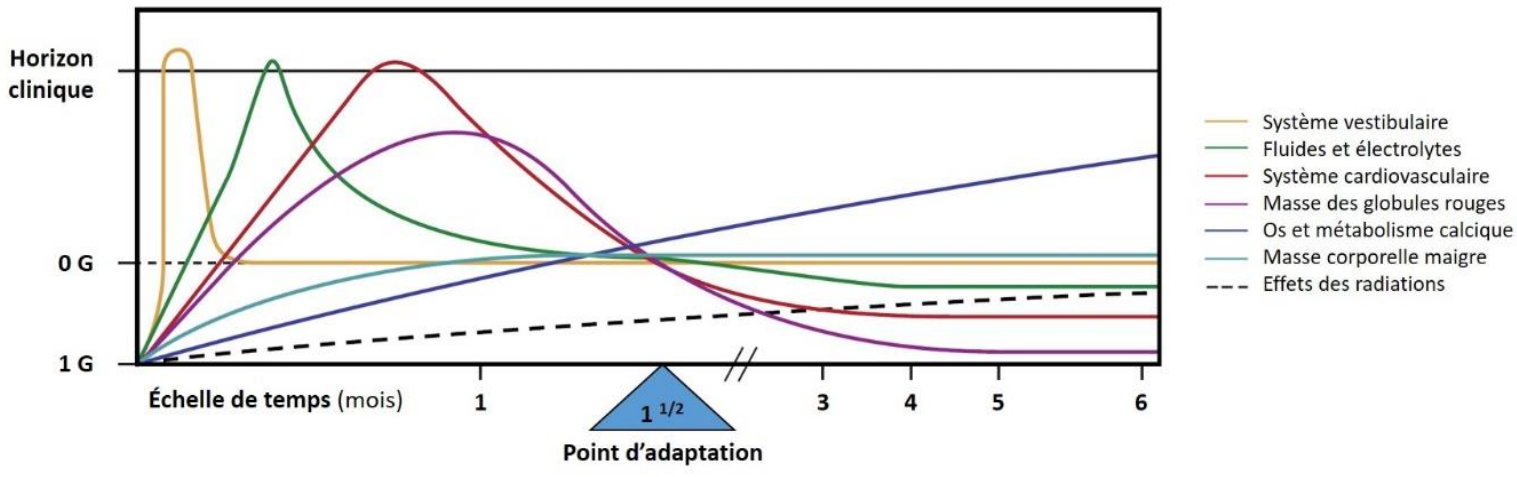


Figure 1. Différentes phases d'adaptation des systèmes physiologiques lors des vols spatiaux.
(Adapté de Zhang and Hargens, 2018)

Le corps humain s'adapte rapidement à l'environnement spatial malgré l'absence de la force gravitationnelle (i.e. la microgravité), l'isolement et le confinement, conduisant une inactivité physique, à la perturbation du sommeil et des rythmes circadiens, ainsi qu'à un stress psychologique et CV (Tanaka et al., 2017; Marshall-Goebel et al., 2019; Jirak et al., 2022).

A l'arrivée en microgravité, la perte des gradients de pression orthostatique entraine une redistribution des fluides corporels vers la partie haute du corps (Hargens and Richardson, 2009b; Gallo et al., 2020).

L'exposition prolongée à la microgravité entraine une « désadaptation » des systèmes, conduisant à des conséquences potentiellement délétères pour l'Homme, lors du retour sur Terre et du retour à la gravité 1 G (FIGURE 2).

En effet, au retour sur Terre, après une exposition prolongée à la microgravité, il est retrouvé un déconditionnement physique se manifestant par une atrophie des muscles posturaux et une diminution de la densité osseuse, notamment des os porteurs (Vico and Pavy-Le Traon, 2010). Concernant le système nerveux et sensori-moteur, l'astronaute présente des troubles de la marche et de l'équilibre au retour sur Terre, ainsi que des illusions sensorielles aux premiers jours post-vol (Tanaka et al., 2017; Custaud et al., 2022). Enfin, il est également retrouvé une IO et un déconditionnement CV, caractérisé par une tachycardie au repos ou en position debout, une diminution de la capacité à l'exercice, une atrophie cardiaque, ainsi qu'une altération de l'efficacité du baroréflexe (Hargens and Watenpaugh, 1996; Hargens and Richardson, 2009b; Iwase et al., 2020; Baran et al., 2021).

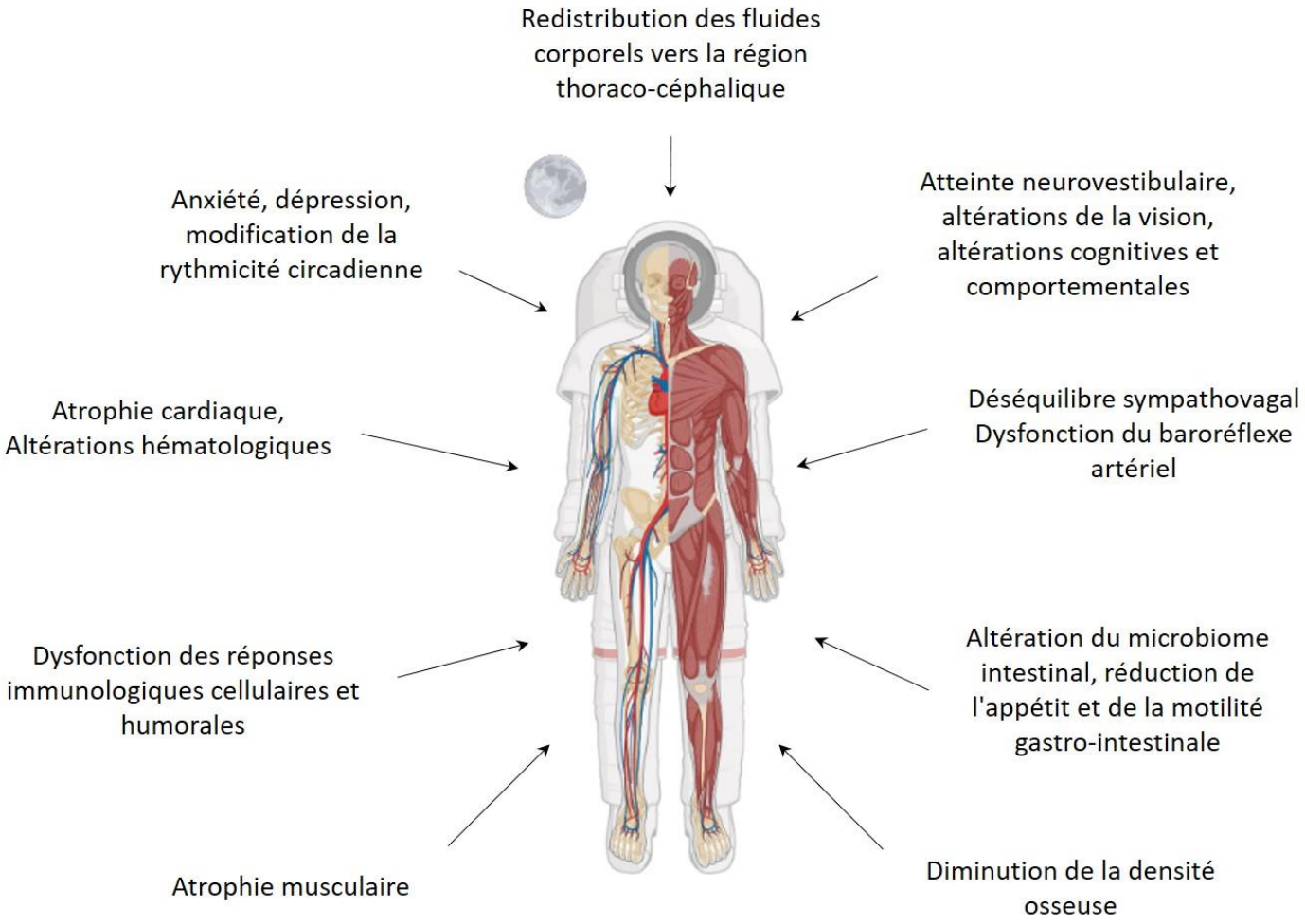


Figure 2. Principaux effets physiologiques d'une exposition à long terme à la microgravité.
(Adapté de Roda et al. 2018)

1.2. Modifications cardiovasculaires

Le système CV est immédiatement affecté lors de l'entrée en microgravité, ce qui entraine l'apparition de signes cliniques dès les premières minutes d'exposition (Riviere, 2009; Iwase et al., 2020).

1.2.1. Gravité et système cardiovasculaire

Sur Terre, l'Homme est en permanence soumis à la force gravitationnelle, ce qui est un déterminant important pour son évolution, son développement et son fonctionnement (Baran et al., 2021). L'alternance d'éveil et de sommeil, et ainsi que nos changements de posture, avec le passage régulier de la position couchée à debout, ont chacun un impact sur le fonctionnement physiologique du corps humain, que les vols spatiaux modifient (Watenpaugh, 2016).

En position couchée, les fluides corporels sont distribués uniformément le long du corps. Lors du passage en position debout, l'attraction gravitationnelle redistribue le sang du corps vers les jambes et l'abdomen. Cela entraine la génération d'un gradient de pression hydrostatique, avec une pression plus élevée au niveau de la partie basse du corps (jambes), tandis que la pression est plus faible au niveau de la partie haute du corps (tête et thorax). Ceci conduit à une diminution des volumes et des pressions liquidiennes centrales et céphaliques (Petersen et al., 2019). De plus, l'accumulation de sang résulte en une diminution parallèle de la pression veineuse centrale (PVC) et de la PA, mais également à une diminution du débit cardiaque et du volume plasmatique (Tanaka et al., 2017; Hughson et al., 2018).

De puissants mécanismes réflexes CV, tels que le baroréflexe artériel (CHAPITRE II) et l'autorégulation cérébrale, permettent le maintien de la perfusion cérébrale en position debout (Kermorgant et al., 2020; Jirak et al., 2022). En effet, la gravité impose des forces de compression sur le corps humain, modulant ainsi la pression intra-thoracique et intracérébrale, ainsi que la résistance vasculaire périphérique (Van Ombergen et al., 2017; Petersen et al., 2019; Jirak et al., 2022). Tous ces mécanismes sont perturbés lors de l'exposition à la microgravité.

1.2.2. Microgravité et redistribution des fluides corporels

Lors des vols spatiaux, l'absence de la force gravitationnelle conduit à une perte du gradient de pression hydrostatique induisant une redistribution des fluides corporels vers la partie haute du corps (déplacement thoraco-céphalique, i.e. « fluid shift ») (Hargens and Richardson, 2009b) (FIGURE 3).

D'une part, la redistribution liquidienne céphalique va entrainer des signes cliniques précoces, qui surviennent dès les premiers jours d'exposition à la microgravité et disparaissent au bout de 1 à 2 semaines. En effet, on peut retrouver chez les astronautes un œdème facial (« puffy face »), une congestion des sinus nasaux (« stuffed noses ») ou encore une dilatation des veines jugulaires, accompagnée d'une augmentation de la pression veineuse et d'un potentiel risque thrombotique (Baran et al., 2021; Jirak et al., 2022).

D'autre part, la migration liquidienne contribue au développement du syndrome neuro-oculaire observé lors des vols spatiaux de longue durée (« Spaceflight-Associated Neuro-ocular Syndrome », SANS). Ceci se caractérise par des modifications de l'acuité visuelle (hypermétropie), la présence d'anomalies au fond d'œil et de cohérence optique mesurée par tomographie (« Optical Coherence Tomography », OCT), l'augmentation de la gaine du nerf optique (« Optic Nerve Sheath Diameter », ONSD) ainsi que le développement possible d'œdème papillaire (Petersen et al., 2019; Lee et al., 2020; Wojcik et al., 2020).

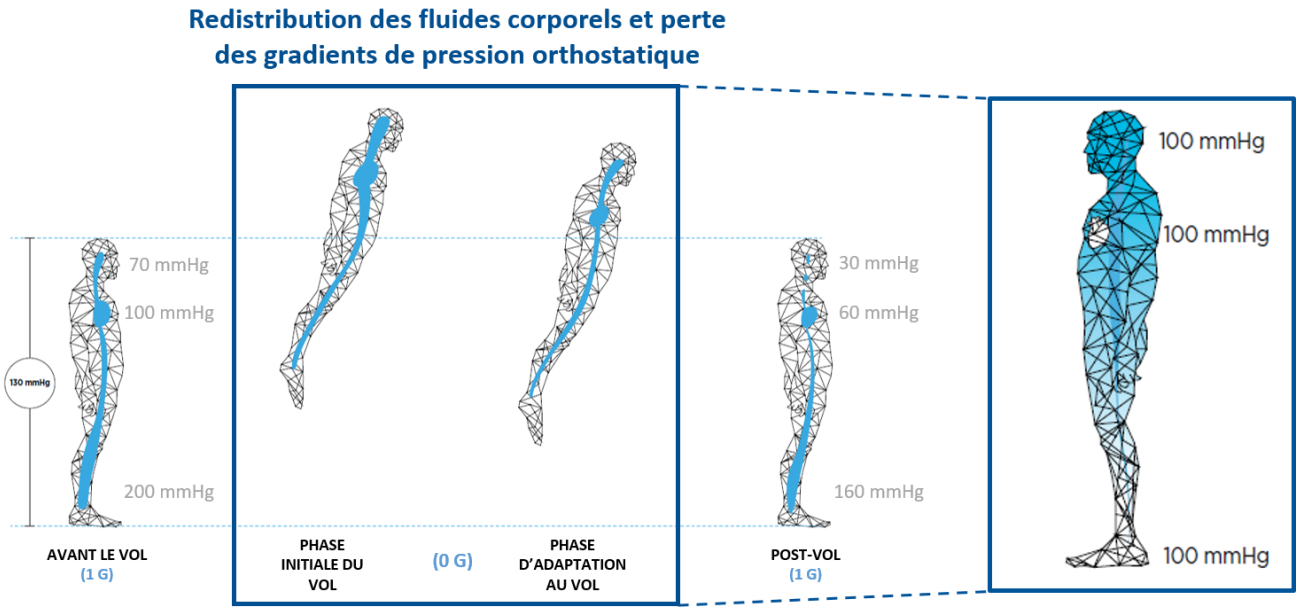


***Figure 3. Schématisation de la répartition des liquides de l'organisme et de la pression artérielle**, avant vol en position debout (1g), à la phase initiale et au cours du vol après adaptation (0g), et lors du retour sur terre (1g). (Adapté de Custaud et al. 2020)*

La redistribution des fluides corporels entraine une augmentation du volume sanguin central et une diminution du retour veineux. D'une part, l'hypervolémie centrale « stimule » les barorécepteurs artériels carotidiens et aortiques, ainsi que les volorécepteurs cardiaques. En réponse à une augmentation de PA et à la distension de la paroi, le baroréflexe à haute pression, qui opère dans les conditions physiologiques, entrainant une stimulation du système nerveux parasympathique, conduisant à la diminution de la fréquence et la contraction cardiaque (Elghozi et al., 2001). En effet, il est retrouvé une modification de la balance sympathovagale du SNA, avec une augmentation de l'activité vagale et à l'inverse, une diminution de l'activité orthosympathique. Ces mécanismes rentrent en jeu afin de réduire la surcharge liquidienne afin de stabiliser la PA (Baran et al., 2021). La PA (moyenne, systolique et diastolique) ainsi que la FC, semblent stables lors des vols spatiaux (Custaud et al., 2022). D'autre part, après le début du vol, ces mécanismes aboutissent rapidement à l'augmentation de la diurèse et de la natriurèse, à la diminution du volume sanguin plasmatique, contribuant au déconditionnement CV au retour sur Terre (Eckberg et al., 2010, 2010; Iwase et al., 2020).

De plus, l'hypervolémie initiale est accompagnée d'une augmentation du débit cardiaque, de volume cardiaque et systolique, ainsi qu'une distension du cœur (Baran et al., 2021). La distension du cœur stimule la production du peptide natriurétique atrial (PNA, « atrial natriuretic peptide »), induisant une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une augmentation de la natriurèse et de la diurèse, qui contribue aussi à la diminution de 10 à 15 % du volume sanguin plasmatique. Cette diminution est aussi la conséquence d'une redistribution des liquides des compartiments intravasculaires vers les espaces intracellulaires (Custaud et al., 2022; Jirak et al., 2022).

2. Modèles de simulation à la microgravité

Des modèles dits analogues à la microgravité sont utilisés pour reproduire, à des degrés variables, certains effets observés lors des vols spatiaux, tels que l'inactivité physique et la migration des fluides corporels. En raison du coût et du nombre limité des missions spatiales, ces modèles de simulation sont de bonnes alternatives pour la recherche gravitationnelle (Hargens and Vico, 2016). Bien qu'ils soient imparfaits, ils présentent leurs propres avantages et inconvénients en termes d'applications à divers systèmes physiologiques (Pandiarajan and Hargens, 2020).

2.1. Modèles humains

Les analogues humains les plus communément utilisés pour simuler la microgravité sur Terre sont représentés dans la FIGURE 4. Parmi ces modèles il est retrouvé l'alitement en inclinaison (le plus souvent, tête déclive à -6°), l'immersion sèche et les vols paraboliques.

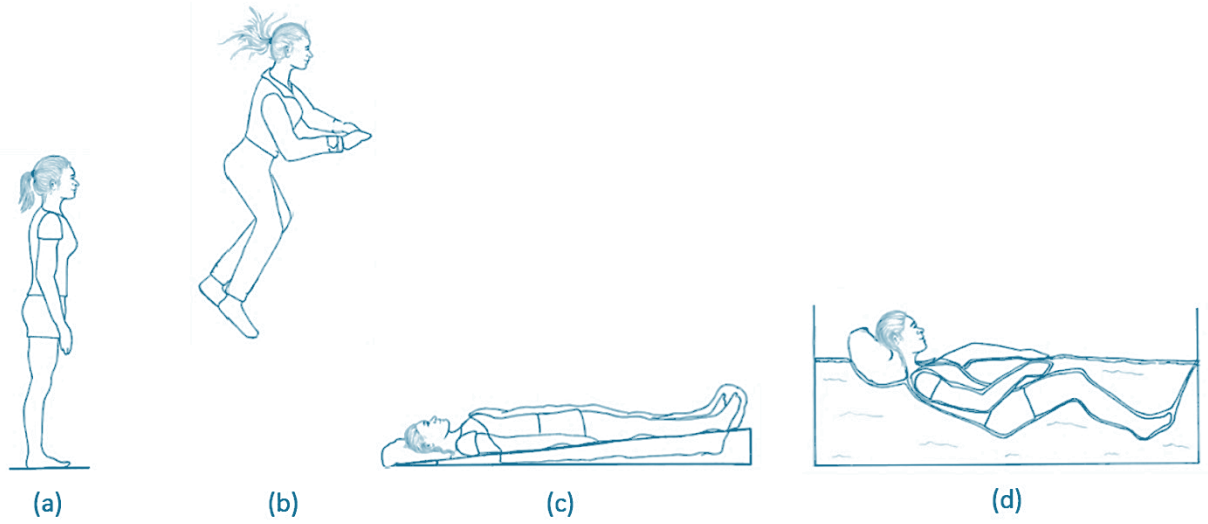


Figure 4. Schéma représentant les analogues des vols spatiaux les plus utilisés chez l'Homme*, comparés à* ***(a)*** *la posture debout à 1 G : (b) en microgravité 0 G,* ***(c)*** *modèle d'alitement tête déclive à -6° et (d) modèle d'immersion sèche.*
(Adapté de Watenpaugh, 2016)

2.1.1. Le modèle d'alitement

Le modèle de l'alitement anti-orthostatique (HDT, « head down tilt ») (FIGURE 4C) est l'analogue le plus utilisé pour simuler les effets de la microgravité sur le corps humain, notamment la redistribution des fluides corporels et le déconditionnement CV. En effet, il permet de simuler efficacement la migration liquidienne vers la tête, en modifiant le vecteur de gravité sur la partie supérieure, ce qui entraîne la diminution des gradients de pression hydrostatique (Watenpaugh, 2016; Pandiarajan and Hargens, 2020). Ce modèle permet également de simuler l'immobilisation et l'inactivité physique aboutissant également à des modifications osseuses et musculaires (Hargens and Vico, 2016; Kermorgant et al., 2020). Pour se faire, les sujets sont allongés sur un lit incliné à -6° ce qui permet de rapprocher la tête du sol et d'élever les pieds, pour une courte (1 semaine à 1 mois) ou longue période (supérieure à 1 mois) (Van Ombergen et al., 2017). La force gravitationnelle est toujours présente dans ce modèle, mais le système CV n'a plus à « travailler » contre la gravité, ce qui permet de se rapprocher des conditions retrouvées lors des vols spatiaux (Hargens and Vico, 2016).

2.1.2. Le modèle d'immersion

L'immersion sèche (« dry immersion », DI) est le modèle qui reproduit aussi les effets physiologiques retrouvé en microgravité, comme la centralisation des fluides corporels, le confinement, l'immobilisation, l'inactivité et également l'absence de support (absence de structure de soutien du corps) (Van Ombergen et al., 2017; Custaud et al., 2022). Ce modèle consiste à immerger le sujet dans une eau à neutralité thermique (32-34 °C), tout en étant recouvert d'un tissu élastique et imperméable pour un maintien au sec. Ainsi, le sujet est suspendu librement et il n'y a pas de contact direct avec l'eau. Ce protocole est souvent utilisé pour des études à court-terme, de quelques jours. L'immersion sèche induit un déplacement des fluides vers la tête et le haut du corps, en raison de la compression hydrostatique du sujet, similaire à ce qui est observé lors des vols spatiaux (Pandiarajan and Hargens, 2020). Ce modèle a un impact rapide sur le système musculo-squelettique et CV (Navasiolava et al., 2010; Kermorgant et al., 2017). Cependant, comme l'immersion est limitée au niveau du cou, elle ne constitue pas un analogue parfait de la microgravité.

Alors que l'immersion sèche provoquent des réponses physiologiques similaires à celles observées en alitement, celles-ci sont démontrées plus rapidement, à raison de 3 jours seulement pour l'immersion en comparaison à 21 jours en alitement tête déclive à -6° pour les réponses CV. Il est important de noter que l'immersion repose sur la neutralisation des pressions internes par la pression de l'eau, alors que l'alitement assure le déplacement des fluides du corps vers la tête (Tomilovskaya et al., 2019; Pandiarajan and Hargens, 2020).

2.1.3. Vol parabolique

Le vol parabolique est la seule méthode sur Terre qui permet de réaliser des expériences à court-terme en microgravité réelle (FIGURE 5). Ce modèle convient à l'étude de phénomènes aigus, tels que la réponse CV et neurosensorielle. Ce modèle simule des phases consécutives de gravité normale (1 G), d'hypergravité (1.5 – 1.8 G) et de microgravité (0 G) (environ 20 secondes) grâce à une trajectoire spécifique. Cette trajectoire peut être modifiée pour acquérir des paraboles de gravité martienne (0,38 G) et lunaire (0,16 G). L'avion effectue généralement 15 à 30 paraboles au cours d'une mission (Van Ombergen et al., 2017).

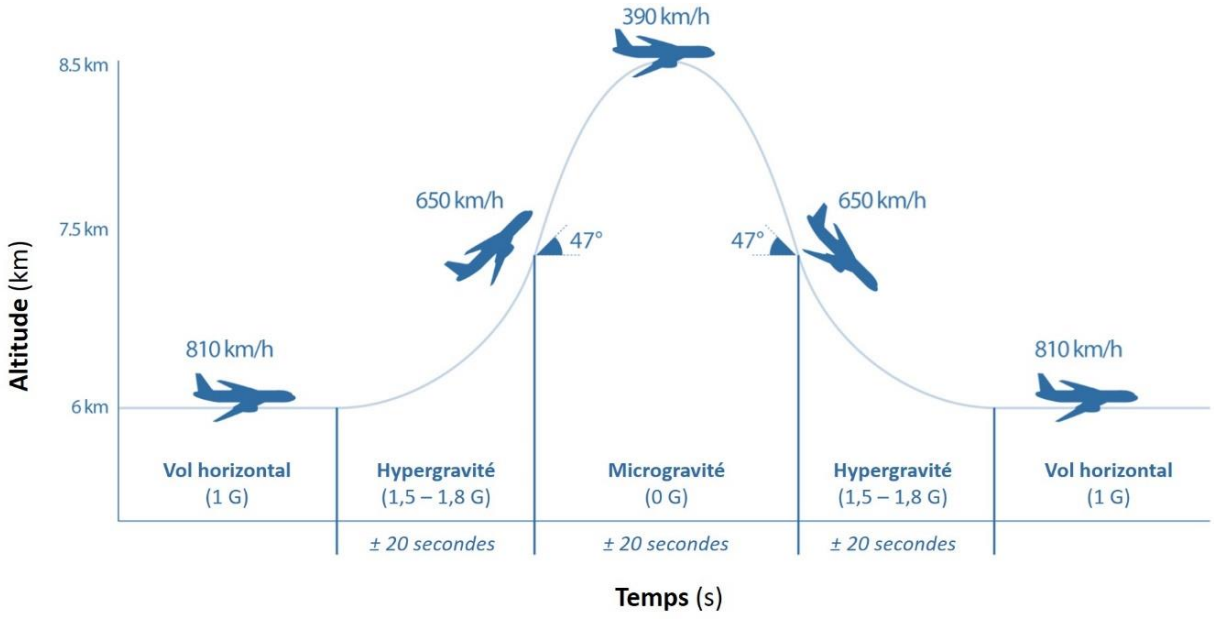


Figure 5. Trajectoire typique d'un vol parabolique composé des phases consécutives de 20 secondes de gravité normale (1 G), d'hypergravité (1.5 – 1.8 G) et de microgravité (0 G).
(Source : Van Ombergen et al. 2017)

2.2. Modèles animaux

L'utilisation de modèles animaux est essentiel pour mieux comprendre la physiologie et la physiopathologie (Baran et al., 2021). Les expériences avec des animaux dans l'espace sont coûteuses et limitées, d'où l'importance de développer des modèles de simulation sur Terre (Morey-Holton and Globus, 2002).

Le modèle le plus communément utilisé pour simuler la microgravité est le modèle de suspension du train arrière à -30° chez le rongeur (« hindlimb suspension », « hindlimb unloading », HU) (FIGURE 6). Ce modèle a été décrit pour la première fois dans les années 80 (Morey, 1979) avant d'être standardisé par la NASA (NASA Ames Research Center, Standard operation procedure, Update 2004). La suspension est devenue une méthode largement utilisée et admise par la communauté scientifique pour simuler les conditions des vols spatiaux sur l'ensemble du corps chez le rat et la souris (Ferranti et al., 2020; Morey-Holton et al. 2005).



Figure 6. Modèle de suspension du train arrière chez le rongeur.
(Adapté de Marzuca-Nassret al. 2017)

La décharge des membres postérieurs des rongeurs consiste à décharger sélectivement l'arrière-train à l'aide d'une traction sur la queue, de broches chirurgicales ou de harnais. Cette traction permet d'une part, d'entrainer la suppression des forces gravitationnelles des membres postérieurs, et d'autre part, d'entrainer une migration des fluides corporels vers la partie thoraco-céphalique, première réponse physiologique retrouvée chez les astronautes lors des vols spatiaux. La gravité est toujours présente, les réponses ne reflètent donc qu'une décharge partielle du système musculo-squelettique.

L’angle d’inclinaison de -30°, appliqué entre la colonne vertébrale de l’animal et le sol, a été déterminé afin que 50 % du poids du corps soit appliqué sur les membres antérieurs (Morey-Holton and Globus, 2002).

Lors de la conception d’une étude avec ce modèle animal, il est important de prendre en compte plusieurs éléments importants qui peuvent influencer les réponses physiologiques obtenues, tels que : les conditions d’hébergement (isolement, température ambiante, éclairage contrôlé), la manipulation (habituation, acte chirurgical, procédures), la durée du protocole (court ou long terme), le sexe (mâle et femelle), l'âge (en croissance ou adulte), l'espèce (souris ou rat) et la souche des animaux. La comparaison et l’extrapolation des résultats d’une espèce à une autre, ou à un autre modèle (vols spatiaux ou analogues), doit être effectuée avec précaution.

Comme pour les vols spatiaux, la durée d'exposition est une variable critique, les réponses aiguës obtenues à court-terme peuvent différer considérablement avec les réponses d’adaptation chronique à plus long terme (Globus and Morey-Holton, 2016; Ferranti et al., 2020). Le modèle de suspension a l’avantage d’être réversible en étant peu traumatique pour l’animal, lui permettant de reprendre ses pleines capacités motrices lorsqu’il est détaché de son système de suspension, offrant ainsi la possibilité d’évaluer les réponses à la récupération.

Malgré ses limites, la suspension du train arrière présente plusieurs avantages. Tout d’abord, ce modèle permet de simuler les conditions environnementales retrouvées lors des vols spatiaux, telles que le confinement, l’isolement et la restriction locomotrice. De plus, une grande partie des effets observés chez l’Homme à la microgravité sont similaires, comme la redistribution des fluides corporels vers la partie thoraco-céphalique, l’hypokinésie, conduisant à une altération des réponses musculo-squelettiques (avec une diminution de la masse musculaire et de la densité osseuse) et CV (Globus and Morey-Holton, 2016).

En effet, la suspension et les vols spatiaux, chez le rongeur et chez l’Homme, induisent une réduction de l’activité physique, une atrophie musculaire notamment des muscles posturaux (soleus) ainsi qu’une ostéopénie.

De manière intéressante, le modèle suspension chez le rongeur mène à plusieurs adaptations CV qui sont également retrouvées chez l'Homme, en lien avec la redistribution liquidienne et le déconditionnement physique. Ainsi ce modèle induit la diminution de la capacité à l'exercice, l'hypovolémie, la tachycardie au repos et à l'effort post-exposition, une diminution de la capacité à augmenter la résistance vasculaire périphérique et l'hypotension orthostatique (Powers and Bernstein, 2004; Moffitt et al., 2008).

En ce qui concerne le système CV, il est également retrouvé des réponses de stress pouvant participer à la perturbation des rythmes circadiens et des réponses hémodynamiques CV (Agarwal, 2010; Tsvirkun et al., 2012). Ce stress est souvent associé à l'augmentation de l'activité orthosympathique et de l'axe hypothalamo-pituitaire-adrénalien (HPA), au changement de la réponse immunitaire avec une augmentation de l'inflammation, du stress oxidatif (Globus and Morey-Holton, 2016). L'axe HPA est le principal régulateur neuroendocrinien des réponses au stress, aux émotions, à l'état d'activité physique, au métabolisme, chez les mammifères (Chen and Yang, 2015; Tahimic et al., 2019).

Chapitre II - Le système nerveux autonome

Le SNA est un composant du système nerveux, caractérisé par une organisation neuronale complexe dans le cerveau, la moelle épinière et la périphérie. Tous les organes du corps reçoivent une innervation végétative. Il régule les processus physiologiques involontaires, notamment la fréquence cardiaque, la pression artérielle, la respiration et la digestion.

1. Physiologie du système nerveux autonome

Le SNA est composé classiquement de deux grandes divisions anatomiquement distinctes : Le système nerveux parasympathique (PNS), qui favorise les processus de repos (« rest-and-digest ») et le système nerveux sympathique (SNS), qui va préparer le corps à l'action (« fight-or-flight »). Ces deux systèmes ont généralement des effets opposés sur un tissu ; lorsque l'activité de l'un augmente, l'autre diminue, ce qui donne un contrôle rapide et précis sur la fonction physiologique. Le système gastro-intestinal, connu sous le nom de système nerveux entérique, est désormais considéré comme un troisième composant du SNA, recevant à la fois des fibres parasympathiques et sympathique et possédant son propre plexus ganglionnaire, que nous ne détaillerons pas dans ce manuscrit (Gibbons, 2019).

1.1. Organisation anatomique et fonctionnelle du système nerveux autonome

Le SNS et le PNS sont composés de fibres nerveuses afférentes et efférentes. En général, les voies efférentes du SNS et du PNS sont constituées d'une série de deux neurones : un neurone préganglionnaire, et un neurone postganglionnaire qui innerve les tissus cibles.

1.1.1. Le système nerveux parasympathique

Le SNP, aussi appelé le système vagal, favorise l'état de repos relatif et permet la restauration des ressources de l'organisme. Son rôle est de de stocker l'énergie et de réguler les fonctions corporelles. Les réponses parasympathiques entrainent par exemple un ralentissement du rythme cardiaque, et au contraire, une augmentation du péristaltisme gastro-intestinal.

Le SNP est organisé de manière métamérique (FIGURE 7). Il est caractérisé par des fibres post-ganglionnaires de petite taille, ce qui lui confère action localisée et spécifique, en raison du rapport faible entre les neurones pré- et post-ganglionnaire (1/1). Les neurones préganglionnaires parasympathiques sont localisées au niveau du tronc cérébral (nerf crâniens, III à X) et dans les segments de la moelle épinière sacrée S_2 à S_4.

Les neurones pré- et post-ganglionnaires du PNS sont cholinergiques (acétylcholine, ACh). L'ACh libérée dans l'espace synaptique va principalement interagir avec les récepteurs muscariniques et nicotiniques. Les récepteurs à l'ACh sont nicotiniques et muscariniques au niveau ganglionnaire et des fibres post-ganglionnaires respectivement (McCorry, 2007; Gibbons, 2019).

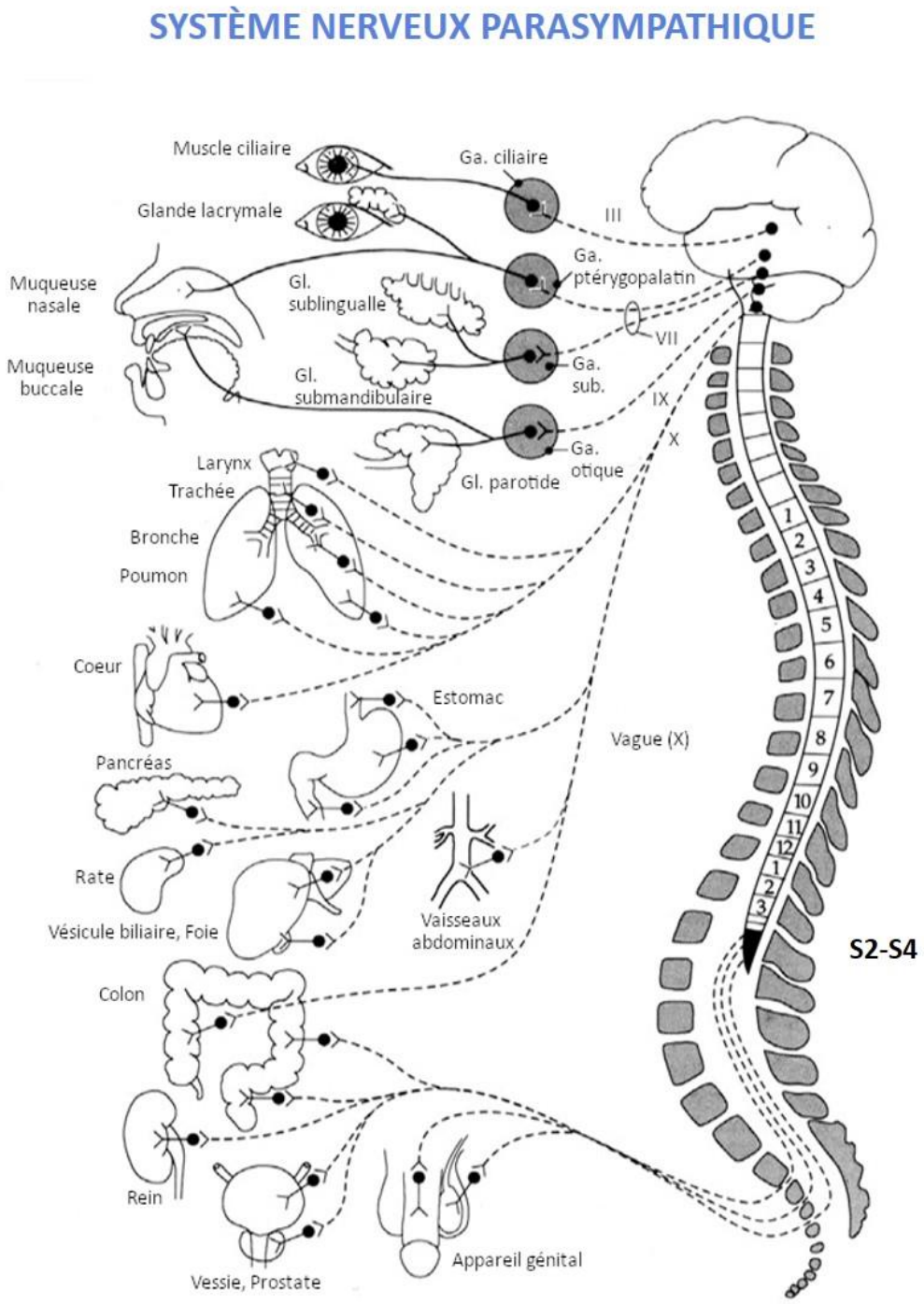


Figure 7. Organisation du système nerveux parasympathique.
Ga, ganglion ; Gl, glande.
(Adapté de Gibbons, 2019)

1.1.2. *Le système nerveux sympathique*

Le SNS, aussi appelé le système orthosympathique, favorise un état d'activité et d'attention élevée. Il est sollicité en particulier dans les situations d'urgence (combat, fuite) et pendant l'exercice, en préparant le corps à l'action et en mobilisant un maximum de ressources. L'activation du SNS engendre une augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque, de la glycogénolyse et de l'afflux sanguin vers les tissus, en particulier, vers les muscles squelettiques. Également, les bronches se dilatent, la contraction cardiaque augmente, et la digestion est inhibée. Ces adaptations rapides et temporaires sont indispensables à la survie d'un individu. Les réponses sympathiques diffèrent selon le type de stress, et peuvent mettre en jeu des circuits réflexes différents (baroréflexe artériel, cardiopulmonaire, chémoréflexe).

Le SNS trouve son origine le long de la moelle dorsolombaire (FIGURE 8). Il est composé majoritairement de fibres post-ganglionnaires peu voire pas myélinisées, qui sont plus nombreuses que les fibres préganglionnaires, ce qui permet une plus grande diffusion des réponses sympathiques. Ces neurones préganglionnaires sont localisés au niveau de la moelle épinière et s'étendent depuis le segment thoracique T_1 jusqu'au segment lombaire L_2.

Les neuromédiateurs du SNS sont l'ACh au niveau ganglionnaire et la noradrénaline (i.e. catécholamines) au niveau post-ganglionnaire (à l'exception des glandes sudoripares et des fibres vasodilatatrices musculaires où le neuromédiateur est l'ACh). La glande médullosurrénale est considérée comme un deuxième neurone et sécrète de l'adrénaline. La neurotransmission noradrénergique concerne la synapse périphérique du second neurone sympathique et agit notamment sur les récepteurs α_1, α_2, β_1 et β_2 adrénergiques (McCorry, 2007; Gibbons, 2019).

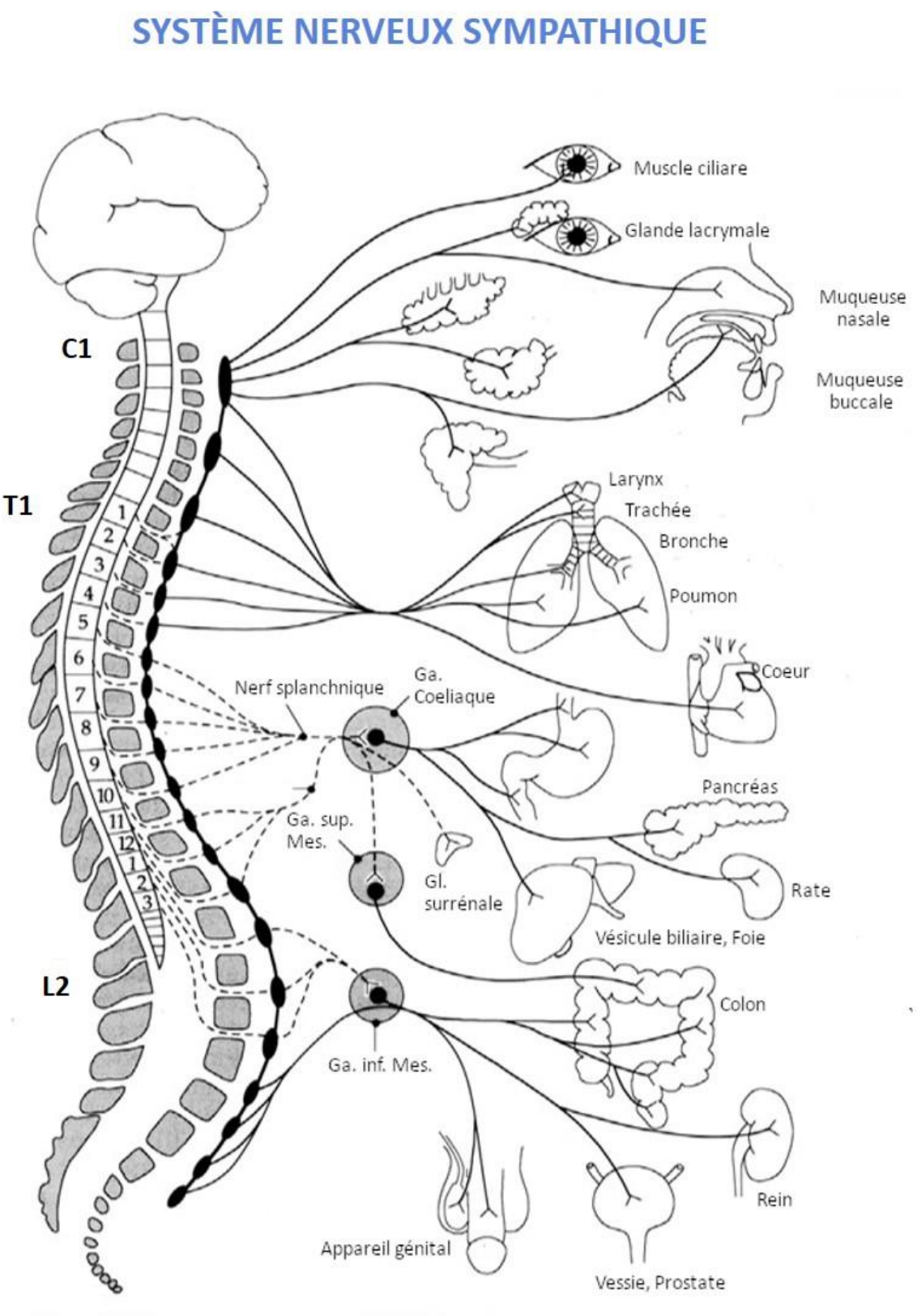


Figure 8. Organisation du système nerveux sympathique.
Ga, ganglion ; Gl, glande ; Inf, inférieur ; Sup, supérieur ; Mes, mésentérique.
(Adapté de Gibbons, 2019)

1.2. Régulation du système cardiovasculaire par le système nerveux autonome

1.2.1. Contrôle du système cardiovasculaire par le SNA

Le SNS exerce plusieurs fonctions sur le système cardiovasculaire incluant l'accélération de la fréquence cardiaque et l'augmentation de la contractilité myocardique, la vasoconstriction artérielle et veineuse. Les fibres sympathiques myocardiques sont localisées au niveau sous-épicardique et cheminent le long des principaux vaisseaux coronariens, représentant la principale influence autonome des ventricules. De manière opposée, le PNS modère l'activité myocardique en diminuant la fréquence cardiaque. Les fibres parasympathiques sont localisées au niveau sous-endocardique, où l'on retrouve le nerf vague (nerf X). Ces fibres sont principalement dans la partie atriale du myocarde et sont moins abondantes dans la partie ventriculaire (FIGURE 9).

Les activations sympathique et parasympathique ont été mises en évidence en inhibant le contrôle autonomique du cœur, par l'utilisation simultanée d'antagonistes cholinergiques (atropine) et noradrénergiques (propanolol).

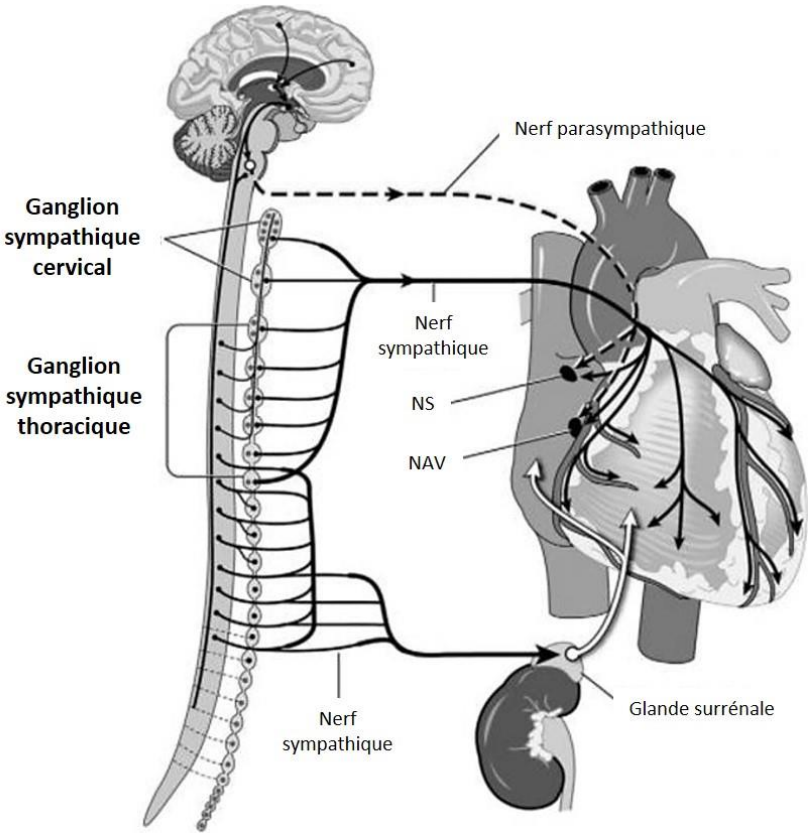


Figure 9. Innervation du coeur et de la glande surrénale par le système nerveux autonome.
NS, nœud sinusal ; NAV, nœud atrioventriculaire.
(Adapté de Laouafa, 2018)

L'activité sympathique est régulée par les réflexes cardiovasculaires et est transmise au cœur et aux vaisseaux périphériques. L'augmentation de son activité va conduire à :

- Une augmentation de la fréquence cardiaque et un raccourcissement de la conduction atrio-ventriculaire par la libération de noradrénaline par le ganglion stellaire droit et le nœud atrioventriculaire (NAV)
- Une augmentation de la force de contraction myocardique par la libération de noradrénaline mais cette fois-ci par le ganglion stellaire gauche sur le ventricule gauche
- La libération de l'adrénaline (90 %) et de noradrénaline (10 %) circulantes, par la médullaire des glandes surrénaliennes, qui agit à la fois sur les vaisseaux périphériques et sur le tissu myocardique
- La libération localisée des catécholamines ayant un effet direct sur les vaisseaux sanguins.

1.2.2. Régulation centrale

Le contrôle central de l'activité du SNA s'opère au niveau de plusieurs régions : au niveau spinal et bulbaire, où siège une activité réflexe locale alimentée directement par des afférences autonomes et également au niveau des régions supra-spinales, localisées dans le tronc cérébral, le diencéphale et certaines zones du cortex (FIGURE 10).

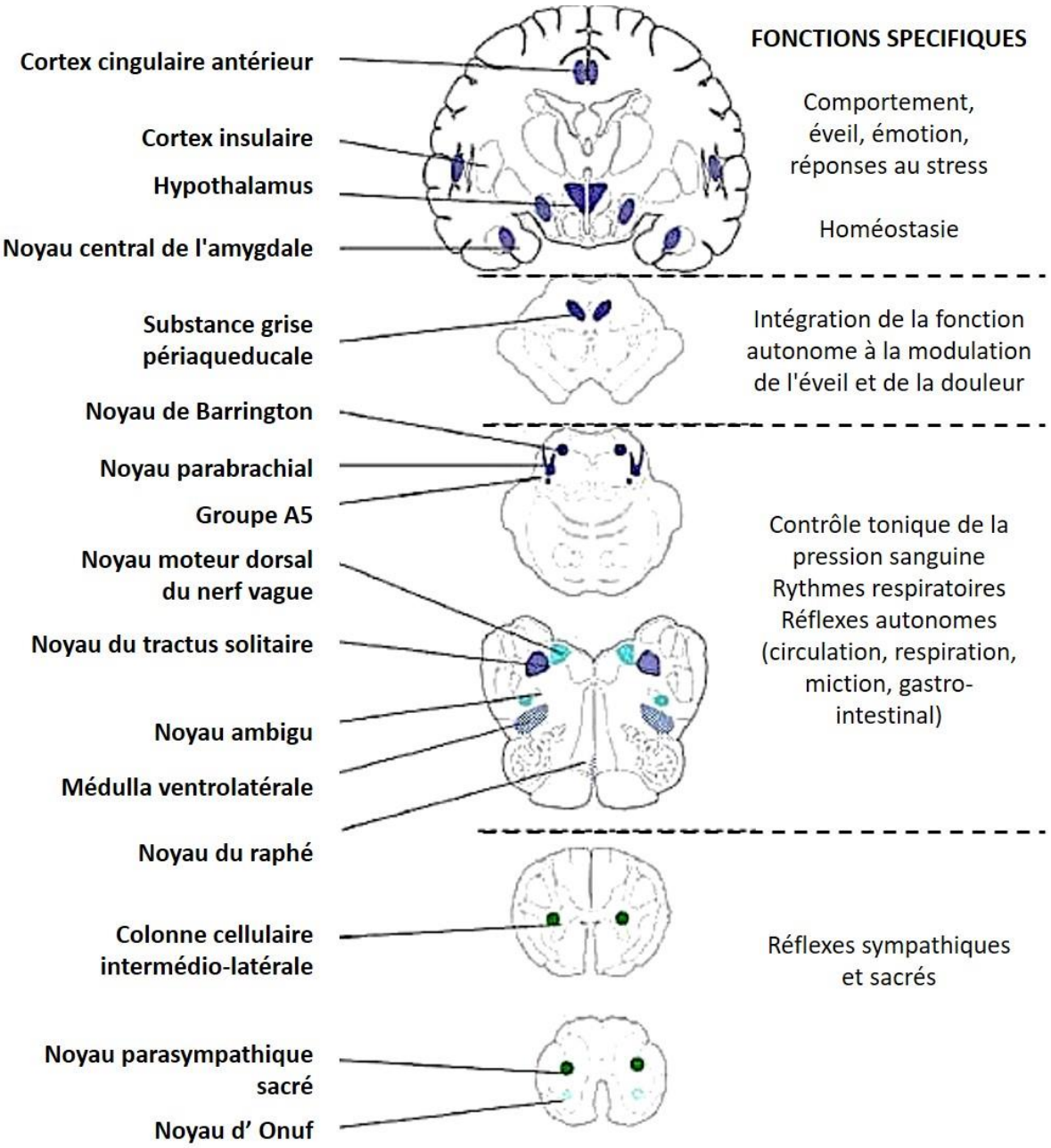


Figure 10. Zones centrales de contrôle autonome et niveaux d'interaction.
(Source : Robertson and Biaggioni, 2012)

a) Contrôle du cerveau antérieur

Au niveau du cerveau antérieur, le système végétatif est régulé par le cortex insulaire, le cortex cingulaire antérieur, l'amygdale et l'hypothalamus. Le cortex insulaire est la région d'intégration primaire des informations. Elle intègre les afférences nociceptives et thermoceptives en provenance des viscères et reçoit également les informations des récepteurs gustatifs, musculaires, et cutanés via le thalamus. Le cortex cingulaire antérieur assure les connexions entre le cortex insulaire et préfrontal, l'amygdale, l'hypothalamus ainsi que le tronc cérébral, grâce auxquelles il contrôle les fonctions du SNS et du PNS. L'amygdale est un noyau situé dans la région interne du lobe temporal, fournissant une valeur émotionnelle aux stimuli sensoriels. Elle établit des connexions avec plusieurs cibles impliquées dans les réponses autonomes et neuroendocriniennes au stress psychologique, à la peur et à l'anxiété. L'hypothalamus est un centre clé du contrôle homéostasique. En effet, il régule les rythmes circadiens et les cycles veille-sommeil, la thermorégulation, la glycémie, les réponses au stress, et l'immunité. Il est constitué d'un ensemble de noyaux qui se distinguent par leur fonction, comme par exemple le noyau suprachiasmatique (NSC) qui assure les rythmes circadiens, les noyaux de la région latérale de l'hypothalamus qui contrôlent l'éveil et le sommeil, et enfin les noyaux paraventriculaire (PVN) et dorsomédian qui coordonnent les réponses CV, autonomes et endocrines impliquées dans la thermorégulation et les réponses au stress. Le NPV de l'hypothalamus est impliqué dans le contrôle autonome et constitue l'une des principales zones du SNC impliquées dans l'intégration de la fonction autonome dans le maintien de l'homéostasie et dans le contrôle de la PA. Il contient plusieurs populations de neurones, les neurones magnocellulaires, responsables de la synthèse et de la sécrétion de la vasopressine et l'ocytocine, ainsi que les neurones parvocellulaires, projetés vers d'autres zones du cerveau impliquées dans le contrôle des fonctions autonomes, telles que la médulla rostroventrolatérale et la colonne intermédiaire latérale de la moelle épinière, où sont situés les motoneurones préganglionnaires. Ces connexions peuvent déclencher des changements réflexes de l'activité sympathique qui sont impliqués dans la régulation de la circulation (Robertson and Biaggioni, 2012; Gibbons, 2019; Amorim et al.)

b) Contrôle du tronc cérébral

Le tronc cérébral possède plusieurs régions importantes de contrôle autonome. C'est ici que l'activité des efférences sympathiques et parasympathiques sont contrôlées, par des régions telles que la substance grise périaqueducale (SGP) du mésencéphale, le noyau parabrachial, plusieurs régions bulbaires notamment le noyau du tractus solitaire (NTS), la formation réticulée ventrolatérale et le noyau du raphé. La SGP établit les interconnections avec le cortex cingulaire, l'amygdale, l'hypothalamus et les aires du tronc cérébral. Elle intègre les réponse somatiques et autonomes au stress et à la douleur, et coordonne les réponses cardiovasculaires, la thermorégulation, la miction, et les rythmes respiratoires. Le noyau parabrachial est un centre de coordination de l'activité du SNA, en recevant les afférences viscérales, nociceptives, thermoceptives de la moelle épinière, qu'il transmet à l'hypothalamus, l'amygdale et au thalamus. Il participe au contrôle des réflexes cardiovasculaires, respiratoires et gastro-intestinaux. Le NTS reçoit les afférences gustatives (portion rostrale), gastro-intestinales (portion intermédiaire) et cardiovasculaires (caudale), et plus précisément les afférences provenant des barorécepteurs, des récepteurs cardiaques, des chémorécepteurs et des récepteurs pulmonaires. Le NTS joue un rôle clé de contrôle des réflexes cardiorespiratoires tels que le baroréflexe cardiaque et le chémoréflexe. Les bulbes ventrolatéraux rostral et caudal jouent un rôle primordial dans la régulation de l'activité cardiovasculaire. La médulla ventrolatérale rostrale (RVLM) joue un rôle central dans le contrôle de la PA par le biais de connexions avec les neurones sympathiques préganglionnaires qui contrôlent le débit cardiaque et la résistance périphérique totale et qui servent de médiateurs aux réflexes baroréflexe, chémoréflexe et cardiopulmonaire. La médulla ventrolatérale caudale (RCLM) exerce un contrôle inhibiteur sur le RVLM (par l'intermédiaire de neurones GABAergiques) et sert de relais pour les entrées inhibitrices du NTS au baroréflexe artériel. Le RCLM va jouer un rôle dans la modulation de la volémie et de la PA par la libération de vasopressine. Les centres respiratoires bulbaires contiennent des neurones chemosensibles, glutamatergiques, sérotoninergiques, et sont impliqués dans les réponses respiratoires liées à l'hypoxie et l'hypercapnie. La médulla ventromédiale et les noyaux du raphé caudal servent de médiateurs de la thermorégulation, de la douleur et de la respiration. Les neurones des noyaux du raphé caudal sont les médiateurs des réponses vasoconstrictives au froid et déclenchent l'activation de la graisse brune pour la production de chaleur (Gibbons, 2019).

1.2.3. *Réflexes périphériques*

a) Baroréflexe artériel

Les barorécepteurs artériels sont des mécanorécepteurs, qui sont sensibles à l'étirement des parois vasculaires, provoqué par le flux sanguin pulsé et donc par la pression artérielle. Ils sont localisés dans l'adventice des corps carotidiens et de la crosse aortique, innervés par les nerfs glossopharyngés et vagues (Gibbons, 2019). Une augmentation de la PA ou de la volémie accroit la fréquence de décharge des barorécepteurs qui provoque une stimulation du tonus parasympathique et une inhibition de l'activité sympathique, par l'action sur les centres bulbaires. La stimulation du tonus vagal provoque une bradycardie, tandis que la diminution de l'activité sympathique conduit à une baisse de la contractilité cardiaque et à une vasodilatation des vaisseaux. La réponse parasympathique est immédiate, de l'ordre de 200 à 600 ms, alors que la réponse sympathique est plus lente, de l'ordre de 2 à 3 secondes.

La diminution de la PA conduit au processus inverse (FIGURE 11). Les variations spontanées de la PA induisent des modifications opposées de l'activité sympathique, permettant des niveaux de pression adaptée. Ce mécanisme de rétrocontrôle négatif module l'activité rythmique du cœur et la relation inverse entre les variations de pressions et l'activité nerveuse.

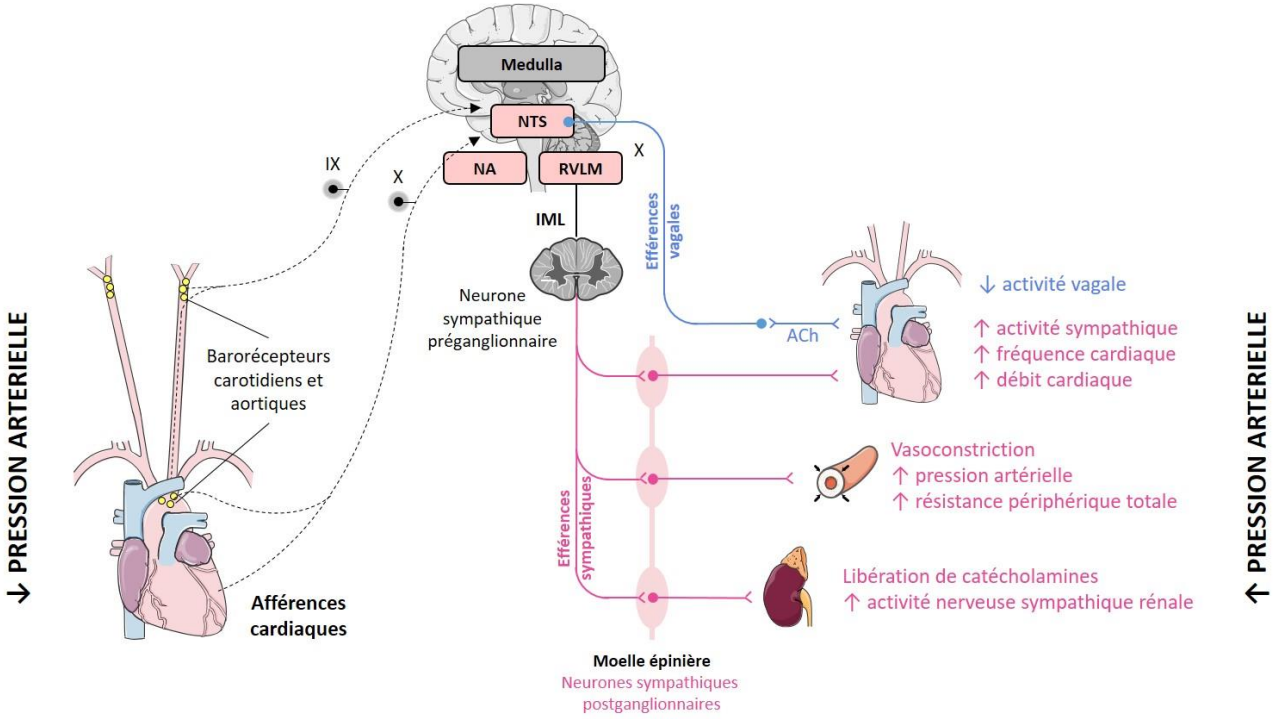


Figure 11. Contrôle de l'hypotension par le baroréflexe artériel.
ACh, acétylcholine ; IML, noyau intermediolatéral ; NA, noyau ambigu ; NTS, noyau du tractus solitaire ; RVLM, nedulla ventrolatérale rostrale ;

b) Réflexe cardiopulmonaire

Les volorécepteurs cardiopulmonaires sont également des mécanorécepteurs, sensibles à l'étirement, et précisément aux modifications du retour veineux. Ils sont localisés au niveau de la paroi des ventricules, à la jonction entre l'oreillette gauche et les veines pulmonaires, ainsi qu'à la jonction entre l'oreillette droite et la veine cave supérieure. Lors d'une diminution du retour veineux, l'effet inhibiteur de ces récepteurs est réduit, ce qui entraine une augmentation de l'activité sympathique et une vasoconstriction périphérique. A l'inverse, l'augmentation du retour veineux conduit à l'inhibition de l'activité des volorécepteurs cardio-pulmonaires, ce qui induit la diminution de l'activité sympathique et une vasodilatation. La respiration influence directement la pression artérielle, le retour veineux pulmonaire, la régulation du PNA (effet hypotenseur) et de l'ADH (hormone antidiurétique, ou vasopressine, également désignée par l'abréviation AVP), et est également influencée lors de situation de stress ou lors du sommeil (Cardinali, 2018).

c) Chémoréflexe

Le chémoréflexe assure la détection des modifications de pressions partielles des gaz (oxygène, O_2 et dioxyde de carbone, CO_2) du sang artériel, en détectant notamment l'hypoxie et l'hypercapnie (FIGURE 12). C'est un modulateur important permettant l'activation du SNS. On retrouve deux types de chémoréflexe : le chémoréflexe périphérique et le chémoréflexe central. Les chémorécepteurs périphériques sont localisés au niveau du corps carotidien et de la crosse aortique, avec des afférences se projetant au niveau de la médulla et du NTS. Ces chémorécepteurs sont sensibles à l'hypoxie, c'est à dire aux variations du contenu du sang artériel en O_2 (PaO_2). Les chémorécepteurs centraux sont surtout sensibles aux variations de CO_2 (i.e. hypercapnie) et sont essentiellement localisés au niveau ventral du bulbe rachidien. La détection de l'hypoxie engendre une augmentation de la décharge sympathique, responsable d'une réponse CV (tachycardie, augmentation de la PA) et ventilatoire (augmentation de la fréquence respiratoire), et module ainsi les échanges gazeux au niveau des tissus. Par rétrocontrôle négatif, une augmentation de la ventilation et de la PA entraine une inhibition de la réponse sympathique par l'activation du chémoréflexe. Il permet ainsi de maintenir l'homéostasie cardiovasculaire et respiratoire (Laouafa, 2018).

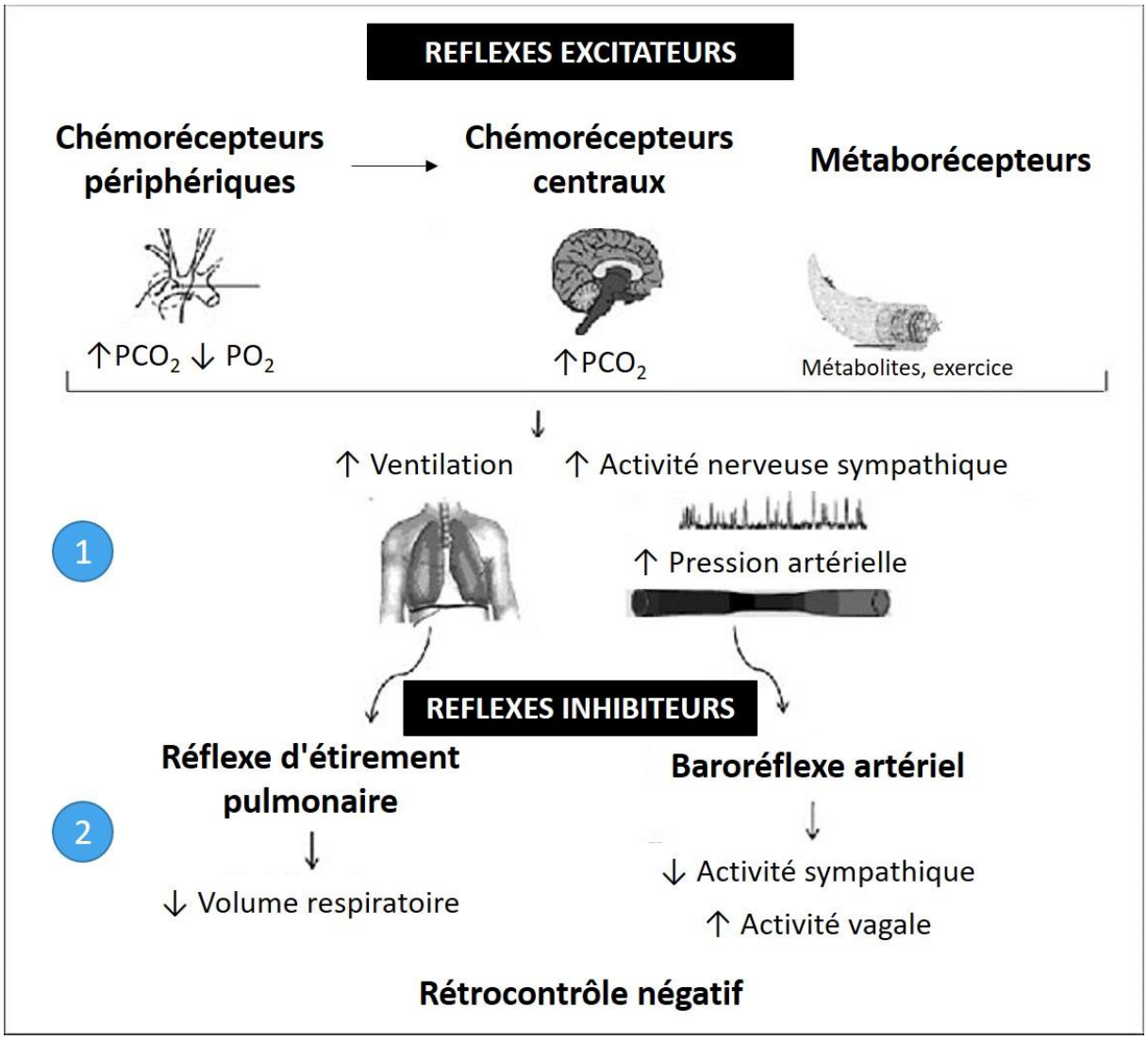


Figure 12. Représentation de l'ajustement des réponses ventilatoires et circulatoires par le chemoréflexe.
(Adapté de Ribeiro et al., 2012)

1.2.4. Autres facteurs influençant le système nerveux autonome cardiovasculaire

a) Les rythmes circadiens

La régulation du système CV par le système végétatif est également influencée par les rythmes circadiens, ainsi que les cycles veille-sommeil. En effet, les rythmes circadiens participent à la régulation de nombreuses fonctions chez les mammifères, comme l'éveil, manger et boire, la sécrétion d'hormones de stress (i.e. cortisol), la température corporelle, la FC et la PA (Sheward et al., 2010). Ces rythmes sont coordonnés au niveau du NSC de l'hypothalamus, en utilisant des signaux neuronaux et humoraux qui synchronisent les horloges périphériques dans la plupart des tissus et organes. D'une part, le NSC intègre les informations en provenance des récepteurs photosensibles de la rétine se projetant sur les régions du diencéphale et du tronc cérébral (Sheward et al., 2010; Otsuka et al., 2018). Ces régions sont responsables de l'éveil et du sommeil, puisque lors des différentes phases de sommeil et des différents cycles de lumière et d'obscurité, les rythmes cardiaque et respiratoire varient, étant modulé par l'activité autonome. D'autre part, certaines des voies de sortie du NSC servent de voies d'entrée pour les tissus périphériques, en tant qu'horloge périphérique. Ces horloges périphériques doivent se coordonner avec l'horloge dite centrale pour synchroniser la réactivité du cœur et des vaisseaux sanguins aux variations diurnes (Chen and Yang, 2015).

Les variations jour-nuit de la PA et de la FC sont parmi les rythmes circadiens les plus connus de la physiologie (FIGURE 13). Chez l'homme, il y a une variation sur 24 heures de la pression artérielle avec une diminution la nuit et une augmentation avant le réveil (Chen and Yang, 2015). Le tonus du SNS domine pendant l'éveil et le tonus vagal domine pendant le sommeil. Le SNS régule la variation circadienne du tonus des vaisseaux sanguins, notamment par la libération d'épinéphrine et de norépinephrine, qui augmente lors de l'éveil et lors du passage en position debout à l'éveil (Agarwal, 2010; Smolensky et al., 2017).

La perturbation des cycles normaux jour/nuit (exemple : décalage horaire, vols spatiaux) entraine la désynchronisation entre les horloges centrales et périphériques, l'altération de la libération de catécholamines et de dopamine, qui joue également un rôle sur les rythmes circadiens du SNS, ainsi que la dérégulation des gènes de l'horloge interne et une dysfonction de la régulation de certaines fonctions (Kiessling et al., 2010; Chen and Yang, 2015; Smolensky et al., 2017).

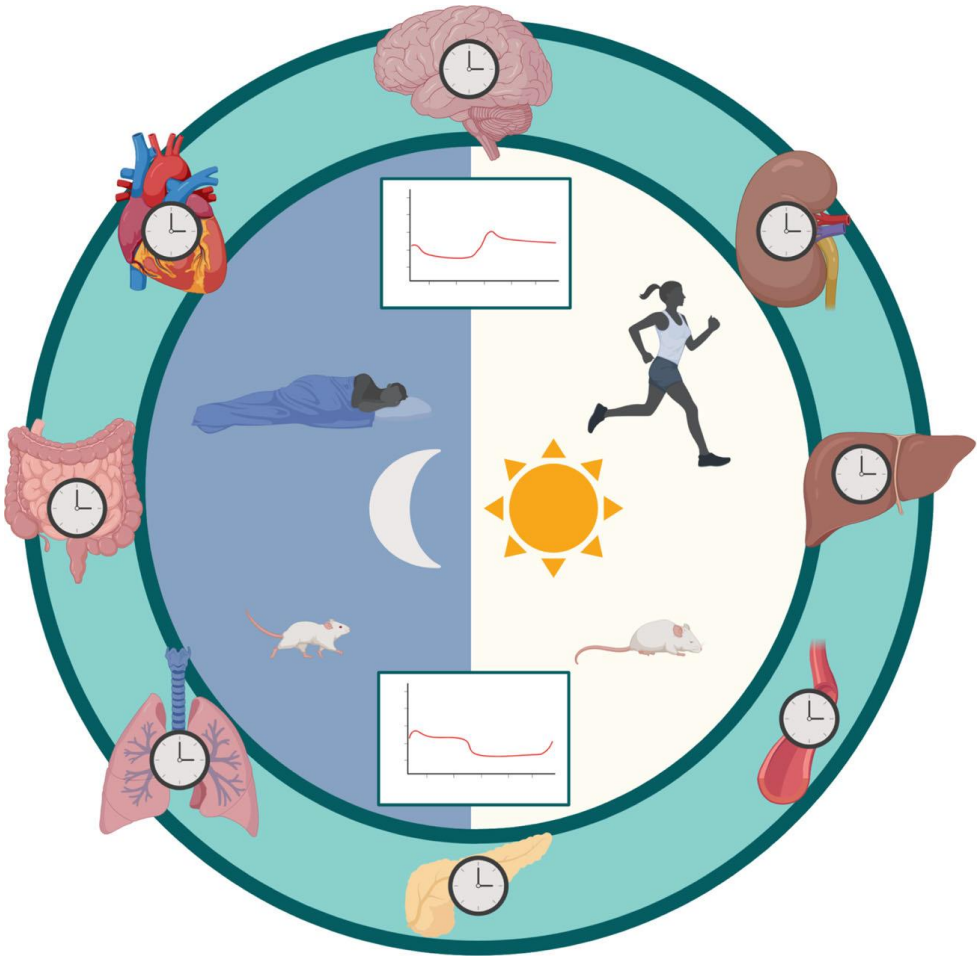


Figure 13. Horloge circadienne et contrôle de la pression artérielle.
Les horloges centrales et périphériques des hommes et des rongeurs gardent le rythme pour coordonner les processus, les fonctions et le comportement. Ces processus modulent les variations diurnes de la pression artérielle, produisant un rythme qui est plus élevé pendant la période active/éveillée et plus faible pendant la période inactive/sommeil.
(Source : Rhoads et al., 2020)

b) Stress psychologique

La commande centrale, regroupant les structures cérébrales telles que le thalamus, l'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal, interviennent dans la mise en jeu de réponses réflexes complexes et anticipées pour la demande énergétique, impliquées lors d'un stress psychologique ou physique. Les stimuli sont détectés et intégrés au niveau conscient via le cortex, l'amygdale, et l'hippocampe qui envoient des projections directes et indirectes sur les neurones hypothalamiques et mésencéphaliques contrôlant les neurones promoteurs sympathiques et les noyaux parasympathiques.

En réponse aux facteurs de stress, l'hypothalamus sécrète l'hormone de libération de la corticotropine (CRH) et la vasopressine, par l'action régulatrice de l'HPA (FIGURE 14). A partir des noyaux PVN, les neurones préganglionnaires contenant la CRH vont se projeter directement dans la moelle épinière et le tronc cérébral. La stimulation de ces régions entraine l'augmentation du tonus sympathique et une diminution du tonus vagal, provoquant une augmentation de la FC, de la libération de cortisol et de norépinéphrine. L'activation du SNS stimule également la libération de CRH par l'hypothalamus, créant ainsi une boucle de rétroaction bidirectionnelle positive (Wood, 2014).

Un stimulus psychologique déclenche une réponse autonome caractérisée par des bouffées de chaleur, de la tachycardie, des palpitations, de l'hypertension artérielle et des symptômes gastro-intestinaux (douleurs abdominales, nausées, diarrhée). Enfin, juste avant un effort physique par exemple, la commande centrale peut amorcer des ajustements CV afin d'accroitre de façon anticipée le débit sanguin parvenant aux muscles squelettiques (Ziegler, 2012; Raffin, 2019).

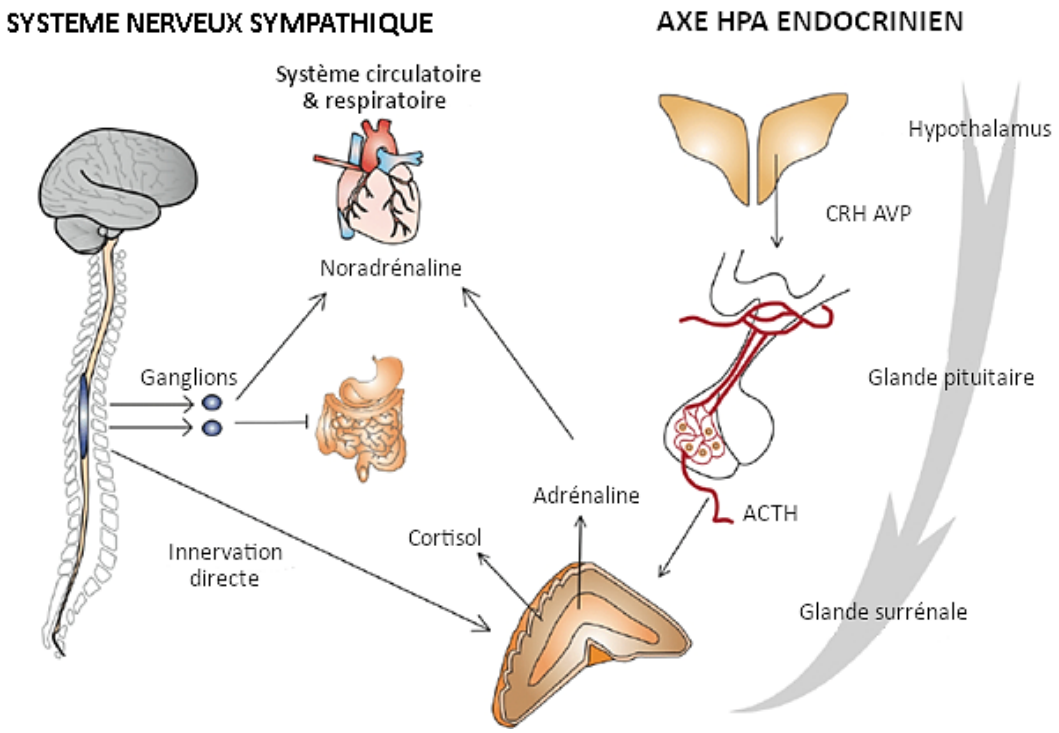


***Figure 14**. **Voies de réponse au stress chez l'homme par le biais du système nerveux autonome et du système endocrinien**.*
Ce schéma illustre comment les signaux neuronaux et hormonaux interagissent et se complètent par l'action régulatrice de l'axe hypothalamo-pituitaire-surrénalien (axe HPA). ACTH, hormone adréno-corticotrope ; AVP, arginine/vasopressine ; CRH, hormone cortico-libératrice.
(Adapté de Even et al., 2012)

c) Thermorégulation

Le contrôle de la température corporelle participe à l'ajustement des fonctions cardiovasculaires et autonomes. Les afférences des thermorécepteurs sont situées dans la peau, l'hypothalamus, la moelle épinière et l'abdomen. Les thermorécepteurs cutanés et centraux sont sensibles respectivement à la température externe et à la température interne. Les variations de température ambiante sont détectées par les thermorécepteurs cutanés, projetant leurs axones à la moelle épinière, transmettant indirectement l'information jusqu'au noyau médian préoptique de l'hypothalamus. Le noyau médian préoptique ajuste l'activité orthosympathique des vaisseaux cutanés, des muscles érecteurs des poils, et du tissu adipeux brun afin de moduler la conservation et la production de chaleur (Gordon, 2017; Gibbons, 2019).

d) La pression intracrânienne

Parmi les facteurs qui peuvent influencer la régulation CV par le SNA, étant les possibles modifications de la pression intracrânienne (PIC), en condition pathologique ou lors des vols spatiaux. Plusieurs études ont montré un lien entre l'augmentation de l'activité sympathique et de la PIC. Il a été montré qu'une augmentation aiguë de la PIC, à des valeurs avoisinantes celle de la PA, déclenche le réflexe de Cushing, caractérisé par une hypertension artérielle avec l'augmentation de la PA moyenne et de la pression pulsée, une bradycardie, et des irrégularités respiratoires (Häni et al., 2019). Une récente étude menée au sein de notre laboratoire, a montré qu'une augmentation progressive et modérée de la PIC par injection de LCR de synthèse entraine une augmentation parallèle et réversible de l'activité du SNS chez l'Homme et chez la souris (Schmidt et al., 2018). Ceci a été retrouvé par d'autres équipes chez le rat et le mouton (Guild et al., 2018; Marina et al., 2020a). Ces travaux suggèrent que l'augmentation de la PIC, induite artificiellement par injection intraventriculaire de LCR de synthèse, entraîne une diminution de flux sanguin cérébral (Cerebral Blood Flow, CBF) par la diminution de l'afflux artériel mais également par une modification de la résistance et du tonus des vaisseaux sanguins cérébraux (Raboel et al. 2012 ; Rodríguez-Botoa et al. 2015 ; Häni et al. 2019). Ces événements engendrent une diminution de la pression de perfusion cérébrale (Cerebral Pressure Perfusion, CPP), nécessaire à la perfusion du tissu nerveux (Rodríguez-Botoa et al. 2015 ; Guild et al. 2018) et conduisent à une augmentation de l'activité sympathique.

2. Techniques de mesures de l'activité nerveuse autonome du système cardiovasculaire

Il existe différentes techniques d'évaluation directe et indirecte de l'activité du SNA et notamment de l'activité sympathique.

2.1. Les techniques de mesure directe

2.1.1. Microneurographie

La microneurographie est la seule méthode qui permet de mesurer de manière directe et dynamique l'activité nerveuse sympathique. Cette technique mesure l'activité des efférences sympathiques postganglionnaires à destinée des vaisseaux des muscles squelettiques.

Chez l'Homme, cette méthode bien décrite, permet la mesure directe des potentiels d'action des fibres sympathiques chez le sujet éveillé (Guild et al., 2010; Hart et al., 2017; Schmidt et al., 2018). Au cours de l'exploration, le sujet est placé en position décubitus dorsal, genou semi-fléchi. L'enregistrement s'effectue au moyen de microélectrodes en tungstène. Après repérage par stimulation externe du trajet du nerf fibulaire, une microélectrode est insérée de façon sélective dans les fibres sympathiques efférentes cheminant autour du nerf fibulaire et une microélectrode de référence, positionnée en sous-cutanée, est insérée à 2-3 cm de celle-ci. Une fois positionnée, la microélectrode permet le recueil de l'activité électrique sympathique de fibres destinées à l'innervation des vaisseaux des muscles périphériques situées en aval du point d'insertion. En l'absence de stimuli sensitifs et de mouvement musculaire la différence de potentiel mesurée entre les 2 électrodes correspond à la sommation de l'activité électrique des fibres sympathiques destinées aux vaisseaux des muscles périphériques. Les signaux nerveux sont amplifiés, filtrés, corrigés et intégrés afin d'obtenir un neurogramme identifiant les trains de décharge de l'activité sympathique sous la forme de pics (bursts) (FIGURE 15).

En général, l'enregistrement du SNA chez l'homme est limité aux nerfs innervant les muscles squelettiques et la peau. L'enregistrement de la SNA est également effectué chez l'animal, mesuré au niveau du nerf rénal (« renal sympathetic nerve activity », RSNA) (Guild et al., 2018; Schmidt et al., 2018; Decataldo et al., 2019), permettent une analyse plus détaillée et invasive des mécanismes que celle qui est possible chez les patients (Hart et al., 2017).

Pour se faire, il est généralement une électrode bipolaire placée autour d'un faisceau nerveux rénal. Une différence de tension entre les électrodes est détectée au fur et à mesure que les potentiels d'action se déplacent le long des axones, qui sont ensuite amplifiés (Guild et al., 2010). La limite de cette méthode est que le voltage mesuré est affecté par plusieurs variables telles que le nombre d'axones dans le faisceau, leur relation spatiale avec l'électrode, la qualité de la dissection du nerf, et les différences physiques entre les électrodes. De plus, il n'existe pas un seul faisceau nerveux et la taille et l'emplacement de ces faisceaux varient selon les animaux (Hart et al., 2017).

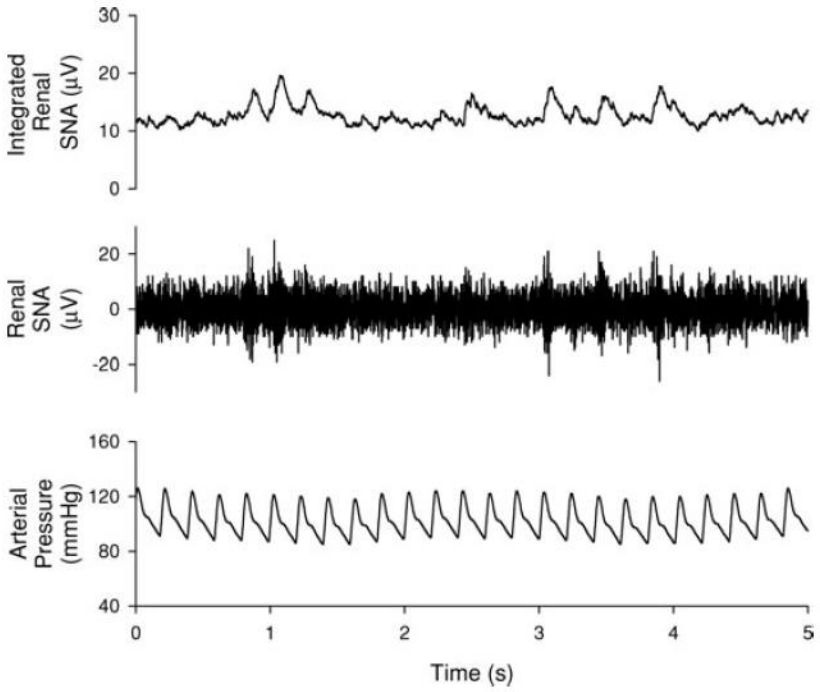


Figure 15. Figure représentant l'enregistrement d'un signal de l'activité nerveuse sympathique et de la pression artérielle.
Signal du SNA rénal intégré (en haut), du SNA rénal (au milieu) et de la pression artérielle (en bas) enregistrés par télémétrie chez un rat conscient 65 jours après l'implantation des électrodes d'enregistrement.
(Source : Guild et al., 2010)

2.2. Les techniques de mesure indirectes

2.2.1. Mesure des catécholamines plasmatiques

Le dosage des catécholamines plasmatiques et urinaires est employé afin de déterminer l'activité sympathique mais présente plusieurs limites. Le dosage de la noradrénaline est l'index employé de manière plus commune afin de caractériser cette activité. En revanche, le dosage de la noradrénaline circulante ne représente qu'une fraction de la quantité du neurotransmetteur excrété au niveau de la synapse. Sa concentration plasmatique dépend d'une part, du niveau d'activité du SNS et de sa libération par le bouton présynaptique, et d'autre part, de la clairance et de la recapture. De ce fait, la mesure de la concentration plasmatique ne permet pas de discriminer l'origine centrale (augmentation de la sécrétion) ou périphérique (diminution de la clairance ou augmentation de la recapture) d'une augmentation du neurotransmetteur, et ne reflète pas le niveau d'activation sympathique global. Aussi, cette mesure représente une faible reproductibilité et sensibilité des niveaux plasmatiques de noradrénaline.

2.2.2. Analyse de la fonction des organes cibles du SNA

L'observation des fonctions des organes cibles innervés par des nerfs autonomes tels que les fonctions des pupilles, la FC, la PA, le flux sanguin, la résistance vasculaire, la sudation, la température corporelle, les fonctions gastro-intestinales ou encore, les fonctions urogénitales, est un moyen simple et classique pour estimer indirectement de quelle manière le système nerveux autonome fonctionne et s'il est altéré.

Plus précisément, la FC et la PA, étant modulées par l'activité sympathique et parasympathique, l'analyse spectrale de puissance de la variabilité de ces deux variables est devenue une méthode classique afin d'évaluer indirectement mais quantitativement les fonctions neuronales autonomes CV (Mano, 2005).

2.2.3. Analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque

La notion de variabilité de la FC (VFC) fait référence aux fluctuations physiologiques de l'intervalle entre chaque battement cardiaque observées au cours du temps. Ces fluctuations complexes sont caractéristiques des systèmes physiologiques, capables de générer de hauts niveaux de régulation sur plusieurs dimensions spatio-temporelles simultanément. La mesure des variations de la FC au cours du temps représente un moyen efficace et non invasif d'exploration du fonctionnement du SNA.

La VFC peut être mesurée à partir de différents signaux physiologiques tels que l'ECG, l'onde de pouls, ou encore les bruits cardiaques. L'outil le plus utilisé et le plus performant reste l'ECG, qui permet de mesurer avec précision les distances séparant chaque complexe QRS des fluctuations cardiaques (FIGURE 16). Cette méthode repose sur l'analyse du tracé des intervalles RR à l'aide de plusieurs méthodes mathématiques. On distingue trois domaines d'analyses : le domaine temporel, le domaine fréquentiel et le domaine non linéaire.

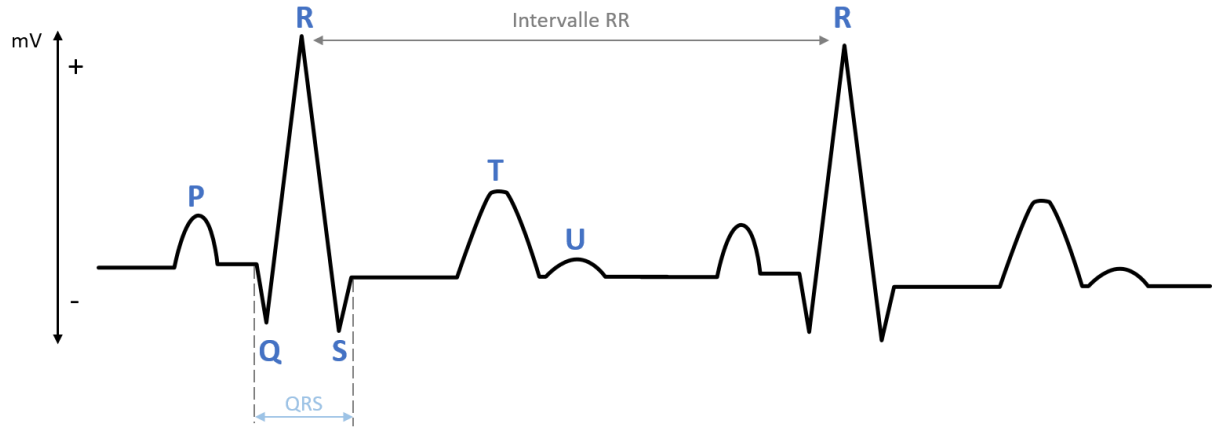


Figure 16. Schéma d'un tracé d'électrocardiogramme.

Le domaine d'analyse temporel renseigne sur les variations de l'intervalle RR au cours du temps, ou des différences entre des intervalles successifs, et repose sur des outils mathématiques simples de type moyenne et écart-type. Cette analyse permet de déterminer plusieurs index tels que le SDNN, le NN50, et le RMSSD. Le SDNN est l'écart type de tous les intervalles RR normaux (NN) extraits de l'ECG, et renseigne sur l'activité autonome globale, sans différenciation du SNS et PNS, bien que la source principale de la variabilité soit l'arythmie sinusale respiratoire, médiée par le système vagal. Le NN50 est le nombre d'intervalles RR (NN) successifs différent de 50 ms, et est étroitement corrélé à l'activité vagale.

Il en est de même pour le RMSSD, qui correspond à la moyenne quadratique des différences entre les intervalles RR (NN) adjacents, qui demeure la principale mesure utilisée pour estimer l'activité parasympathique.

Le domaine d'analyse fréquentiel, ou spectrale, permet une quantification précise des différents rythmes oscillants influençant la VFC. Cette analyse permet d'extraire les oscillations périodiques comprises au sein du signal. L'application de la transformée de Fourier à une série d'intervalles RR permet d'extraire plusieurs plages de fréquences d'intérêt : les ultras basses fréquences (« ultra low frequency », ULF), les très basses fréquences (« very low frequency », VLF), les basses fréquences (« low frequency », LF) et les hautes fréquences (« high frequency », HF).

Les ULF nécessitent des enregistrements longs (24 heures), déterminent des rythmes biologiques lents (métabolisme, système rénine-angiotensine (SRA), exercice physique…) et seraient influencés par les rythmes circadiens principalement. Ils sont rarement utilisés, comme les VLF, pour lesquelles leur implication dans la modulation de la fréquence cardiaque est controversée. Certaines études rapportent qu'elles seraient un déterminant de l'activité physique, et que les facteurs tels que la thermorégulation, le SRA ou encore certains mécanismes hémodynamiques pourraient également jouer un rôle.

Les LF seraient influencées à la fois par l'activité sympathique et parasympathique. L'inhibition de leur activité par l'utilisation de propanolol ou d'atropine provoque la diminution voire la disparition des LF. Une augmentation des LF serait retrouvée lors d'un stress. Les HF reflètent principalement l'activité vagale, et sont modulées par l'arythmie sinusale respiratoire.

Enfin, le rapport entre les basses et hautes fréquences (LF/HF) permet d'estimer l'état de la balance sympathovagale et peut être considéré comme un index sympathique. Des valeurs inférieures ou supérieures à 1 peuvent traduire respectivement une prédominance parasympathique ou sympathique. En revanche, étant donné que les LF ne sont pas seulement modulées par le tonus sympathique, l'interprétation de ce rapport est délicate. L'analyse fréquentielle permet également de déterminer la puissance totale, qui est un indice de la variabilité autonome globale équivalent au SDNN.

L’analyse non linéaire permet d’étudier la complexité de la modulation cardiaque par le SNA. L’analyse des intervalles-RR en fonction du temps fait apparaitre un haut degré de fluctuations qui traduisent la capacité du SNA à intégrer une grande gamme de stimuli et à produire des réponses optimales et différenciées. En effet, le tracé présente des motifs similaires quantifiables qui se reproduisent en fonction du temps, que ce soit à l’échelle de quelques minutes sur plusieurs heures, ce qui permet de déterminer un degré d’autosimilarité et qui est quantifiable. Par exemple, deux personnes ayant les mêmes valeurs de SDNN, peuvent avoir une modulation d’aspect différente. Ces indices non linéaires pourraient avoir une valeur pronostique puissante, notamment sur la survenue d’événements CV défavorables (Elghozi and Julien, 2007; Taralov et al., 2016; Raffin, 2019).

2.2.4. Sensibilité du baroréflexe artériel

Comme décrit précédemment, le rôle principal du baroréflexe est de maintenir la PA à des valeurs physiologiques stables, notamment lors des changements posturaux. Toute modification de la PA sera détectée par les barorécepteurs artériels participant à la mise en place de réponses autonomes, permettant la régulation de la FC et des résistances périphériques. Le gain ou la sensibilité du baroréflexe (SBR) représente cette capacité de moduler la fréquence cardiaque, en fonction des fluctuations de pression artérielle.

De manière générale, la SBR est mesurée comme le ratio entre la variation de FC, quantifiée par les intervalles RR (en ms), en réponse à la variation de pression artérielle, quantifiée par les pics de pression systolique (en mmHg). Un ratio élevé indique que le système est sensible et réagit efficacement aux variations de pression artérielle, alors qu'un ratio faible traduit un système plus inerte.

La SBR est évaluée par plusieurs méthodes qui visent à quantifier le gain de la fonction de transfert ou la pente de la relation linéaire entre les changements parallèles entre la PA et de la FC (Laude et al., 2008). D'une part, la SBR est évaluée par les méthodes classiques permettant l'évaluation de la réponse réflexe en intervalles RR au changement de la pression artérielle. Ces méthodes sont réalisées par l'utilisation de drogues vasoactives telles que le nitroprussiate de sodium (vasodilatateur) et la phényléphrine (vasoconstricteur), par la réalisation d'actes chirurgicaux (dénervation sélective des zones barosensibles de la crosse aortique), ou par la réalisation de la manœuvre de Valsalva par exemple (Laude et al., 2008). D'autres part, la SBR peut être évaluée de manière non-invasive et spontanée, par l'utilisation de méthodes « mathématiques », comme la méthode des « séquences ». Cette méthode permet de quantifier l'association linéaire entre les changements de PA systolique (PAS) et des intervalles RR. Elle est basée sur l'identification de séquences de 3 battements consécutifs où les changements de PAS sont suivis d'un changement spontané de l'intervalle RR. La pente de régression qui relie la PAS et l'intervalle RR (exprimée en ms/mmHg) est considérée comme étant un index de la SBR. Il existe également les méthodes dans le domaine fréquentiel.

Chapitre III – La microgravité et le système nerveux autonome

Etant donné le rôle joué par le SNA dans l'adaptation posturale, il n'est pas surprenant que les changements induits par la microgravité se traduisent par une modification de l'activité autonome et neuronale, tant au niveau central que périphérique (Mano, 2005; Globus and Morey-Holton, 2016). L'activité du SNA dans l'espace a été montré en particulier en 1998, lors de la mission Neurolab Spacelab STS-90 qui a duré 16 jours. En effet, cette mission a été consacrée à l'étude du fonctionnement du système nerveux dans l'espace à l'aide de plusieurs espèces (humains, rats, souris, grillons) (Buckey and Homick, 2003; Eckberg et al., 2010).

Chez l'Homme, l'adaptation à court-terme conduit à une réduction du tonus sympathique en faveur de l'augmentation de l'activité vagale, en réponse au phénomène de redistribution des fluides corporels (Rienzo et al. 2008 ; Hughson et al. 2018). L'augmentation de l'activité vagale a également été montré après 30 minutes d'immersion sèche ou d'HDT chez l'Homme (Chouchou et al. 2019). Dans cette étude, les marqueurs fréquentiels de l'activité parasympathique tels que le HF, était augmenté, tandis que LF normalisé et la balance sympathovagale (LF/HF) étaient diminués (Chouchou et al., 2020). De plus, une augmentation de l'intervalle RR ainsi que la SBR étaient rapportés. Enfin, la diminution de l'activité du SNS, mesurée par MSNA au niveau du nerf tibial chez l'Homme, a été montré lors de l'exposition à court terme à la microgravité en vol parabolique ou après deux heures d'immersion (Mano, 2005). Cette réduction d'activité du SNS et l'augmentation du PNS sont provoquées par l'activation des réflexes artériels et cardio-pulmonaires, mais peuvent être également liées à des modifications des entrées vestibulaires et somatosensorielles, rapportées pour modulées le SNS. Il est également suggéré que la suppression de la réponse MSNA dans le modèle d'immersion, peut jouer un rôle important dans le maintien de l'homéostasie des paramètres hémodynamiques, en coopérant avec les mécanismes humoraux comme la suppression de la sécrétion d'hormone antidiurétique (i.e. réflexe de Gauer Henry) (Mano, 2005).

L'adaptation à plus long terme à la microgravité chez l'Homme conduit à une augmentation du tonus sympathique, pendant et après le vol (Mandsager et al., 2015; Chouchou et al., 2020). En effet, la mission Neurolab a montré une augmentation de l'activité du MSNA, mesuré au niveau du nerf sciatique poplité externe, accompagnée d'une augmentation de la PA, de la FC et de la concentration de norépinephrine, notamment en fin de mission spatiale (vers 12/13ème jours) et juste après le retour sur Terre (Mano and Iwase, 2003; Mandsager et

al., 2015). Les réponses du MSNA à la manœuvre de Valsalva étaient également élevées (Cox et al., 2002; Eckberg, 2003). L'augmentation du tonus orthosympathique est retrouvée dans les protocoles d'alitement à -6° de longue durée, comprise entre 6 à 120 jours (Mano, 2005). L'augmentation de de MSNA après une longue durée d'HDBR était liée à une augmentation de la capacité veineuse de la jambe, qui, quant à elle, n'était pas corrélée à une libération de monoxide d'azote plasmatique, puissant vasodilatateur endothélial (Mano, 2005). De plus, les réponses réflexes orthosympathiques ainsi que la tolérance orthostatique étaient préservées chez les astronautes de la mission Neurolab (Eckberg et al., 2010). D'autres études montrent une diminution de la SBR vagale pendant (Cox et al., 2002) et après le vol (Hughson et al., 2018). Ceci participerait, au retour sur Terre, à l'IO avec ou sans syncope et également, à des réponses tachycardiques et vasoconstrictrices inadéquates contre le stress gravitationnel (Mano and Iwase, 2003; Mandsager et al., 2015). Ces résultats suggèrent que l'activité du SNS augmente après une exposition prolongée à la microgravité, de manière à compenser divers changements induits par la microgravité. Au contraire, une réduction de la réponse du MSNA lors de l'exercice des muscles de la jambe peut être liée à certains changements dans les muscles antigravitaires tels que l'atrophie avec de possibles changements morphologiques et/ou fonctionnels (Mano, 2005). Après le vol spatial de courte et de longue durée, le baroréflexe artériel est altéré chez certains astronautes et la tolérance à la position verticale est diminuée en raison de l'hypotension orthostatique due à une réduction du retour veineux et du volume cardiaque, et d'une vasoconstriction périphérique insuffisante, qui s'accompagne souvent de réponses vasovagales (Moffitt et al., 1998; Eckberg et al., 2010). En position debout, le sang artériel inférieur défie le flux sanguin cérébral, qui est normalement protégé par l'autorégulation cérébrale qui est altérée après le vol (Hughson et al., 2018; Kermorgant et al., 2020).

Chez le rongeur, les réponses sympathiques et parasympathiques sont beaucoup moins étudiées en condition de microgravité. Il est rapporté que la balance sympathovagale est altérée, avec une augmentation du tonus sympathique et une diminution de l'activité vagale chez le rat suspendu (Moffitt et al., 1998, 2008; Mueller et al., 2006). L'utilisation d'un agent bloquant l'activité du SNS (i.e. propanolol) résulte d'une diminution importante de la FC, alors que l'utilisation d'un agent bloquant l'activité du PNS (i.e. atropine) n'induit pas de modification (Moffitt et al., 2008) . Les index de l'analyse spectrale de la PA, tels que le SDNN,

le LF, le LF et le HF normalisés, montrent une diminution après 14 jours de suspension chez le rat (Moffitt et al., 2008). La PA n'est pas modifiée (Powers and Bernstein, 2004) ou légèrement élevée (Musacchia et al., 1992; Tsvirkun et al., 2012) pendant la suspension chez la souris et chez le rat, et diminue à la récupération (Jung et al., 2005; Zhang et al., 2008). Pendant le vol spatial, les souris ne montrent pas de modification de la PA, tandis que la FC est diminuée dans les premières minutes de vols (en hypergravité), ce qui a été également montré dans le modèle de suspension (Powers and Bernstein, 2004). Progressivement, il y a une augmentation de la PA dès l'entrée en orbite pour la PA et de la FC au bout d'une semaine de vol (Andreev-Andrievskiy et al., 2017). La FC est augmentée chez le rat pendant les vols spatiaux (Andreev-Andrievskiy et al., 2017), alors qu'elle est normale ou transitoirement élevée pendant la suspension (Tsvirkun et al., 2012), tandis que la tachycardie est observée après la suspension (Mueller et al., 2006; Zhang et al., 2008; Tsvirkun et al., 2012) ou l'atterrissage (Waki et al., 2002; Andreev-Andrievskiy et al., 2017). De plus, la SBR est pratiquement inchangée chez les souris en suspension de la queue (Powers and Bernstein, 2004). En revanche, le contrôle du tonus sympathique par le baroréflexe artériel chez rongeur est nettement diminué après un vol spatial ou une simulation au sol (Brizzee and Walker, 1990; Fagette et al., 1995a, 1995b; Powers and Bernstein, 2004; Yamasaki et al., 2004; Foley et al., 2005). La diminution de la SBR est accompagnée d'une augmentation des marqueurs de l'activité sympathique, du RSNA ou LSNA, et d'une diminution de la capacité à augmenter la FC par un retrait du tonus vagal (Powers and Bernstein, 2004; Foley et al., 2005; Moffitt et al., 2008). En revanche, les concentrations de catécholamines sont inchangées après la simulation (Moffitt et al., 1998). Il est suggéré que l'élévation du tonus du SNS est très probablement due à des ajustements physiologiques spécifiques, associés au déconditionnement CV (compensation de la réduction du volume sanguin et plasmatique, de l'homéostasie neurohormonale, dérégulation autonome) et à une réponse au stress non spécifique au modèle de suspension.

Chapitre IV - La microgravité et les rythmes circadiens

Lors des vols spatiaux, les rythmes circadiens chez les astronautes sont perturbés, en raison des cycles irréguliers de lumière et d'obscurité (pas de cycles de 24 heures), de la microgravité et de l'inactivité physique, pouvant affecter d'importantes fonctions physiologiques (Guo et al., 2014; Otsuka et al., 2018) (FIGURE 17). Les rythmes circadiens sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et comportementaux sur Terre, pour lesquels des observations similaires ont été faites dans l'espace et semblent affectés chez certaines astronautes (Yamamoto et al., 2015; Otsuka et al., 2018). Néanmoins, les modifications des rythmes circadiens provoqués par la microgravité restent mal comprises (Pavy-Le Traon et al., 2007).

Chez l'Homme, il a été montré que le SNA, estimé par l'analyse de la VFC, était altéré après une exposition prolongée (6 mois), alors que le rythme circadien de la FC est amélioré (Otsuka et al., 2018). Des travaux ont montré qu'une exposition à court terme conduisait à des rythmes circadiens désordonnées, associés à des troubles du sommeil (Yamamoto et al., 2015). De plus, il a également été montré qu'après un mois de vol spatial, la FC et l'activité parasympathique étaient améliorées et restaurées de différentes manières dépendantes à chaque astronaute : certains ont présenté une bradycardie élevée ou modérée, d'autres une tachycardie (Yamamoto et al., 2015). Il a également été rapporté que le dysfonctionnement autonome entraînait une perturbation des rythmes circadiens avec une réduction des différences jour/nuit, une perte des variations rythmiques de la FC (i.e. intervalles RR), une diminution de la durée de repolarisation ventriculaire (i.e. intervalles QT) et des arythmies ventriculaires favorisées, après 5 jours de d'HDT (Hughson et al., 2018; Solbiati et al., 2021). Selon une étude sur les variations de la température intrabuccale d'un cosmonaute, l'influence du stimulateur circadien endogène sur la température buccale et la vigilance subjective des rythmes circadiens a été considérablement affaiblie (Monk et al., 2001). Lors d'exposition à long terme d'HBDR, il a été montré que même si les synchroniseurs d'éclairage et d'alimentation étaient contrôlés, les rythmes circadiens se détérioraient progressivement, avec une diminution du sommeil, de la fatigue, une modification des acrophases circadiennes de l'insuline et d'hormone de croissance, ce qui a également été montré dans certains vols spatiaux (Solbiati et al., 2021).

Chez les rongeurs, en condition physiologique, les pics d'activité locomotrice, métaboliques et CV sont élevés pendant la période d'obscurité, ainsi l'augmentation de la PA et de la FC, permet de répondre aux exigences d'une activité accrue chez les souris (Li et al., 1999). En condition de microgravité simulée, il a été montré une perturbation de la régulation circadienne, avec une augmentation de la PA systolique et diastolique, et la perte de l'augmentation de la FC pendant la phase active chez le rat suspendu (Tsvirkun et al., 2012). Une perturbation des gènes de l'horloge centrale (BMAL1, CLOCK, Period) a été observée dans chez l'animal et chez l'Homme, entraînant une dérégulation physiologique et métabolique aux niveaux neuronal, moléculaire et cellulaire (Otsuka et al., 2018; Rhoads et al., 2020).

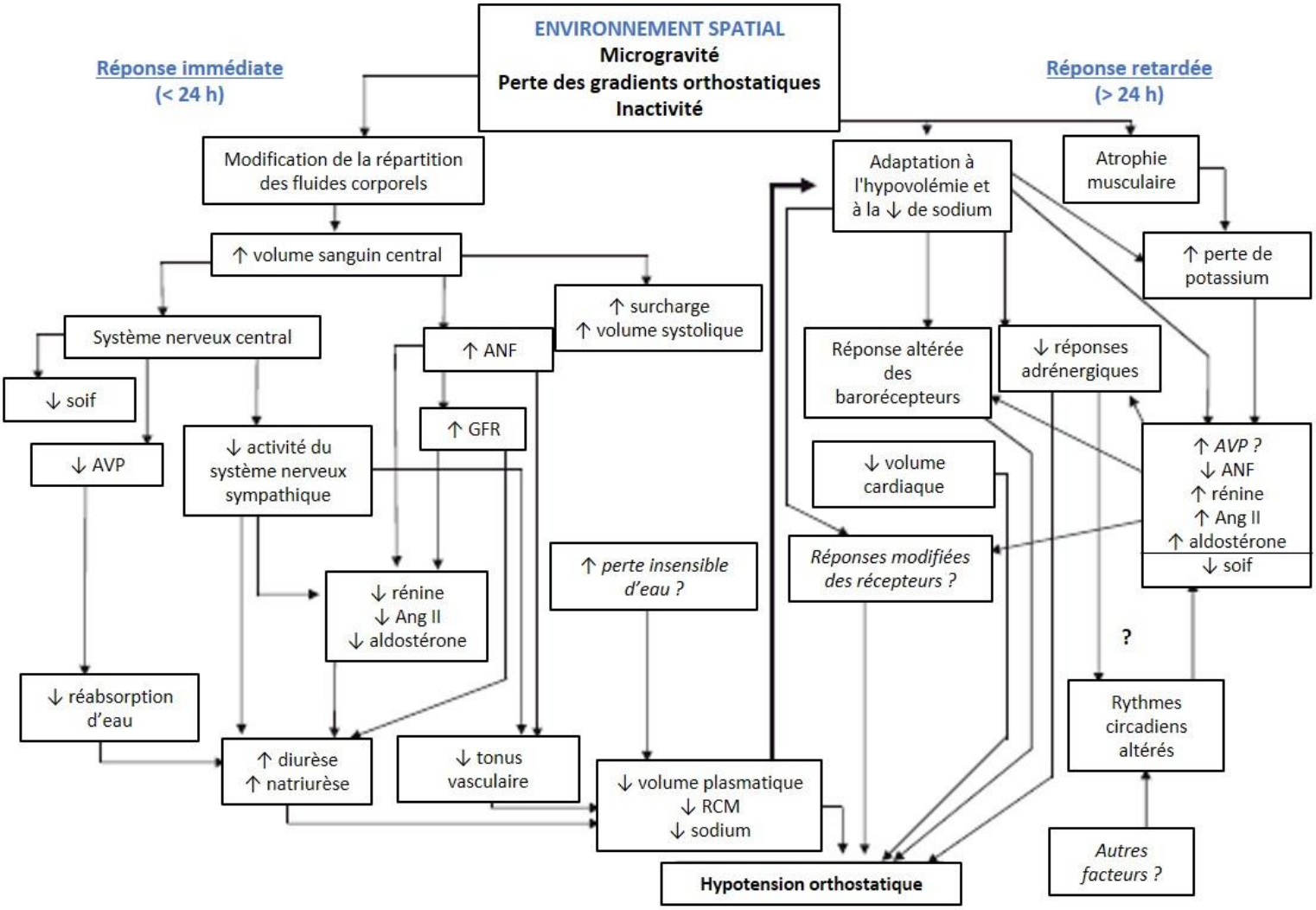


Figure 17. Réponses cardiovasculaires suggérées en condition de microgravité réelle et simulée.
ANF, facteur natriurétique atrial ; Ang, angiotensine ; AVP, arginine vasopressine ; GFR, débit de filtration glomérulaire (glomerular filtration rate) ; RCM, masse des globules rouges (red cell mass).
(Adapté de Gharib and Hughson, 1992)

Chapitre V – La microgravité et la pression intracrânienne

1. La pression intracrânienne : définition

Les travaux présentés par la doctrine de Monro-Kellie (18ème siècle), affinés par le neurochirurgien Cushing (20ème siècle) ont permis d'établir les principes de base qui régissent la PIC. De manière générale, le maintien d'une PIC régulière dépend du volume contenu dans la cavité crânienne. La cavité crânienne étant close, n'ayant pas d'expansion, le volume qu'elle contient reste constant (FIGURE 18). Le cerveau (parenchyme cérébral) humain représente environ 80% du volume intracrânien. Se répartissent de manière égale le sang (10%) ainsi que le LCR (10%), afin d'établir un volume intracrânien total constant dans des conditions normales. Ainsi, la PIC physiologique est régie par l'équilibre des composants fluidiques. Elle est d'une part influencée par l'interaction de la production et de l'absorption du LCR, mais également de l'afflux du sang artériel et de l'écoulement veineux (Mokri, 2001; Rodríguez-Boto et al., 2015; Harary et al., 2018; Häni et al., 2019).

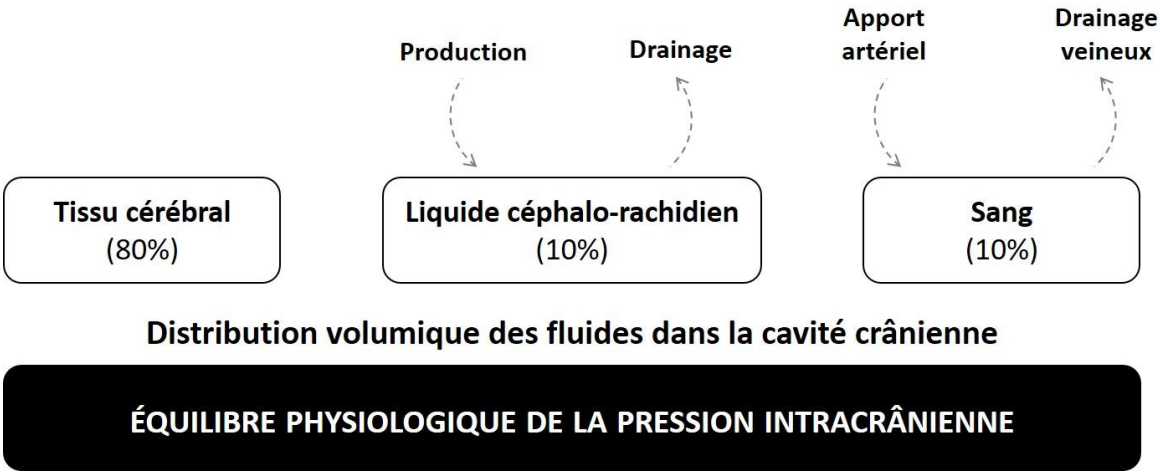


Figure 18. Equilibre physiologique donnant la constante de la pression intracrânienne.

2. Modifications physiologiques

Certains facteurs physiologiques peuvent influencer la PIC, y compris le changement de posture, l'activité cérébrale, la fonction CV (PA, tonus adrénergique…) et également respiratoire (Raboel et al., 2012; Häni et al., 2019). Ainsi, chez l'adulte sain, la PIC en position allongée est de l'ordre de 7–15 mmHg. Les manœuvres de Valsalva, augmentant la pression intra-thoracique ou intra-abdominale (toux, défécation), entraînent une augmentation de la PIC à des valeurs supérieures à 40 mmHg, pouvant atteindre les 100 mmHg (Raboel et al., 2012; Rodríguez-Boto et al., 2015). Enfin, lorsque le corps est en position allongée, la PIC mesurée est comprise entre -10 et +5 mmHg (Raboel et al., 2012; Harary et al., 2018). Le passage d'une position allongée à assise, provoque une diminution de la PIC à des valeurs environnant 0 mmHg, ainsi qu'une modification de la PA systémique ainsi que la respiration (Rodríguez-Boto et al., 2015; Lindén et al., 2018). Au contraire, lors du passage d'une position allongée à une position inclinée, tête déclive à -10°, il est observé une augmentation de la PIC allant à des valeurs de PIC moyennes à 15 mmHg (FIGURE 19).

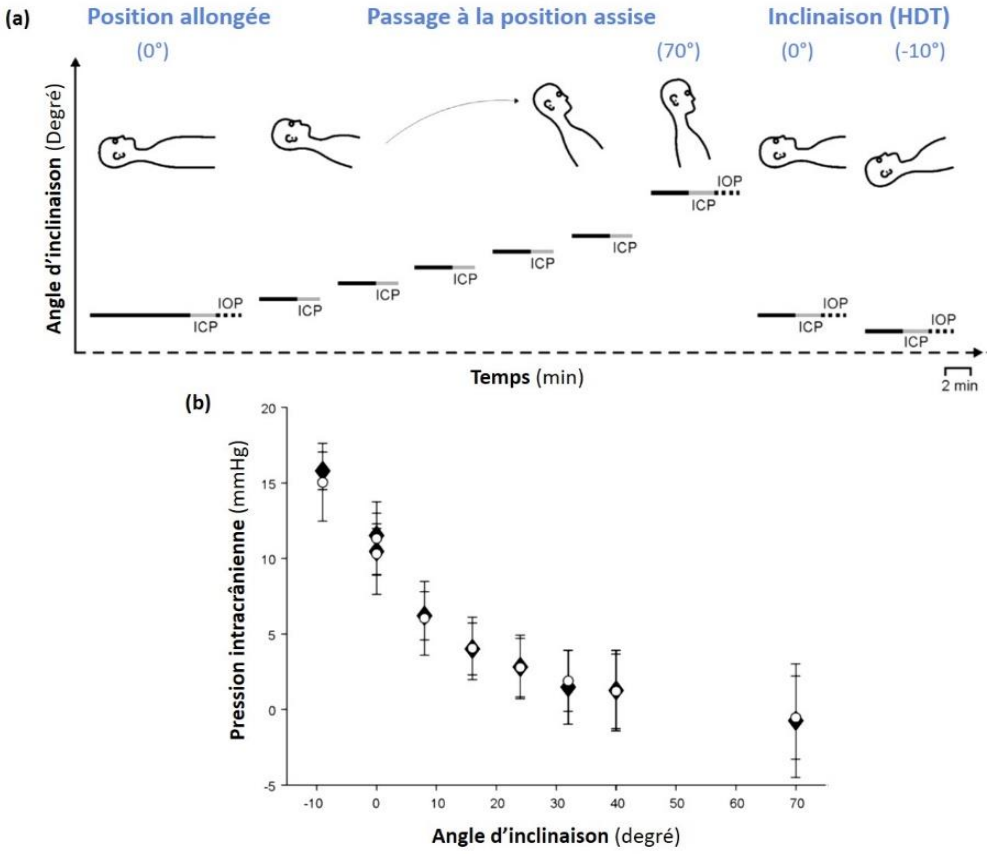


Figure 19. Changement posturaux et variations de la pression intrâcranienne.
(a) Illustration du protocole expérimental montrant les changements de posture chez l'Homme, et les variations de la pression intracrânienne (ICP, mmHg) et de la pression intraoculaire (IOP, mmHg). (b) Valeurs moyennes de la pression intracrânienne en fonction des différents angles d'inclinaison du corps, évaluée chez des sujets malades (cercles blancs) et chez des sujets sains (cercles noirs). (Source : Lindén et al., 2018)

3. Modifications physiopathologiques

La PIC peut également être influencée par des facteurs physiopathologiques tels que l'œdème cérébral, le volume de lésions cérébrales, des troubles de la circulation du LCR, des modifications du volume sanguin et des pressions artérielle et veineuse (Raboel et al. 2012 ; Häni et al. 2019). En effet, une augmentation de la PIC peut résulter de tout mécanisme qui augmente le volume de l'un des trois composants. Le LCR est un élément important dans le maintien d'une PIC stable, ayant un rôle de liquide protecteur du cerveau et de la moelle épinière, et les perturbations de la sécrétion ou du drainage peuvent entrainer des modifications de la PIC (Bothwell, 2019). Ainsi, l'augmentation volumique du LCR induirait une modification de l'un ou des deux autres composants. Dans des conditions normales, des mécanismes compensatoires immédiats, tels que la compliance et l'autorégulation cérébrale, vont intervenir afin de stabiliser le système (Rodríguez-Boto et al., 2015). Si ces mécanismes sont épuisés, il se produit une décompensation et une augmentation exponentielle de la PIC. D'une autre manière, la PIC peut augmenter par l'ajout d'un quatrième composant, tel qu'une hémorragie intracrânienne ou un œdème cérébral qui s'étend au-delà de la capacité du système à compenser en diminuant le volume d'un autre (Rodríguez-Boto et al., 2015; Harary et al., 2018; Häni et al., 2019).

Le maintien de l'homéostasie de la PIC est d'une importance cruciale afin prévenir les lésions cérébrales et préserver le système nerveux central (SNC) (Bothwell, 2019). Une élévation de la PIC est régulièrement retrouvée après une lésion neurologique dans de nombreuses conditions comprenant l'hydrocéphalie, l'hypertension intracrânienne idiopathique, l'œdème, la lésion cérébrale traumatique, et l'accident vasculaire cérébral ou le trauma crânien (Rodríguez-Boto et al., 2015; McBryde et al., 2017; Bothwell, 2019). Les dommages relatant de la PIC élevée se produisent principalement par l'intermédiaire de l'un des deux mécanismes : l'ischémie cérébrale et l'engagement cérébral. En effet, le différentiel de pression entre la cavité intracrânienne et le canal rachidien, induit par l'augmentation de la PIC, peut provoquer le déplacement du tissu cérébral, pouvant provoquer une compression des structures vitales du tronc cérébral, et par la suite mener à des résultats neurologiques graves, y compris la mort (Rodríguez-Boto et al., 2015; McBryde et al., 2017; Harary et al., 2018).

4. Mécanismes de régulation

4.1. Débit sanguin cérébral et pression de perfusion

L'augmentation de la PIC entraine une diminution de débit sanguin cérébral (DSC) par la diminution de l'afflux artériel mais également par une modification de la résistance et du tonus des vaisseaux sanguins cérébraux (Raboel et al., 2012; Rodríguez-Boto et al., 2015; Häni et al., 2019). Ces événements engendrent une diminution de la pression de perfusion cérébrale (PPC), nécessaire à la perfusion du tissu nerveux (Rodríguez-Boto et al., 2015; Guild et al., 2018). La PPC est elle-même régie par la PA moyenne (PAM) et la PIC par le biais de la relation suivante : PPC = PAM-PIC (McBryde et al., 2017; Häni et al., 2019). Le diamètre des vaisseaux de résistance régulateurs participe également aux facteurs décisifs de la circulation cérébrale avec la PPC (Häni et al., 2019).

4.2. Mécanismes compensatoires

Il existe des mécanismes compensatoires intrinsèques pour maintenir une PIC stable, parmi lesquels il est retrouvé la compliance et l'autorégulation cérébrale (AC) (McBryde et al., 2017; Kermorgant et al., 2020).

La compliance cérébrale ($\Delta V/\Delta P$) décrit le changement de volume qui conduit à un changement de pression en raison d'un changement de volume. C'est est comme la capacité d'adaptation de la boite crânienne et du tissu cérébral qui permet de tolérer une augmentation de volume (Lindén et al., 2018). Quand la compliance du LCR diminue et que la PIC est élevée, le changement de volume conduit à un changement de pression plus important qu'en cas de valeurs de PIC plus faibles (Häni et al., 2019).

L'AC est un mécanisme homéostatique spécifique, qui permet la régulation et le maintien du DSC à des valeurs constantes contre tout changement de la PA ou de la PIC, dans le but de préserver la fonction cérébrale. La courbe d'autorégulation a été déterminée avec trois phases spécifiques montrant le plateau du DSC, distinguant la limite inférieure de la limite supérieure de l'autorégulation (FIGURE 20). Quand ces limites sont dépassées, l'AC peut être perdue et le DSC ne peut plus rester stable (Kermorgant et al. 2020) (ANNEXE I).

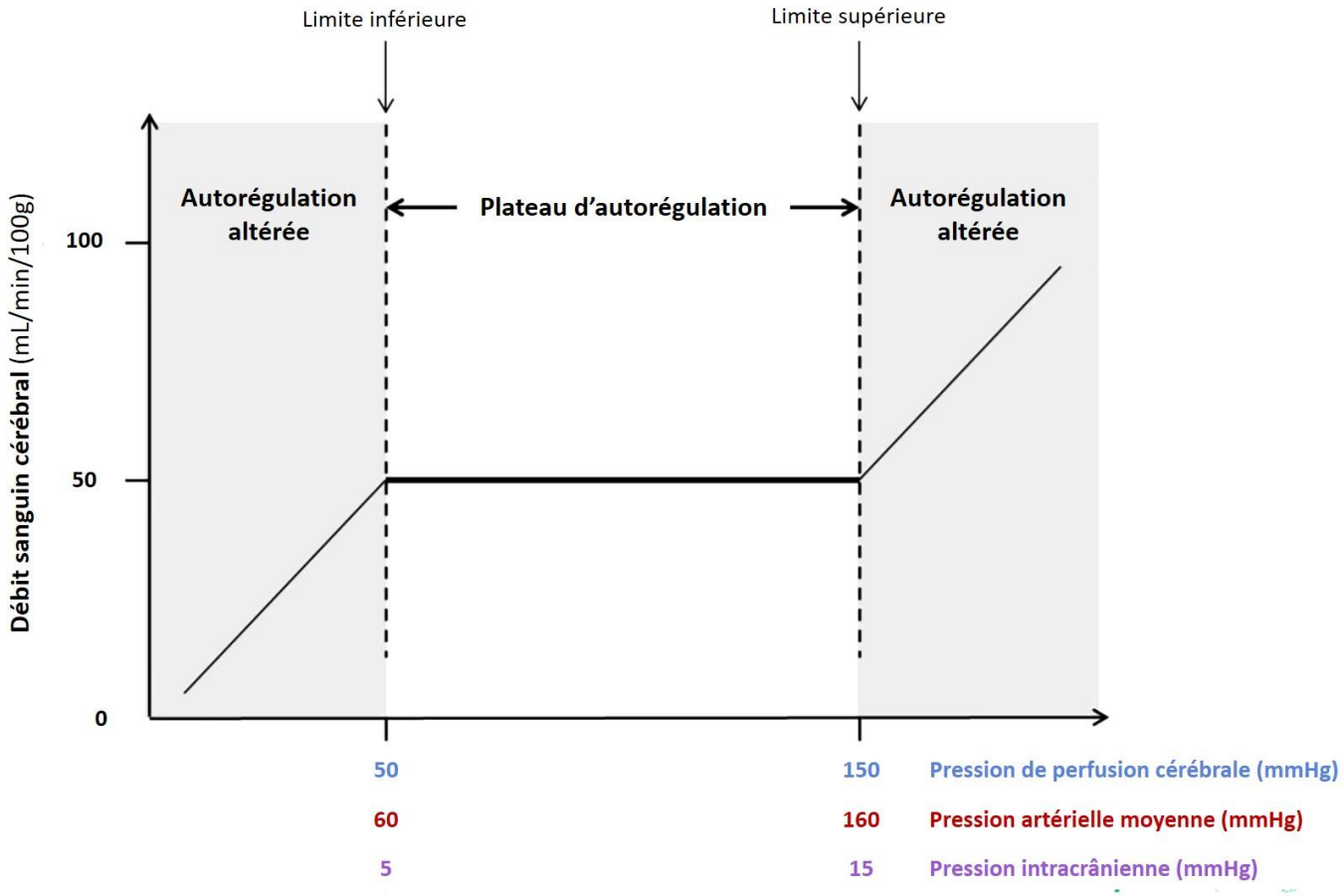


Figure 20. Courbe théorique d'autorégulation cérébrale.
Courbe théorique d'autorégulation cérébrale, avec le plateau d'autorégulation pour lequel le débit sanguin cérébral reste constant, avec les limites supérieure et inférieure de la gamme d'autorégulation.
(Adapté de Kermorgant et al., 2020)

5. La microgravité

En l'absence de gravité, la redistribution des fluides corporels, et en particulier la redistribution du LCR, mais aussi la diminution du retour veineux, a été supposée être un des facteurs des troubles visuels observés chez certains astronautes après les vols de longue durée (Lawley et al., 2017; Kermorgant et al., 2020). Cette redistribution est suspectée d'augmenter la PIC d'une manière disproportionnée par rapport à la pression intraoculaire (PIO), entraînant ainsi une modification du gradient de pression. En effet, dans un modèle aigu d'alitement à -9 et -10°, il a été observé une augmentation de la PIC mais pas la PIO (Lawley et al., 2017; Lindén et al., 2018). Une autre étude a montré une augmentation de la PIC et de la PIO à l'inclinaison à 15° chez l'Homme (Macias et al., 2015). Les astronautes atteints de ce syndrome développent des symptômes suggérant une PIC élevée, y compris un œdème papillaire, un aplatissement du globe de l'œil et la dilatation de la gaine du nerf optique (Nelson et al., 2014; Lawley et al., 2017). Ceci a également été montré dans le modèle d'immersion sèche à court terme (Kermorgant et al., 2017) (ANNEXE II) et lors de vols spatiaux (Mader et al., 2011).

L'absence de gradients hydrostatiques augmente la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, induisant une augmentation du flux sanguin dans les artères cérébrales, une perturbation de la circulation du LCR et une diminution de drainage sanguin, modulé par un écoulement passif du volume veineux et céphalo-rachidien (Du et al., 2021). Il est suggéré que la diminution de la compliance cérébrale dans les premiers jours de vol augmenterait l'effet de la redistribution des fluides corporels, entrainant l'augmentation de la PIC. Il est également rapporté que ce système se normalise au bout de quelques jours, entrainant progressivement un retour de la PIC vers les valeurs de base (Marshall-Goebel et al., 2019; Du et al., 2021). Cependant, des modifications, observées par IRM après les vols de longue durée faisant suspecter une augmentation de la PIC (Roberts et al., 2017). A ce jour, la cinétique et l'importance des variations de PIC lors des vols spatiaux est mal connue.

Méthodologie

Partie I. Protocole chronique - Réponses à long terme

Cette partie consiste à étudier les réponses à long terme de la suspension du train arrière à -30° chez la souris vigile, et ainsi, évaluer la cinétique de l'adaptation CV et sa régulation par le SNA.

Pour répondre à ces objectifs, le modèle de suspension du train arrière à -30° est réalisée pendant 5 jours, chez la souris mâles C57BL/6J âgées de 18-20 semaines à la fin du protocole (FIGURE 21).

D'une part, les souris sont équipées d'implants télémétriques afin de mesurer, en continu, les paramètres cardiovasculaires, tels que la PA, la PVC et la FC. Les paramètres pouvant influencer le SNA et les réponses CV, tels que l'activité locomotrice, la température centrale et sous cutanée, mais aussi la masse corporelle et la consommation (alimentaire et hydrique) sont également mesurées. Ces paramètres sont mesurés quotidiennement pendant le protocole de microgravité simulée, composé comme suit : 3 jours à l'état de base (« contrôle »), pendant 5 jours de suspension, 2 jours de récupération après la dé-suspension, et 1 jour de re-suspension. Les variations de ces paramètres selon les conditions expérimentales mais également selon les cycles de lumière et d'obscurité, nous permettent d'évaluer l'influence de la suspension mais également des rythmes circadiens chez nos souris. Afin d'évaluer la régulation indirecte du SNA cardiovasculaire, la VFC ainsi que la SBR, reflétant indirectement l'activité du SNA, sont analysées.

Dans le but de mieux comprendre les réponses obtenues dans notre modèle, ont été analysé, avant et après la suspension : la fonction et la structure du cœur par échocardiographie et la composition corporelle par RMN bas-champ. Enfin, les zones impliquées dans la régulation du SNS et les modifications potentielles des structures tissulaires, ont été étudiées après prélèvement du cœur et du cerveau, avant et après la suspension, par des analyses immunohistochimiques de marqueurs de morphologie et d'activation neuronale.

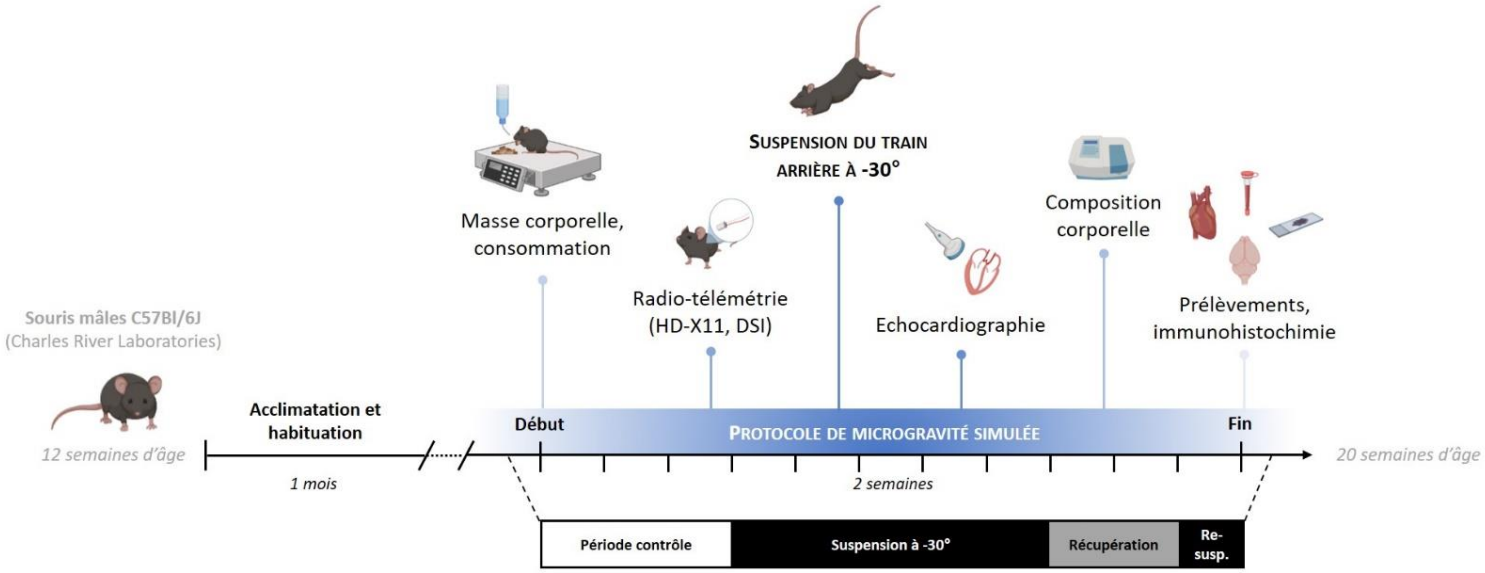


Figure 21. Schéma récapitulatif des procédures expérimentales du protocole chronique.

Partie II. Protocole aigu - Réponses à court terme

L'objectif de cette partie est d'étudier les réponses initiales à l'inclinaison à -30° et d'évaluer si la migration des fluides corporels conduit à une l'augmentation, d'une part, de l'activité du SNS, et d'autre part, de la PIC.

Pour répondre à cet objectif, le protocole expérimental consiste à inclinée une souris à -30° (tête déclive), dans le but de provoquer la migration des liquides corporels vers la partie thoraco-céphalique et ainsi l'augmentation probable de la PIC.

Ici, la mesure des paramètres est réalisée de manière aiguë (invasive) chez la souris anesthésiée, avec une alternance de période et de conditions différentes comme suit : une période de 30 minutes à l'état de base à 0°, une période de 30 minutes d'inclinaison à -30°, et une période de 30 minutes de récupération à 0° (FIGURE 22).

La chirurgie consiste en l'implantation de capteurs permettant la mesure en continu de : la PA, la PIC, ainsi que les paramètres indirectement régulés par le SNA tels que la VFC et la respiration. La température est contrôlée pendant toute la durée du protocole expérimental. Également, nous avons tenté de mesurer de manière directe l'activité du SNP et du SNS au niveau du nerf vague et du nerf rénal, respectivement, grâce à l'utilisation de micro-implants.

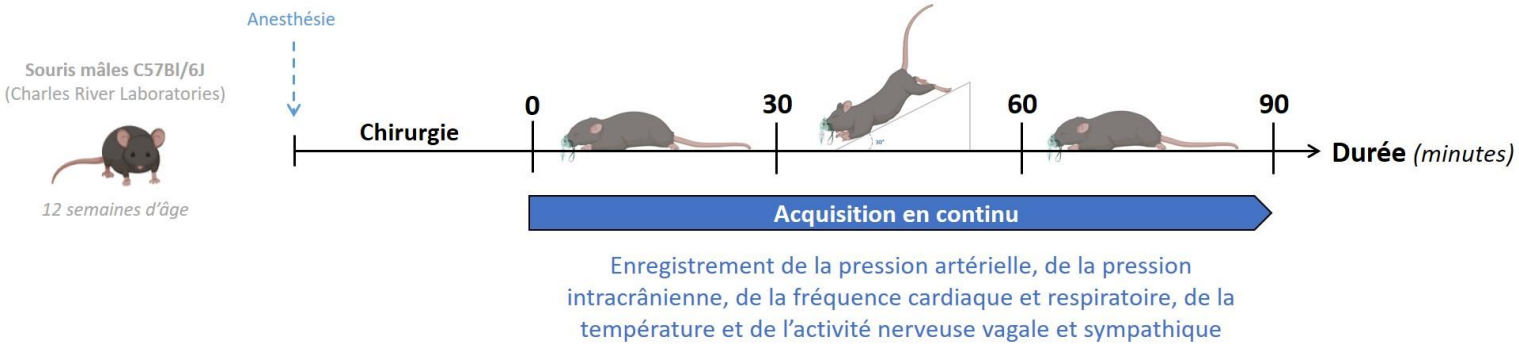


Figure 22. Schéma récapitulatif des procédures expérimentales du protocole aigu.

MATERIELS & METHODES

Matériels et méthodes

Animaux

Cette étude est menée sur des souris mâles, de souche C57BL/6J (Charles River Laboratories, Saint-Germain Nuelles, France). Elles sont âgées de 12 semaines à leur réception et de 16 semaines au début du protocole expérimental. En effet, à leur réception, les souris sont hébergées et acclimatées pendant un mois au sein de l'animalerie du Centre Régional d'Exploration Fonctionnelle et de Ressources Expérimentales de Rangueil (CREFRE Rangueil, INSERM/UPS US006, Toulouse) au sein de la zone d'expérimentation classée SPF. De manière à respecter le bien-être des animaux, Les souris sont hébergées à raison de 5 animaux par cages ventilées (de tailles conventionnelles) dont la litière est changée régulièrement. Elles sont hébergées dans une pièce où les conditions environnementales sont contrôlées, avec une température ambiante à 23 ± 1 °C et une humidité relative de 60 %. Également, les animaux sont synchronisés au cycle de lumière/obscurité de 12 heures, de 7 heures à 19 heures. Pendant leur acclimatation, les souris ont accès à de la nourriture standard (R03-10, SAFE®, Rosenberg, Allemagne) et à de l'eau disponible ad libitum.

Toutes les procédures expérimentales ont été approuvés après révision par le comité d'éthique régional dans le but d'améliorer le bien-être de l'animal et de respecter la règle des « 3Rs » (Comité d'éthique US006/CREFRE, CEEA-122). Les procédures réalisées sont conformes aux directives du Conseil des Communautés européennes (2010/63/UE) et aux normes de la Communauté européenne sur le bien-être et l'utilisation des animaux de laboratoire (Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, MESRI, France, autorisation 25468).

Modèle expérimental : Suspension du train arrière à -30°

Les souris ont été soumises au modèle classique de microgravité simulée chez le rongeur, la suspension du train arrière à -30°, comme décrit dans la littérature par Morey-Holton et Globus en 2016.

Pour se faire, la souris est rapidement anesthésiée par inhalation d'un mélange d'isoflurane (2 %, Iso-Vet®, Irelande) et d'oxygène à 100 % (1 L/min-1), afin d'accrocher la queue sur une tige métallique à l'aide de ruban adhésif, en veillant à ne pas couvrir totalement la queue afin d'assurer une capacité de thermorégulation adéquate. La tige est ensuite reliée au dispositif de suspension, composé d'un système de poulie et d'un pivot, placé au sommet de la cage sur deux barres parallèles, les pattes antérieures de l'animal restant toujours en contact avec le sol. L'animal est libre de se déplacer grâce au dispositif expérimental de chariot adapté à la dimension de la cage (elle-même conforme à la législation en vigueur) et à la taille de l'animal suspendu. L'animal se déplace donc sur ses pattes avant à l'aide d'une grille placée au-dessus de la litière, qui lui permet de s'accrocher pour pouvoir se déplacer. Les souris sont surveillées quotidiennement et sont exclues de l'étude si elles présentent des signes de souffrance (retrait, mauvaise apparence physique, vocalisation) ou une perte de poids apparent (≥ 20 % du poids corporel initial). Lors de la suspension, les souris ne peuvent urinées et déféquées correctement. C'est pourquoi elles sont habituées à un nettoyage uro-génital, mais également à la procédure de suspension avec une suspension rapide de 10 secondes, réalisée par le manipulateur avant le début du protocole expérimental.

Ce modèle de suspension par le train arrière a été valide par les agences spatiales nationales et internationales pour mimer les effets induits par la microgravité, par une mise en décharge des pattes arrière ainsi qu'une répartition des fluides vers l'avant du corps. Il a également l'avantage d'être réversible car non traumatique. Lorsque l'animal est détaché de son système de suspension, il reprend la pleine capacité des pattes arrière ainsi que toute sa mobilité habituelle.



Illustration 1. Photographie d'une souris suspendue par le train arrière à -30°

Design de l'étude

Après la période d'acclimation, les souris sont individualisées dans les cages de suspension pendant au moins deux semaines avant le début du protocole de suspension. Les souris sont habituées au manipulateur, à leur environnement (conditions d'hébergement, salle de l'animalerie) et aux procédures expérimentales (contention, manipulation, suspension, nettoyage). Les souris sont surveillées et habituées quotidiennement par le même utilisateur.

Le protocole de microgravité est représenté dans la FIGURE 23. Pour chaque animal, les données basales sont collectées pendant trois jours avant la suspension, chaque animal étant son propre contrôle (période « contrôle », de C-3 à C-1). Tous les animaux sont ensuite suspendus pour une durée de 5 jours (période « suspension », S1 à S5), avant de retourner en position normale pendant 2 jours afin d'observer leur récupération (période « récupération », R+1 et R+2). Une re-suspension d'un jour est également réalisée afin d'analyser la réadaptation de ces animaux (période « re-suspension », S+1).

Afin de minimiser les effets des rythmes circadiens potentiels, toutes les procédures expérimentales ont sont effectuées chaque matin à 10 heures. Le suivi de la prise alimentaire et de la consommation en eau, le nettoyage ainsi que l'enregistrement des données, sont effectués quotidiennement. Les souris sont également pesées tous les jours, sauf pendant la période de suspension, afin de ne pas détacher l'animal, de ne pas perturber les enregistrements et les réponses physiologiques observées. A la fin des expérimentations les souris âgées sont âgées de 20 semaines.

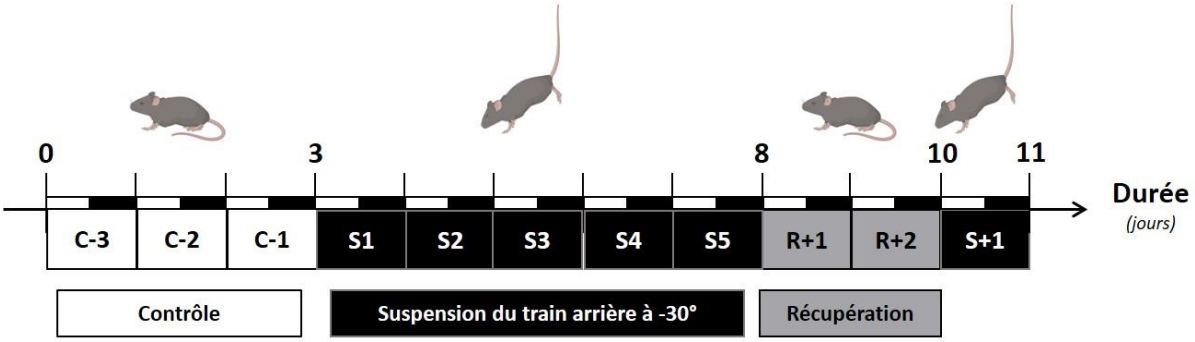


Figure 23. Protocole de microgravité simulée chez la souris.
Ce protocole de microgravité simulée réalisé chez la souris de 11 jours au total, est divisé en plusieurs périodes : 3 jours de contrôle (boites blanches, C-3 à C-1), 5 jours de suspension du train arrière à -30° (boites noires, S1 à S5), 2 jours de récupération (boites grises, R+1 et R+2) et 1 jour de re-suspension (boite noire, S+1).

Mesure de variables physiologiques par radio-télémétrie

Les variables physiologiques telles que la pression sanguine systémique (artérielle et veineuse), la fréquence cardiaque, la température (centrale et sous-cutanée) ou l'activité locomotrice, sont mesurées chez la souris vigile et éveillée, de manière directe, instantanée et en continu, à l'aide d'un implant télémétrique (HD-X11, Data Science International®, DSI, Saint Paul MN, USA) (FIGURE 24).

Chaque souris est implantée par chirurgie du dispositif télémétrique (pesant 2,2 grammes) composé de trois éléments principaux :

3. D'un **cathéter**, composé d'un gel non compressible, biocompatible et antithrombotique, et d'un capteur sensible, permettant la mesure directe de la pression sanguine systémique et notamment, dans notre étude, de la pression artérielle de l'artère carotide gauche, et de la pression veineuse de la veine jugulaire gauche
4. De deux **électrodes bipotentielles** pour la mesure de l'électrocardiogramme (ECG) (aussi utilisées pour l'acquisition d'électromyogramme et d'électroencéphalogramme)
5. Du **corps de l'implant**, comportant la batterie et des modules électroniques composés de capteurs permettant de calculer indirectement la température corporelle (centrale, sous-cutanée), ainsi que l'activité locomotrice de l'animal

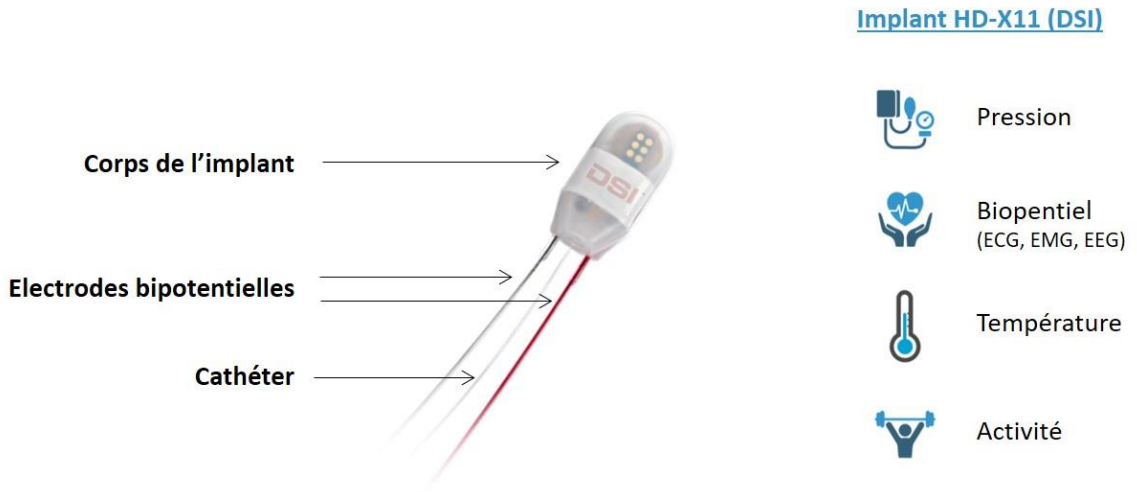


Figure 24. Composition de l'implant HD-X11 (DSI)

1. Chirurgie d'implantation

1.1. Anesthésie et analgésie

Afin de garantir une anesthésie et une analgie optimale pendant toute la procédure chirurgicale, la souris est anesthésiée par injection intra-péritonéale (à l'aide d'une aiguille 26G) d'un mélange de kétamine (100 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg). L'animal reçoit également une injection (à l'aide d'une aiguille 26G) de buprénorphine en sous-cutanée (100 µg/kg) afin de garantir une analgésie optimale. L'anesthésie est maintenue tout au long de la procédure par voie gazeuse à l'aide d'un mélange oxygène/isoflurane (0,1L/min d'oxygène et 1,5 % d'isoflurane).

1.2. Mise en place du cathéter

Pour la mise en place du cathéter pour la mesure de la pression artérielle (FIGURE 25), une tonte du cou est réalisée, suivie d'une désinfection à l'alcool 70° et à la bétadine, puis l'animal est positionné en décubitus dorsal sur une plaque chauffante afin de garder une température corporelle avoisinant les 37°C. Après avoir vérifié que l'animal est correctement anesthésié (absence de réflexes et de nociception), une incision cutanée d'environ 1,5 cm est pratiquée au niveau du cou. Les glandes mandibulaires sont écartées afin de repérer l'artère carotidienne, à gauche de la trachée. L'artère est ensuite isolée des tissus et des nerfs environnants à l'aide de pinces fines, en veillant à ne pas toucher le nerf vague. Une ligature définitive est réalisée au plus près de la bifurcation des artères interne et externe (côté tête). Enfin, un orifice est effectué dans la carotide près de la ligature, afin d'insérer le cathéter de l'implant. Le cathéter est avancé jusqu'à ce qu'il soit positionné dans la crosse aortique (10mm final), puis sécurisé à l'aide de fils de soie permettant de le maintenir dans la carotide.

Afin de pouvoir mesurer la pression de la veine jugulaire, la même procédure a été réalisée, en plaçant le cathéter directement au niveau de la veine jugulaire droite.

Pour la mise en place du cathéter pour la mesure de la pression intracrânienne, l'animal est positionné en décubitus ventral et la tête est stabilisée à l'aide d'un cadre stéréotaxique. Une tonte de la tête est réalisée, désinfectée à l'alcool 70° et badigeonnée à la bétadine. Après avoir vérifié que l'animal est correctement anesthésié, une incision cutanée médiane d'environ 1,5 cm est pratiquée sur le haut de la tête.

Le crâne est ensuite nettoyé des tissus conjonctifs à l'aide de ciseaux afin d'exposer au mieux l'os frontal antérieur jusqu'au lambda à l'extrémité postérieure. Un trou est foré dans l'os pariétal à environ 2 mm latéral, et 2 mm postérieur du bregma. Ce trou est foré à l'aide d'une perceuse équipé d'une fraise de 1 mm de diamètre. Le cathéter de l'implant est inséré de 2 mm dans l'espace épidural de manière parallèle à l'os. Enfin, le système est stabilisé et fixé à l'aide d'une colle physiologique. Les quatre incisions cutanées sont refermées par du fil de suture stérile 5-0 non résorbable.

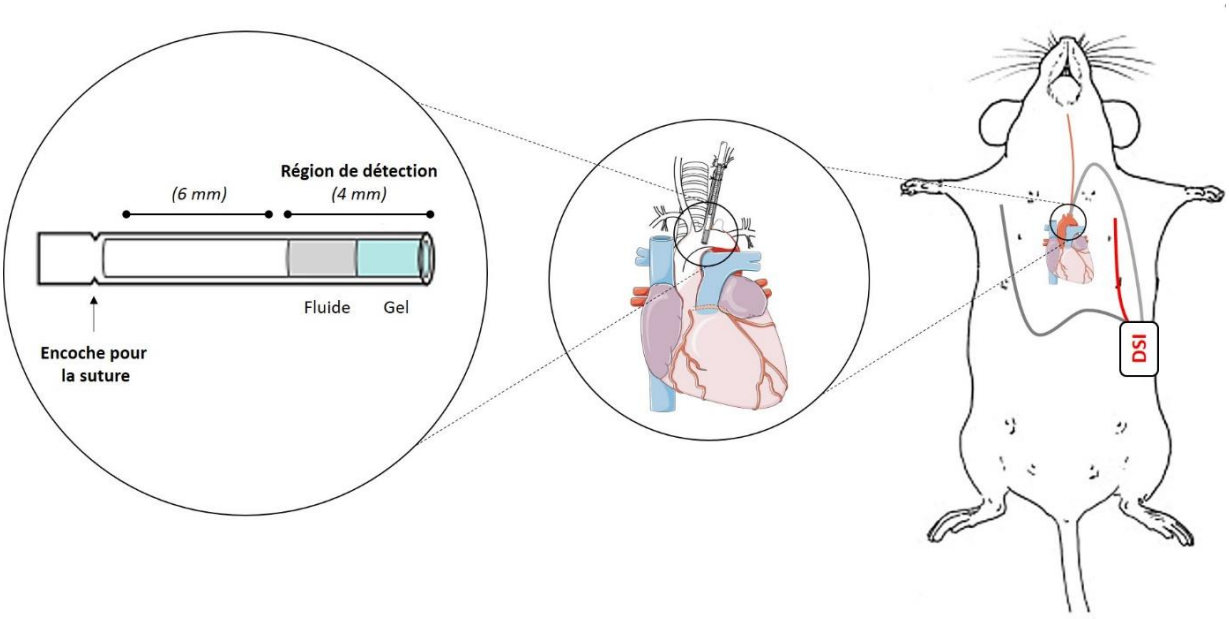


Figure 25. Schéma de l'implantation du cathéter pour la mesure de la pression artérielle grâce à l'implant télémétrique (HD-X11, DSI) chez la souris.
Le cathéter, comportant une région de détection de la pression en son extremité, composée de fluide et de gel (à gauche), est inséré jusqu'à 10 cm dans l'artère carotide jusqu'à la crosse aortique avant d'être suturé et sécurisé (au milieu). Le corps de l'implant est placé au niveau du décubitus latéral de la souris, et les électrodes ECG sont placées et suturées de part et d'autre du cœur (à droite).

1.3. Mise en place du corps et des électrodes de l'implant

À l'aide de ciseaux à dissection à bouts arrondis, une poche sous-cutanée est préparée pour placer le corps de l'implant au niveau du flanc gauche de la souris pour la mesure de la température sous-cutanée, ou dans le péritoine pour la mesure de la température centrale. Après avoir injecté 1 mL de sérum physiologique stérile, le corps de l'implant y est installé. Deux petites incisions cutanées de 3mm sont réalisées de part et d'autre du cœur, l'une au niveau de l'épaule droite, l'autre sous les côtes, côté gauche. Les deux électrodes pour l'enregistrement de l'ECG sont amenées par « tunnélisation » en sous-cutané, jusqu'à ces emplacements. L'électrode négative est fixée au muscle pectoral droit par du fil de suture stérile 6-0 non résorbable. L'électrode positive est fixée à la paroi musculaire au-dessus de la dernière côte gauche (environ 1 cm à gauche de l'appendice xiphoïde). Les trois incisions cutanées sont refermées par du fil de suture stérile 5-0 non résorbable.

Après avoir récupéré de l'anesthésie sur un coussin chauffant (37°C), la souris est placée et hébergée individuellement dans la cage de suspension. Les cages de suspension sont placées directement sur les récepteurs télémétriques (récepteurs RPC-1 PhysioTelTM, DSI, Saint Paul MN, USA), dans une pièce dédiée sous conditions environnementales contrôlées, telles que le cycle de lumière et d'obscurité. Les animaux récupèrent pendant une semaine avant le début de l'expérience et sont surveillés quotidiennement.

2. Acquisition et traitement des données télémétriques

Avant le début des enregistrements, les implants télémétriques sont activés en positionnant brièvement un aimant à proximité. La pression sanguine, la fréquence cardiaque, l'activité locomotrice et les signaux de température sont collectés à l'aide du système d'acquisition de données de télémétrie (Ponemah Physiology Platform Software, v6.41, DSI, Saint Paul MN, États-Unis) (FIGURE 26).

Les données de pression artérielle (ou veineuse) proviennent de l'enregistrement direct, à l'aide du cathéter de l'implant, de la pression intra-artérielle absolue. Ces données ajustées en fonction de la pression atmosphérique. La fréquence cardiaque est directement mesurée à l'aide des électrodes ECG de l'implant et indirectement calculée à partir de la pression pulsée de la pression sanguine. L'activité locomotrice est obtenue en fonction des mouvements du corps entier, conduisant à des changements de l'intensité du signal de l'émetteur présent dans le corps de l'implant, qui est détecté directement par le récepteur. Cette méthode ne détecte que le mouvement de l'émetteur et n'enregistre pas l'activité comportementale (van den Buuse and Malpas, 1997). Quant à la température corporelle, celle-ci est également mesurée à partir du corps du transmetteur, et permet de déterminer la température centrale si celui-ci est positionné en intra-péritonéal, ou la température sous-cutanée s'il est positionné au niveau du flanc. Les signaux sont mesurés pour une fréquence de 1000 Hz et sont enregistrés toutes les 20 secondes. De plus, les données sont acquises en temps réel et en continu pendant toute la durée du protocole expérimental, soit pendant 11 jours.

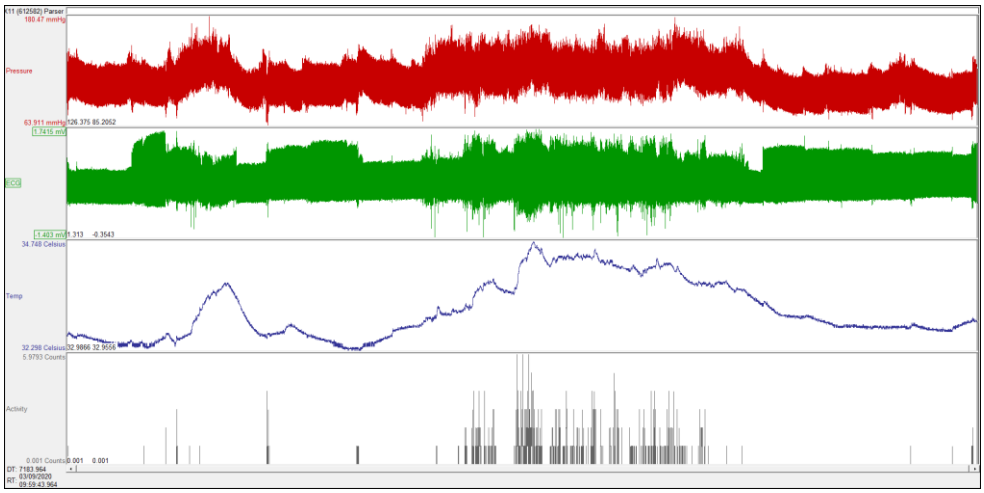


Figure 26. Extrait d'un enregistrement des données télémétriques.
Extrait d'un enregistrement de la pression artérielle (courbe rouge), de la fréquence cardiaque (courbe verte), de la température sous-cutanée (courbe bleue) et de l'activité locomotrice (barres grises) mesurées par radio-télémétrie chez une souris.

3. Analyses des données télémétriques

Afin d'éliminer le biais des mesures et le passage du manipulateur, les données comprises entre 10 et 11 heures du matin sont exclues de l'analyse pour chaque jour d'enregistrement. Les données obtenues sont extraites et analysées de différentes manières :

- Les valeurs sont moyennées toutes les 2 heures, afin d'observer précisément les variations de chaque variable en fonction des conditions (suspension, récupération, re-suspension)
- Les valeurs sont moyennées sur 12 heures, afin d'observer les variations en fonction des rythmes circadiens et notamment selon les différents cycles de lumière (de 7 à 19 heures) et d'obscurité (de 19 à 7 heures)
- Les valeurs sont moyennées sur 1 minutes, afin d'évaluer la réponse immédiate à la suspension et à la re-suspension par rapport au contrôle et à la récupération
- La variabilité des données est également exprimée sous forme de coefficient de variation (100 * ET / pression artérielle ou fréquence cardiaque).

3.1. Modélisation informatique

Les données obtenues par télémétrie sont également analysée grâce à une collaboration avec l'Institut des Mathématiques de Toulouse (S. Déjean). Le but était d'analyser et de représenter les résultats avec différentes représentations graphiques, afin d'obtenir des représentations plus précises et spécifiques, et ainsi, de mieux comprendre les résultats obtenus.

3.1.1. Analyse descriptive

Dans un premier temps, l'évolution des variables mesurées par télémétrie ont été tracées en fonction du temps, des conditions de l'expérience, et des cycles de lumière et d'obscurité. D'autres graphiques ont été réalisés, tels que des box plots, pour voir l'impact de la suspension sur les cycles circadiens selon les différentes conditions.

3.1.2. Étude des corrélations

La matrice de corrélation, ou le « corrélogramme », a été tracée afin de déterminer s'il existe des corrélations potentielles entre les variables (fréquence cardiaque, pression sanguine…), permettant de conclure sur la pertinence des mesures choisies et de voir si elles sont redondantes.

4. Analyses des rythmes circadiens

La méthode traditionnelle d'analyse des rythmes circadiens est l'analyse Cosinor (FIGURE 27). Cette analyse permet de quantifier le cycle circadien de 24 heures, et/ou d'autres cycles périodiques (infra- ou ultra-diens), en examinant le degré d'ajustement entre les données expérimentales et un modèle défini. Ceci consiste en la superposition de fonctions cosinus et permet de calculer les paramètres de la rythmicité circadienne tels que (Fossion et al., 2018; Hou et al., 2021a) :

6. Le mésor : niveau moyen
7. L'amplitude des cycles
8. La phase
9. La période
10. L'acrophase

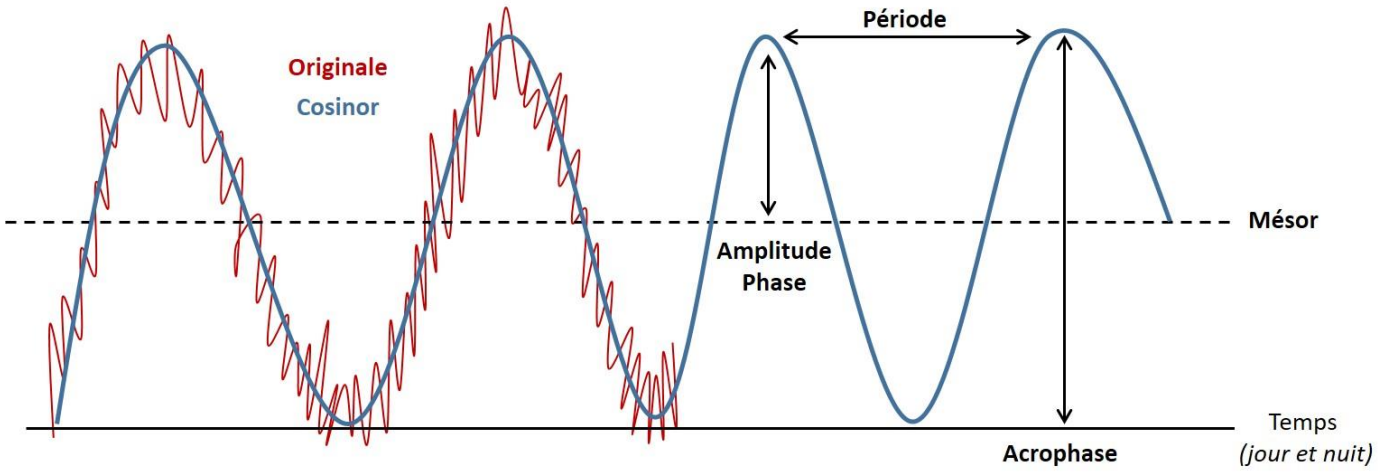


Figure 27. Analyse de la rythmicité circadienne par la méthode cosinor.
Détermination des paramètres de la rythmicité circadienne sinuoïdale par la méthode du Cosinor (courbe bleue) à partir d'un signal original de télémétrie (courbe rouge).

Le calcul du niveau moyen et de l'amplitude d'un rythme peut être basé directement sur les données brutes ou sur une courbe de cosinus ajustée aux données. La phase peut être déterminée par l'inspection des actogrammes, le calcul du pic du rythme lissé ou l'identification de l'acrophase de la courbe cosinus ajustée. La période d'un rythme est le plus souvent déterminée par diverses méthodes d'inspection des actogrammes, par l'analyse de transformée de Fourier, par le périogramme d'Enright (chi carré) ou par le périogramme de Lomb-Scargle. Il n'existe pas de procédure standard pour quantifier la forme d'onde des rythmes circadiens. Cette analyse est réalisée sur les séries de données acquises par télémétrie telles que la PA et la FC, et est déterminée grâce au logiciel R Studio (R Core Team, 2022).

5. Analyse de l'activité indirecte du système nerveux autonome cardiovasculaire

5.1. Analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque

La VFC est la fluctuation du rythme cardiaque au cours du temps entre deux battements consécutifs, définis par les intervalles RR, et dépend essentiellement de la régulation extrinsèque de la fréquence cardiaque. La VFC est considérée comme le reflet de l'activité du système nerveux autonome, et son analyse constitue une méthode non invasive, reproductible et utile pour évaluer l'état du cœur et du système neuro-végétatif, responsable de la régulation de l'activité cardiaque (Elghozi and Julien, 2007; Marsac, 2013).

L'analyse de la VFC est réalisée à l'aide du module logiciel Ponemah (Heart Rate Variability, Ponemah v6.41, DSI, Saint Paul MN, USA). L'analyse de la VRC a été évaluée à la fois dans les domaines temporel et fréquentiel. À partir des signaux ECG, chaque pic R est détecté et les intervalles R-R normaux (autrement appelés intervalles N-N) ont été déterminés. Les battements ectopiques et les artefacts doivent être identifiés et éliminés avant l'analyse VRC. Comme le signal n'est pas stationnaire chez les souris éveillées en télémétrie, il est recommandé de faire la moyenne de plusieurs analyses à court terme pour l'analyse du VRC, comme le suggèrent Thireau et ses collaborateurs (2007). Par conséquent, chaque battement de trois périodes ECG stables de 3 minutes, sans fluctuations erratiques, a été analysé et moyenné. Ces périodes ont été sélectionnées pendant une phase de faible activité et de stabilité du signal entre 8 et 10 heures. La démarche de l'analyse de la VFC à l'aide du logiciel Ponemah est détaillée dans la FIGURE 28.

5.1.1. Domaine temporel

L'analyse du domaine temporel a porté sur les paramètres suivants : la moyenne des intervalles R-R (RR-I, en ms), l'écart-type de tous les intervalles R-R normaux (SDNN, en ms) et les différences quadratiques moyennes des intervalles RR successifs (RMSSD, en ms). Le SDNN correspond à toutes les composantes cycliques responsables de la variabilité autonome totale, tandis que le RMSSD fournit des informations sur les variations à court terme de la fréquence cardiaque, reflétant l'activité parasympathique cardiaque.

5.1.2. Domaine fréquentiel

L'analyse dans le domaine fréquentiel a été réalisée à l'aide d'un spectre à transformée de Fourier rapide avec des séries de 1 024 points spectraux avec un chevauchement de 50 % en utilisant le périodogramme de Welch. La longueur des segments avec interpolation linéaire et rééchantillonnage à une série temporelle inter-battements de 50 Hz et une tolérance de 20 ms (ainsi qu'un fenêtrage de Hanning) a été calculée à partir des données enregistrées. Deux composantes spectrales distinctes ont été analysées : les basses fréquences (LF, 0,10 - 1,00 Hz) et les hautes fréquences (HF, 1,00 - 5,00 Hz). La très basse fréquence (VLF, 0,01 - 0,10 Hz) a été exclue de l'analyse. LF et HF ont été exprimées en valeurs absolues de puissance (ms^2) et en unités normalisées (n.u). Ces composantes spectrales semblent être un bon compromis pour évaluer les composantes sympathiques et parasympathiques du VRC. Les indices LF (spectre, en ms^2 et normalisé, n.u.) ont été considérés comme des indices du tonus sympathique et parasympathique cardiaque, alors que les HF ne reflètent que la composante parasympathique cardiaque. L'équilibre sympathique-vagal a été déterminé à partir du rapport LF (ms^2) / HF (ms^2).

Cette analyse a également été réalisé entre 15 et 17 heures, mais les résultats ne sont pas représentés dans ce manuscrit. A noter que les résultats obtenus pour cette période étaient très variables et que les signaux étaient peu stables.

De plus, l'analyse de VFC a également été réalisée à l'aide du logiciel « HRV analysis » (Logiciel de l'Université de Jean Monnet à Saint-Etienne, France) pour quelque souris. Puisque nous avons observé une très grande similarité des résultats obtenus entre les deux logiciels, les résultats obtenus avec ce dernier ne sont pas présentés, et l'intégralité de l'analyse a été réalisée avec le logiciel d'acquisition télémétrique.

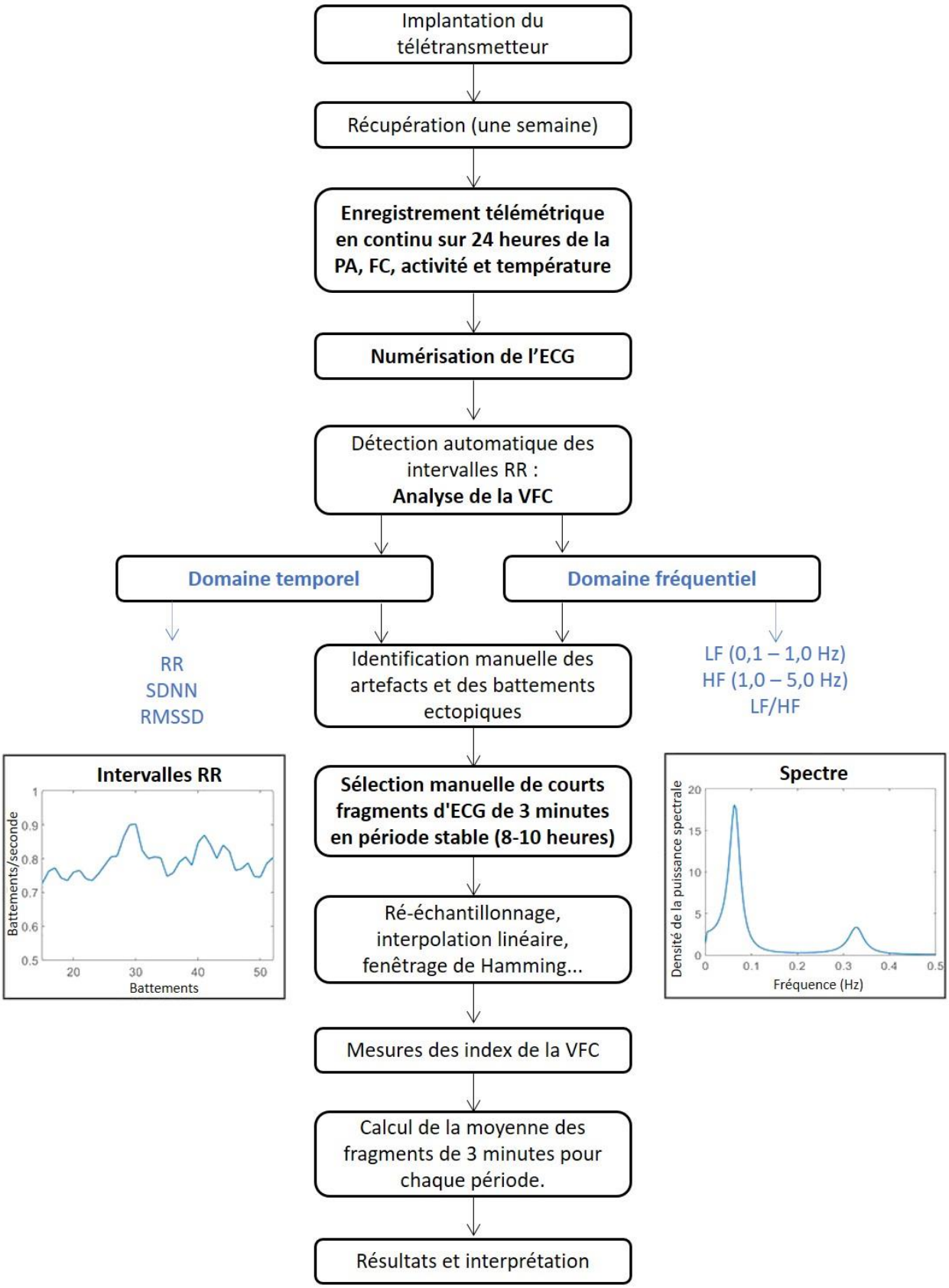


Figure 28. Protocole standardisé pour l'analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque chez la souris implantée d'un capteur télémétrique.
(Adapté de Thireau et al., 2008; Cho et al., 2017)

5.2. Analyse de la sensibilité du baroréflexe cardiaque

La SBR est déterminée selon la méthode des séquences. Cette méthode est basée sur l'identification de séries temporelles consécutives, battement par battement, de la PA systolique (PAS) et des intervalles RR (Rötzer et al., 2021). Les augmentations ou les diminutions consécutives de la PAS avec des séquences de trois battements, sont associées à des changements parallèles d'allongement ou de raccourcissement des intervalles R-R, indiquant des réponses baroréflexes spontanées (FIGURE 29). Cette méthode n'est pas invasive pour l'animal, n'utilisant par l'injection de médicaments vas actifs pour induire des modifications de la PA comme les méthodes ancestrales.

L'analyse de la SBR est réalisée avec un logiciel dédié (eCar, Angers). Les données sont analysées à partir de signaux de pression artérielle et d'ECG des implants télémétriques, échantillonnés à 1000 Hz, battement par battement, pendant une période de trois minutes stables. Un nombre moyen de 20 séquences (40 segments) est utilisé pour l'analyse. La SBR spontanée (ms/mmHg) a été déterminée à partir de la pente de la ligne de régression linéaire obtenue. Pour l'analyse, nous n'utilisons pas de seuil pour la PAS, l'intervalles R-R et le coefficient de corrélation (r).

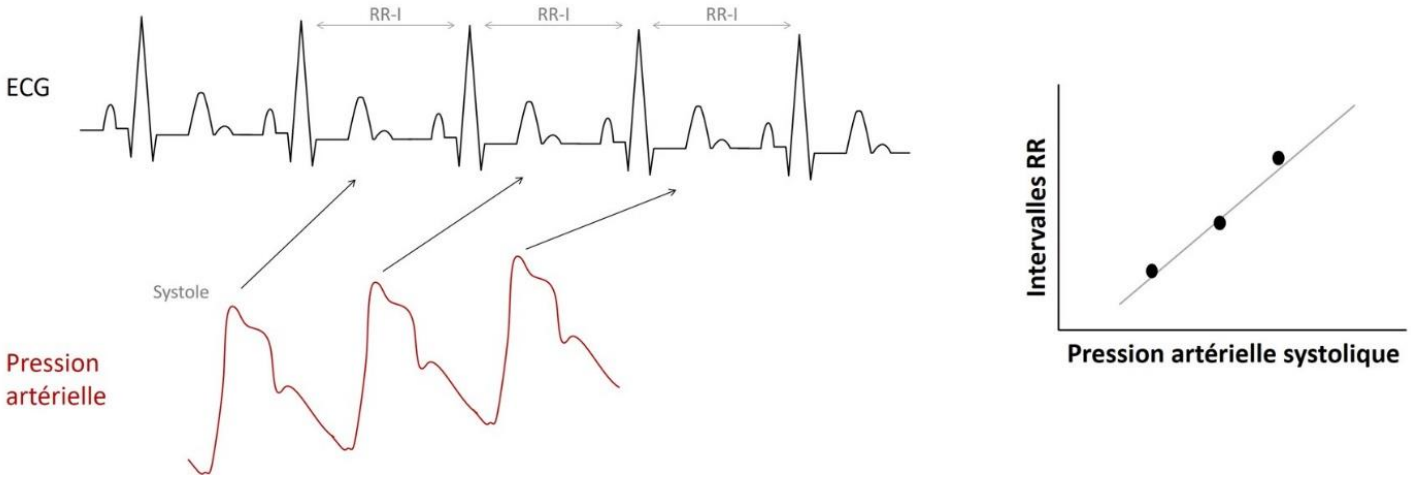


Figure 29. Schéma représentant l'estimation de la sensiblité du baroréflexe par la méthode des séquences.
Chaque point de la pente correspond au couplage d'un pic de PAS et d'un intervalle RR. La pente de la ligne de régression entre ces points est considérée comme index de la SBR.

Analyses statistiques

Puisque les valeurs individuelles de chaque souris ne différaient pas de façon marquée, tous les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type (« standard deviation », SD).

Les données ont été analysées avec les tests de données appariées, avec l'analyse de la variance à mesures répétées à une voie (ANOVA, comparaison simple avec le contrôle), afin d'évaluer l'effet de la suspension, ou par une ANOVA à deux voies (en prenant en compte les facteurs "Condition" et "Cycle"), afin d'évaluer l'effet d'interaction entre la suspension et les variations des cycles de lumières. Ces tests sont complétés avec des comparaisons ultérieures post-test de Dunnett ou de Tukey, selon les cas.

La puissance β a été définie à 0,80 et les résultats étaient statistiquement significatifs lorsque les valeurs de P étaient inférieures à 0,05 (*).

Toutes les figures et les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9 (9.3.1 GraphPad Software, USA) et du logiciel R Studio (R Core Team, 2022).

Article : Les analyses de données en série chronologique ont été tracées à l'aide du logiciel R, en appliquant le paquet ggplot2 (version 3.3.6, version 4.2.1), permettant l'affichage graphiques avec des données moyennées sur deux heures. Afin de mieux visualiser les tendances, nous avons utilisé LOESS (LOcally Estimated Scatterplot Smoothing) afin de lisser les données, de visualiser la moyenne mobile et la régression polynomiale (Cleveland and Devlin, 1988).

Analyse structurelle et fonctionnelle du cœur par échocardiographie

L'échocardiographie et le Doppler cardiaque permettent une analyse fine et non invasive de visualisation des structures et de la fonction cardiaque, ainsi que l'hémodynamique, en temps réel. En effet, le développement d'appareils d'échocardiographie ayant une grande résolution axiale et permettant l'obtention d'images de hautes fréquences, permettent la réalisation d'échocardiographie chez le petit animal ayant des fréquences cardiaques élevée comme la souris (Slama et al., 2003).

L'échocardiographie a été réalisée selon la méthode décrite par notre équipe de recherche (Guilbeau-Frugier et al., 2019). La souris est d'abord anesthésiée par inhalation d'un mélange d'isoflurane (2 %, Iso-Vet®, Irelande) et d'oxygène à 100 % (1 L/min-1), avant d'être fixée à l'aide de sparadrap sur la plaque recouverte des électrodes métalliques de l'ECG. La température corporelle est surveillée et maintenue aussi proche que possible de 37°C pendant toute la procédure. La souris est tondue avant le début de l'examen pour éviter les bruits de fond. L'échocardiographie transthoracique est réalisée à l'aide d'un Vevo 2100 (Fujifilm VisualSonics), équipé d'un transducteur de 25 MHz (MS250). Une vue 2D parasternale du ventricule gauche (VG) en mode M, grand axe et petit axe, est réalisée au niveau du muscle papillaire pour évaluer l'épaisseur de la paroi du VG et son diamètre interne. La fraction d'éjection systolique du ventricule gauche (FE) a également été calculée (%) à partir d'une vue parasternale grand axe en mode B en traçant les limites endocardiques diastoliques et systoliques pour estimer les volumes du VG (FE % = [volume end-diastolique (VED)-volume end-systolique]/VED×100). La fonction diastolique a été évaluée par imagerie Doppler à ondes pulsées du flux mitral obtenue à partir de la vue apicale des quatre chambres. La vitesse de pointe précoce (E) et tardive (A) du flux transmitral et le temps de relaxation isovolumique (IVRT) ont été mesurés. Le mouvement longitudinal de l'anneau mitral a été capturé par l'imagerie Doppler tissulaire. Les vitesses de l'anneau mitral (pics E' et A') ont été mesurées et le rapport E/A, ainsi que E/E' ont été calculés. La dimension de l'oreillette gauche (diamètre antéropostérieur) a été comparée au diamètre aortique dans le grand axe parasternal. Toutes les mesures sont quantifiées et moyennées pour trois cycles cardiaques et obtenues par un examinateur aveugle au génotype des animaux. Cette analyse a été réalisée quelques jours avant la suspension (pour que les souris puissent récupérées correctement de l'anesthésie), et après les 5 jours de suspension lors de la dé-suspension, sur les mêmes animaux (n=6).

Analyse de la composition corporelle par RMN à bas-champ

La composition corporelle a été mesurée par RMN Bas champs (MiniSpec LF110®, Bruker, Etats-Unis) chez la souris éveillée. Ce dispositif permet de mesurer la masse grasse, la masse maigre, les liquides libres ainsi que l'eau totale. Cette analyse est rapide, durant moins de deux minutes, et est peu invasive, non destructrice et traumatisante pour l'animal, ne nécessitant pas le recours à l'anesthésie ou à la sédation.

Le système RMN présente un champ magnétique d'une intensité minimum de 0,15 T correspondant à une fréquence proton minimum de 7,5 MHz pour obtenir la sensibilité optimale. La précision obtenue pour la mesure est de l'ordre du dixième de g.

Brièvement, après avoir allumé l'appareil et réaliser la calibration, la souris est placée dans un tube de contention afin qu'elle ne puisse pas bouger. Le tube est placé dans la machine, puis la mesure est lancée. Une fois l'analyse terminée, les valeurs pour chaque paramètre mesuré est affiché à l'écran.

Cette analyse a été réalisée avant la suspension, et après les 5 jours de suspension lors de la dé-suspension, sur les mêmes animaux.

Analyse des tissus

Les tissus, tels que le cœur et le cerveau, sont prélevés lors du sacrifice de l'animal, afin de réaliser des analyses plus précises et spécifiques des structures d'intérêt et de mieux comprendre les réponses obtenues dans notre modèle.

Pour se faire, les prélèvements de tissus sont réalisés à différents temps, pour évaluer la réponse précoce à la suspension (24 heures après) et à plus long terme (après les 5 jours de suspension, immédiatement lors de la dé-suspension) comparé au contrôle.

C'est dans ce sens que trois groupes de souris sont établis, un groupe de souris contrôle, un groupe de souris suspendues pendant un jour et un groupe de souris suspendues pendant 5 jours. Ces trois groupes ont subis les mêmes conditions : individualisation, pièce aux conditions contrôlées, pesées quotidiennes (masse corporelle, consommation en aliment et en eau), habituation à la suspension…

1. Sacrifice

Les souris sont sacrifiées à 20 semaines d'âge. Elles sont sacrifiées par exsanguination sanguine et dislocation des cervicales après anesthésie par inhalation d'isoflurane à saturation (induction > 3 %).

2. Histologie et immunohistochimie

2.1. Cœur

Après le sacrifice, le cœur est directement excisé et rincé du sang restant dans du PBS froid sur glace. Après le rinçage, il est immédiatement fixé dans du formaldéhyde à 4 % pendant 48 heures. Après cette période, les tissus sont placés dans de l'éthanol à 70 % avant d'être inclus dans des blocs de paraffine, puis sectionnés à intervalles de 5 µm en coupe longitudinale. Les sections de tissu cardiaque incluses en paraffine sont utilisées pour l'analyse immunohistochimique. Dans un premier temps, les échantillons ont été déparaffinés, réhydratés et soumis à une récupération d'épitopes induite par la chaleur en fonction des anticorps.

2.1.1. Marquage des cardiomyocytes (WGA)

Les coupes ont ensuite été perméabilisées (0,5 % Triton X100-PBS), bloquées avec 0,5 % d'une solution de BSA/PBS, et colorées pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires. Les coupes ont été ensuite incubées pendant une heure à température ambiante avec les anticorps secondaires fluorescents, dilués dans 0,1 % BSA / 0,1 % Tween 20 / 0,5 % Triton X-100-PBS. Les noyaux ont été visualisés avec du DAPI (32670, 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma Aldrich), pour une fluorescence bleue. Les membranes cellulaires ont été colorées avec de l'agglutinine de germe de blé conjuguée à Oregon Green™ 488 (W6748, Wheat Germ Agglutinin, Oregon Green™ 488 Conjugate, Invitrogen) pour une fluorescence brillante et verte. Toutes les images ont été acquises grâce à un scanner de lame (NanoZoomer, 2.0 RS Hamamatsu).

2.1.2. Marquage de la fibrose (Trichrome)

Le kit de coloration trichrome (ab150686, Abcam) est destiné pour la visualisation histologique du tissu conjonctif, et notamment pour la mise en évidence des fibres de collagène, dans les coupes de tissus.

Une fois que les lames de tissu cardiaque ont été déparaffinées et réhydratées, elles sont incubées dans du liquide de Bouin (fixateur) préchauffé à 60° environ, pendant 60 minutes. Les lames sont ensuite refroidies pendant 10 minutes, puis rincées à l'eau avant d'être incuber pendant 5 minutes dans l'hématoxyline de Weigert (coloration des noyaux). Après l'incubation, les lames sont rincées à l'eau puis différencier dans une solution d'acide phosphomolybdique (APM) et d'acide phosphotungstique (APT) pendant 10/15 minutes (APM : se lie au collagène, APT : accentue de la coloration cytoplasmique). Les lames sont ensuite incubées dans une solution de bleu d'aniline pendant 5/10 minutes (colore le collagène en se liant à l'APM), avant d'être rincée à l'eau, et incubées dans une solution d'acide acétique pendant 5 minutes. Les lames sont ensuite déshydratées à l'alcool (90%), nettoyées au xylène et montées pour la visualisation. Les fibres de collagènes sont marquées en bleu, les fibres musculaires en rouge, et les noyaux en bleu/noir.

2.2. Cerveau

Après le sacrifice, le cerveau est directement prélevé et rincé dans du PBS froid sur glace. Après le rinçage, il est immédiatement fixé dans du formaldéhyde à 4 % pendant 48 heures, puis dans de l'éthanol à 70%.

Le cerveau est coupé en deux au niveau de la ligne sagittale, entre les deux hémisphères. L'hémisphère gauche est inclus entier en paraffine sur la partie large. L'hémisphère droit est également inclus, après avoir été coupé en deux (FIGURE 30).

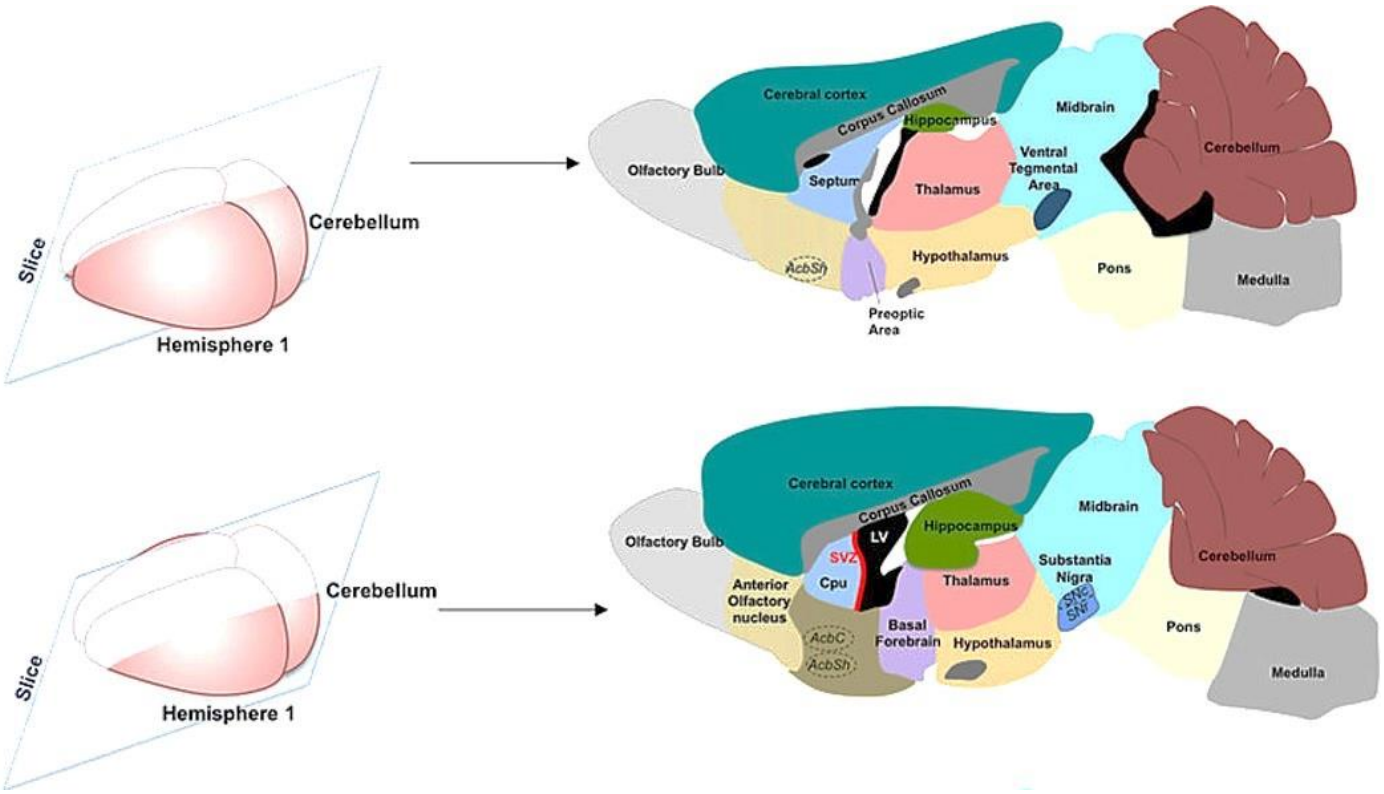


Figure 30. Schéma de la coupe sagittale des cerveaux de souris adultes et régions anatomiques.
(Source : Silvin and Ginhoux, 2018)

Comme pour le tissu cardiaque, les sections de cerveau sont également déparaffinées, réhydratées et soumises à une récupération d'épitopes induite par la chaleur en fonction des anticorps. Les coupes ont ensuite été incubées pendant une nuit à 4°C avec un anticorps primaire d'intérêt pour l'activation neuronale, l'anticorps c-Fos (anti-c-Fos antibody [2H2], ab208942). C-Fos fait partie d'une famille de gènes qui sont rapidement et transitoirement inductibles par un large éventail d'agents. Ces gènes précoces immédiats sont impliqués dans la cascade de transduction du signal couplant des stimuli extracellulaires a des évènements. En particulier, c-Fos est impliqué dans la régulation de la transcription et peut médier les effets

à long terme des facteurs de croissance et des signaux dépolarisants membranaires sur l'activité neurale. Sur cette base, l'expression de c-Fos est de plus en plus utilisée pour détecter l'activation neuronale. Les coupes ont été ensuite incubées pendant une heure à température ambiante avec les anticorps secondaires fluorescents, dilués dans 0,1 % BSA / 0,1 % Tween 20 / 0,5 % Triton X-100-PBS. Les noyaux ont été visualisés avec du DAPI (Sigma Aldrich, 32670). Toutes les images ont été acquises grâce au scanner de lame (NanoZoomer 2.0 RS Hamamatsu).

Design de l'étude

Cette partie consiste à évaluer les réponses immédiates à la suspension et d'évaluer si ces réponses sont en lien avec une probable augmentation modérée de la pression intracrânienne. Pour répondre à cet objectif, le protocole expérimental consiste à induire chez la souris des variations de la pression intracrânienne en induisant la migration des liquides corporels vers la région céphalique, en recourant au modèle de suspension du train arrière (tête déclive à -30°). Enfin, les mesures de plusieurs paramètres tels que la pression intracrânienne, ainsi que les paramètres régulés par le système nerveux autonome tels que la variabilité de la fréquence cardiaque, ainsi que la pression artérielle, la respiration, sont réalisées de manière invasive chez la souris anesthésiée. Également, l'activité du système nerveux sympathique et vagale est directement mesurée au niveau des nerfs rénaux et vagues par microneurographie à l'aide d'implants dédiées.

Anesthésie

Les souris sont anesthésiées par voie gazeuse à l'aide d'un mélange d'isoflurane/oxygène (3% d'isoflurane et 0,1 L/min d'oxygène). L'anesthésie est maintenue tout au long de la procédure par voie gazeuse a l'aide de ce même mélange d'isoflurane/oxygène (1 % d'isoflurane et 0,1L/min d'oxygène). Une injection (a l'aide d'une aiguille 26G) de buprénorphine en sous-cutanée (100 µg/kg) est également effectuée afin de garantir une analgésie optimale.

Mesure de la fréquence cardiaque et de la fréquence respiratoire

Dans un premier temps, l'animal est positionné en décubitus dorsal sur une plaque chauffante, tête vers l'opérateur. Une sonde de température rectale est insérée afin de contrôler la température de l'animal. Après avoir vérifié que l'animal est correctement anesthésié (absence de réflexes de nociception, vérification par pincement interdigital), trois électrodes (AD Instruments®) sont placées en sous-cutanée, permettant l'acquisition de l'électrocardiogramme et ainsi la mesure de la fréquence cardiaque. La fréquence et l'amplitude respiratoire sont mesurées à l'aide d'un capteur piézo-électrique (AD Instruments®) placé sur la cage thoracique.

Mesure de la pression artérielle

Afin de pouvoir mesurer la pression artérielle, une tonte du cou est réalisée, suivie d'une désinfection a l'alcool 70° et à la bétadine. Sous microscope à dissection, une incision cutanée d'environ 1,5 cm est pratiquée, les glandes mandibulaires sont réclinées et maintenues en position à l'aide d'écarteurs. L'artère carotidienne est isolée des tissus environnants ainsi que du nerf vague. Trois fils de soie (fils tressés 4/0) sont placés sous la carotide. L'artère carotidienne est définitivement ligaturée au plus près de la bifurcation des artères interne et externe (côté tête). Le fil au plus proche du cœur est utilisé pour clamper l'artère temporairement, et de manière à isoler 6 mm d'artère. Le fil central servira à maintenir le cathéter en place une fois dans la carotide. A l'aide de ciseaux, une ouverture est effectuée dans la carotide, près de la ligature. Le cathéter, directement relié au capteur de pression (AD Instruments®), y est inséré puis avancé dans la carotide jusqu'a la zone clampée et est sécurisé à l'aide du fil central. Les nœuds du fil central et du fil côté cœur sont serrés autour de la carotide et du cathéter de manière à sécuriser l'ensemble. La tension côté ligature est relâchée et les extrémités des fils de soie coupées le plus court possible.

Mesure de la pression intracrânienne

Afin de mesurer la pression intracrânienne, l'animal est positionné en décubitus ventral, et la tête est stabilisée à l'aide d'un cadre stéréotaxique. Après une tonte de la tête, et une désinfection a l'alcool 70° et à la bétadine, une incision cutanée médiane d'environ 1,5 cm est pratiquée sur le haut de la tête. Le crane est ensuite nettoyé des tissus conjonctifs à l'aide de ciseaux afin d'exposer au mieux l'os frontal antérieur jusqu'au lambda à l'extrémité postérieure. Un trou est foré dans l'os pariétal a environ 2 mm latéral, et 2 mm postérieur du bregma. Ce trou est foré à l'aide d'une perceuse équipé d'une fraise de 1 mm de diamètre. Le capteur de pression (Pressio®2 ICP monitor) est inséré d'environ 2 mm dans l'espace épidural de manière parallèle à l'os (si possible, sinon, insertion intra-parenchymateuse).

Mesures de l'activité du système nerveux sympathique au niveau du nerf rénal.

1. Implants

Afin de mesurer directe l'activité du système nerveux sympathique, des micro-implants ont été développées par une équipe du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS, CNRS, Toulouse). Grace à une collaboration, les micro-implants ont été optimisés à partir d'implants fabriqués et développés par cette équipe, initialement comme prothèses neuronales implantables (Lecomte et al., 2018; Saunier et al., 2020; Cointe et al., 2022). Brièvement, ils sont composés de poly(chloro-p-xylylene) (Parylène C) qui est un polymère physiquement et chimiquement inerte et neutre, qui présente une haute biocompatibilité, et se retrouve désormais comme substrat dans un certain nombre de dispositif médicaux, comme les implants rétiniens. L'implant est composé de 4 électrodes d'or, de 40 µm de diamètre (FIGURE 31). Ces implants permettent les enregistrements de données en wifi avec un système de télémétrie.

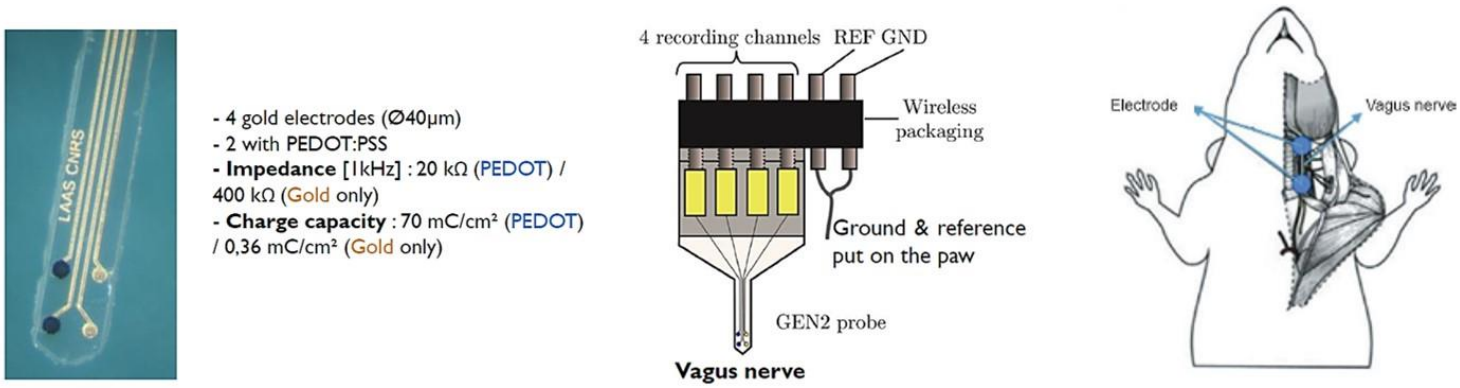


Figure 31. Schéma de l'implant utilisé pour la mesure directe de l'activité nerveuse parasympathique au niveau du nerf vague.
(Source : C. Cointe, LAAS, 2020)

2. Procédure chirurgicale

Ces implants sont dans un premier temps testé chez la souris anesthésiée au niveau du nerf vague. Le nerf vague, d'une part, est plus accessible et repérable plus facilement chez la souris, et d'autre part, permet la mise au point des enregistrements. Afin d'effectuer la mesure de l'activité parasympathique au niveau du nerf vague, une tonte du cou est réalisée, suivie d'une désinfection à l'alcool 70° et à la bétadine, puis l'animal est positionné en décubitus dorsal sur une plaque chauffante afin de garder une température corporelle avoisinant les 37°C. Après avoir vérifié que l'animal est correctement anesthésié, une incision cutanée d'environ 1,5 cm est pratiquée au niveau du cou. Les glandes mandibulaires sont écartées afin de repérer l'artère carotidienne et le nerf vague, à gauche de la trachée. Le nerf de l'artère carotide est isolé de l à l'aide de pinces fines, en veillant à ne pas léser le nerf vague.

Afin effectuer la mesure de l'activité sympathique au niveau du nerf rénal, une tonte du flanc latéral gauche est réalisée, suivie d'une désinfection a l'alcool 70° et à la Bétadine. L'animal est positionné en décubitus latéral droit sur une plaque chauffante. Une incision cutanée d'environ 1 mm est effectuée sur le flanc latéral. Le rein gauche est récliné vers l'expérimentateur, et séparé du tissu adipeux. Les nerfs du rein sont préalablement identifiés et isolés afin de placer l'électrode.

Une fois que l'électrode est correctement placée, un enregistrement est lancé afin de savoir si l'acquisition est correcte, des tests de modifications de l'activité peuvent être effectué à l'aide d'injection de drogues vasoactives puis l'ensemble est stabilisé à l'aide d'une colle physiologique (Kwik-Sil™, WPI).

Plusieurs essais ont été réalisés chez la souris anesthésiée, afin de développer et optimiser ces implants pour notre modèle expérimental, avec l'aide du service de microchirurgie (D. Calise, Service de Microchirurgie, CREFRE US006, Toulouse).

Acquisition des données

Les signaux sont enregistrés en continu pendant toute la durée du protocole expérimental, à l'aide du logiciel LabChart® : ils sont mesurés pendant au moins une demi-heure avant l'inclinaison de la souris, afin d'obtenir des paramètres hémodynamiques stables. Après l'inclinaison, l'acquisition est également réalisée pendant une demie heure au minimum, jusqu'à la fin de l'expérimentation, où l'animal est sacrifié.

Enfin, un équivalent de la manœuvre de Valsalva est également effectué, à l'aide d'une brève compression abdominale, donnant un pic transitoire de la PIC suivi d'un retour à la ligne de base, afin de vérifier s'il y a des modifications de l'activité du système nerveux autonome liés à cette augmentation. Également, l'utilisation de drogues, telles que la phényléphrine (10 µg/kg) ou le nitroprussiate de sodium (10 µg/kg) est également utilisée afin de voir ces modifications (augmentation ou diminution de l'activité nerveuse en fonction de la vasoconstriction ou vasodilatation des vaisseaux). De plus, l'injection intra- péritonéale d'atropine (blocage du système nerveux parasympathique, 10 mg/kg) ou de propranolol (blocage du système nerveux sympathique, 10 mg/kg) permettront d'évaluer les mécanismes nerveux impliqués dans les possibles régulations des paramètres hémodynamiques en lien avec la modification de la PIC (Powers and Bernstein, 2004; Dorey et al., 2020).

Si les paramètres hémodynamiques tels que la pression artérielle et la fréquence sont inférieurs à 50 mmHg et 200 bpm respectivement, et si la souris présente une détresse respiratoire ou/et cardiaque, une hémorragie, l'animal est immédiatement euthanasié.

RESULTATS

Résultats

(A) Etude de l'adaptation du système cardiovasculaire et autonome dans le modèle de suspension du train arrière à -30° de 5 jours chez la souris mâle C57BL/6J

Dans le but de répondre au premier objectif, concernant l'étude de la cinétique d'adaptation du système CV et de sa régulation par le SNA, la première partie de ce projet était d'évaluer les réponses cardiovasculaires et autonomes, ainsi que les rythmes circadiens de la PA et de la FC dans le modèle de suspension à -30° durant 5 jours chez la souris vigile.

Publication d'un article

Autonomic nervous system adaptation and circadian rhythm disturbances of the cardiovascular system in a ground-based murine model of spaceflight.

O. HELISSEN, M. KERMORGANT, S. DEJEAN, A. MERCADIE, S. LE GONIDEC, R. ZAHREDDINE, D. CALISEn N. NASR, C. GALES, C. ARVANITIS, A. PAVY-LE TRAON.

*(**Soumis** chez Life, Astrobiology, MDPI)*

Résumé de l'article

Les conditions extrêmes de l'environnement spatial, telles que l'isolement et la microgravité, sont connues pour engendrer diverses réponses physiologiques inhabituelles, mettant à l'épreuve le corps de l'Homme (Afshinnekoo et al., 2020; Patel et al., 2020). L'adaptation physiologique à la microgravité est décomposée en trois phases : l'adaptation immédiate, correspondant à l'entrée en microgravité ; l'adaptation prolongée, correspondant aux effets retrouvés par l'exposition à plus long terme ; et la réadaptation à la gravité au retour sur Terre (Jirak et al., 2022). La première adaptation physiologique à la microgravité est la redistribution des fluides corporels vers la partie supérieure du corps, due à la perte immédiate des gradients de pression orthostatique, aboutissant par la mise en jeu de mécanismes réflexes CV neurohormonaux, à une hypovolémie centrale vraie (Hargens and Richardson, 2009a; Gallo et al., 2020). D'autres perturbations, moins bien connues, comme les modifications des rythmes circadiens, des réponses immunologiques ainsi qu'un stress psychologique et l'augmentation de la PIC, sont suggérées.

Au retour sur Terre, les études révèlent des troubles neuro-vestibulaires, un déconditionnement du système musculo-squelettique (Comfort et al., 2021), un dérèglement du système immunitaire (ElGindi et al., 2021), des problèmes de sommeil dus au décalage circadien (Brainard et al., 2016) et un déconditionnement du système CV (Baran et al., 2021). Ce déconditionnement se manifeste par une tachycardie et une intolérance orthostatique, une altération du baroréflexe ainsi que des modifications de l'activité du SNA, reflétant une incapacité du système à réguler la PA en position debout. Le SNA joue un rôle clé dans l'adaptation CV au défi postural (McCrory et al., 2016). Néanmoins, malgré ces constations, l'adaptation à court et à long terme de la régulation CV par le SNA en microgravité reste mal comprise (Mandsager et al., 2015).

Le modèle de suspension du train arrière à -30° chez le rongeur confère la capacité de simuler et d'étudier les effets de la microgravité sur Terre (Globus and Morey-Holton, 2016; Hawliczek et al., 2022). Il est admis ce que modèle permet de mimer les modifications physiologiques et CV retrouvée chez l'astronaute, parmi lesquels il est retrouvé la redistribution des fluides vers la partie thoraco-céphalique, une natriurèse/diurèse entraînant une hypovolémie et une dérégulation hémodynamique avec une tachycardie au repos après la suspension (Powers and Bernstein, 2004; Zhang et al., 2008; Tsvirkun et al., 2012). De plus, l'atténuation des réponses sympathiques, médiée par le baroréflexe en réponse à un stimulus hypotensif, a été démontrée à la fois chez le rat (Hasser and Moffitt, 2006; Mueller et al., 2006; Tsvirkun et al., 2012) et chez la souris (Powers and Bernstein, 2004) après la suspension. Les modifications de l'activité physique et des rythmes circadiens pendant la suspension pourraient également avoir un impact sur les réponses hémodynamiques et autonomes (Yamamoto et al., 2015). En revanche, ces réponses pendant la microgravité simulée chez les modèles de rongeurs sont controversées, non seulement en raison de la divergence entre les espèces, mais aussi en raison des différences à la fois dans la durée de l'exposition à la microgravité ainsi que dans le choix des temps de mesure.

L'objectif de ce travail est d'étudier la cinétique d'adaptation et de récupération CV dans le modèle de suspension du train arrière à -30° chez la souris vigile. Seize souris mâles C57BL/6J, âgées de 16 semaines, ont été équipées d'implants télémétriques afin de mesurer, en continu, les paramètres cardiovasculaires et physiologiques : deux groupes de 5 souris pour l'enregistrement de la PA, de la FC, l'activité locomotrice et la température sous-cutanée ; un groupe de 6 souris pour la mesure de la température centrale. L'enregistrement de ces paramètres a été réalisé pendant toute la durée du protocole expérimental de microgravité, comme suit : 3 jours à l'état de base (« contrôle »), pendant 5 jours de suspension et 2 jours de récupération après la dé-suspension (FIGURE 33). Les variations de ces paramètres ont été analysées selon les conditions expérimentales mais également selon les cycles de lumière et d'obscurité afin de voir l'impact sur le cycle circadien, à l'aide d'outils d'analyse plus précis. De plus, la VFC, ainsi que la SBR, reflétant indirectement l'activité du SNA, ont également été déterminées. Le suivi de la masse corporelle, de la consommation alimentaire et hydrique a également été réalisé.

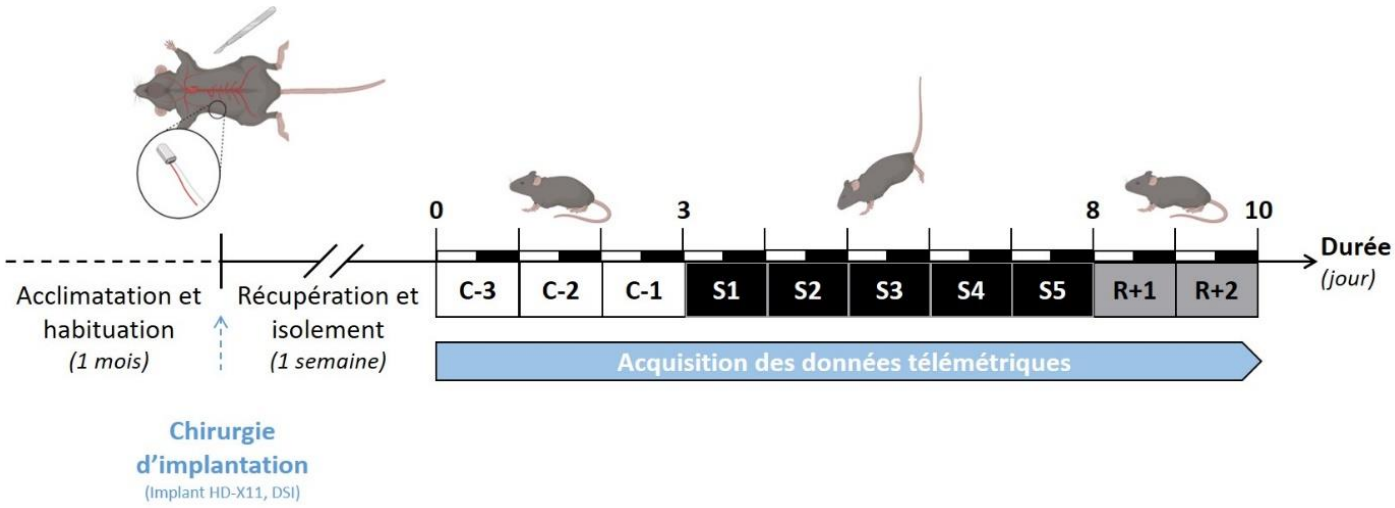


Figure 33. Design expérimental de l'étude.

Cette étude illustre l'adaptation CV chez la souris vigile dans le modèle de suspension à -30°. En effet, nos résultats ont montré que la suspension provoque, dans un premier temps, à une bradycardie significative les 24 premières heure, accompagnée d'une augmentation de la SBR et de l'activité vagale déterminée par la VFC, en réponse à la migration des liquides corporels vers la région thoraco-céphalique et à l'hypervolémie centrale. L'hypervolémie est soutenue par la diminution de la consommation en eau de souris. La FC revient à des valeurs de base avant la fin de la suspension malgré la persistance de la diminution drastique de l'activité locomotrice, de la température corporelle mesurée en sous-cutanée et contrôlée par la mesure de la température centrale. Concernant les modifications éventuelles de l'activité du SNS, une augmentation progressive de la PA systolique et diastolique est retrouvée après 72 heures de suspension, avant de revenir à des valeurs de base à la fin de la suspension.

Nos résultats ont également mis en évidence une perturbation persistante des rythmes circadiens de la PA et de la FC pendant la suspension, avec une diminution des différences jour/nuit. Une augmentation de l'amplitude des cycles est retrouvée après la dé-suspension, pendant la période de récupération, pour laquelle il est également observé une tachycardie significative, comme décrit dans la littérature. Cette a permis de clarifier les informations contradictoires contenues dans la littérature et nous a donné des idées sur la manière de mieux concevoir ce type d'expériences à l'avenir.

life

MDPI

Article

Autonomic nervous system adaptation and circadian rhythm disturbances of the cardiovascular system in a ground-based murine model of spaceflight.

Ophélie Hélissen[1], Marc Kermorgant[1,2], Sébastien Déjean[3], Aurélie Mercadie[3], Sophie Le Gonidec[4], Rana Zahreddine[4], Denis Calise[4], Nathalie Nasr[1], Céline Galès[1], Dina N Arvanitis[1*†], Anne Pavy-Le Traon[1,2*†]

1 I2MC, Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases, UMR1297, INSERM, University Hospital of Toulouse, Toulouse, France.
2 Neurology Department, University Hospital of Toulouse, France.
3 IMT, Institut de Mathématiques de Toulouse, UMR5219, CNRS, Université de Toulouse, UT3, 31062, Toulouse, France, Toulouse, France.
4 CREFRE-Anexplo, Services Phénotypage et Microchirurgie, UMS006, INSERM, Université de Toulouse, UT3, ENVT, Toulouse, France.

† Contributed equally to this work.
* Correspondence: constandina.arvanitis@univ-tlse3.fr and pavy-letraon.a@chu-toulouse.fr

Abstract. Whether in real or simulated microgravity, Humans or animals, the kinetics of cardiovascular adaptation and its regulation by the autonomic nervous system (ANS) remain controversial. In this study, we used the model of hindlimb unloading (HU) in conscious mice to monitor blood pressure (BP) and heart rate (HR), as well as temperature and locomotor activity, continuously with radio-telemetry, during 3 days of control, 5 days of HU and 2 days of recovery. Non-parametric smoothing was used to visualize patterns in times series. ANS activity was indirectly determined by analyzing both heart rate variability (HRV) and baroreflex sensitivity (BRS). Our study showed that HU induced an initial bradycardia, accompanied by an increase in vagal activity markers of HRV and BRS, together with a decrease in water intake, indicating the early adaptation to fluid redistribution. During HU, BRS was reduced; temperature and BP circadian rhythms were altered, showing a loss in day/night differences, a decrease in cycle amplitude, a decrease in core body temperature and an increase in day BP suggestive of an increase in sympathetic activity. Reloading induced resting tachycardia and a decrease in BP, HRV vagal activity index and BRS, showing the cardiovascular deconditioning to normal gravity.

Keywords: microgravity; hindlimb unloading; telemetry; autonomic nervous system; circadian rhythm

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The ability of Humans to explore space is limited by both psychological factors such as isolation and confinement as well as physical factors such as exposure to radiation and microgravity [1,2]. Numerous studies aiming to understand the biological impact of spaceflight focused largely on the risks of microgravity, which has important physiological consequences on the human body. Astronaut physiology is challenged in three phases: first, changes elicited upon entry to microgravity (short term adaptation); second, the effects of prolonged exposure to microgravity; third, the re-adaptation to Earth's gravity upon return. A number of studies from exposure to microgravity have shown that immediate loss of

orthostatic pressure gradients leads to fluid redistribution towards the upper part of the body [3,4]. On return to Earth, the astronauts showed neuro-vestibular disturbances, reduction in bone mass [5,6], deconditioning of the musculoskeletal system [7], dysregulation of the immune system [8], sleep problems with circadian misalignment [9] and cardiovascular deconditioning [10]. Few studies have been performed to assess the autonomic nervous system (ANS) inflight, which plays a key role in cardiovascular adaptation to postural challenge [11]. Early short flight studies showed reduced baroreflex sensitivity (BRS) and evidence of increased sympathetic activity [12]. However, the role of the ANS during adaptation to short and long duration missions remains unclear [12]. Blunted sympathetic responses and compromised regulation of the ANS, persisting upon returning to Earth, could be factors of orthostatic intolerance and resting tachycardia [4,13,14]. On board, real microgravity-based studies are mainly limited due to high costs and difficulties in the collection of data during missions.

Despite their limitations, ground-based analogs of spaceflight have proven to be valuable techniques regarding numerous physiological systems and correlate with findings observed from real microgravity experimentation [15-19]. Rodent studies for microgravity often use the model referred to as hindlimb unloading (HU), that has proven to bring about similar physiological adaptations as observed in astronauts from real microgravity settings [20,21]. Some of these physiological alterations include fluid redistribution to the upper part of the body, increased natriuresis/diuresis leading to hypovolemia and hemodynamic dysregulation with resting tachycardia post-HU [15,20,22]. Attenuation of the baroreflex-mediated sympathoexcitation in response to a hypotensive stimulus has been shown in both rats [23,24] and in mice [13] following HU. However, the hemodynamic and autonomic responses during simulated microgravity in rodent models are controversial due to the discrepancy between species but also because of differences in both the duration of microgravity exposure as well as the choice of time points when measurements are recorded.

The purpose of this study is to clarify various controversial aspects of these forms of experiments by devising a murine HU model with continuous monitoring of relevant parameters. We aimed to define the kinetics of cardiovascular adaptation and recovery using a mouse model with three phases over 10 days: 3 days of control, 5 days of HU and 2 days of recovery. Over the time course, we measured mouse weight as well as their water and food intake. Using implantable radio telemetry devices, we continuously collected data on mouse subcutaneous temperature and locomotor activity, as well as cardiac parameters, arterial blood pressure (ABP) and HR. The cardiac parameters were further exploited to calculate heart rate variability (HRV) and BRS.

Our study showed that HU induced: 1) an initial bradycardia associated with an increase in vagal indirect markers of ANS activity, followed by a return to baseline values 2) a persistent striking decrease in locomotor activity and in mice temperature associated to a disruption of circadian rhythms; 3) an increase in BP associated to a disruption of circadian rhythms suggestive of an increase in sympathetic activity 4) a resting tachycardia at the recovery with a decrease in BP and in vagal activity markers reflecting the CV deconditioning .

2. Materials and Methods

2.1. Ethics statement

Animal procedures were in accordance with European Communities Council Directive (2010/63/EU) and European Community standards on the Care and Use of Laboratory Animals (Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, MESRI, France, authorization 25468).

2.2. Animals

C57BL/6J mice (12-week-old males) were purchased from Charles River Laboratories (Saint Germain l'Arbresle, France). Prior to experimentation the mice were housed for 1 month in standard ventilated cages in the animal facility (US006 CREFRE Rangueil, Toulouse, France) under controlled conditions, with 23 ± 1 °C of ambient temperature and 60 % of relative humidity. They were synchronized to a 12-hour light-dark cycle (light cycle (LC) from 7:00 a.m. to 7:00 p.m., dark cycle (DC) from 7:00 p.m. to 7:00 a.m.) with access to standard mouse chow (R04-10, SAFE®, Rosenberg, Germany) and water *ad libitum*. One week prior to experimentation, mice were separated and individually housed in the cages used for HU. Mice (n=16) were divided in two-independent groups: 10 mice were used for telemetry recordings for ABP, HR, locomotor activity and subcutaneous temperature in two independent periods (n=5 each) and 6 mice were used for central (core) temperature recording.

2.3. Surgery

Mice were implanted with the HD-X11 transmitters (Data Science International®, DSI, Saint Paul MN, USA). Briefly, mice were anaesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) by intraperitoneal injection (with 26 G needle) followed by a subcutaneous injection of buprenorphine (100 µg/kg). Anesthesia was maintained by mask inhalation of vaporized isoflurane (1.5%) and 100% oxygen mixed (0.2L/min). Mice were placed on a warmed bed and depth of anesthesia was assessed regularly by hind leg pinch. A midline incision (1.5 cm) was made on the ventral neck. The left common carotid artery was isolated and ligated to its bifurcation. A second ligature was used to clamp on the artery 6 mm proximal to the site of ligation. By a small incision in the artery wall, the catheter was advanced 7-10 mm towards the aorta and fixed in place with silk sutures (6-0 surgical suture, Ethicon, Somerville, NJ). A subcutaneous pocket on the left flank of the animal was made with blunt scissors, and the body implant was inserted. Two small cutaneous incisions (3 mm) in the skin were performed on both sides of the heart, and the two electrodes of the telemetry transmitter from ECG recording are tunneled under the skin. ECG electrodes were placed and sutured subcutaneously with 6-0 surgical suture (Ethicon, Somerville, NJ) with the negative electrode attached to the right pectoral muscle; the positive lead on the left side on the level of xiphoid space and caudal to the heart. Skin incisions were sutured (5-0 surgical non-absorbable suture, Ethicon, Somerville, NJ) and animals were allowed to recover on a warming pad (37°C). For the recording of core temperature, the implant was inserted into the peritoneal cavity of 6 mice. The peritoneum was opened with fine scissors, the implant body was placed, and the peritoneum was sutured with 6-0 surgical suture. Following recovery, mice were housed in individual cages and placed on the telemetric receivers (RPC-1 PhysioTelTM Receivers, DSI, Saint Paul MN, USA), in a light-dark cycled room for 7-day recovery period.

2.4. Hindlimb unloading

Mice were subject to -30° tail unloading as described [25]. The apparatus and cages were employed as previously described [26]. Mice were briefly anaesthetized with inhaled mixed of isoflurane (2 %) and 100% oxygen gas (0.2L/min), in order to wrap the tail to the metal rod using the adhesive tape, ensuring that there is sufficient uncovered space

around the tail to ensure adequate thermoregulatory capacity. The metal rod was connected to the unloading device, composed by a pulley system and a swivel, located at the top of the cage on two parallel metals bars of the cage. Using this setup and a grid at the bottom of the cage, mice were able to access all areas of the cage and were able to eat, groom and move easily with their forelimbs.

2.5. Experimental design

The experimental design of the study is depicted in **Figure 1**. Telemetry recordings were initiated 7 days after surgery. Baseline collection of telemetric data was performed during 3 days (Control, C-3 to C-1). All animals (n=16) were suspended by their tail for a total of 5 days (Unloading, HU1 to HU5), after which they were returned to the normal four-extremity weight bearing "reloaded" position for 2 days (Recovery, R+1 and R+2). For consistency, and to minimize disturbances in the collection of the physiological data, all procedures including animal handling, cleaning, changes and measurements of food and water intake, and, data collection of recordings were performed at 10 a.m.. Food (15 grams per day) and water were weighed daily from surgery to the end of telemetry recordings. Body weight was monitored daily during the control period, then only at the unloading and the recovery period. Body weight, food and water intake were analyzed and described in this study for 11 mice. As previous mentioned, 16 mice were used in three independent experiments: two independent groups of 5 were used for recording of ABP, HR, activity and temperature and, 6 for recording of central temperature. All animals survived implantation and to experimental endpoints. Technical issues included the intermittent dropout of the ECG signal on 2 recordings out of 10 mice. These mice were removed from all analyses of telemetric data. No gross pathological signs were noticed in any of the 16 mice. At the end of the protocol, telemetric devices were removed and the mice were sacrificed by cervical dislocation under anesthesia.

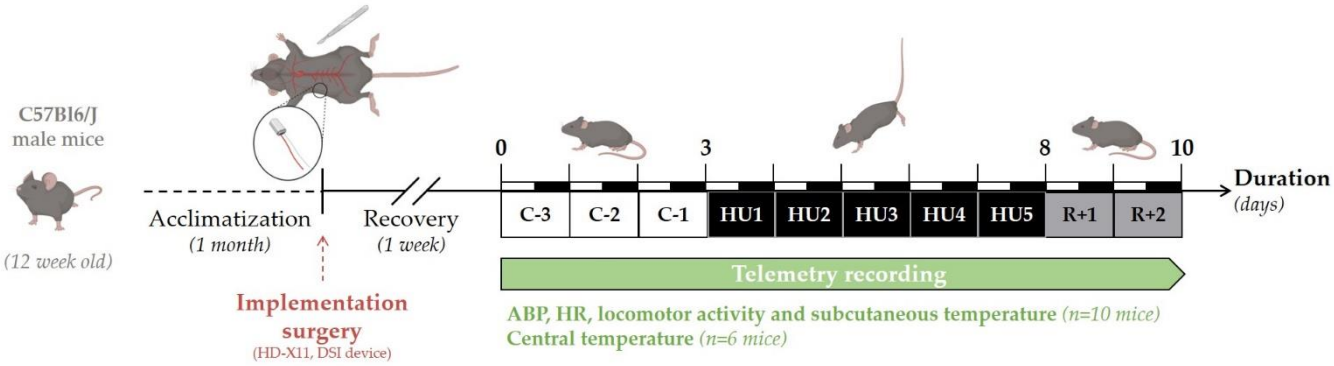


Figure 1. **Schematic representation of the experimental design.**

2.6. Telemetric data collection and analysis.

Telemetry transmitters were activated by positioning the magnet in close proximity to the implant as per the manufacturer's instructions (Data Science International®, DSI, Saint Paul MN, USA). ABP, HR, locomotor activity and temperature (subcutaneous or intraperitoneal) signals were collected using the data acquisition system (Ponemah Physiology Platform Software, v6.41, DSI, Saint Paul MN, USA). Blood pressure data is a direct analogue recording of the absolute intra-arterial pressure that is adjusted for variations in atmospheric pressure. HR was directly obtained from with ECG and was also calculated from the blood pressure pulse. Activity counts were obtained by monitoring changes in the signal strength of the transmitter signal reflecting gross movements. This method only detects movement of the transmitter and does not register grooming or other behavioral activities [27].

Signals were digitized at a rate of 1000 Hz. In order to remove measurement bias due to the entry of the experimenter at 10 a.m., this hour was excluded from the analysis. LC and DC values were determined with 12-hour mean.

2.7. Heart rate variability analysis

HRV analysis was performed with the Ponemah software module (Heart Rate Variability, Ponemah v6.41, DSI, Saint Paul MN, USA). HRV analysis was assessed in both time and frequency domains. Each R peak was detected and R-R intervals were determined from ECG recordings. Ectopic and artefact beats were removed. Since the signal is non-stationary in awake mice, we averaged 3 independent 3min periods for HRV analysis as reported [14]. Therefore, each beat of three stable ECG 3 min intervals, with no erratic fluctuations, were analyzed and averaged between 8 and 10 a.m. We excluded one mouse from the HRV analyses because stable discernable 3 min intervals were not distinguished by the experimenter.

Time-domain analysis included the following parameters: the mean of R-R intervals, the standard deviation of all normal R-R intervals (SDNN) and the root-mean square differences of successive R-R intervals (RMSSD). Frequency-domain analysis was performed using Fast Fourier Transform spectrum with 1.024 spectral points series with 50% overlap using Welch's periodogram. Segment length with linear interpolation and resampling to a 50 Hz interbeat time series and 20 ms tolerance (together with Hanning windowing) were averaged from data recorded. Two separate spectral components were analyzed: the low frequency (LF, 0.10 – 1.00 Hz) and the high frequency (HF, 1.00 – 5.00 Hz) powers. LF and HF were expressed in absolute values of power (ms^2). Very low frequency (VLF, 0.01 – 0.10 Hz) was excluded from the analysis.

2.8. Baroreflex sensitivity analysis

The BRS was calculated by the sequence technique (eCar software, Angers, France). Stable signals in 3 min intervals were analyzed (n=7 mice). Consecutive increases or decreases in SBP associated with parallel changes in R-R intervals lengthening or shortenings, indicated spontaneous baroreflex responses. Up and down sequences were defined to a ramp of 3 SBP beats, associated with subsequent R-R intervals. An average number of 20 sequences (40 segments) were used for the analysis. No thresholds in SBP, R-R interval or coefficient correlation (r) were used and the spontaneous BRS was calculated as the slope (ms/mmHg) of the linear regression lines.

2.9. Statistical analysis

Changes of food consumption, water intake, body weight, 24 hours mean variations, HRV and BRS analysis, were analyzed by one-way repeated-measures of variance analyses (ANOVA, comparison to the last day of control, C-1) with Dunnett post-test comparison.

Two-way ANOVA (with Condition and Cycle factors) with Tukey post-test comparisons, were used to evaluate the interaction effect between unloading and LC/DC variations. All results were expressed as mean ± SD, and were statistically significant when p-values < 0.05.

Figures and statistical analyses were performed with GraphPad Prism 9 software (version 9.3.1, USA) and R Studio software (R Core Team, 2022[28]). Our continuously collected data was first averaged into 2 h time bins and plotted using R, by applying the ggplot2 package[29] (version 3.3.6), which allows for graphical displays. To better visualize trends and patterns in our times series, LOcally Estimated Scatterplot Smoothing (LOESS; [29]) was used. To gauge the extent of the change in amplitude and acrophase on oscillatory data, Cosinor based analyses was applied and one-way ANOVA or Friedman test with Tukey or Dunn's (respectively) post-test comparison was performed[31–33].

3. Results

3.1. Physiological phenotyping.

During the control period (C-3 to C-1) daily average food intake was 5.7 ± 0.9 g and water intake was 4.1 ± 1.2 g. Since there was no significant difference between the control days, we chose C-1 values as our baseline values for all comparison studies.

HU resulted in a marked decrease in food intake at HU1 (***$p<0.001$), that persisted to HU2 (*$p<0.05$) compared to C-1. This dramatic decrease was then followed by a gradual recuperation and food intake was finally similar to C-1 by the end of the unloading period. Food intake was increased at R+1 as compared to C-1 (*$p<0.05$) (**Figure 2 a**).

A similar pattern was observed for water intake, whereby a significant decrease at HU1 (*$p<0.05$), HU2 (*$p<0.05$), HU3 (**$p<0.01$) up to HU4 (*$p<0.05$) compared to the control C-1. Water consumption increased at R+1 (*$p<0.05$) compared to C-1 (**Figure 2 b**).

Body weight was decreased by 4.5% after Unloading (***$p<0.001$) compared to Control. Mice began to recover their body weight in the 2-days recovery period, even if by the end of our analyses they still presented a 2.4% decrease (**$p<0.01$) compared to their initial weight (**Figure 2 c**).

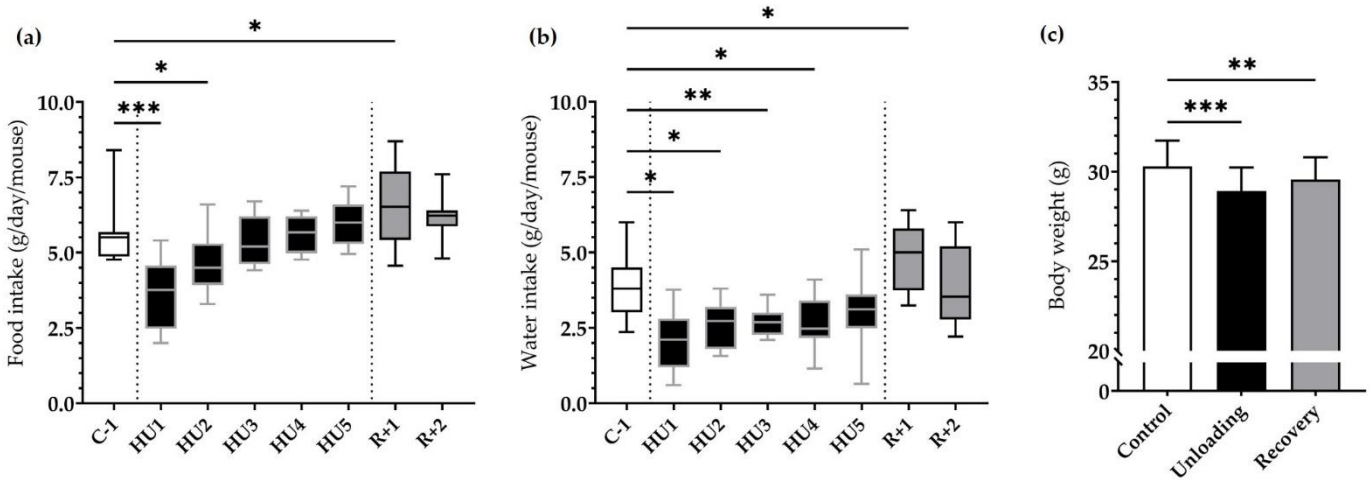


Figure 2. Effects of HU on food, water intake and body weight. **(a)** Food and **(b)** water intake were averaged daily during basal state (C-1, white box), during HU (HU1 to HU5, black box) and during recovery (R+1 and R+2, grey box). Data were measured 24 hours, at 10 a.m. the next day (n=11 mice). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 vs C-1. **(c)** Body weight were measured before unloading (control, white bar), at the reloading (unloading, black bar) and after 2 days of recovery (recovery, grey bar). Body weight values were expressed as mean ± SD (n=11 mice). **p<0.01 and ***p<0.001 vs control.

ABP, HR, activity and temperature were directly and continuously recorded for the 10-days of the experiment. To globally assess the effects by day, we binned the data into 24h averages. For all our analyses, we compared values to C-1 as there was no significant differences between the different control days.

Our results showed a significant and progressive increase in mean ABP during the first 48 hours of HU (***$p<0.001$) persisting to HU3 (***$p<0.001$) until HU4 (***$p<0.001$) compared to C-1. After 2 days of recovery, ABP significantly decreased compared to C-1 (***$p<0.001$) (**Figure 3 a**). Concurrently, HU led to a biphasic response in HR. An important bradycardia occurred early (HU1, ***$p<0.001$) reaching a maximum 11 % decrease compared to C-1. This bradycardia persists to HU2 (***$p<0.001$) and then returned to baseline values on HU3, while conversely, a significant tachycardia was observed at recovery (***$p<0.001$) (**Figure 3 b**).

HU induced a 85% reduction in mean locomotor activity, occurring immediately (HU1, ***$p<0.001$) compared to C-1. This reduction remained throughout the entire HU

until the end (HU5, ***$p<0.001$). At recovery, locomotor activity returned to control values (**Figure 3 c**). Mean subcutaneous temperature was significantly decreased during HU, from HU1 (***$p<0.001$) to HU5 (**$p<0.01$), compared to C-1 and then returned to control values at recovery (**Figure 3 d**).

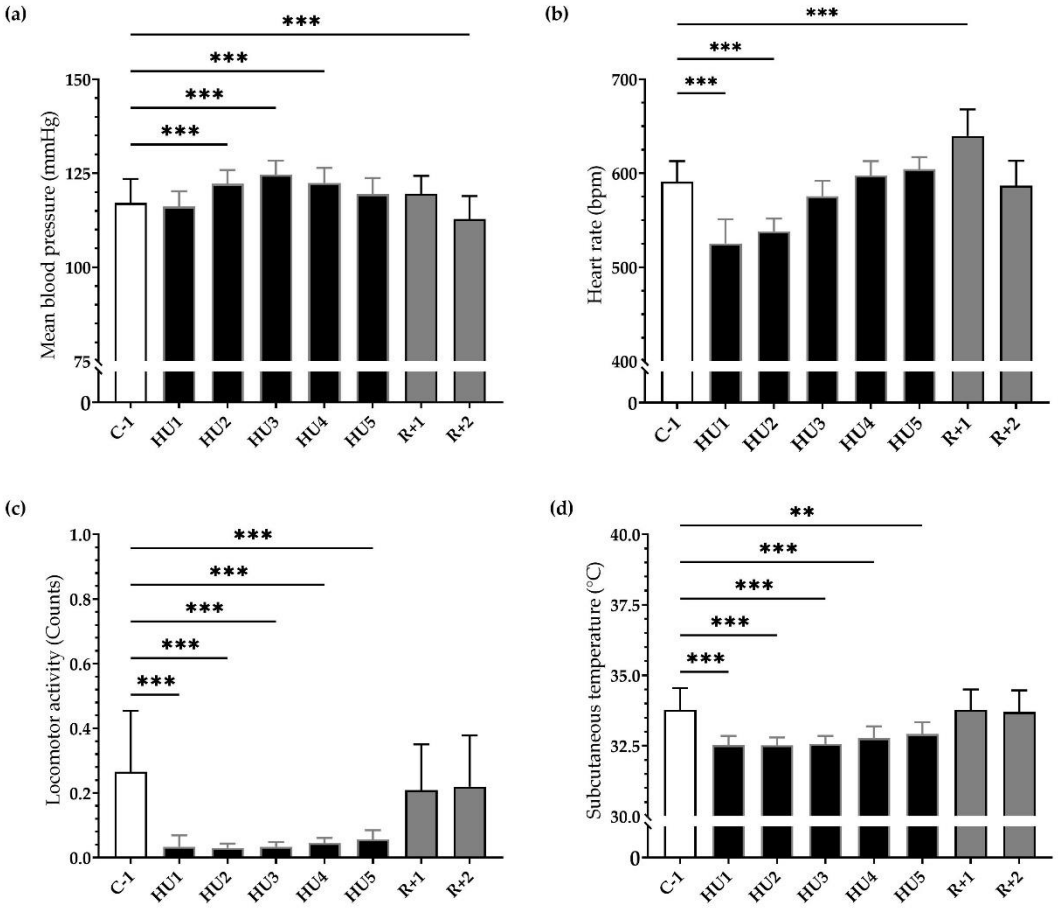


Figure 3. Ten-day continuous recordings of ABP, HR, locomotor activity and subcutaneous temperature. Histograms representing day averaged data for each measure factor illustrating the values of **(a)** arterial blood pressure, **(b)** heart rate, **(c)** locomotor activity and **(d)** subcutaneous temperature. All data are expressed as 24h mean ± SD (n=8 mice).

3.2. ANS activity analysis

HRV was used to assess autonomic modulation of cardiac activity in both the temporal or spectral domains.

First, in time domain, the SDNN significantly increased following unloading at HU1 (**$p<0.01$) and HU2 (*$p<0.05$) as compared to the C-1. At recovery, SDNN significantly decreased at R+1 (*$p<0.05$) (**Figure 4 a**). Likewise, RMSSD was significantly increased at HU1 (*$p<0.05$), compared to C-1 (**Figure 4 b**).

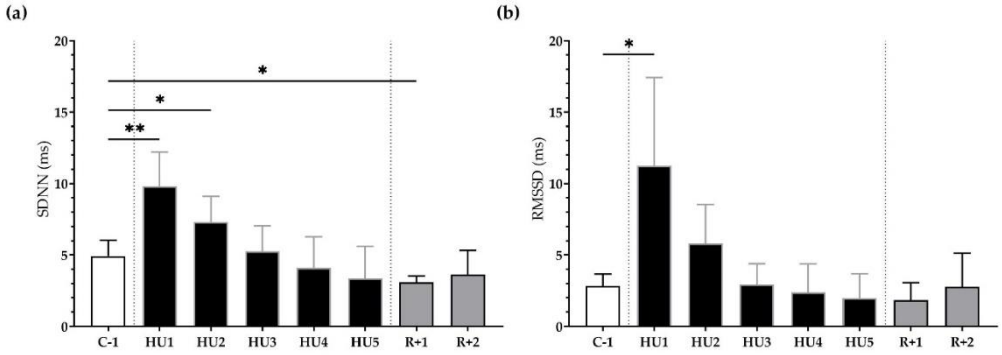


Figure 4. Time-domain analysis before (C-1), during unloading (HU1 to HU5) and recovery (R+1 and R+2). **(a)** Standard Deviation of NN intervals (SDNN) and **(b)** Root Mean Square of Successive R-R Interval Difference (RMSSD) were determined for 3 minutes mean triplicates, 20 hours after each condition, between 8-10 am the next day. Inset: control (C-1, white bar), 5 days of unloading (HU1 to HU5, black bar) and 2-days recovery (R+1 and R+2, grey bar). Values are expressed as mean ± SD (n=7 mice). *$p<0.05$ and **$p<0.01$ vs C-1.

Next, frequency-domain analysis was performed. We found that LF, HF and LF/HF were not significantly different during HU compared to control despite a trend for decrease at HU4 of the unloading compared to C-1 for LF/HF ($p=0.08$) (**Figure 5 a-c**).

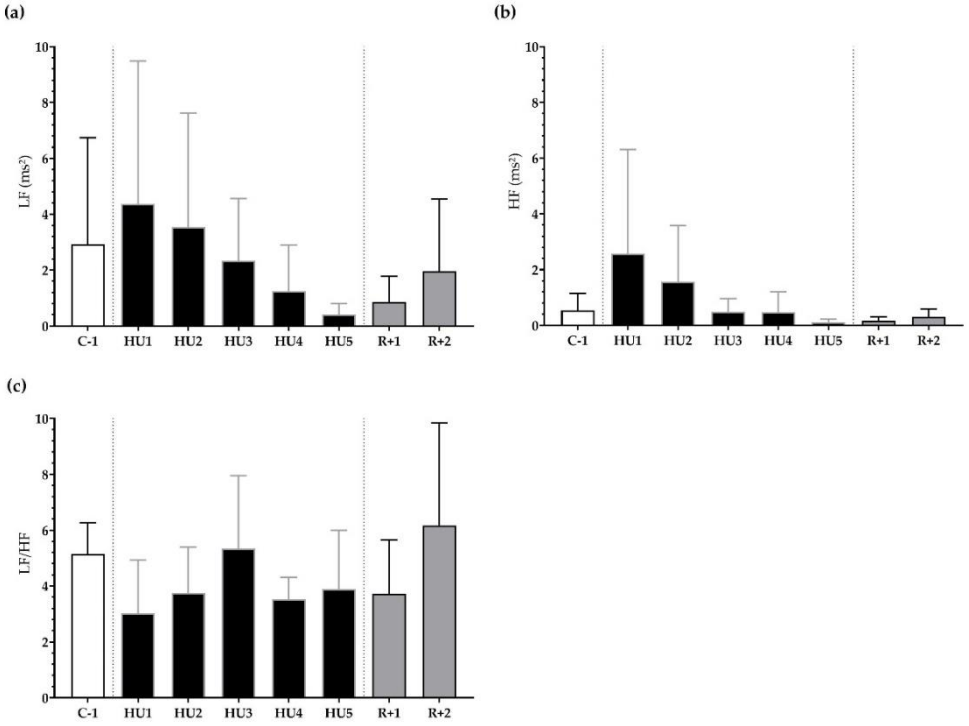


Figure 5. Frequency-domain analysis before (C-1), during unloading (HU1 to HU5) and recovery (R+1 and R+2). **(a)** low frequency (LF), **(b)** high frequency (HF), and **(c)** sympathovagal balance (LF/HF ratio) were determined for 3 minutes mean triplicates, 20 hours after each condition, between 8-10 a.m. the next day. Inset: control (C-1, white bar), 5 days of unloading (HU1 to HU5, black bar) and 2-days recovery (R+1 and R+2, grey bar). Values are expressed as mean ± SD (n=7 mice).

We subsequently analyzed the BRS, using the sequence method, throughout the experimental protocol. An increase at HU1 (**$p<0.01$) and HU2 (**$p<0.01$) was observed with an ensuing decrease by HU4 (*$p<0.05$) and HU5 (*$p<0.05$), as compared to C-1. At the recovery, a decrease was observed at R+1 (*p<0.05) compared to C-1 (**Figure 6**).

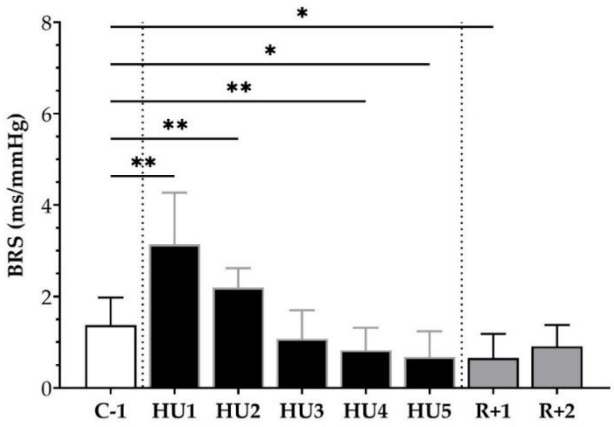


Figure 6. Baroreflex sensitivity (BRS) before (C-1), during unloading (HU1 to HU5) and recovery (R+1 and R+2). Inset: control (C-1, white bar), 5 days of unloading (HU1 to HU5, black bar) and 2-days recovery (R+1 and R+2, grey bar). Values are expressed as mean ± SD for n=7 mice. *$p<0.05$ and **$p<0.01$ vs C-1.

3.3. Phenotyping circadian rhythms

We next sought to further characterize the adaptations for each parameter measured by radio-telemetry over the entire experimental protocol.

3.3.1. Locomotor activity

Overall, progression of locomotor activity during the control period showed rhythmic day/night cycles with maximum peaks during DC and minimum values in the LC. During HU, this rhythmicity was completely abolished and yet immediately retrieved during the recovery period (**Figure 7 a**).

Locomotor activity was also assessed by 12 hours means, and showed a marked activity pattern at expected nocturnal periods during the control condition (cycle effect, ***$p<0.001$). These movements were significantly higher during DC than LC (**$p<0.01$). As described, HU resulted to a striking decrease in locomotor activity, immediately following unloading and continued throughout HU (condition effect, ***$p<0.001$). Locomotor circadian rhythm showed a significant difference between DC (**$p<0.01$) and LC (**$p<0.01$) compared to control DC and LC, respectively (interaction effect, ***$p<0.001$). At the recovery, values similar to control locomotor activity and DC/LC oscillation were observed, with an increase in LC (***$p<0.001$) and in DC (***$p<0.001$) as compared to unloading (**Figure 7 b**).

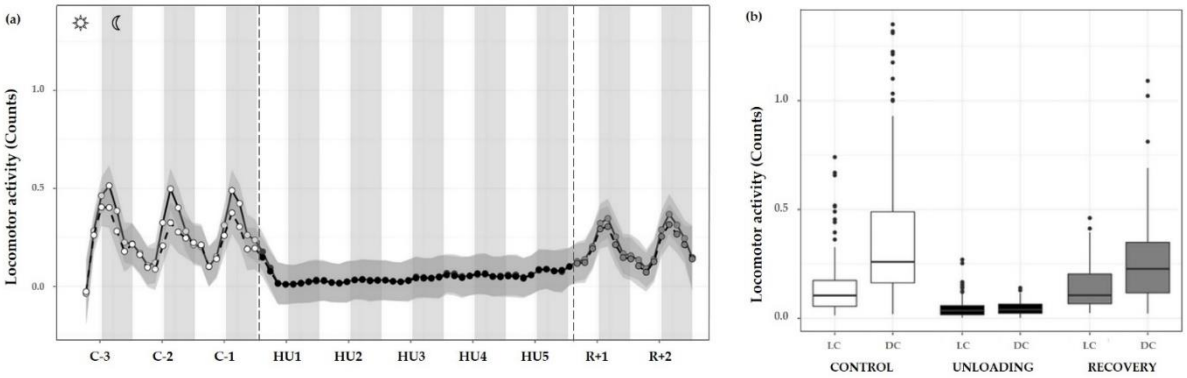


Figure 7. Locomotor activity changes during unloading and recovery period. (a) Mean (black full curve) and median (black dotted curve) variations of locomotor activity were represented during 3 days of control (C-3 to C-1, white circle), 5 days of unloading (HU1 to HU5, black circle) and 2 days of recovery (R+1 and R+2, grey circle). White and grey bars indicate 12/12-hour light (LC) and dark (DC) periods (7-7), respectively. Curve are smoothed, grey area represented confidence interval (n=8 mice). **(b)** Box plot showing locomotor activity during control (white box), unloading (black box) and recovery (grey box) periods for LC and DC (n=8 mice).

3.3.2. Temperature

Next, subcutaneous temperature was plotted to visualize the evolution of temperature throughout the experiment. Overall, the temperature response to HU was similar to that observed for locomotor activity, with a consistent decrease in mean subcutaneous temperature, returning to normal upon recovery. During the control period, temperature showed rhythmic day/night cycles with maximum peaks during DC, and this this rhythmicity was abolished during HU (**Figure 8 a**).

Moreover, when analyses were performed by LC/DC means LC temperature during the control condition was lower as compared to DC temperature (***$p<0.001$) showing a circadian cycle effect (***$p<0.001$). In fact, unloading led to a decrease in DC temperature compared to DC during control period (***$p<0.001$). As mentioned, mean subcutaneous temperature and cycle difference was decreased during unloading (condition effect, ***$p<0.001$), inducing an interaction effect (***$p<0.001$). At the recovery, LC (***$p<0.001$) and DC (***$p<0.001$) differences were also restored compared to unloading and showed no difference compared to the control period (**Figure 8 b**).

A similar trend for central temperature was also observed with a significant decrease during 5-days HU (condition effect, ***$p<0.001$). Our results showed a significant decrease in DC temperature during unloading compared to control period (***$p<0.001$) but no changes in LC. During the control period, LC (***$p<0.001$) and DC showed a circadian pattern (cycle effect, ***$p<0.001$). This pattern is preserved, but attenuated, during HU (*$p<0.05$). Core temperature returned to control values during recovery, showing no differences with the control period and a similar DC and LC pattern (***$p<0.001$) (**Figure 8 c**).

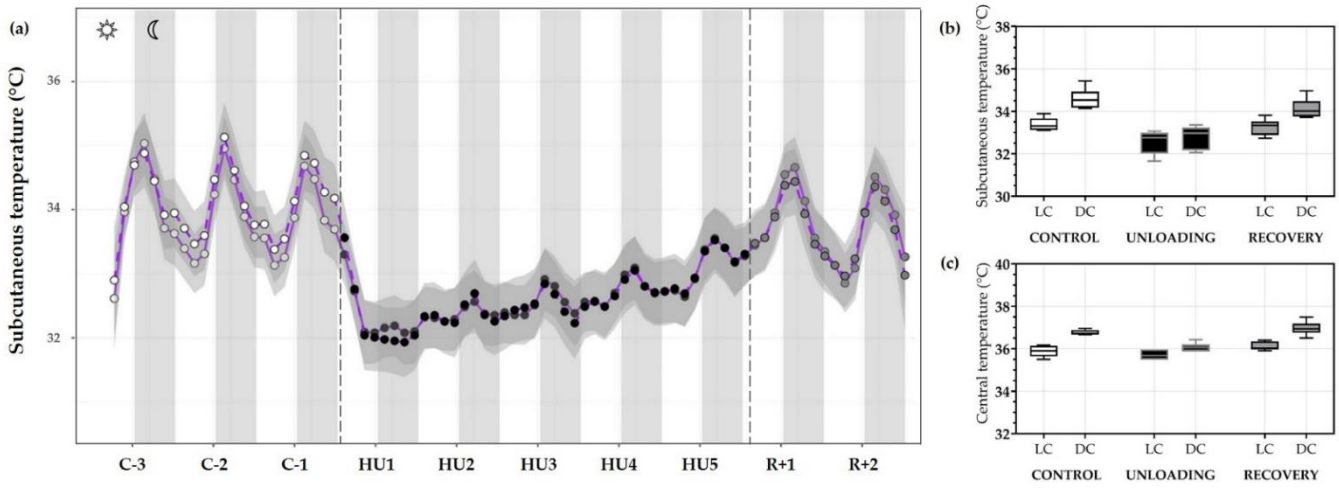


Figure 8. Subcutaneous and central temperature variations. **(a)** Mean (purple full curve) and median (purple dotted curve) variations of subcutaneous temperature were represented during 3 days of control (C-3 to C-1, white circle), 5 days of unloading (HU1 to HU5, black circle) and 2 days of recovery (R+1 and R+2, grey circle). White and grey bars indicate 12/12-hour light (LC) and dark (DC) periods (7-7), respectively. Curve are smoothed, grey area represented confidence interval (n=8 mice). **(b)** Box plots showing subcutaneous (n=8 mice) and **(c)** central (n=6 mice) temperature variations for control (white box), unloading (black box) and recovery (grey box) for LC and DC.

3.3.3. Arterial blood pressure

ABP was separated into systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP, respectively). During the control condition the circadian BP pattern is characterized by a decrease in both SBP and DBP during the day that reaches its trough around midday, with a subsequent gradual rise towards the nocturnal period with a peak near midnight. A continual circadian rhythm during the 3-day control period, with higher values during DC are observed, and both showed a cycle effect (***$p<0.001$). HU resulted in a significant increase in SBP (condition effect, ***$p<0.001$) and DBP (*$p<0.05$). There was also a marked loss of LC and DC rhythmic differences, SBP and DBP showed a significant interaction effects (***$p<0.001$) (**Figure 9 a-c**).

SBP showed a significant difference in LC compared to DC in control period (***$p<0.001$). During HU, LC and DC pattern was preserved (***$p<0.001$) by maintaining higher values in DC mean than LC mean. However, both LC and DC pattern during unloading showed significant difference compared to control period (***$p<0.001$). No differences were reported for DC in the recovery period compared to control despite a significant difference in LC (***$p<0.001$) (**Figure 9 b**).

A similar pattern was observed for DBP, with a marked difference between LC and DC during control period (***$p<0.001$). This pattern was maintained during hindlimb unloading (**$p<0.01$). During unloading, LC was increased compared to control (***$p<0.001$) but no differences is reported concerning DC. At the recovery, LC and DC values were no different compared to LC control period. There was a significant difference in LC (***$p<0.001$) and DC values (**$p<0.01$) compared to unloading (**Figure 9 c**).

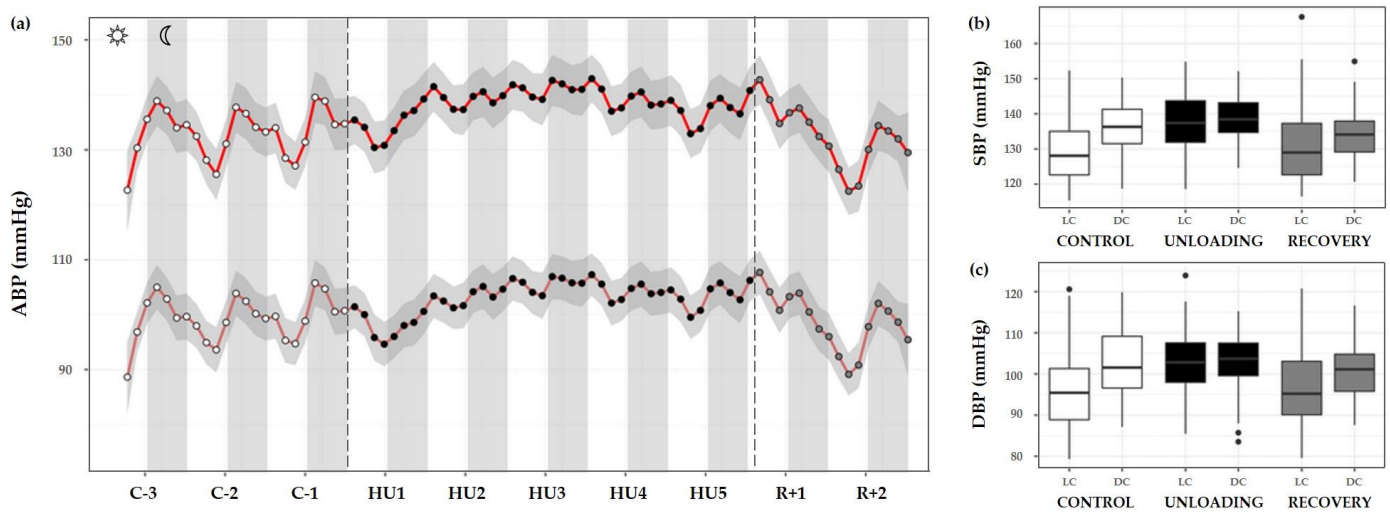


Figure 9. Arterial blood pressure changes before, during HU and recovery. **(a)** Mean variations of systolic (SBP, red full curve) and diastolic (DBP, red dotted curve) blood pressure were represented during 3 days of control (C-3 to C-1, white circle), 5 days of unloading (HU1 to HU5, black circle) and 2 days of recovery (R+1 and R+2, grey circle). White and grey bars indicate 12/12-hour light (LC) and dark (DC) periods (7-7), respectively. Curve are smoothed, grey area represented confidence interval (n=8 mice). **(b)** SBP and **(c)** DBP box plots for control (white box), unloading (black box) and recovery (grey box) periods LC and DC.

3.3.4. Heart rate

HR measurements were also plotted as time series plots with smoothing effect to better observe the patterns. Throughout the control condition, HR didn't appear to follow a circadian pattern such as ABP (no cycle effect, ns). Unloading led to a significant decrease compared to control (condition effect, ***$p<0.001$). LC values during unloading were lesser than LC values during control (***$p<0.001$) or recovery period (***$p<0.001$). DC values followed the same trend, with a decreased value compared to control (***$p<0.001$) and recovery state (***$p<0.001$). LC and DC values during recovery were higher than control LC (***$p<0.001$) and DC (*$p<0.05$) values (Figure 10 a-b).

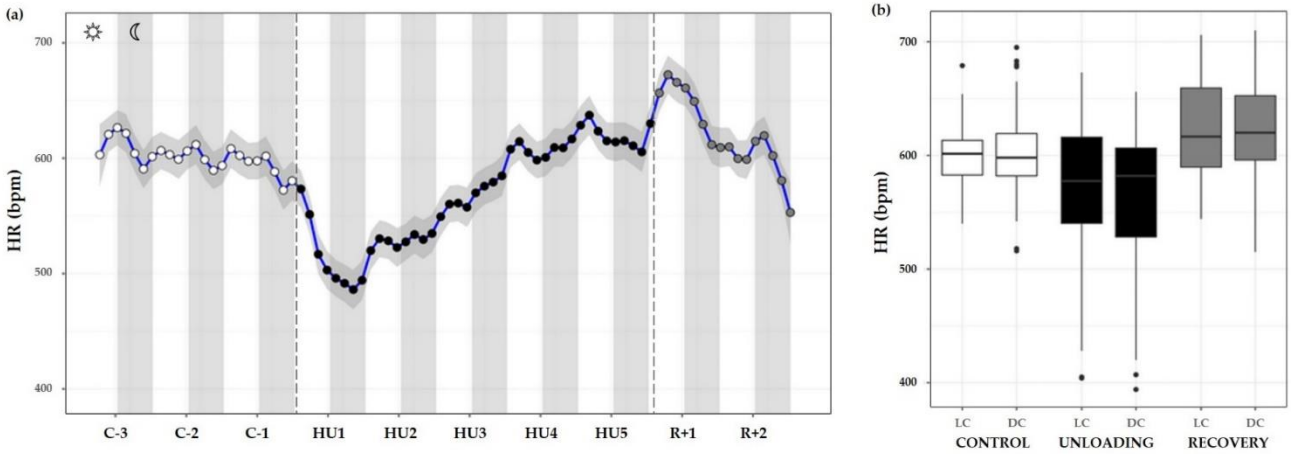


Figure 10. Heart rate responses before, during HU and recovery. **(a)** Heart rate (HR, blue curve) were represented 3 days of control (C-3 to C-1, white circle), 5 days of unloading (HU1 to HU5, black circle) and 2 days of recovery (R+1 and R+2, grey circle). White and grey bars indicate 12/12-hour light (LC) and dark (DC) periods (7-7), respectively. Curve are smoothed, grey area represented confidence interval (n=8 mice). **(b)** Box plot of HR for control (white box), unloading (black box) and recovery (grey box) periods LC and DC.

3.3.5. Cosinor Analyses

Using the Cosinor analysis, the mesor, a rhythm-adjusted mean; the amplitude, the extent of predictable change within a cycle; and, the acrophase, a measure which can be defined as the time of day where the circadian cycle obtains its maximum, with respect to a fixed moment in time [31] were defined and presented in **Table I**.

Data of locomotor activity and subcutaneous temperature are significantly changed during HU, showing a decrease in both amplitude and mesor value. During HU, our results showed a decrease in the amplitude of SBP and DBP, but also an increase in SBP (mesor) during HU. During recovery period, data showed a decrease in SBP amplitude. HR showed a decrease in mesor value during HU and an increase during recovery.

For coherence in applying the model we further performed the rhythm detection test p-value, to determine the fit of the model to the data. It is noteworthy that the rhythm detection test showed that only locomotor activity and temperature fit the model during the control period. During the recovery period, the data fit the model only for temperature. Concerning BP the model was not able to fit the data.

Table I. Cosinor analysis of mesor, acrophase and amplitude, before, during and after unloading.

	Condition		
	Control	**Unloading**	**Recovery**
Locomotor activity (Counts)			
MESOR	0.26 ± 0.11	0.04 ± 0.01 ***	0.21 ± 0.05 ###
Acrophase	-1.10 ± 0.82	-0.64 ± 0.68	0.95 ± 1.00 *** ##
Amplitude	0.18 ± 0.11	0.01 ± 0.01 ***	0.13 ± 0.08 ##
Rhythm detection test p-value	*0.005**	*0.420*	*0.070*
Subcutaneous temperature (°C)			
MESOR	33.81 ± 0.72	32.69 ± 0.51 ***	33.73 ± 0.40 ##
Acrophase	-0.69 ± 0.25	-0.72 ± 1.01	0.18 ± 1.36
Amplitude	0.78 ± 0.19	0.23 ± 0.07 ***	0.71 ± 0.17 ###
Rhythm detection test p-value	*0.004**	*0.129*	*0.026**
Systolic blood pressure (mmHg)			
MESOR	128.3 ± 14.4	134.4 ± 14.9 *	129.0 ± 12.8
Acrophase	-0.76 ± 0.96	-0.41 ± 0.39	-0.26 ± 1.06
Amplitude	6.32 ± 2.74	2.66 ± 1.28 ***	3.39 ± 1.89 **
Rhythm detection test p-value	*0.118*	*0.192*	*0.486*
Diastolic blood pressure (mmHg)			
MESOR	102.3 ± 2.8	106.4 ± 7.1	101.8 ± 8.6 #
Acrophase	-1.18 ± 0.14	-0.40 ± 0.64	-0.05 ± 1.25 *
Amplitude	5.37 ± 2.53	2.09 ± 1.10 **	2.28 ± 4.95
Rhythm detection test p-value	*0.104*	*0.316*	*0.372*
Heart rate (bpm)			
MESOR	590.6 ± 14.5	569.9 ± 22.9 *	616.6 ± 22.2 * ###
Acrophase	0.30 ± 0.87	0.17 ± 0.97	-0.09 ± 0.66
Amplitude	18.23 ± 8.29	8.57 ± 6.01	16.47 ± 10.46
Rhythm detection test p-value	*0.170*	*0.562*	*0.486*

Cosinor analysis was performed for locomotor activity (counts), subcutaneous temperature (°C), systolic blood pressure (mmHg), diastolic blood pressure (mmHg), and heart rate (bpm). Mean of mesor, acrophase, amplitude and model coherence, were determined for the control period of 3-days, hindlimb unloading period of 5 days and the 2 days of recovery. Rhythm detection test refers

to the fit of the model to the data where p<0.05. Data were expressed as mean ± SD (n=8). **p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001* vs Control; *#p<0.05, ##p<0.01* and *###p<0.001* vs Unloading.

4. Discussion

4.1. Dynamic responses of the ANS to HU and recovery

In an effort to resolve some of the controversy surrounding how HU alters cardiovascular ANS function, we performed continuous recordings of the ABP, HR, locomotor activity, and temperature in a murine model of simulated microgravity. We found that the cardiovascular system responses were highly dynamic and that within the 5-days HU experimental phase, there was an initial adaptation followed by a relative return to baseline levels for HR and ABP. We observed that the initial response to HU consisted of a significant bradycardia, along with an increase in vagal activity and in BRS. Additionally, SDNN, a time-domain marker for HRV that reflects total ANS variability [34], showed a marked increase on the first day of hindlimb unloading and remained elevated up to day 2 as compared to control values. Correspondingly, the HRV time-domain marker, RMSSD, which is a marker of cardiac parasympathetic activity[34], was elevated on day 1 of HU. Even though these markers showed changes, it is of interest that no significant change was found in the frequency-domain analysis of LF, considered as an index of cardiac sympathetic and parasympathetic tones and the HF, reflecting only cardiac parasympathetic tone. HF tends to increase only on the first day of unloading and couples with the decrease in HR, which indicate an increase in vagal tone. HRV in frequency domain not reaching significance may be due to the large intra-individual variability [35], or even in the restrictive data time frame measured. The decrease in HR can hardly be explained by the reduction in locomotor activity, as reduced locomotor activity persists throughout the HU period. This change was accompanied with a decrease in water intake. This may reflect an early adaptation to the fluid redistribution to the upper part of the body mediated by neuro-hormonal mechanisms [36]. The increased central blood volume perceived by aortic and carotid baroreceptors and cardiac receptors induce an increase in natriuresis and diuresis leading to real hypovolemia [36]. An increase in plasma atrial natriuretic factor has been show after 2h of -30° HU in rats in response to the early central hypovolemia [35]. Direct measurements of the central venous pressure in rats showed that an increase was related to the head-down level and that central venous pressure remained elevated after 24h at -45° [37]. We suppose that the changes observed in HR as the initial response persisted mainly for the first 2-3 days, and then the animals recovered their baseline values are a reflection of the adaptation to central fluid shift [36]. Inverse to HR, ABP increased during this period, and also stabilized to baseline values by the third day of HU. The subsequent response was observed following the 3 days, even though animals remained in the HU experimental phase. This included a stabilization of HR and HRV markers of vagal activity and also ABP values. A previous study also showed a moderate bradycardia by day 2 of HU that continued over the course of 4 days, after which HR returned to baseline as measured by radio telemetry in mice [13]. An increase in BP was also reported in rats by Tsvirkun et al. [22]. However, these authors did not report an initial decrease in HR. Several reasons may explain these discrepancies: for instance, the magnitude and the response to the cephalad fluid shift may vary with the species. Other studies have been performed at discrete timepoints, often when the animal is released from constraint, and therefore cardiovascular deconditioning is studied, or is confounded by use of anesthesia for handling and experimentation [21,22,38–40].

The recovery period, which represents the return to normal gravity with the HU model, is also of interest to understand post-flight adaptations in astronauts. Our data showed that, as expected, the recovery period provoked a significant resting tachycardia and a decrease in vagal activity. Indeed resting tachycardia in rodent models was previously described at recovery after 7 or 14 days HU in mice [13,41,42] and in rats [38,43,44]. These findings are in accordance with the central hypovolemia induced by the

reloading and also leading to the increase in water intake significant on R+1. ABP levels returned to baseline values at R+1, but a significant decrease in ABP was observed at R+2. Our findings are in accordance with previous studies for the return to baseline by R+1. For example, resting ABP was normal following 14 days HU in rats [36,43], but reached lower levels compared to control group [43]. In mice, Powers and Bernstein found that ABP dropped slightly after reloading (R+1), yet the observed effect at R+2 shows how increasing the timing of experimentation can have a large role in the results [13]. Indeed, most deconditioning studies are performed immediately following reloading of the animal, and several of these have shown ABP levels return to resting state. These data surrounding ABP responses to recovery, however, may differ and are likely due to the unloading duration, blood pressure measurement technique and the duration of the recovery period following HU. The significant decrease in ABP at R+2 may reflect a reduced sympathetic response to postural challenge. It has been suggested that impaired baroreflex and sympathetic activity could play a role in cardiovascular deconditioning and orthostatic intolerance observed after exposure to simulated or reel microgravity. Foley et al [43] showed that baroreflex-mediated activation of sympathetic activity (measured by RSNA) was blunted by HU (13-15 days) in rats. In our experiment, we also observed that HR variability (SDNN) and BRS was lower at the recovery than control period. However cardiac parasympathetic activity (RMSSD) showed no significant change. We did not find any modification in frequency-domain indicators of HRV and sympatho-vagal scale (LF/HF), which agrees with a previous study that showed simulated microgravity did not change autonomic balance assessed by spectral properties of BP and HR in rats [38,45]. However, other studies using pharmacological tools showed an alteration of the baroreflex mediated sympathetic activity and an altered HR sympathovagal balance (both significant increase in sympathetic tone and reduction in parasympathetic tone) in response to HU [34,39,40]. The decreasing trend observed in BRS may reflect a lack of ANS adaptation to postural challenge.

4.2. Light/dark cycles and circadian rhythms during HU and recovery

Daily, 24 h rhythmic variations in body temperature and activity levels are found in mice with an increase in both during the DC[46,47]. In our data, we observed a relationship between temperature and locomotor activity. When measures of activity are elevated, there is also a rise in the temperature. Both of these parameters show a clear baseline day/night response with elevation during the DC versus the LC. This pair of parameters also correlate in terms of their response to the HU phase and their ability to re-acquire baseline waveforms during the recovery phase. Immediately upon introduction to the HU phase, mouse activity declined severely and lost any semblance of LC- DC periodicity; albeit to a greater degree during the DC when the mice are normally more active [47], and this is likely due to the restraint since these parameters returned to normal upon release. Temperature readings trended in a very similar pattern throughout the 5-day HU phase. Additionally, both of these parameters were able to regain LC- DC periodicity immediately upon exiting HU. Body temperature positively correlate with locomotor activity [48] and HU led to a reduction in both. Interestingly, mouse food uptake returned to baseline within 72h during HU, suggesting a compensatory thermoregulation mechanism [49] possibly in order to maintain body temperature. Our finding for reduced body temperature is in contrast to recent study conducted on astronauts that found an increase in core body temperature during spaceflights [50]. It is worth noting that the changes in intraperitoneal temperature and subcutaneous temperature had the same pattern. Changes in mean daily body temperature are of considerable interest in healthcare [51,52]. This reduction may be specific to rodents and to the experimental design. Recent findings using thermographic imaging shows that increases in body temperature were not always associated with the appearance of locomotor activity but also with non-locomotor activities such as grooming and postural

adjustments, which alone induce considerable elevation of body temperature [46]. A recent study where female mice were sacrificed aboard the International Space Station after 37 days of flight (RR-1 mission) proposed that spaceflight impaired activities, such as grooming and postural adjustments, thereby resulting in an increase in their dependence for adaptive thermogenesis including gene expression changes in the metabolic profiles [53]. Altogether, these data suggest that thermoregulation, even if species specific, likely plays an important role in the physiological adaptation to microgravity.

Investigation of rhythms in biological parameters requires continuous monitoring of data in order to reveal cyclical waveforms. Repetition of patterns over a 24h period is referred to as circadian. ABP and HR have an established circadian pattern with a peak during the DC in rodents[54]. By plotting the measured parameters with demarcations indicating LC and DC, one can clearly see 1) the circadian rhythm of that parameter during the control period, 2) the perturbation of that rhythm during the days of HU, and 3) the conduct of that rhythm during the days of recovery. The goal of the initial 3-day control phase is to establish the nature of the baseline waveform, before mice are subjected to HU. This baseline permits the comparison of a parameter waveform obtained throughout the HU phase as well as within the 2-day recovery phase. Within the series of parameters that we monitored during this study, there are many different types of results, both in terms of how the baseline circadian pattern is changed within the HU phase as well as how well the recovery waveform re-aligned with the control waveform. In order to obtain an understanding of the interactions and dependencies inherent to the various parameters, once can compare and contrast various parameter profiles across the different phases of the study. The main finding is the most significant increase occurring in blood pressure during daylight with a reduced fall during daylight. This corresponds to a non-dipper pattern which may due to vascular sympathetic activation. This pattern has been already described in HU in rats by Tsvirkun et al [22] who also reported the same pattern in isolated rats in individual cages. In addition, the possible changes in baroreflex and ANS regulation induced by the HU may also play a role. Indeed studies performed in sinoaortic denervated rats have shown that the disruption of the baroreflex elevates the BP in rats during the light period, eliminating the 24-hour rhythmicity although the level and pattern of locomotor activity rhythms were not changed by sinoaortic denervation [55].

For example, ABP shows a circadian waveform during the control phase, the changes observed during HU are subtler and more difficult to interpret. There appears to be an alternation in the shape of the waveform immediately upon introduction to HU that then leads to a distortion in the circadian waveform on each subsequent day. Even upon exit to the recovery phase, it was not evident during the 2 days of recovery how the ABP waveform would eventually regain the baseline shape. In fact, the circadian rhythm observed for the days R+1 and R+2 are more different than any subtle modulations observed during the 3 control days. The circadian cycle of HR, after a complete perturbation on day 1 of HU, appears to gradually increase over the remaining days of HU. Akin to the recovery response observed for ABP, HR was not able to return to a baseline waveform within the 2-day recovery period.

Our results are consistent with previous findings showing that microgravity conditions result in circadian disruptions in several physiological parameters including but not limited to sleep and immunity [8,9,16,54]. Of interest, upon application of the Cosinor model [32,33]. We found that locomotor activity and temperature that fit the model during the control period no longer fit the model during HU, which was probably related to disruptions in circadian rhythms. However, fitting the model to certain data such as blood pressure was not possible even during the control period. We suppose that these results may be influenced by the number of days of control versus the HU phase and the recovery phase. Second, we presume that since the period was tightly controlled

in our experiment, this may bias the wave function. Future work and more thorough analyses are required to fully understand how HU impacts the circadian cycle.

4.3. Limitations of the model and analyses

While we conducted a controlled experiment to understand the impact of HU on cardiovascular conditioning, we found considerable interaction between the physiological parameters, food and water consumption, with HU. Stress response are classically measured by the loss of body weight, food consumption, decreased core body temperature; all of which were altered in our experiment. It is important to note that mice were housed individually in HU studies. Social isolation is known to induce anxiety, depressive-like behavior, as well as disrupted circadian rhythms, and to cause memory deficits and increase levels of pro-inflammatory factors [57]. HU has also been described as a model of stress and depression due to this social isolation aspect [22,38]. Although we tried to reduce stress, by acclimating the mice to handling and isolation prior to experimentation, we cannot exclude the effects of stress on the cardiovascular responses observed. There is some consensus that stress-related features manifest in unloading models and these can influence ABP and HR levels [22,58]. As such, the ensemble of changes renders the dissection of the root cause of cardiovascular ANS alterations during HU, and the ensuing deconditioning, challenging. We need to keep in mind that in addition to ground based nature of these experiments, there are other features such as the fact that mice are quadrupeds and that fluid redistribution towards the upper part of the body may not be as significant as in Humans. There is a supposition that that changes due to microgravity are proportionally larger for individuals with a greater weight and body size, and this theory was recently corroborated in assessment of microgravity-induced ocular changes [59]. These shortcomings are known in the literature and remain a caveat for all rodent based studies and may also contribute to the disputed nature of findings.

Despite these limitations, our findings offer insight into the fluxes in HR and ABP in response to the experimental phase and the time that may explain the conflicting findings in the field. One noteworthy observation in our study is that several parameters of ANS activity appear to return to control period levels during the HU period. While we are aware that the exposure to microgravity in our experiment was relatively of short duration, our findings agree with previously published studies of short term HU showing similar adaptations while in HU [13,22]. It is important to keep in mind that most of the experimental protocols used assess cardiovascular ANS tone at discrete time points; and several of these require the unloading of the animal and/or use of anesthesia. Moreover, analyses of the different parameters of the ANS require stable HR and ABP signals, that are a challenge to obtain in awake, free roaming animals. Our analyses of the ANS indices followed those previously published for 3 min intervals in the early morning [60]. To dissect the data more systematically, we sought to explore our continuous monitoring measures by analyzing light/dark cycles, and representing the data into time series plots. Using these techniques, we found that some changes notably in circadian rhythm of ABP persisted along the HU. In addition, our data equally shows a divide between locomotor activity counts and the cardiovascular markers, HR and ABP. These findings are perplexing given the high correlation between HR and activity (reviewed but not limited to[61,62]). We hypothesize that observed overall increase in the sympathetic tone during the LC may help explain these findings.

4.4. Conclusion and potential new insights

In our study, we demonstrated the several phases of physical, cardiovascular and autonomic adaptation during the early and prolonged phase to simulated microgravity but also to recovery. On the one hand, we demonstrated an initial bradycardia associated with an increase in vagal activity of HRV and BRS, accompanied with a decrease in water intake, which may reflect an early adaptation to fluid redistribution. HU also led to a disruption of cardiovascular circadian rhythms during HU, in particular a decrease in day/night differences in blood pressure characterized by an increase in BP in DC, which may be related to an increased sympathetic activity. On the other hand, our results confirm that HU induced an immediate, dramatic and persistent decrease in locomotor activity as reported. Surprisingly, HU also induces a decrease in subcutaneous and core temperature, which to our knowledge has not been shown in mice. Finally, at the recovery, mouse showed a resting tachycardia with a decrease in blood pressure, in vagal activity marker of HRV and BRS, reflecting the re-adaptation to normal gravity. Our investigation with continuous monitoring has both provided a degree of clarity with regard to the CV adaptation and regulation by the ANS in HU, also confirm the interest of this model to simulate and assess the post flight CV deconditioning. While the circadian rhythm is the most studied cycle, there are also cycles in nature that are shorter, ultradian (< 22h), and longer, infradian (> 26h) that also play a role in the regulation of biological systems [63]. Observable cycles with a period greater than 26h manifested as cycles in biological systems are thought to be regulated by a collection of earth-moon-sun changes [64,65]. The underlying mechanisms for infradian rhythms are poorly understood even if examples of these, which include levels in sex hormones [66,67], melatonin [68], and dopamine [69] have been shown. A major issue in the study of such cycles is the enormous amount of interaction between all the different rhythms with all their various periods. For instance, dopamine, an important neurotransmitter involved in stress and depression [70], not only exhibits ultradian rhythms but also influences circadian and infradian rhythms [69]. Dopamine levels were found to be reduced in *C. elegans* grown under microgravity [71] well as mice exposed to 1 month of spaceflight on the Russian biosatellite BION-M1 [72], suggesting possible interactions between a known ultradian rhythm and microgravity. Studies have implicated both ultradian and infradian rhythms play a role in HRV [73]. Recent evidence, from birds and rodents, have shown that characteristics such as body temperature and motor activity, as well as the concentration of glucocorticoid hormones, follows both circadian and infradian rhythms [74].

Our present study revealed the 24h day/night cycle is relevant to this type of experiment but also suggests that there are additional infradian cycles that also exert an influence on results obtained with ground-based models for microgravity. Therefore, in order to perform these types of experiments, one must be cognizant of the various factors, experimental as well as both intrinsic and extrinsic forces, that not only modulate the observations under study, but exist as cyclical frequencies with various overlapping and interacting frequencies. In addition to experimental modifications such as longer HU times and enhanced precision in time-based monitoring of physiology, our results also suggest that additional analysis of our current data integrating multiple ultradian and infradian cycles might aid in the analysis and reveal interesting results. Integrating our database with existing databases, coupled with new findings, and tracking in real time physiological and behavioral parameters are key areas of study in the future to understand and enhance cosmonaut physiology for spaceflight missions.

Funding: This research was funded by CNES grant number 48000011/24/73 and funding number; and, FDF grant number FDFR19222BB.

Institutional Review Board Statement: Animal procedures with animals were in accordance with European Communities Council Directive (2010/63/EU) and European Community standards on the Care and Use of Laboratory Animals (Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, MESRI, France, authorisation 25468). This experimental protocol has been approved by the regional ethic committee (Comité d'éthique de l'US006/CREFRE, CEEA-122).

Author Contributions: Conceptualization, DN.A and A.PLT; Formal analysis, O.H, M.K, S.D, A.M, S.LG and N.N; Funding acquisition, M.K, DN.A and A.PLT; Investigation, O.H, M.K, S.D, S.LG, R.Z, D.C, N.N and DN.A; Methodology, O.H, M.K, S.LG, R.Z, D.C, DN.A and A.PLT; Project administration, C.G and A.PLT; Resources, S.LG, R.Z, D.C and N.N; Supervision, M.K, S.D, D.C, DN.A and A.PLT; Writing – original draft, O.H, DN.A and A.PLT; Writing – review & editing, O.H, M.K, S.LG, D.C, N.N, C.G, DN.A and A.PLT. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement: All data related to the article are found within the article and the 2h time bin datasets are available at doi:10.57745/QVRW8W. (released upon publication of the article).

Acknowledgments: The authors thank Déborah Campayo and the staff of the CREFRE US006 of Toulouse for their help, Yann Abéguilé and the technical team of DSI for the technical support, Angèle Chopard from DMEM (UMR866-INRAE) of Montpellier and Laurence Vico, Laura Peurrière, from SAIMBIOSE (UMR1059-INSERM) of Saint-Etienne for the material, Jean Michel Senard from I2MC (UMR1297-INSERM) and the of IMT (UMR5219-CNRS) of Toulouse, for their participation in the elaboration of the statistics in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Patel, Z.S.; Brunstetter, T.J.; Tarver, W.J.; Whitmire, A.M.; Zwart, S.R.; Smith, S.M.; Huff, J.L. Red Risks for a Journey to the Red Planet: The Highest Priority Human Health Risks for a Mission to Mars. *NPJ Microgravity* **2020**, *6*, 33, doi:10.1038/s41526-020-00124-6.
2. Afshinnekoo, E.; Scott, R.T.; MacKay, M.J.; Pariset, E.; Cekanaviciute, E.; Barker, R.; Gilroy, S.; Hassane, D.; Smith, S.M.; Zwart, S.R.; et al. Fundamental Biological Features of Spaceflight: Advancing the Field to Enable Deep-Space Exploration. *Cell* **2020**, *183*, 1162–1184, doi:10.1016/j.cell.2020.10.050.
3. Ly, V.; Velichala, S.R.; Hargens, A.R. Cardiovascular, Lymphatic, and Ocular Health in Space. *Life (Basel)* **2022**, *12*, 268, doi:10.3390/life12020268.
4. Gallo, C.; Ridolfi, L.; Scarsoglio, S. Cardiovascular Deconditioning during Long-Term Spaceflight through Multiscale Modeling. *NPJ Microgravity* **2020**, *6*, 27, doi:10.1038/s41526-020-00117-5.
5. Man, J.; Graham, T.; Squires-Donelly, G.; Laslett, A.L. The Effects of Microgravity on Bone Structure and Function. *npj Microgravity* **2022**, *8*, 1–15, doi:10.1038/s41526-022-00194-8.
6. Coulombe, J.C.; Senwar, B.; Ferguson, V.L. Spaceflight-Induced Bone Tissue Changes That Affect Bone Quality and Increase Fracture Risk. *Curr Osteoporos Rep* **2020**, *18*, 1–12, doi:10.1007/s11914-019-00540-y.
7. Comfort, P.; McMahon, John.J.; Jones, Paul.A.; Cuthbert, M.; Kendall, K.; Lake, Jason.P.; Haff, G.G. Effects of Spaceflight on Musculoskeletal Health: A Systematic Review and Meta-Analysis, Considerations for Interplanetary Travel. *Sports Med* **2021**, *51*, 2097–2114, doi:10.1007/s40279-021-01496-9.
8. ElGindi, M.; Sapudom, J.; Ibrahim, I.H.; Al-Sayegh, M.; Chen, W.; Garcia-Sabaté, A.; Teo, J.C.M. May the Force Be with You (Or Not): The Immune System under Microgravity. *Cells* **2021**, *10*, 1941, doi:10.3390/cells10081941.
9. Brainard, G.C.; Barger, L.K.; Soler, R.R.; Hanifin, J.P. The Development of Lighting Countermeasures for Sleep Disruption and Circadian Misalignment during Spaceflight. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* **2016**, *22*, 535–544, doi:10.1097/MCP.0000000000000329.

10. Baran, R.; Marchal, S.; Garcia Campos, S.; Rehnberg, E.; Tabury, K.; Baselet, B.; Wehland, M.; Grimm, D.; Baatout, S. The Cardiovascular System in Space: Focus on In Vivo and In Vitro Studies. *Biomedicines* **2021**, *10*, 59, doi:10.3390/biomedicines10010059.
11. McCrory, C.; Berkman, L.F.; Nolan, H.; O'Leary, N.; Foley, M.; Kenny, R.A. Speed of Heart Rate Recovery in Response to Orthostatic Challenge. *Circulation Research* **2016**, *119*, 666–675, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308577.
12. Mandsager, K.T.; Robertson, D.; Diedrich, A. The Function of the Autonomic Nervous System during Spaceflight. *Clin Auton Res* **2015**, *25*, 141–151, doi:10.1007/s10286-015-0285-y.
13. Powers, J.; Bernstein, D. The Mouse as a Model of Cardiovascular Adaptations to Microgravity. *J Appl Physiol (1985)* **2004**, *97*, 1686–1692, doi:10.1152/japplphysiol.00925.2003.
14. Hargens, A.R.; Richardson, S. Cardiovascular Adaptations, Fluid Shifts, and Countermeasures Related to Space Flight. *Respir Physiol Neurobiol* **2009**, *169 Suppl 1*, S30-33, doi:10.1016/j.resp.2009.07.005.
15. Zhang, P.; Hamamura, K.; Yokota, H. A Brief Review of Bone Adaptation to Unloading. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2008**, *6*, 4–7, doi:10.1016/S1672-0229(08)60016-9.
16. Yamamoto, N.; Otsuka, K.; Kubo, Y.; Hayashi, M.; Mizuno, K.; Ohshima, H.; Mukai, C. Effects of Long-Term Microgravity Exposure in Space on Circadian Rhythms of Heart Rate Variability. *Chronobiol Int* **2015**, *32*, 327–340, doi:10.3109/07420528.2014.979940.
17. Chouchou, F.; Pichot, V.; Costes, F.; Guillot, M.; Barthélémy, J.-C.; Bertoletti, L.; Roche, F. Autonomic Cardiovascular Adaptations to Acute Head-out Water Immersion, Head-down Tilt and Supine Position. *Eur J Appl Physiol* **2020**, *120*, 337–347, doi:10.1007/s00421-019-04278-4.
18. Pavy-Le Traon, A.; Heer, M.; Narici, M.V.; Rittweger, J.; Vernikos, J. From Space to Earth: Advances in Human Physiology from 20 Years of Bed Rest Studies (1986-2006). *Eur J Appl Physiol* **2007**, *101*, 143–194, doi:10.1007/s00421-007-0474-z.
19. Pandiarajan, M.; Hargens, A.R. Ground-Based Analogs for Human Spaceflight. *Front Physiol* **2020**, *11*, 716, doi:10.3389/fphys.2020.00716.
20. Globus, R.K.; Morey-Holton, E. Hindlimb Unloading: Rodent Analog for Microgravity. *J Appl Physiol (1985)* **2016**, *120*, 1196–1206, doi:10.1152/japplphysiol.00997.2015.
21. Hawliczek, A.; Brix, B.; Al Mutawa, S.; Alsuwaidi, H.; Du Plessis, S.; Gao, Y.; Qaisar, R.; Siddiqui, R.; Elmoselhi, A.B.; Goswami, N. Hind-Limb Unloading in Rodents: Current Evidence and Perspectives. *Acta Astronautica* **2022**, *195*, 574–582, doi:10.1016/j.actaastro.2022.03.008.
22. Tsvirkun, D.; Bourreau, J.; Mieuset, A.; Garo, F.; Vinogradova, O.; Larina, I.; Navasiolava, N.; Gauquelin-Koch, G.; Gharib, C.; Custaud, M.-A. Contribution of Social Isolation, Restraint, and Hindlimb Unloading to Changes in Hemodynamic Parameters and Motion Activity in Rats. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e39923, doi:10.1371/journal.pone.0039923.
23. Hasser, E.M.; Moffitt, J.A. Regulation of Sympathetic Nervous System Function after Cardiovascular Deconditioning. *Ann N Y Acad Sci* **2001**, *940*, 454–468, doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03698.x.
24. Mueller, P.J.; Cunningham, J.T.; Patel, K.P.; Hasser, E.M. Proposed Role of the Paraventricular Nucleus in Cardiovascular Deconditioning. *Acta Physiologica Scandinavica* **2003**, *177*, 27–35, doi:10.1046/j.1365-201X.2003.01044.x.
25. Morey-Holton, E.R.; Globus, R.K. Hindlimb Unloading Rodent Model: Technical Aspects. *J Appl Physiol (1985)* **2002**, *92*, 1367–1377, doi:10.1152/japplphysiol.00969.2001.
26. Garg, P.; Strigini, M.; Peurière, L.; Vico, L.; Iandolo, D. The Skeletal Cellular and Molecular Underpinning of the Murine Hindlimb Unloading Model. *Front Physiol* **2021**, *12*, 749464, doi:10.3389/fphys.2021.749464.

27. van den Buuse, M.; Malpas, S.C. 24-Hour Recordings of Blood Pressure, Heart Rate and Behavioural Activity in Rabbits by Radio-Telemetry: Effects of Feeding and Hypertension. *Physiol Behav* **1997**, *62*, 83–89, doi:10.1016/s0031-9384(97)00145-5.
28. R: The R Project for Statistical Computing Available online: https://www.r-project.org/ (accessed on 26 August 2022).
29. Wickham, H. *Ggplot2*; Springer New York: New York, NY, 2009; ISBN 978-0-387-98140-6.
30. Cleveland, W.S.; Devlin, S.J. Locally Weighted Regression: An Approach to Regression Analysis by Local Fitting. *Journal of the American Statistical Association* **1988**, *83*, 596–610, doi:10.1080/01621459.1988.10478639.
31. Cornelissen, G. Cosinor-Based Rhythmometry. *Theoretical Biology and Medical Modelling* **2014**, *11*, 16, doi:10.1186/1742-4682-11-16.
32. Mutak, A. Cosinor2: Extended Tools for Cosinor Analysis of Rhythms 2018.
33. Sachs, M. Cosinor: Tools for Estimating and Predicting the Cosinor Model 2022.
34. Shaffer, F.; Ginsberg, J.P. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. *Frontiers in Public Health* **2017**, *5*.
35. Gauquelin, G.; Kazek, C.; Allevard, A.-M.; Garcin, R.; Bonnod, J.; Gutkowska, J.; Cantin, M.; Gharib, C. Early (1 to 24h) Plasma Atrial Natriuretic Factor Changes in the Rat during Antiorthostatic Hypokinetic Syspension. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1987**, *148*, 582–588, doi:10.1016/0006-291X(87)90916-8.
36. Antunes-Rodrigues, J.; Machado, B.H.; Andrade, H.A.; Mauad, H.; Ramalho, M.J.; Reis, L.C.; Silva-Netto, C.R.; Favaretto, A.L.; Gutkowska, J.; McCann, S.M. Carotid-Aortic and Renal Baroreceptors Mediate the Atrial Natriuretic Peptide Release Induced by Blood Volume Expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, *89*, 6828–6831, doi:10.1073/pnas.89.15.6828.
37. Shellock, F.G.; Swan, H.J.; Rubin, S.A. Early Central Venous Pressure Changes in the Rat during Two Different Levels of Head-down Suspension. *Aviat Space Environ Med* **1985**, *56*, 791–795.
38. Moffitt, J.A.; Grippo, A.J.; Beltz, T.G.; Johnson, A.K. Hindlimb Unloading Elicits Anhedonia and Sympathovagal Imbalance. *J Appl Physiol (1985)* **2008**, *105*, 1049–1059, doi:10.1152/japplphysiol.90535.2008.
39. Moffitt, J.A.; Henry, M.K.; Welliver, K.C.; Jepson, A.J.; Garnett, E.R. Hindlimb Unloading Results in Increased Predisposition to Cardiac Arrhythmias and Alters Left Ventricular Connexin 43 Expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2013**, *304*, R362–R373, doi:10.1152/ajpregu.00391.2012.
40. Greening, G.J.; Miller, K.P.; Spainhour, C.R.; Cato, M.D.; Muldoon, T.J. Effects of Isoflurane Anesthesia on Physiological Parameters in Murine Subcutaneous Tumor Allografts Measured via Diffuse Reflectance Spectroscopy. *Biomed. Opt. Express, BOE* **2018**, *9*, 2871–2886, doi:10.1364/BOE.9.002871.
41. Rose, A.; Steffen, J.M.; Musacchia, X.J.; Mandel, A.D.; Sonnenfeld, G. Effect of Antiorthostatic Suspension on Interferon-Alpha/Beta Production by the Mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* **1984**, *177*, 253–256, doi:10.3181/00379727-177-41939.
42. Musacchia, X.J.; Fagette, S. Weightlessness Simulations for Cardiovascular and Muscle Systems: Validity of Rat Models. *J Gravit Physiol* **1997**, *4*, 49–59.
43. Foley, C.M.; Mueller, P.J.; Hasser, E.M.; Heesch, C.M. Hindlimb Unloading and Female Gender Attenuate Baroreflex-Mediated Sympathoexcitation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2005**, *289*, R1440-1447, doi:10.1152/ajpregu.00356.2005.
44. Mueller, P.J.; Sullivan, M.J.; Grindstaff, R.R.; Cunningham, J.T.; Hasser, E.M. Regulation of Plasma Vasopressin and Renin Activity in Conscious Hindlimb-Unloaded Rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2006**, *291*, R46-52, doi:10.1152/ajpregu.00622.2005.

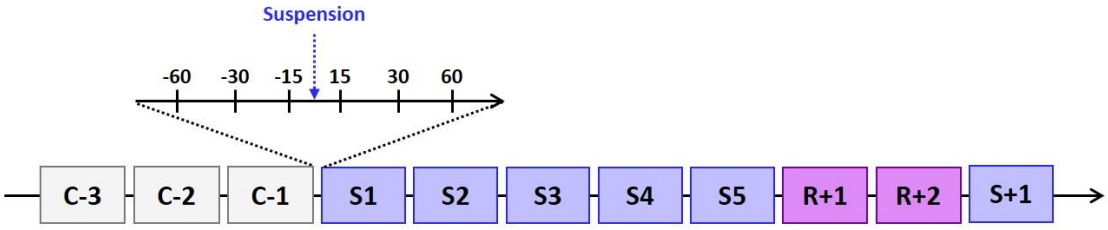
45. Fagette, S.; Lo, M.; Gharib, C.; Gauquelin, G. Cardiovascular Variability and Baroreceptor Reflex Sensitivity over a 14-Day Tail Suspension in Rats. *J Appl Physiol (1985)* **1995**, *78*, 717–724, doi:10.1152/jappl.1995.78.2.717.
46. Gordon, C.J. The Mouse Thermoregulatory System: Its Impact on Translating Biomedical Data to Humans. *Physiology & Behavior* **2017**, *179*, 55–66, doi:10.1016/j.physbeh.2017.05.026.
47. Ripperger, J.A.; Jud, C.; Albrecht, U. The Daily Rhythm of Mice. *FEBS Letters* **2011**, *585*, 1384–1392, doi:10.1016/j.febslet.2011.02.027.
48. Shimatani, H.; Inoue, Y.; Maekawa, Y.; Miyake, T.; Yamaguchi, Y.; Doi, M. Thermographic Imaging of Mouse across Circadian Time Reveals Body Surface Temperature Elevation Associated with Non-Locomotor Body Movements. *PLOS ONE* **2021**, *16*, e0252447, doi:10.1371/journal.pone.0252447.
49. Gaskill, B.N.; Gordon, C.J.; Pajor, E.A.; Lucas, J.R.; Davis, J.K.; Garner, J.P. Impact of Nesting Material on Mouse Body Temperature and Physiology. *Physiol Behav* **2013**, *110–111*, 87–95, doi:10.1016/j.physbeh.2012.12.018.
50. Stahn, A.C.; Werner, A.; Opatz, O.; Maggioni, M.A.; Steinach, M.; von Ahlefeld, V.W.; Moore, A.; Crucian, B.E.; Smith, S.M.; Zwart, S.R.; et al. Increased Core Body Temperature in Astronauts during Long-Duration Space Missions. *Sci Rep* **2017**, *7*, 16180, doi:10.1038/s41598-017-15560-w.
51. Kickhefel, A.; Rosenberg, C.; Weiss, C.R.; Rempp, H.; Roland, J.; Schick, F.; Hosten, N. Clinical Evaluation of MR Temperature Monitoring of Laser-Induced Thermotherapy in Human Liver Using the Proton-Resonance-Frequency Method and Predictive Models of Cell Death. *J Magn Reson Imaging* **2011**, *33*, 704–712, doi:10.1002/jmri.22499.
52. Eggenberger, P.; Bürgisser, M.; Rossi, R.M.; Annaheim, S. Body Temperature Is Associated With Cognitive Performance in Older Adults With and Without Mild Cognitive Impairment: A Cross-Sectional Analysis. *Front Aging Neurosci* **2021**, *13*, 585904, doi:10.3389/fnagi.2021.585904.
53. Wong, C.P.; Iwaniec, U.T.; Turner, R.T. Evidence for Increased Thermogenesis in Female C57BL/6J Mice Housed Aboard the International Space Station. *npj Microgravity* **2021**, *7*, 1–4, doi:10.1038/s41526-021-00150-y.
54. Agarwal, R. Regulation of Circadian Blood Pressure—From Mice to Astronauts. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **2010**, *19*, 51–58, doi:10.1097/MNH.0b013e3283336ddb.
55. Makino, M.; Hayashi, H.; Takezawa, H.; Hirai, M.; Saito, H.; Ebihara, S. Circadian Rhythms of Cardiovascular Functions Are Modulated by the Baroreflex and the Autonomic Nervous System in the Rat. *Circulation* **1997**, *96*, 1667–1674, doi:10.1161/01.CIR.96.5.1667.
56. Flynn-Evans, E.E.; Barger, L.K.; Kubey, A.A.; Sullivan, J.P.; Czeisler, C.A. Circadian Misalignment Affects Sleep and Medication Use before and during Spaceflight. *npj Microgravity* **2016**, *2*, 1–6, doi:10.1038/npjmgrav.2015.19.
57. Tahimic, C.G.T.; Paul, A.M.; Schreurs, A.-S.; Torres, S.M.; Rubinstein, L.; Steczina, S.; Lowe, M.; Bhattacharya, S.; Alwood, J.S.; Ronca, A.E.; et al. Influence of Social Isolation During Prolonged Simulated Weightlessness by Hindlimb Unloading. *Frontiers in Physiology* **2019**, *10*.
58. Zhai, B.; Fu, J.; Xiang, S.; Shang, Y.; Yan, Y.; Yin, T.; Zhang, T. Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Ameliorates Recognition Memory Impairment Induced by Hindlimb Unloading in Mice Associated with BDNF/TrkB Signaling. *Neuroscience Research* **2020**, *153*, 40–47, doi:10.1016/j.neures.2019.04.002.
59. Buckey, J.C.; Phillips, S.D.; Anderson, A.P.; Chepko, A.B.; Archambault-Leger, V.; Gui, J.; Fellows, A.M. Microgravity-Induced Ocular Changes Are Related to Body Weight. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **2018**, *315*, R496–R499, doi:10.1152/ajpregu.00086.2018.
60. Thireau, J.; Zhang, B.L.; Poisson, D.; Babuty, D. Heart Rate Variability in Mice: A Theoretical and Practical Guide: Heart Rate Variability in Mice. *Experimental Physiology* **2008**, *93*, 83–94, doi:10.1113/expphysiol.2007.040733.

61. Rossi, A.; Dikareva, A.; Bacon, S.L.; Daskalopoulou, S.S. The Impact of Physical Activity on Mortality in Patients with High Blood Pressure: A Systematic Review. *J Hypertens* **2012**, *30*, 1277–1288, doi:10.1097/HJH.0b013e3283544669.
62. Reimers, A.K.; Knapp, G.; Reimers, C.-D. Effects of Exercise on the Resting Heart Rate: A Systematic Review and Meta-Analysis of Interventional Studies. *J Clin Med* **2018**, *7*, 503, doi:10.3390/jcm7120503.
63. Tabibzadeh, S. CircadiOmic Medicine and Aging. *Ageing Res Rev* **2021**, *71*, 101424, doi:10.1016/j.arr.2021.101424.
64. Breus, T.K.; Cornélissen, G.; Halberg, F.; Levitin, A.E. Temporal Associations of Life with Solar and Geophysical Activity. *Annales Geophysicae* **1995**, *13*, 1211–1222, doi:10.1007/s00585-995-1211-8.
65. Andreatta, G.; Tessmar-Raible, K. The Still Dark Side of the Moon: Molecular Mechanisms of Lunar-Controlled Rhythms and Clocks. *J Mol Biol* **2020**, *432*, 3525–3546, doi:10.1016/j.jmb.2020.03.009.
66. Rutovskaya, M. ;V.; Kosyreva, A.M.; Diatroptov, M.E. Ultradian and Infradian Rhythms in the Dynamic of Testosterone Concentration in the Serum of the White-Breasted Hedgehog Erinaceus Roumanicus. *Sci Rep* **2020**, *10*, 6334, doi:10.1038/s41598-020-63399-5.
67. Coyne, M.D.; Kesick, C.M.; Doherty, T.J.; Kolka, M.A.; Stephenson, L.A. Circadian Rhythm Changes in Core Temperature over the Menstrual Cycle: Method for Noninvasive Monitoring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2000**, *279*, R1316-1320, doi:10.1152/ajpregu.2000.279.4.R1316.
68. Kauffman, A.S.; Hoffmann, H.M. Editorial: Hormone Release Patterns in Mammals. *Mol Cell Endocrinol* **2020**, *507*, 110781, doi:10.1016/j.mce.2020.110781.
69. Blum, I.D.; Zhu, L.; Moquin, L.; Kokoeva, M.V.; Gratton, A.; Giros, B.; Storch, K.-F. A Highly Tunable Dopaminergic Oscillator Generates Ultradian Rhythms of Behavioral Arousal. *eLife* **2014**, *3*, e05105, doi:10.7554/eLife.05105.
70. Baik, J.-H. Stress and the Dopaminergic Reward System. *Exp Mol Med* **2020**, *52*, 1879–1890, doi:10.1038/s12276-020-00532-4.
71. Sudevan, S.; Muto, K.; Higashitani, N.; Hashizume, T.; Higashibata, A.; Ellwood, R.A.; Deane, C.S.; Rahman, M.; Vanapalli, S.A.; Etheridge, T.; et al. Loss of Physical Contact in Space Alters the Dopamine System in C. Elegans. *iScience* **2022**, *25*, 103762, doi:10.1016/j.isci.2022.103762.
72. Popova, N.K.; Kulikov, A.V.; Kondaurova, E.M.; Tsybko, A.S.; Kulikova, E.A.; Krasnov, I.B.; Shenkman, B.S.; Bazhenova, E.Yu.; Sinyakova, N.A.; Naumenko, V.S. Risk Neurogenes for Long-Term Spaceflight: Dopamine and Serotonin Brain System. *Mol Neurobiol* **2015**, *51*, 1443–1451, doi:10.1007/s12035-014-8821-7.
73. Otsuka, K.; Izumi, R.; Ishioka, N.; Ohshima, H.; Mukai, C. Chronomics of Heart Rate Variability on Earth and in Space. *Respir Physiol Neurobiol* **2009**, *169 Suppl 1*, S69-72, doi:10.1016/j.resp.2009.02.003.
74. Diatroptov, M.E.; Diatroptova, M.A. Association of Infradian Rhythms of Motor Activity, Concentration of Glucocorticoid Hormones, and One-Minute-Step Oscillations of Body Temperature with Intensity of Fluctuations of Secondary Cosmic Rays. *Bull Exp Biol Med* **2022**, *172*, 592–597, doi:10.1007/s10517-022-05443-0.
75. Heer, M.; Paloski, W.H. Space Motion Sickness: Incidence, Etiology, and Countermeasures. *Auton Neurosci* **2006**, *129*, 77–79, doi:10.1016/j.autneu.2006.07.014.

(B) Résultats complémentaires - Télémétrie

Analyse de la réponse immédiate une heure après la suspension

Les paramètres hémodynamiques indirectement régulé par le SNA, tels que la PA et la FC, ainsi que les marqueurs indirects de son activité, déterminée par la VFC, ont été analysés après 15, 30 et 60 minutes de suspension, afin d'évaluer l'adaptation immédiate à la suspension. De plus, les facteurs pouvant influer ces paramètres, tels que l'activité locomotrice et la température ont également été analysés. Les 5 premières minutes post-suspension ont été exclues de l'analyse en raison des biais liés à l'anesthésie gazeuse.



Dans un premier temps, les paramètres hémodynamiques ont été analysés (FIGURE 34). Nos résultats indiquent que la suspension induit une augmentation immédiate de la PA moyenne (PAM, FIGURE 34 A), la PA systolique (PAS, FIGURE 34 B) et la PA diastolique (PAD, FIGURE 34 C) dès les 30 premières minutes. En effet, en comparaison au 15 dernières minutes de contrôle (-15), il y a une augmentation de 12 % de la PAM (30, 123.8 ± 7.4 mmHg vs -15, 111.0 ± 12.0 mmHg, ***p<0.01*) et de 13 % pour la PAD (30, 96.0 ± 13.7 mmHg vs -15, 108.1 ± 10.9 mmHg, ***p<0.01*) après de 30 minutes de suspension. De plus, dès les 15 premières minutes de suspension, il est retrouvé une augmentation significative de la PAS (15, 139.8 ± 8.3 mmHg, ****p<0.001*), persistante après 30 (30, 140.5 ± 7.4 mmHg, ****p<0.001*) à 60 minutes de suspension (60, 138.5 ± 8.3 mmHg, ****p<0.001*), en comparaison au contrôle (-15, 125.7 ± 12.8 mmHg). Parallèlement, nos résultats indiquent une diminution significative de la FC dès les 15 premières minutes de suspension. La FC a été déterminée de deux manière, elle a été d'une part déterminée à partir des signaux de pression (FIGURE 34 E) et d'autre part, à l'aide des électrodes ECG (FIGURE 34 D). En effet, la FC démontre une diminution significative de 9 % au bout de 15 minutes de suspension (15, 543.4 ± 62.2 bpm, **p<0.05*) en comparaison aux valeurs de la pré-suspension (-15, 598.8 ± 42.6 bpm) (FIGURE 34 E). Cette bradycardie est stabilisée au bout des 30 premières minutes, ne présentant pas de différence avec le contrôle.

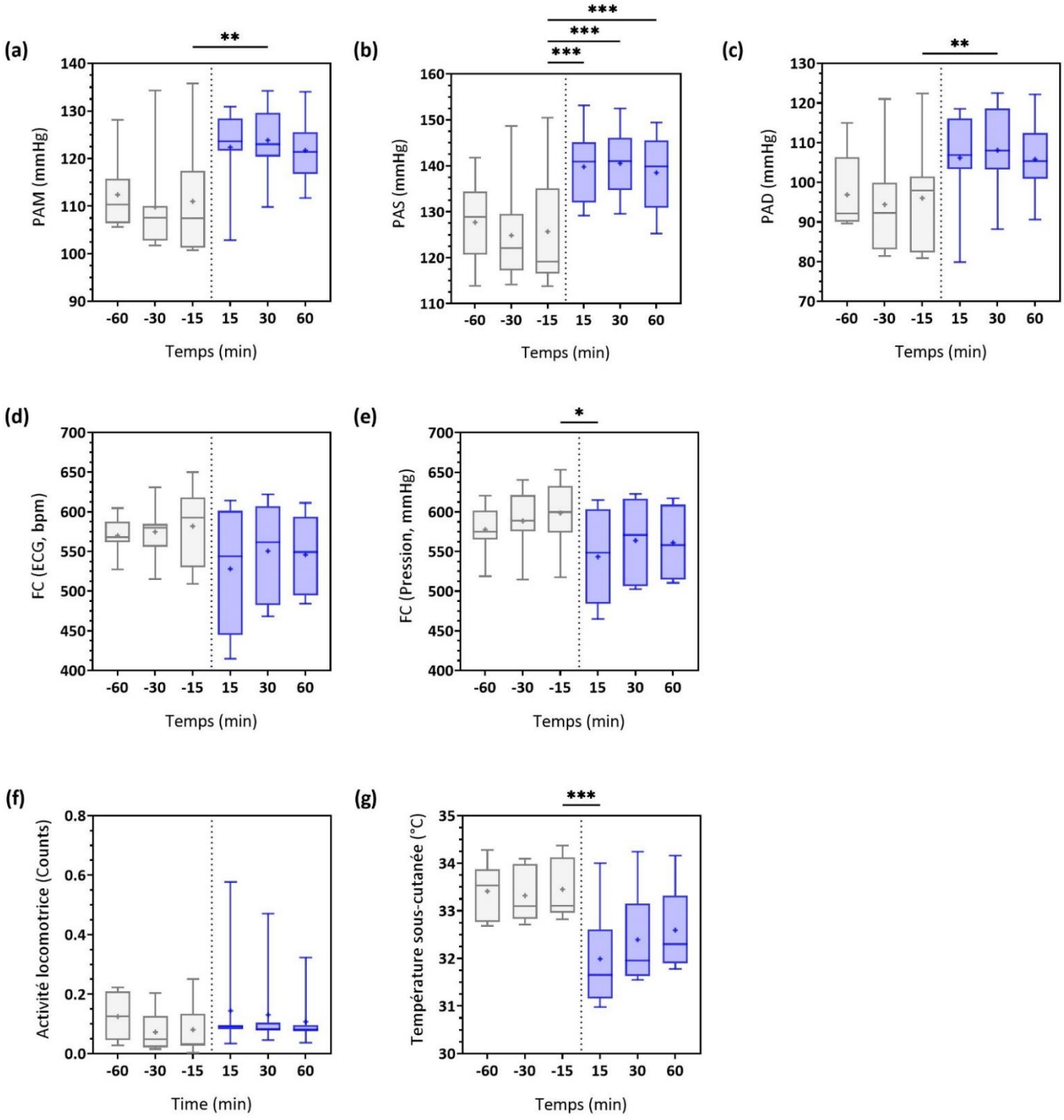


Figure 34. Variations immédiates des variables hémodynamiques et physiologiques avant et après 15, 30 et 60 minutes de suspension.

*Box plot representant les variations de la pression artérielle **(a)** moyenne (PAM, mmHg), **(b)** systolique (PAS, mmHg) et **(c)** diastolique (PAD, mmHg), de la fréquence cardiaque **(d)** déterminée à partir de l'ECG et **(e)** calculée à partir des signaux de pression (FC, bpm), **(f)** de l'activité locomotrice (Counts) et de **(g)** la température sous-cutanée (°C). Les variables ont été analysées avant (boites grises) et après la suspension (boites bleues) à 15, 30 et 60 minutes. Les données ont été moyennées pour 1 minutes puis pour chaque période. Les 5 premières minutes post-suspension ont été exclues de l'analyse afin de limiter le biais en raison de l'anesthésie gazeuse.*p<0.05, **p<0.01 et ***p<0.001 pour la différence avec la condition contrôle à -15 minutes avant la suspension (n=8 souris).*

De plus, il n'est pas observé de modifications significatives de l'activité locomotrice après la suspension (FIGURE 34 F), probablement en raison des grands écart-types, en raison d'un stress des souris d'être attachées et aussi, d'une souris ayant une activité très élevée. En effet, cette souris a une activité moyenne de 0.576 ± 0.257 counts après 15 minutes de suspension, en comparaison aux valeurs moyennes des autres (0.087 ± 0.090 counts pour n=7 souris) et à son activité avant la suspension (-15, 0.031 ± 0.0759 counts). Enfin, nos résultats indiquent une diminution significative de la température sous-cutanée (FIGURE 34 G) dès les 15 premières minutes (15, 31.99 ± 1.01 °C vs -15, 33.45 ± 0.63 °C, ****p<0.001*), revenant à des valeurs comparables au contrôle dès les 30 minutes de suspension.

Dans un deuxième temps, afin d'évaluer la modulation autonome de l'activité cardiaque en réponse au modèle de microgravité simulée, la VFC a été analysée (FIGURE 35). Il est important de noter que les index de l'analyse de la VFC n'ont pas été déterminés à partir de l'analyse précise d'une période stable de l'ECG de 3 minutes, dénouée d'artéfacts. En effet, les résultats ici ont été directement moyennées par minute puis par période (15, 30 et 60 minutes) comme pour les autres variables. D'une part, les index du domaine fréquentiel, tels que l'énergie dans les basses fréquences (LF) l'énergie dans les hautes fréquences (HF), ainsi que l'index sympathique (LF/HF) ont été déterminé (FIGURE 35 A-C). Tout d'abord, nos résultats indiquent que la suspension ne provoque pas de modification initiale du LF normalisé, considéré comme un indice du tonus sympathique et parasympathique cardiaque, du HF normalisé, ne reflétant que la composante parasympathique, ainsi que de l'index sympathique, malgré une tendance à l'augmentation les 15 premières minutes de suspension pour ce dernier paramètre (ns, *p=0.31*). D'autre part, les index du domaine temporel, tels que le SDNN et le RMSSD, sont représentés dans la FIGURE 35 D et E. Il est observé une augmentation du SDNN, représentant la variabilité autonome globale, après 15 minutes de suspension (15, 69.32 ± 79.07 ms, **p<0.05*) en comparaison au contrôle (-15, 17.26 ± 17.19 ms). De plus, le RMSSD, reflétant l'activité vagale uniquement, ne présente pas de modification significative après la suspension, en revanche, une tendance vers l'augmentation est observée après 15 minutes de suspension (ns, *p=0.08*).

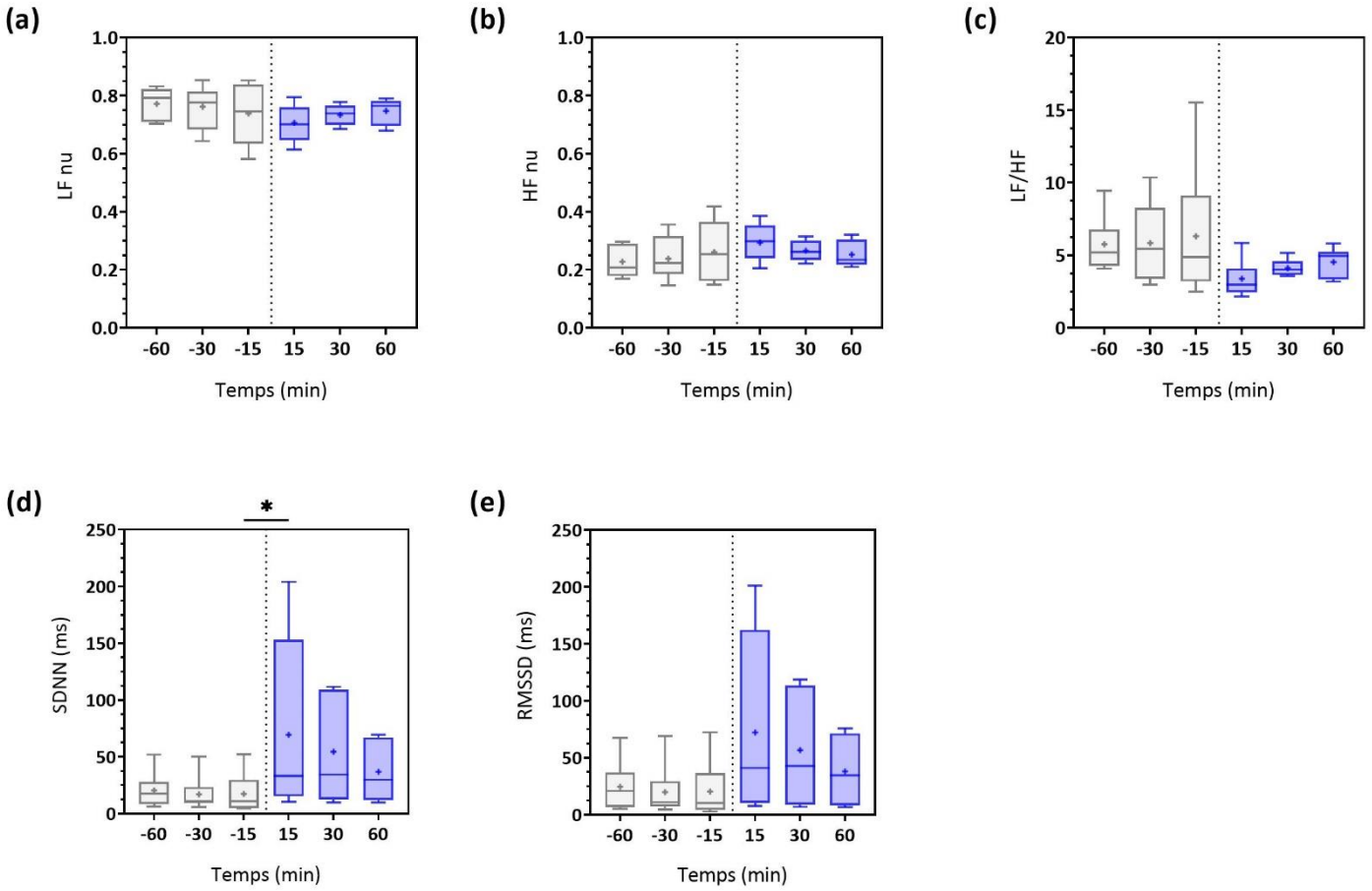
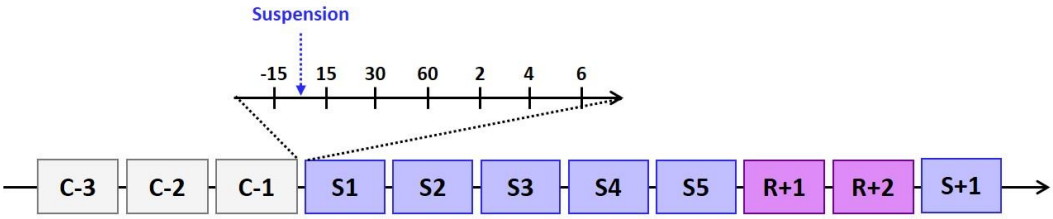


Figure 35. Variations immédiates des index fréquentiels et temporels de la variabilité de la fréquence cardiaque, avant et après 15, 20 et 30 minutes de suspension. *Box plot representant les varations des index du domaine fréquentiel tels que* ***(a)*** *le LF normalisé (LF nu),* ***(b)*** *le HF normalisé (HF nu),* ***(c)*** *la balance sympathovagale (LF/HF), et des index du domaine temporel,* ***(d)*** *le SDNN (ms) et* ***(e)*** *le RMSSD (ms). Les variables ont été analysées avant (boites grises) et après la suspension (boites bleues) à 15, 30 et 60 minutes. Les données ont été moyennées pour 1 minutes puis pour chaque période. Les 5 premières minutes post-suspension ont été exclues de l'analyse afin de limiter le biais en raison de l'anesthésie gazeuse.*p<0.05 pour la différence avec la condition contrôle à -15 minutes avant la suspension (n=8 souris).*

Analyse de la réponse immédiate quelques heures après la suspension

Afin de compléter l'analyse précédente, les variables mesurées ont également été analysées après 2 heures, 4 heures et 6 heures de post-suspension (FIGURE 36).



Comme présenté dans la partie précédente, la suspension provoque une augmentation immédiate de la PAM (***p<0.01*), de la PAS (***p<0.01*) et de la PAD (**p<0.05*), dès les 30 la première de suspension (FIGURE 36 A-C). Cette augmentation persiste jusqu'à la première heure de suspension pour la PAM (**p<0.05*) et PAS (**p<0.05*), avant de revenir à des valeurs normales, comparables au contrôle, après 2 heures de suspension. En ce qui concerne la FC (FIGURE 36 E), la suspension induit une bradycardie significative pendant les 15 premières minutes par rapport au contrôle (**p<0.05*). La FC ensuite se stabilise, jusqu'à présenter une nouvelle diminution significative de 10 % à 6 heures post-suspension (-15, 598.8 ± 42.6 bpm vs, 6, 540.6 ± 37.9 bpm, **p<0.05*). L'activité locomotrice et la température sous-cutanée ne présentent pas de différence avec la période contrôle après 2, 4 ou 6 heures de suspension (FIGURE 36 F-G). En revanche, il est observé une tendance à la diminution pour l'activité locomotrice, en passant d'une moyenne de 0.083 ± 0.056 counts après 2 heures jusqu'à une moyenne de 0.039 ± 0.024 counts après 6 heures de suspension, par rapport au contrôle (-15, 0.080 ± 0.085 counts). La température sous-cutanée, qui présentait une diminution significative dès les 15 premières minutes de suspension (****p<0.001*), semble se stabilisée, ne présentant pas de différence avec la période contrôle, mais démontre une tendance à la diminution.

Note : Les tests statistiques ici sont différents de ceux réalisées dans la partie précédente, en raison du nombre de condition plus élevé et de l'absence de normalité pour chaque variable (test non paramétrique).

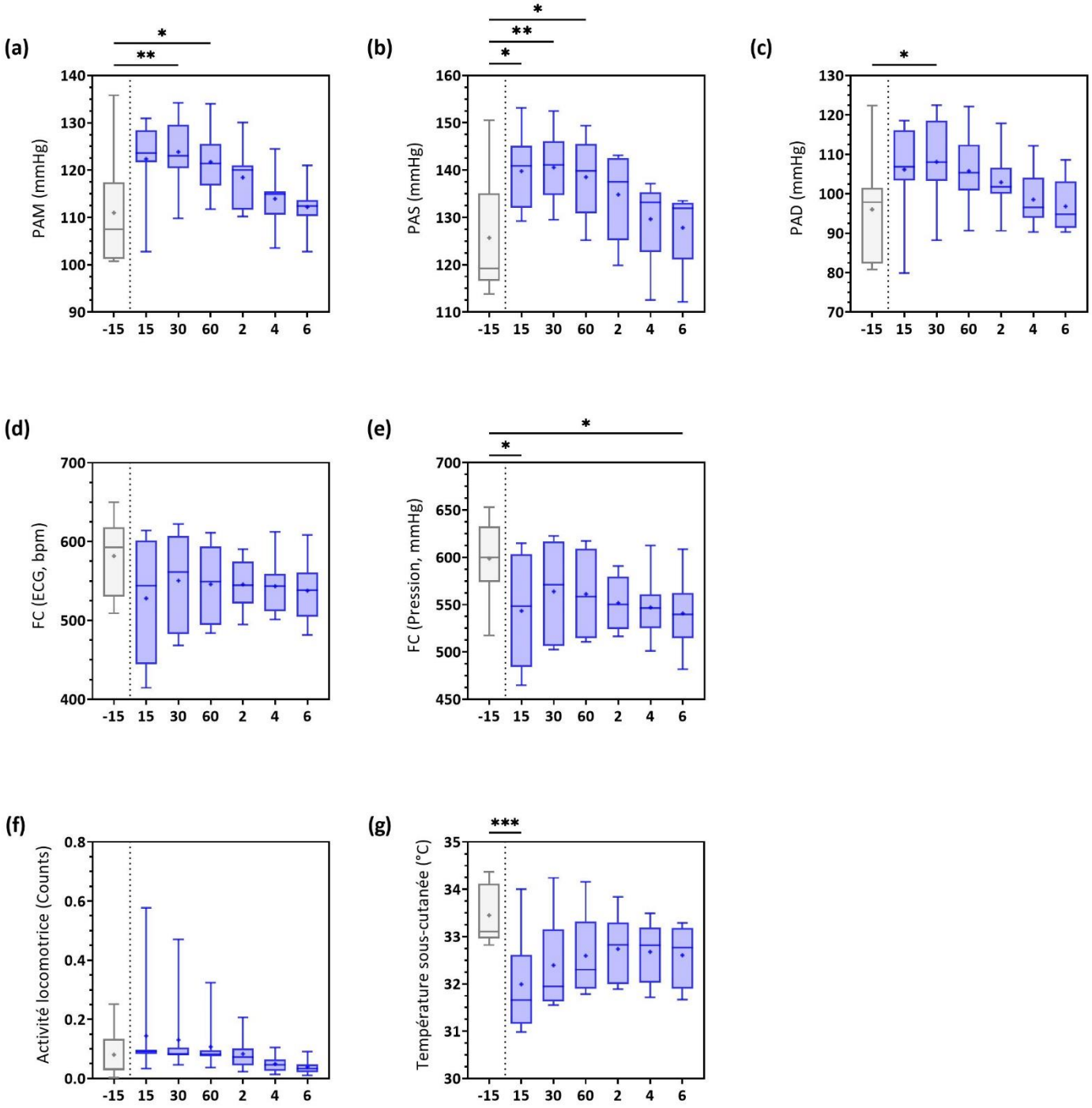
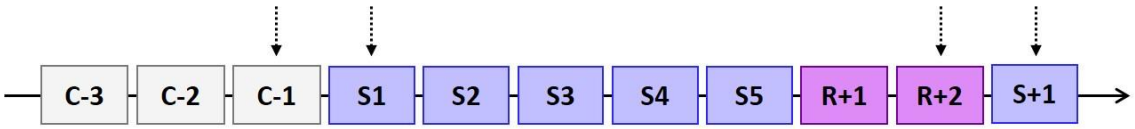


Figure 36. Adaptation immédiate des variables hémodynamiques et physiologiques après 15, 30, 60 minutes, 2 heures, 4 heures et 6 heures de suspension.

*Box plot representant les variations de la pression artérielle **(a)** moyenne (PAM, mmHg), **(b)** systolique (PAS, mmHg) et **(c)** diastolique (PAD, mmHg), de la fréquence cardiaque **(d)** déterminée à partir de l'ECG et **(e)** calculée à partir des signaux de pression (FC, bpm), **(f)** de l'activité locomotrice (Counts) et de **(g)** la température sous-cutanée (°C). Les variables ont été analysées 15 minutes avant (boite grise) et après la suspension (boites bleues) à 15, 30 et 60 minutes puis à 2, 4 et 6 heures. Les données ont été moyennées pour 1 minutes puis pour chaque période. Les 5 premières minutes post-suspension ont été exclues de l'analyse afin de limiter le biais en raison de l'anesthésie gazeuse.*p<0.05, **p<0.01 et ***p<0.001 pour la différence avec la condition contrôle à -15 minutes avant la suspension (n=8 souris, sauf pour l'activité, n=7 souris en raison d'un outlier).*

Analyse de la suspension et de la re-suspension

Dans la réalisation de notre protocole expérimental de microgravité simulée chez la souris, nous avons réalisé une seconde suspension d'un jour. Cette re-suspension a été réalisée après les deux jours de récupération, afin d'évaluer si les paramètres mesurés s'adaptent de la même manière à un nouveau stress.



Réponse immédiate

L'aaptation immédiate a été évaluée pour la <u>première heure</u> suivant la suspension (S1) ou la re-suspension (S+1), en comparaison au dernier jour de contrôle (C-1) ou de récupération (R+2) (FIGURE 37). A la suspension, nos résultats indiquent qu'il y a une augmentation significative de la PAM (S1, 121.7 ± 6.7 mmHg vs C-1, 112.4 ± 7.4 mmHg), de la PAS (S1, 138.5 ± 8.3 mmHg vs C-1, 127.7 ± 8.9 mmHg) et de la PAD (S1, 105.8 ± 9.4 mmHg vs C-1, 96.87 ± 9.9 mmHg), en comparaison au contrôle (*$p<0.05$). A la re-suspension, il n'est pas observé de différence avec la récupération (R+2) et le contrôle (C-1), malgré une tendance à l'augmentation en comparaison à R+2 (FIGURE 37 A-C). En ce qui concerne les variations immédiates de la FC, nos résultats ne montrent pas de différence significative, ni entre le contrôle et la suspension, ni entre la récupération et la re-suspension. En outre, nos résultats indiquent une diminution significative à la re-suspension (S+1, 495.5 ± 62.5 bpm, **$p<0.01$) en comparaison au contrôle (C-1, 569.8 ± 23.0 bpm). Malgré qu'elle présente un profil similaire, la FC calculée à partir des signaux de pression (FIGURE 37 D) ne présentent pas de différence avec le contrôle pour chaque condition. L'activité locomotrice (FIGURE 37 F) ne présente pas de différence entre la condition contrôle et la suspension. Par contre, elle présente une diminution significative à la re-suspension (S+1, 0.043 ± 0.036 Counts, #$p<0.05$) en comparaison à la récupération (R+2, 0.136 ± 0.108 Counts). En revanche, il est important de noter, qu'une très grande variabilité inter- et intra-individuelle est observée, avec des valeurs minimales et maximales très dispersées à S1 (0.037 et 0.323 Counts, respectivement) et à R+2 (0.050 et 0.389 Counts, respectivement). La température sous-cutanée, quant à elle, ne présente aucune différence pour chaque condition, malgré une tendance à la diminution entre C-1 et S1 (C1, 33.41 ± 0.60 °C vs S1, 32.59 ± 0.87 °C, *ns, $p=0.08$*) (FIGURE 37 G).

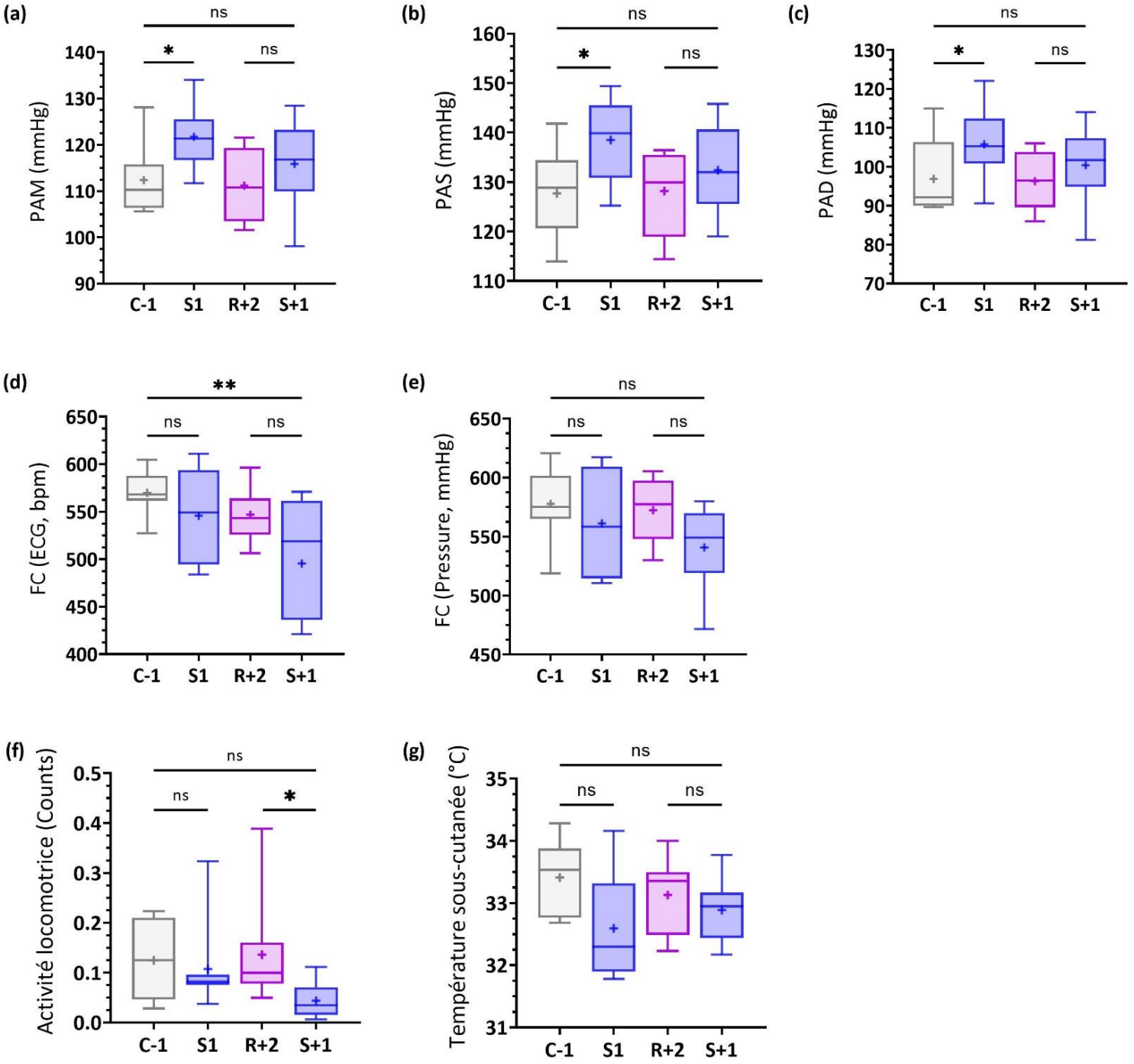


Figure 37. Variations immédiates des variables hémodynamiques avant et après la suspension et la re-suspension. *Histogramme representant les variations de la pression artérielle* ***(a)*** *moyenne (PAM, mmHg),* ***(b)*** *systolique (PAS, mmHg) et* ***(c)*** *diastolique (PAD, mmHg), de la fréquence cardiaque* ***(d)*** *déterminée à partir de l'ECG et* ***(e)*** *calculée à partir des signaux de pression (FC, bpm),* ***(f)*** *de l'activité locomotrice (Counts) et de* ***(g)*** *la température sous-cutanée (°C). Les variables ont été analysées pour le dernier jour de contrôle (C-1, barre grise), le premier jour de suspension (S1, barre bleue), le deuxième jour de récupération (R+2, barre violette) et le jour de re-suspension (S+1, barre bleue). Les données ont été moyennées pour 1 minutes puis pour 60 minutes, et les 5 premières minutes post-suspension ont été exclues de l'analyse. *p<0.05 et **p<0.01 pour la différence avec le contrôle C-1 et la récupération R+2 (n=8 souris).*

Réponse après 24 heures de suspension et de re-suspension

Paramètres hémodynamiques et physiologiques

Les variations par jour, pour une moyenne de 23 heures (l'heure entre 10 et 11 heures a été exclue de l'analyse), ont également été déterminées pour les mêmes conditions. Ici, seules les variations de la PAS et de la PAD, de la FC calculée à partir des électrodes ECG, de l'activité locomotrice, de la température sous-cutanée et centrale sont présentées dans la FIGURE 38. Seules les comparaisons avec C-1 et R+2 sont représentées.

D'une part, nos résultats indiquent qu'il n'y a pas de différence significative de la PAS entre S1 et C-1 et entre S+1 et R+2. En revanche, en comparaison à C-1 (133.7 ± 6.9 mmHg), il est retrouvé une diminution significative de 3 % à R+2 (129.1 ± 6.4 mmHg, ****p<0.001*) et à S+1 (129.9 ± 5.8 mmHg, ****p<0.001*). De plus, il est retrouvé une diminution significative entre S1 (134.1 ± 5.3 mmHg) et R+2 (**p<0.05*) ainsi qu'à S+1 (***p<0.01*). La PAD présente un profil similaire à la PAS, puisqu'il est retrouvé une diminution significative de 5 % à R+2 (96.9 ± 6.2 mmHg, ****p<0.001*) et à S+1 (96.3 ± 4.8 mmHg, ****p<0.001*) en comparaison à C-1 (101.5 ± 6.3 mmHg), mais il n'y a pas de différence avec S1 (S1, 98.9 ± 3.6 mmHg, *ns*). Aussi, nos résultats ne montrent pas de différence entre R+2 et S+1, mais il est retrouvé une significative entre S1 et S+1 (****p<0.001*) (FIGURE 38 A-B). D'autre part, la suspension provoque une diminution marquée de la FC. En effet, il est retrouvé une réduction significative de 13 % de la fréquence cardiaque à S1 (497.2 ± 25.7 bpm, ****p<0.001*) en comparaison à C-1 (570.5 ± 22.2 bpm). Les valeurs de la FC à R+2 sont plus élevées par rapport à S1 (550.3 ± 23.5 bpm, ****p<0.001*), mais présentent toujours une diminution significative de 4 % par rapport à C-1. Concernant la re-suspension (S+1, 442.9 ± 52.2 bpm), une réponse similaire est observée, de manière plus marquée qu'à S1, puisqu'une réduction de 22 % est retrouvée en comparaison à C-1 (****p<0.001*) et de 20 % par rapport à R+2 (****p<0.001*). Cette diminution est aussi significative à S1 (****p<0.001*) (FIGURE 38 C). La suspension, ainsi que la re-suspension, induisent une nette diminution significative de l'activité locomotrice, de 87 % à S1 (0.034 ± 0.036 Counts, ****p<0.001*) et de 78 % à S+1 (0.059 ± 0.043 Counts, ***p<0.01*) par rapport au contrôle (C-1, 0.266 ± 0.188 Counts). Cette diminution est également marquée entre S+1 et R+2 (0.220 ± 0.158 Counts, **p<0.05*) (FIGURE 38 D).

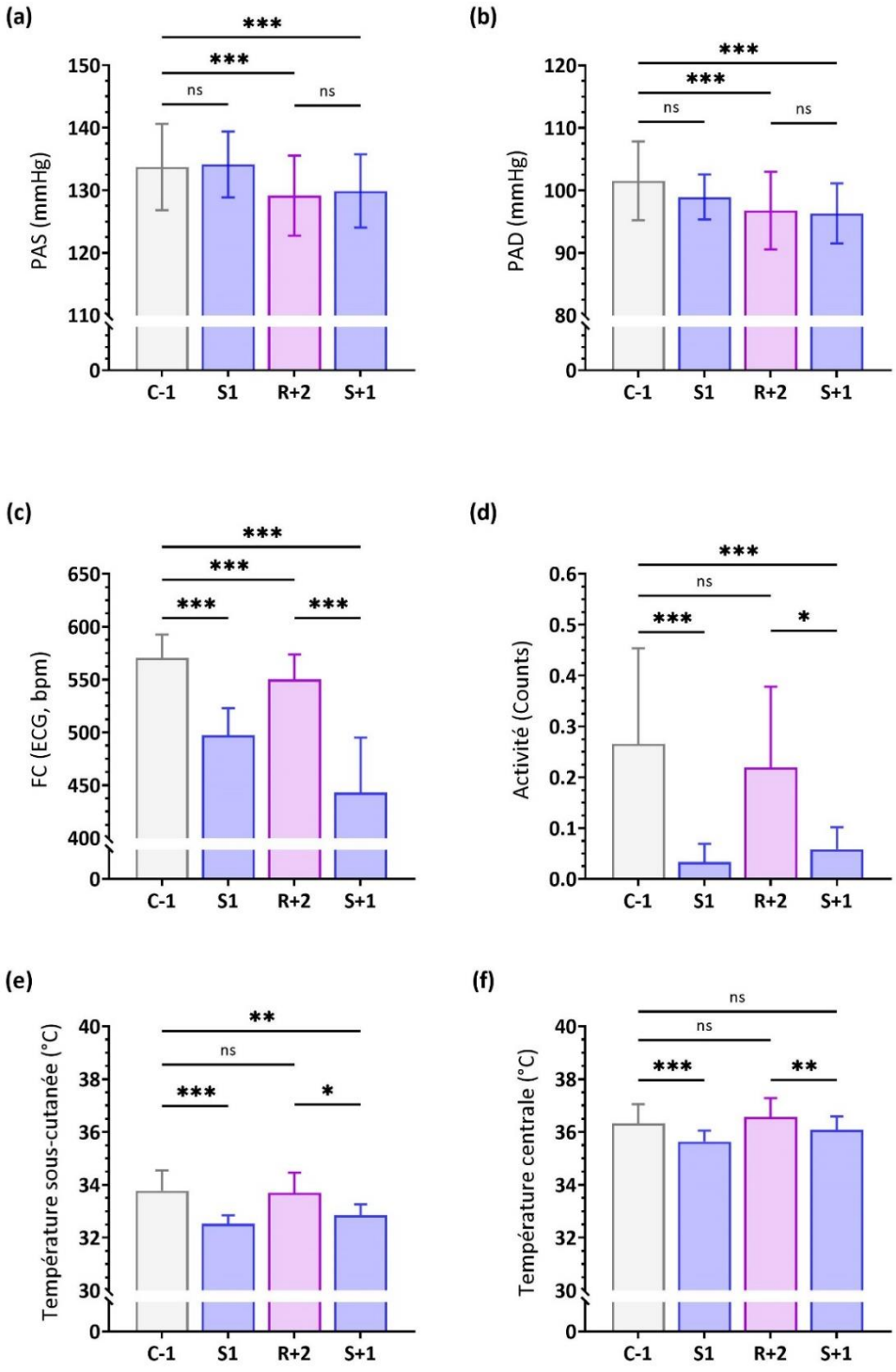


Figure 38. Variations sur 24 heures des variables hémodynamiques et physiologiques à la suspension et à la re-suspension.

*Histogramme representant les variations de **(a)** la pression artérielle systolique (PAS, mmHg) et **(b)** diastolique (PAD, mmHg), **(c)** de la fréquence cardiaque déterminée à partir de l'ECG, **(d)** de l'activité locomotrice (Counts), de **(e)** la température sous-cutanée et **(f)** centrale (°C). Les variables ont été analysées pour le dernier jour de contrôle (C-1, barre grise), le premier jour de suspension (S1, barre bleue), le deuxième jour de récupération (R+2, barre violette) et le jour de re-suspension (S+1, barre bleue). Les données sont exprimées pour 24 heures ± SD. Les valeurs à 10 heures ont été exclues. *p<0.05, **p<0.01 et ***p<0.001 pour la différence avec C-1, S1 et R+2 (n=8 souris sauf pour la température centrale, n=6).*

Enfin, la suspension provoque également une faible réduction de la température sous-cutanée, avec une diminution significative de 4 % à S1 (32.53 ± 0.32 °C, ****p<0.001*) et de 3 % à S+1 (32.86 ± 0.41 °C, ***p<0.01*) en comparaison à C-1 (33.78 ± 0.77 °C). Il n'y a pas de différence entre C-1 et R+2 (33.70 ± 0.77 °C), mais celle-ci est retrouvée entre R+2 et S+1 (**p<0.05*). Des résultats similaires sont retrouvées pour la température centrale, puisqu'une diminution de 2 % est retrouvée à S1 (35.64 ± 0.42 °C, ****p<0.001*), comparée à C-1 (36.34 ± 0.72 °C). Egalement, une diminution significative est retrouvée à S+1 (36.08 ± 0.51 °C, ***p<0.01*) par rapport à R+2 (36.57 ± 0.71 °C) (FIGURE 38 E-F).

Paramètres du SNA cardiovasculaire

L'activité du SNA cardiovasculaire a également été déterminée, grâce à l'analyse de la VFC selon la méthode décrite dans le « Matériels et Méthodes » (page 86).

Nos résultats indiquent que la suspension provoque une augmentation significative du SDNN par rapport au contrôle (S1, 9.30 ± 2.65 ms vs C-1, 5.01 ± 1.07, **p<0.05*). Un effet similaire est observé lors de la re-suspension en comparaison à la récupération (S+1, 7.26 ± 2.26 ms vs R+2, **p<0.05*). Il n'y a pas de différence entre C-1, R+2 et S+1 (FIGURE 39 A). Concernant le RMSSD, il est également observé une augmentation significative à S1 (10.1 ± 6.21 ms, **p<0.05*) en comparaison à C-1 (3.03 ± 0.812 ms), mais cette réponse n'est pas observée à S+1, qui ne présente pas de différence significative par rapport à C-1 ou à R+2 (FIGURE 39 B). En ce qui concerne les marqueurs du SNA cardiovasculaire du domaine fréquentiel, tels que le LF, le HF et le ratio LF/HF, nos résultats ne montrent pas de différence entre les quatre conditions. Notons que le LF et le HF en puissance spectrale (ms^2) présentent une grande variabilité ce qui diminue la fiabilité de ces résultats. De plus, nous pouvons observer que, lors de la suspension S1, le LF normalisé tend à la diminution et que le HF normalisé tend à l'augmentation, ainsi que cette réponse n'est pas retrouvée à la re-suspension S+1. Enfin, on peut observer une tendance à la diminution du ratio LF/HF à la suspension et à la re-suspension (FIGURE 39 C-G).

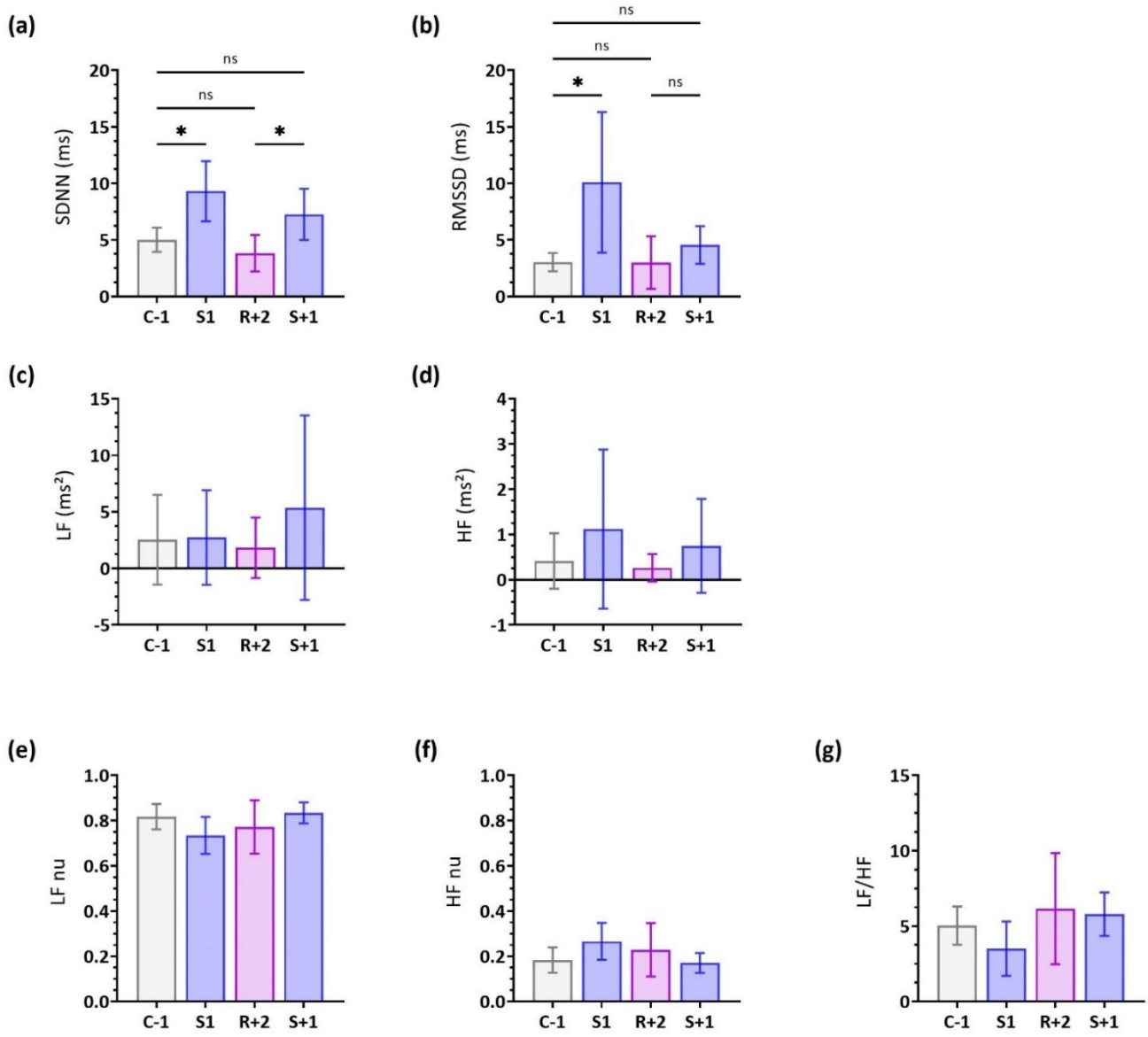


Figure 39. Variations sur 24 heures des index de la variabilité de la fréquence cardiaque à la suspension et à la re-suspension. *L'analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque a été réalisée pour déterminer les marqueurs du domaine temporel :* ***(a)*** *l'écart type de tous les intervalles R-R normaux (SDNN, en ms),* ***(b)*** *les différences quadratiques moyennes des intervalles RR successifs (RMSSD, en ms) ; et les marqueurs du domaine fréquentiel : les basses fréquences (LF) en* ***(c)*** *valeurs absolues de puissance (ms²) et en* ***(e)*** *unité normalisée, les hautes fréquences (HF) en* ***(d)*** *valeurs absolues de puissance (ms²) et en* ***(f)*** *unité normalisée, et* ***(g)*** *la balance sympathovagale (LF/HF). Ces index ont été déterminés pour des segments de 3 minutes, en triplicat, 20 heures après chaque condition, entre 8 et 10 heures le lendemain. Encart : contrôle (C-1, barre grise), premier jour de suspension (S1, barre bleue), deuxième jour de récupération (R+2, barre violette) et re-suspension (S+1, barre bleue). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD. (n = 7, One-way ANOVA).*

Etude de la corrélation entre les variables mesurées

Corrélogramme

La matrice de corrélations potentielles entre les variables mesurées a été tracée, afin d'observer si les mesures effectuées sont pertinentes et corrélées. La corrélation entre les variables est représentée sous forme d'ellipse et sous forme de coefficients de corrélation dans la FIGURE 40. Plus l'ellipse est foncée et se rapproche du bleu, plus la corrélation est forte et positive (proche de 1). En revanche, plus l'ellipse est claire et tend vers le rouge, plus la corrélation est faible et négative (proche de -1).

De manière attendue, les variables dérivées de la PA, telles que la pression systolique, diastolique et moyenne, qui sont corrélés positivement. La corrélation est élevée, puisqu'elle est proche de 1, se situant entre 0.78 et 0.94. De même, les variables +dP/dt et -dP/dt, déterminées également à partir des signaux de PA, étant complémentaires, sont fortement corrélées de manière positive. La température et l'activité locomotrice sont également positivement corrélés, avec un coefficient de variations de 0.75, signifiant que ces deux variables ont une influence l'un sur l'autre. Par exemple, une activité élevée entraine une augmentation de la température, alors qu'au contraire, une diminution de l'activité peut entrainer la diminution de la température. Les signaux de la FC, directement déterminés à partir des électrodes ECG de l'implant et calculé à partir des signaux de pression artérielle, sont corrélés positivement avec une valeur faible de 0.59, ce qui signifie que ces variables sont proches et peuvent être utiliser la détermination de la FC, même si la mesure à l'aide de l'ECG est plus fiable. De plus, les variables dérivées et calculées à partir de la fréquence cardiaque mesurée à l'aide de l'ECG, telles que l'intervalle RR, le QRS et l'intervalle QT, démontrent des corrélations négatives avec la fréquence cardiaque, avec des coefficients de -0.31, -0.46 et -0.27 respectivement. Ceci est normal puisque plus la FC diminue, plus ces variables telles que l'intervalle RR, augmentent.

Les variables mesurées par radio-télémétrie sont corrélées et robustes. En effet, les variables dérivées de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque sont très corrélées, ce qui signifie que ces mesures sont reproductibles et fiables. Enfin, il est intéressant d'observer que la température et l'activité sont dépendantes l'une de l'autre, ce qui nous permet de mieux comprendre les réponses obtenues dans notre modèle.

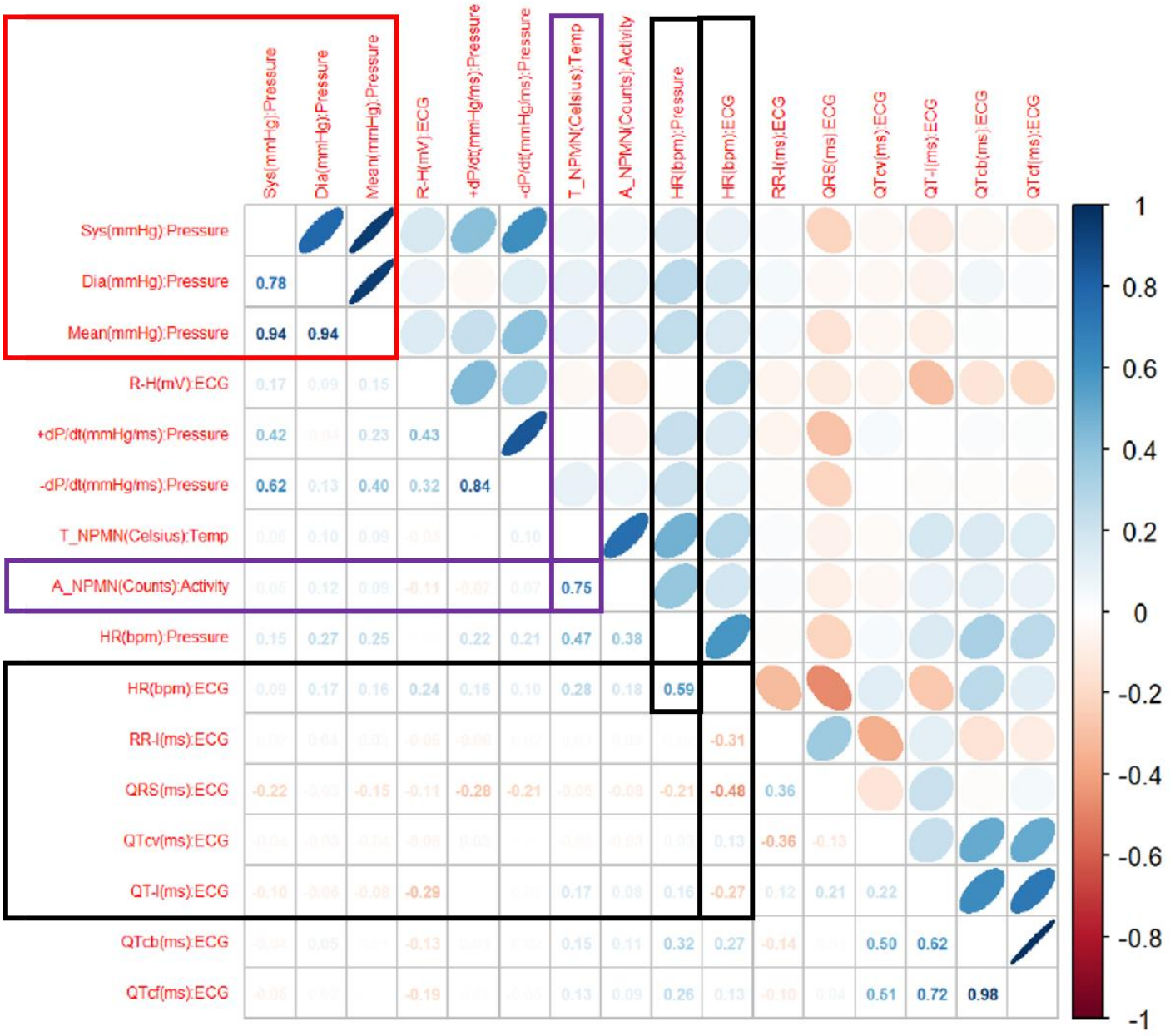


Figure 40. Corrélogramme des variables quantitatives.
(Source : Sébastien Déjean)

(C) Etude des variations de la pression intracrânienne

Un des objectifs de ce projet était d'étudier la cinétique des variations potentielles de la PIC en condition de microgravité simulée, et son impact éventuel sur les paramètres du SNA, et plus précisément, du SNS. Dans cette partie, nous avons tenté de mesurer d'une part, la PV jugulaire, qui est un indicateur indirect des variations de la PIC, et d'autre part, les variations directes de la PIC, par télémétrie.

Mesure de la pression de la veine jugulaire supérieure par télémétrie

Nous avons dans un premier temps évaluer les variations de la pression de la veine jugulaire supérieure chez nos souris. En effet, il est établi que l'augmentation supposée de la PIC serait favorisée par la diminution du retour veineux objectivée au niveau de la veine jugulaire et de la diminution de réabsorption du liquide céphalo-rachidien, lors des vols spatiaux (Norsk, 2020). Pour réaliser cette mesure, 5 souris ont été équipées des implants télémétriques HD-X11, utilisés précédemment pour la mesure de la PA carotidienne. Afin de mesurer la PV, le cathéter de pression a été introduit dans la veine jugulaire supérieure. Le protocole expérimental précédemment utilisé comprenant 10 jours d'enregistrement en continu avec 5 jours de suspension à -30° a été réalisé, les conditions expérimentales ont été exactement les mêmes.

La FIGURE 41, illustre deux types d'enregistrement : d'un côté, un enregistrement normal de la PA, d'un autre côté, l'enregistrement de la PV que nous avons obtenu dans notre modèle. Malheureusement, les signaux de pression des 5 souris démontrent beaucoup d'artéfacts, de bruit de fond, avec une ligne de base de pression très faible.

Lorsque les données sont extraites du logiciel d'acquisition, à raison d'une valeur moyennée par heure pour chaque souris (FIGURE 42), nous observons d'une part, la présence de valeurs moyennes aberrantes de la pression veineuse, avec des valeurs allant de 50 à 100 mmHg, et d'autres part, un grand manque de valeurs, en raison de ces artéfacts

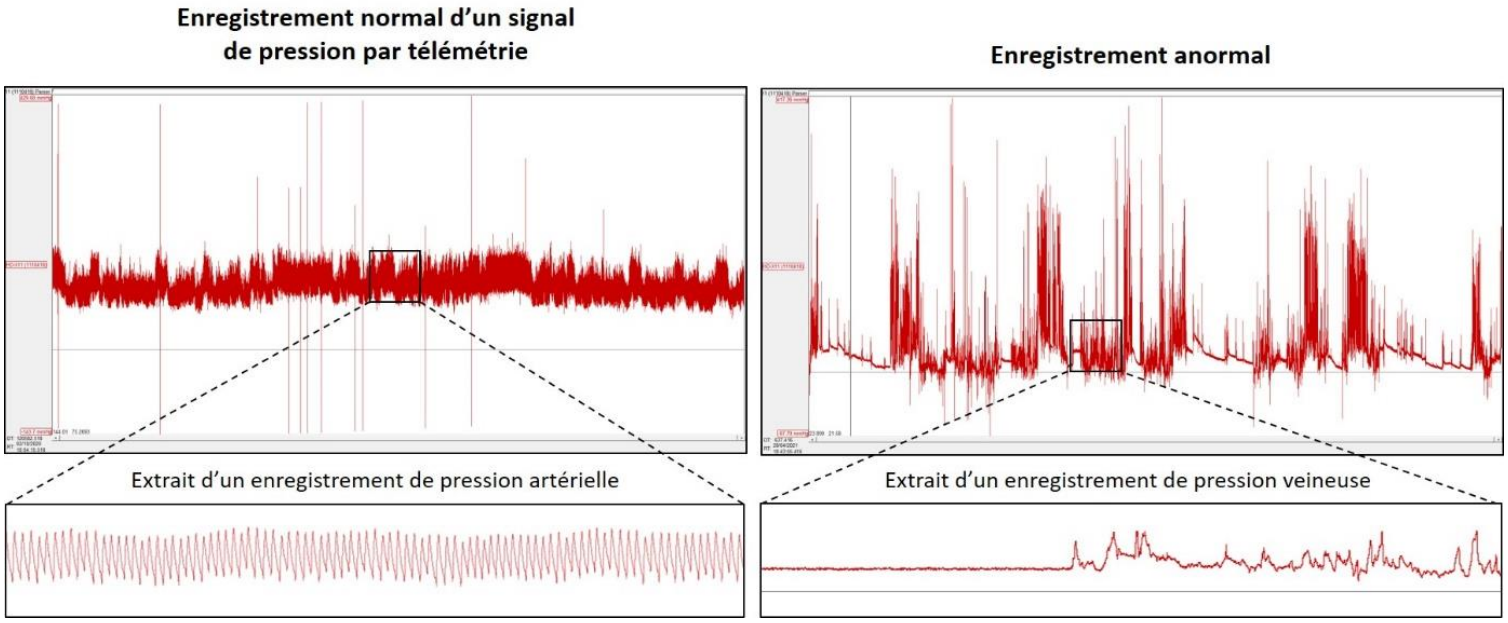


Figure 41. Extrait d'un enregistrement normal et anormal des signaux de pression mesurés par télémétrie.
Représentation de deux signaux de la pression artérielle (mmHg) en fonction du temps chez la souris.

Table format: XY		X	Group A				
		Time (hours)	NPMN(mmHg):Pressure				
		X	1110418	826-367	1077138	1077140	839-427
169	Title	7	21.1700	25.3100	4.0147	20.8990	13.0490
170	Title	8	102.0000	17.9740	3.0861	11.9450	9.7650
171	Title	9	103.0000	16.5360	0.6863	9.9961	8.8791
172	Title	*10**	*102.0000**	*19.6410**	*4.5115**	*21.1420**	*11.4510**
173	Title	11	98.0000			14.5370	
174	S5	12	98.0000	48.8130		14.0630	
175	Title	13	100.0000			15.7520	
176	Title	14	99.0000			11.6330	
177	Title	15	98.0000	67.2950		8.5969	
178	Title	16	103.0000	51.3400		10.0480	
179	Title	17	99.0000			11.2630	
180	Title	18	98.0000	50.7080		15.0660	
181	Title	19	91.0000	65.8070		18.6350	
182	Title	20	92.0000	50.6040		21.0470	
183	Title	21	92.0000	73.4210	2.0132	13.3380	
184	Title	22	94.0000	39.0850	7.6948	24.4450	
185	Title	23	94.0000		2.7367	7.2187	
186	Title	24	94.0000	51.6800	11.7150	21.3630	
187	Title	1	103.0000	58.7090	2.8349	10.6670	
188	Title	2	100.0000	46.1250	0.7186	18.5440	
189	Title	3	98.0000		3.2282	9.4108	
190	Title	4	103.0000	68.1940	8.1171	15.0930	82.8120
191	Title	5	94.0000	53.5300	1.1052	16.1090	
192	Title	6	99.0000		7.5467	27.8640	10.3520

Figure 42. Extrait d'un tableau des valeurs de la pression veineuse mesurée par radiotélémétrie chez les souris vigile pendant le protocole expérimental de microgravité.

Malgré l'absence de nombreuses valeurs et la présence d'un grand nombre d'artéfacts, nous avons établi la courbe de variations des variations de pression veineuse pendant toute la durée du protocole (FIGURE 43). Nous pouvons facilement distinguer les différentes phases du protocole, avec des valeurs plus faibles et une variabilité moindre pendant la suspension (S1 à S5 ; S+1) par rapport aux périodes de contrôle et de récupération (C-3 à C-1 et R+1/R+2). En revanche, selon la période de contrôle et de récupération, il est observé beaucoup de variabilité, en raison de données aux valeurs aberrantes ou manquantes.

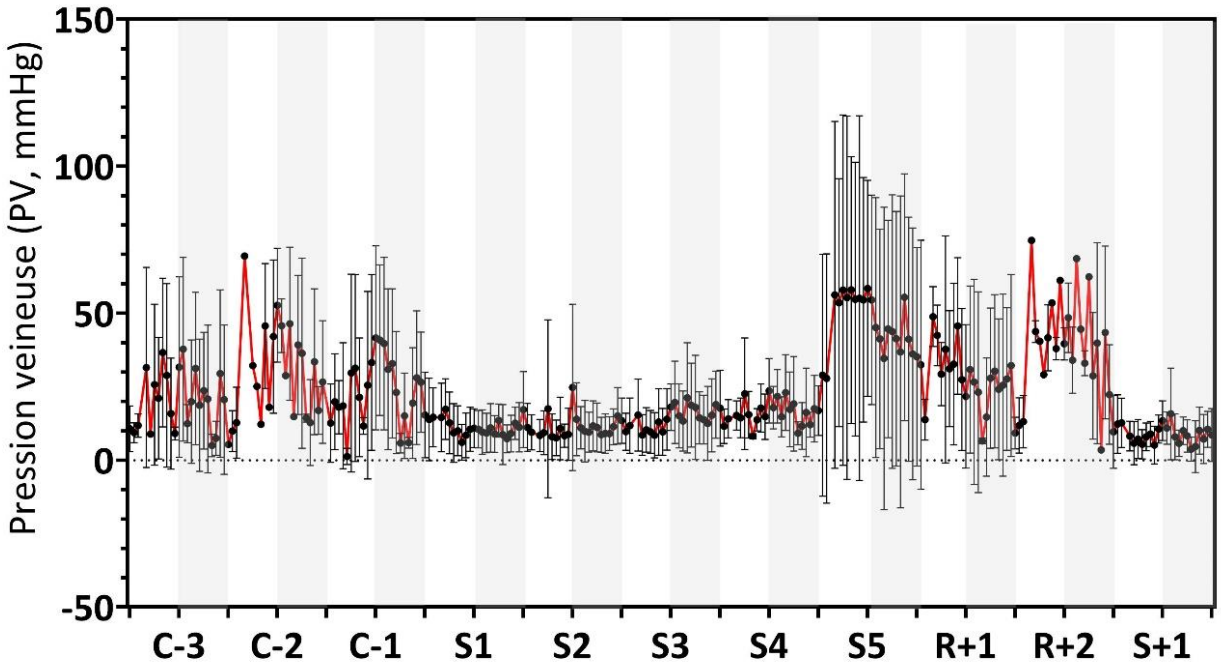


Figure 43. Variations de la pression veineuse avant (C-3 à C-1), pendant (S1 à S5 ; S+1) et après la suspension (R+1 et R+2).

Courbe representant les variations de la pression veineuse (courbe rouge) ont été mesurées par télémétrie chez la souris vigiles. Les barres blanches et grises représentent les cycles de lumière (de 7 heures à 19 heures) et d'obscurité (de 19 heures à 7 heures), respectivement. Les valeurs sont moyennées pour 1 heure ± SD pour n=5 souris.

Mesure de la pression intracrânienne par télémétrie

Dans un deuxième temps, nous avons souhaité évaluer les variations directes de la PIC chez la souris vigile dans le modèle de suspension, à l'aide des implants télémétriques. Cette technique est très peu utilisée notamment chez la souris, le plus souvent chez le plus gros animal tel que le lapin ou le rat, et sur animal anesthésié en procédure dite « aiguë ». C'est pourquoi, un certain nombre de mises au point ont dû être réalisées dans notre modèle afin de mesurer en continu la PIC chez la souris vigiles. Les différentes mises au point de la procédure expérimentale seront présentées comme suit : mise au point de la procédure chirurgicale, test avec les implants vides, test sur la souris.

Mise au point de la procédure chirurgicale

Afin de mesurer les variations directes de la PIC, nous avons utilisé les implants HD-X11 (DSI) qui ont été utilisés précédemment pour la mesure de la PA et de la PV. Comme expliqué, la procédure d'utilisation de ces implants a dû être optimisée pour la mesure de la PIC par télémétrie et pour la souris. Dans un premier temps, une revue de la littérature a été réalisée afin de déterminer un protocole adapté pour la chirurgie et l'équipement de la souris. Comme illustré sur la FIGURE 44, le cathéter de pression de l'implant a été inséré au niveau de l'os pariétal gauche à environ 2 mm latéral et 2 mm postérieur de bregma, au niveau de l'espace sous-dural, comme décrit dans la littérature (Silasi et al., 2009).

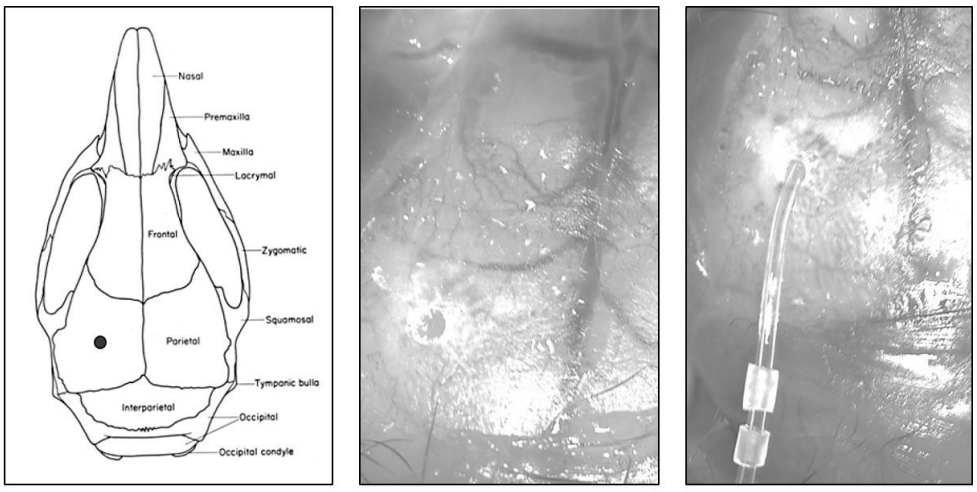


Figure 44. Chirurgie d'implantation du cathéter de pression pour la mesure de la pression intracrânienne. *Schéma représentant le crâne d'un rongeur avec la zone percée pour l'insertion du cathéter (cercle noir, à gauche), suivi de deux photographies montrant le trou (au centre) puis l'insertion du cathéter (à droite).*

Après plusieurs essais et plusieurs problèmes d'hémorragies, de nombreuses colles ont été testées afin de sécuriser le cathéter et de le fixer sur la boite crânienne, allant de la colle physiologique (Kwik Sil, WPI) à chirurgicale (Vetbond 3M®, WPI ; Lin et Liu, 2010), jusqu'à une colle qui se solidifie à l'UV (colle Bondic®) que nous avons retenu en étant la plus efficace. Le cathéter est un peu "plié" pour entrer dans la boite crânienne, pour éviter que le léger déplacement du cerveau à l'intérieur de la boite crânienne lié à la suspension ne perturbe la mesure et, à l'extérieur de la boite crânienne, et suivre ensuite la courbe du crâne pour ne pas soulever la peau à ce niveau. La peau de la tête a ensuite été suturée. Les électrodes pour la mesure de l'ECG de l'implant ont également été placées, puis l'implant a été placé en sous-cutanée pour la mesure de la température corporelle. Une fois que les animaux ont récupéré et ne présentent aucun signe de souffrance apparent, les implants télémétriques et l'enregistrement ont été lancé afin de visualiser s'il y avait la présence de signal de pression.

Essai de mesure de la PIC sur des souris implantées

Afin de vérifier que le cathéter de pression est correctement placé, que l'implant fonctionne correctement, nous avons enregistré les variables mesurées (PIC, FC, T°C) pendant 10 minutes avec la souris à 0° (à plat), 10 minutes en inclinaison à -30° et enfin 10 minutes à 0° (FIGURE 45).

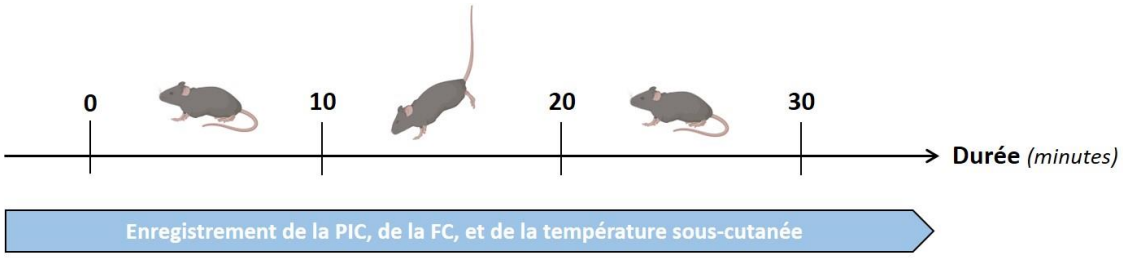


Figure 45. Design expérimental des essais réalisés chez la souris inclinée à -30° pour la mesure de la pression intracrânienne à l'aide de l'implant télémétrique.
L'inclinaison de la souris à -30° a été effectuée pendant 10 minutes, précédée et suivie d'une période de contrôle à 0° de 10 minutes.

Les valeurs attendues de la pression intracrânienne sont comprises entre 5 et 15 mmHg en condition normale. Comme il est décrit dans la littérature, la migration des fluides corporelles en microgravité induirait une augmentation de la PIC, nous nous attendions à une augmentation de la PIC a des valeurs supérieures à 15 mmHg.

Exemple pour une souris.

Avant la suspension (0°), la PIC moyenne était de 3.5 mmHg. Cette valeur est faible mais reste normale. De manière surprenante lors de l'inclinaison à -30°, la PIC moyenne est descendue à des valeurs négatives allant de -3 voire -6 mmHg. La FC et la température ont également diminuées, en étant en moyenne à 360 bpm pour la FC. Lorsque la souris a été remise à 0°, les valeurs de la PIC ont augmenté et sont revenues immédiatement aux valeurs de base, à des valeurs positives, c'est-à-dire à environ 3.5 mmHg. La FIGURE 46 montre les variations de la FC, de la température et de la pression lorsque la souris est à 0° et lorsqu'elle est à -30°. Lorsque la souris est inclinée à -30°, la FC et la température diminue. Les variations de pression, quant à elles, ne montrent pas de différence distinctes par rapport à la situation à 0°.

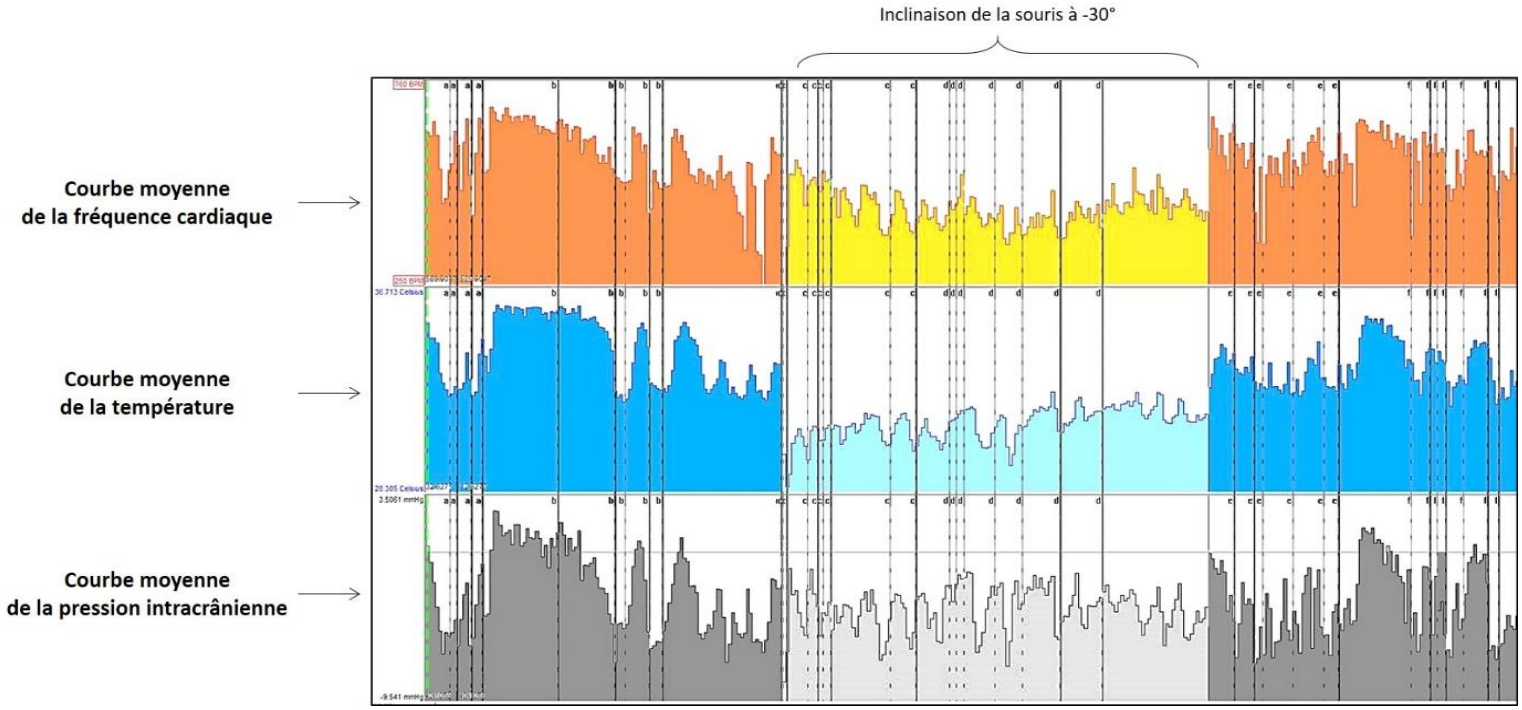


Figure 46. Variations de la fréquence cardiaque, de la température sous-cutanée et de la pression intracrânienne, avant, pendant et après l'inclinaison à -30°.
Les variations de la fréquence cardiaque (orange), de la température sous-cutanée (bleu) et de la pression (gris) ont été mesurés par télémétrie chez la souris en position à 0° (couleur foncée) et à -30° (couleur claire).

En observant les résultats obtenus et en analysant plus précisément les signaux, nous avons soulevé différents points :

1. **La pression semble très corrélée à la température (**FIGURE 47**)**

- Est-ce que l'extrémité du cathéter est obstrué ? Si oui, la pression risque de varier en fonction des mouvements et de la température
- Est-ce que la diminution et/ou l'augmentation de la température entraine une dilatation ou une compression du fluide présent dans le cathéter induisant les variations de pression que l'on observe ?

2. **Le signal de pression semble très sensible aux artéfacts de mouvement (**FIGURE 48**)**

- Le signal de pression semble comporter une composante posturale, car comme on peut le voir dans la figure, lorsqu'il y a une composante artéfactuelle lors de mouvements ou en lien avec les changements de température par exemple, la pression présente également cet artéfact et semble plus diminuée

3. **Les fluctuations du signal de pression ne semblent pas synchronisées avec l'ECG (**FIGURE 48**)**

- Il y a plus de cycles cardiaques que de cycle sur le signal de pression
- Le signal de pression ressemble au signal atypique de la PIC
- En revanche, les variations que l'on observe sont peut-être liées aux cycles respiratoires de la souris

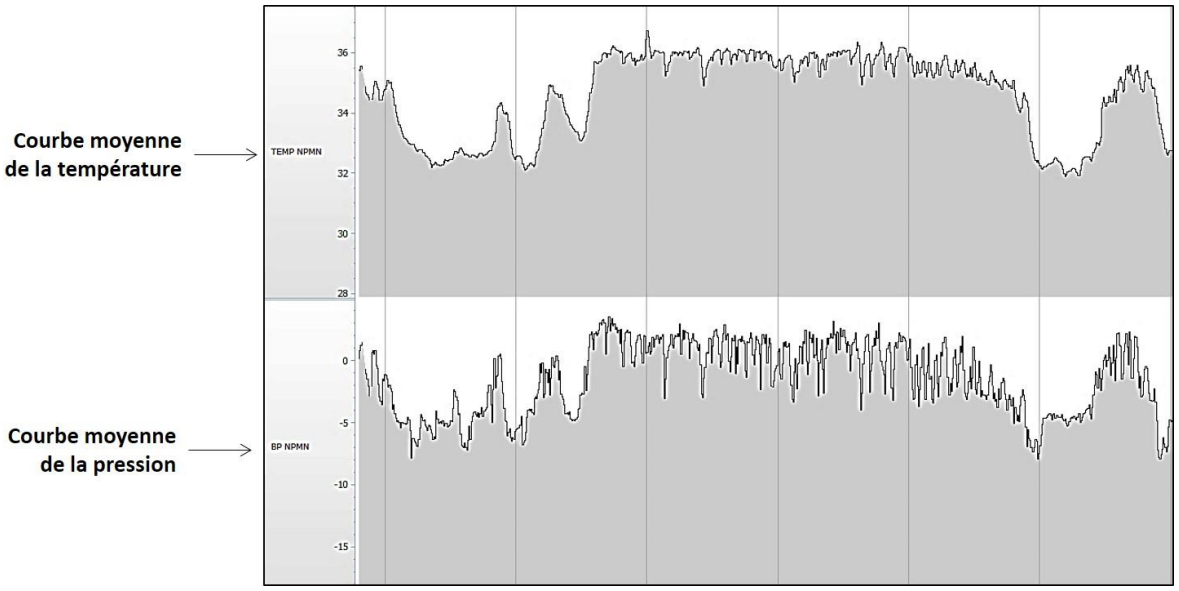


Figure 47. Variations moyennes de la température sous-cutanée et de la pression intracrânienne mesurée par télémétrie chez la souris.
Courbes des variotions moyennes de la température sous-cutanée et de la pression intracrânienne en fonction du temps.

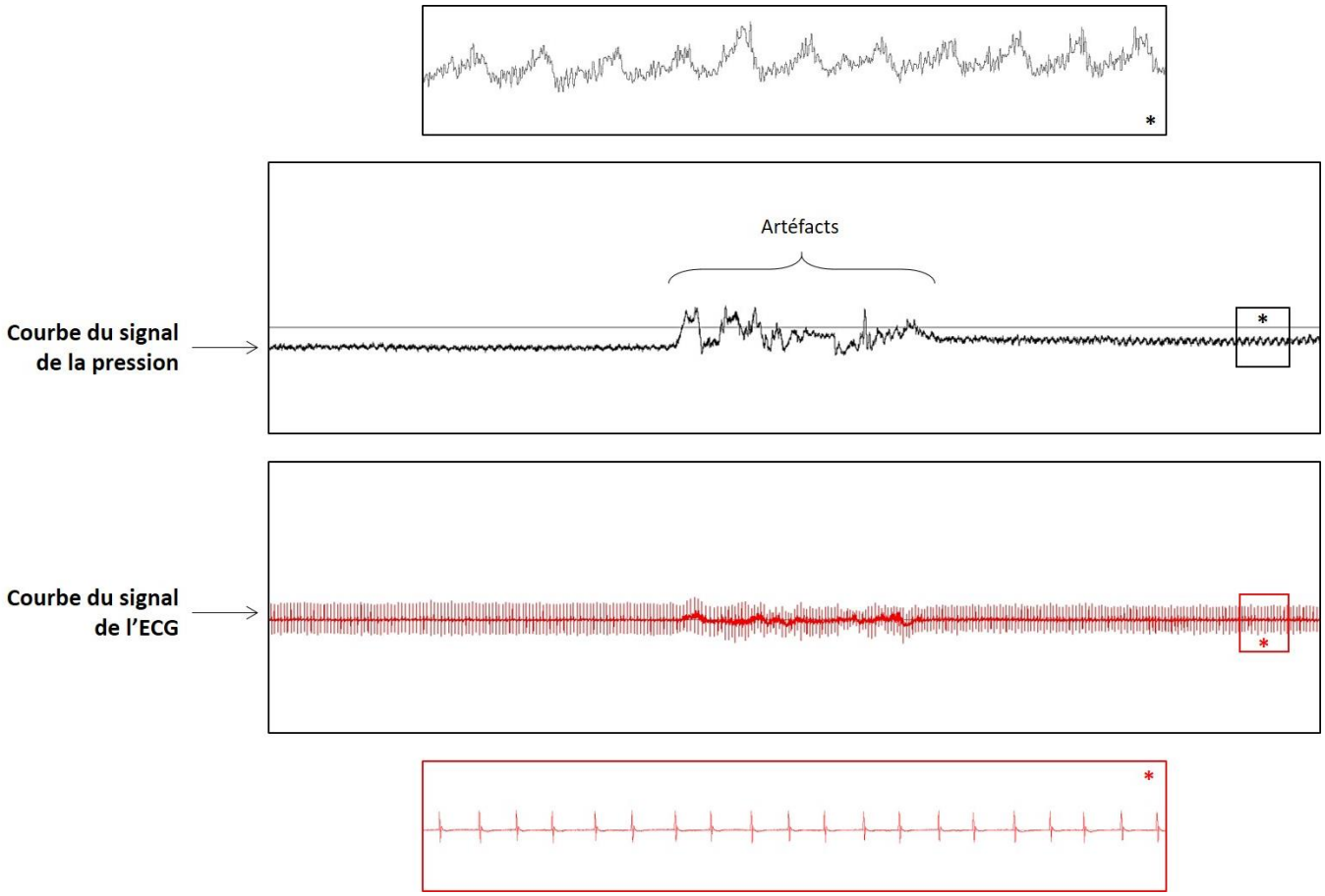


Figure 48. Extrait de signaux de la pression intracrânienne et de la fréquence cardiaque enregistrés par télémétrie chez la souris.
Les variations des signaux de la pression intracrânienne (noir, en haut) et de la fréquence cardiaque (rouge, en bas) en fonction du temps ont été mesurés par télémétrie.

Afin de mieux comprendre pourquoi nous obtenons des valeurs négatives lors du passage à -30° nous avons effectué des tests avec seulement les implants « vides ». Nous nous sommes posées plusieurs questions dans le but d'élucider la présence de données négatives pour la pression :

- « Est-ce que le fluide incompressible du cathéter qui se déplace et expliquerait l'obtention des valeurs négatives ? »
- « Est-ce en raison de l'inclinaison et ainsi que le corps de l'implant soit plus haut que la tête du cathéter ? »
- « Est-ce que le cathéter est bien positionné et non obstrué ? »
- « Est-ce que l'implant télémétrique est assez sensible et adapté pour mesurer des pressions faibles comme la PIC ? »

Afin de comprendre pourquoi les valeurs deviennent négatives lors de l'inclinaison, les implants ont été placés à plat (0°) sur les récepteurs de télémétrie et ont été inclinés à 25°, 45° ou 90° afin d'observer s'il y avait des variations de pression. On observe que le cathéter a une valeur de pression de base à -3 mmHg lorsqu'on est à 0° (FIGURE 49) Lorsque l'on effectue l'inclinaison de récepteur avec l'implant aux différents angles, on obtient une diminution de la pression.

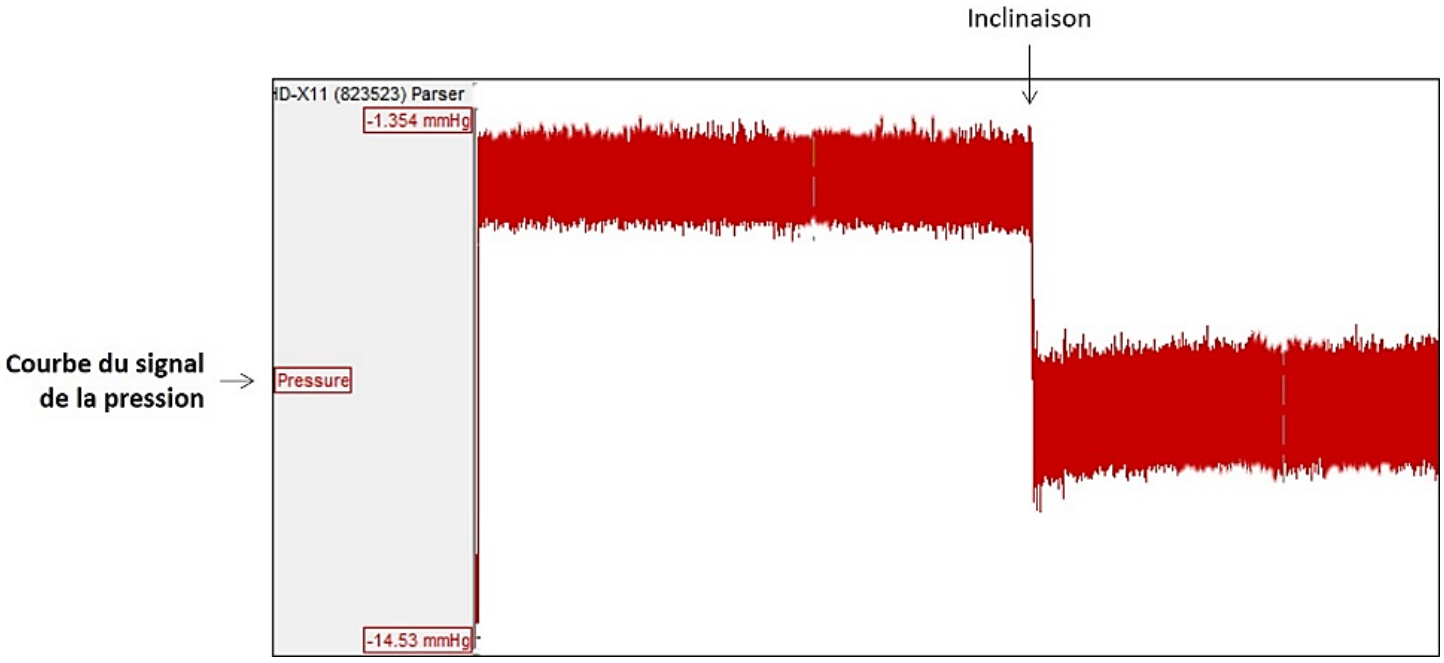


Figure 49. Extrait de l'enregistrement du signal de pression de l'implant lorsqu'il est position à 0° et à -45° sur le récepteur de télémétrie.

En effet, les valeurs sont négatives, proches de zéro, en bougeant avec l'inclinaison des récepteurs. Si l'on corrige les valeurs obtenues avec la valeur de pression de base du cathéter à 0°, nous observions un biais avec la sensibilité du capteur, avec des valeurs de pression croissantes et parallèles à l'augmentation de l'angle de l'inclinaison :

Longueur cathéter (cm)	*Angle par rapport à l'horizontale (°)*	*Pression (mmHg)*
5	*0*	*0*
5	*26*	*3.14*
5	*45*	*5.06*
5	*90*	*7.16*

Il faut noter qu'on est ici dans un cas extrême, avec le cathéter parfaitement droit, ce qui fait que la différence d'altitude entre le corps du cathéter et le bout du cathéter est importante. En effet, en réalité la différence d'altitude entre le corps de l'implant et le cathéter sera bien moindre dans l'animal (FIGURE 50).

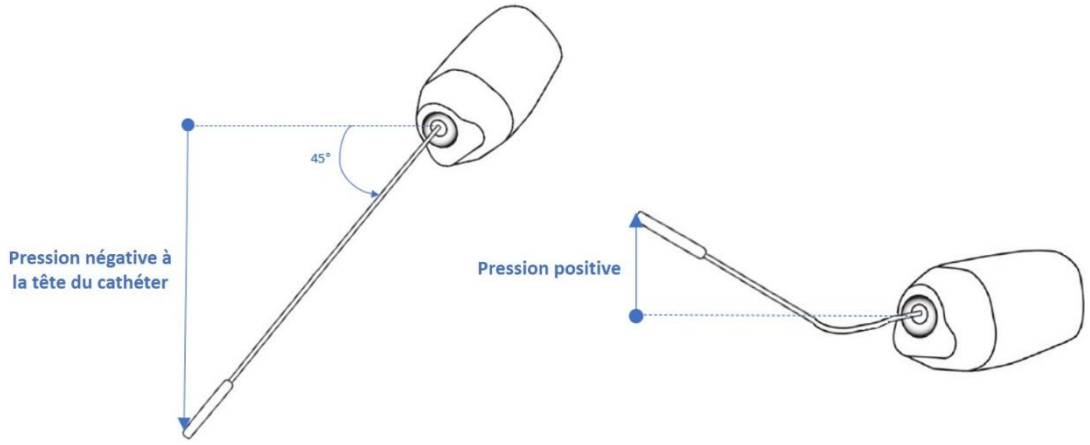


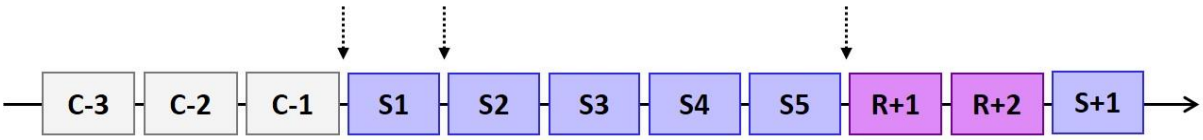
Figure 50. Schéma de l'inclinaison du cathéter de l'implant télémétrique et des modifications de pression probable.
(Source : Y. Abeguilé, DSI)

Tous ces essais ont pu être réaliser avec l'aide du service de Phénotypage et de Microchirurgie (Sophie Le Gonidec et Denis Calise, CREFRE US006, Toulouse) mais également grâce au support technique et chirurgical d'une équipe de DSI (Y. Abéguilé, K. Nichols).

(D) Impact de la suspension à l'échelle des tissus

Analyse de la composition corporelle

Afin d'étudier l'impact du modèle de suspension des membres postérieurs sur le corps des souris, nous avons analysé la composition corporelle par RMN bas champs chez l'animal vigile au moment de suspension (S0), après 1 jours de suspension (S1) et après 5 jours de suspension, à la dé-suspension (R+0) (FIGURE 51).



Pour cette procédure, et de manière étonnante, la masse corporelle (Figure a) ne présente pas de différence après un jour (S1, 29.74 ± 1.62 g) ou 5 jours de suspension (R+0, 29.34 ± 1.78 g), malgré une tendance à la diminution non significative, par rapport au contrôle (31.39 ± 2.02 g). En ce qui concerne la masse grasse (Figure b), la suspension n'induit pas de modification après un jour de suspension (S1, 2.49 ± 0.38 g) et après 5 jours (R+0, 2.54 ± 0.20 g) par rapport au contrôle (S0, 2.64 ± 0.38 g). Des résultats similaires sont observés pour la masse des liquides corporels libres (Figure c), puisqu'il n'y a aucune différence entre S0 (23.71 ± 1.76 g), S1 (22.47 ± 1.35 g) et R+0 (22.29 ± 1.66 g). En revanche, comme illustré dans la Figure d, nos résultats indiquent une diminution significative de la masse maigre après un jour de suspension par rapport au contrôle (S1, 0.58 ± 0.15 g vs S0, 0.75 ± 0.11 g, *$p<0.05$). La masse maigre augmente après 5 jours de suspension (R+0, 0.78 ± 0.07 g) par rapport au premier jour de suspension (*$p<0.05$), mais ne présente pas de différence avec le contrôle (*ns*).

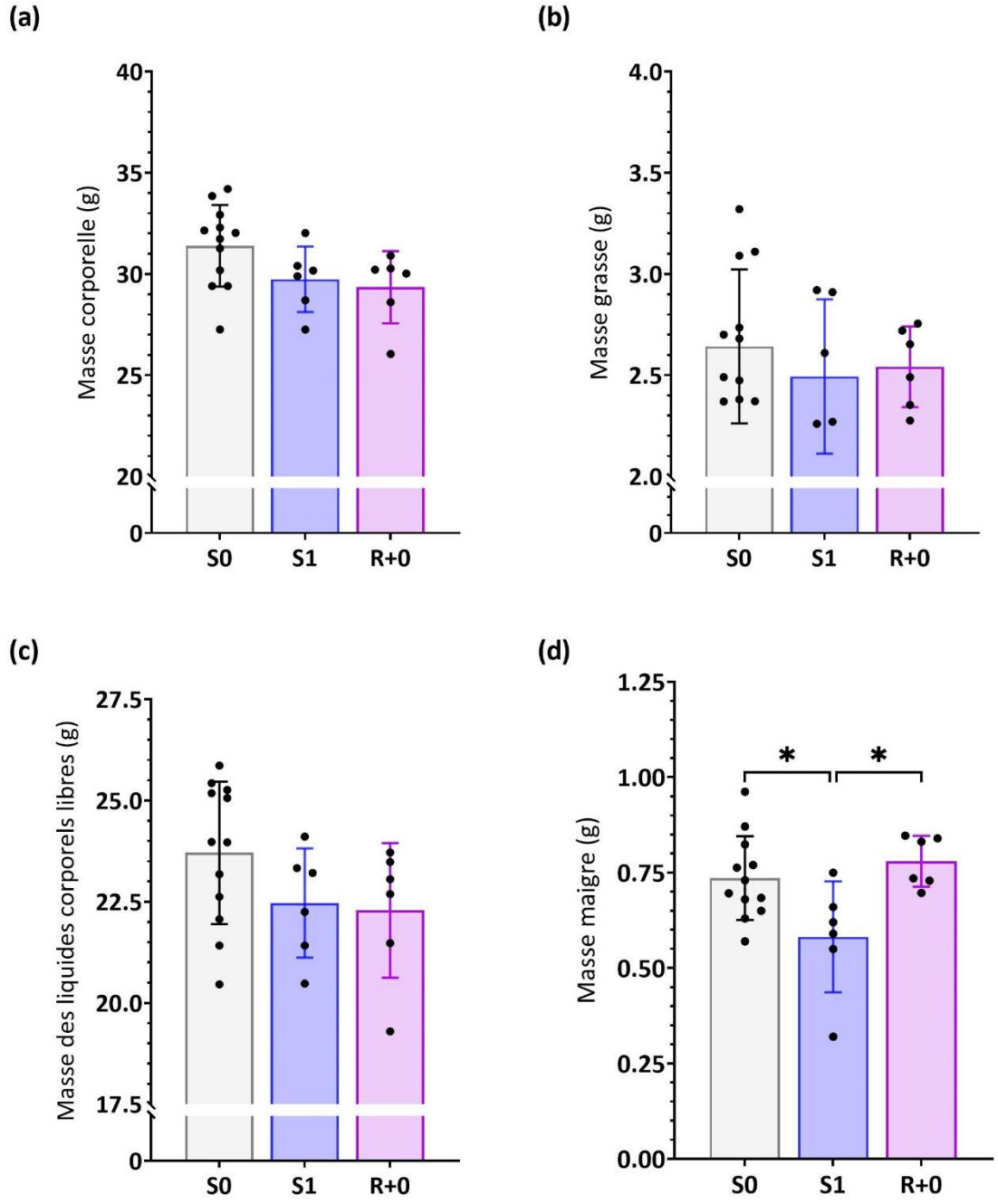
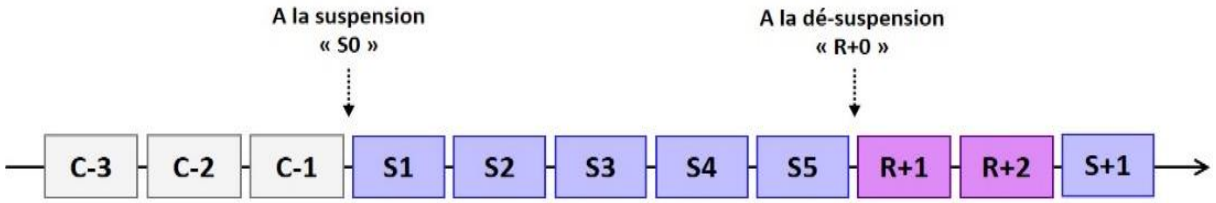


Figure 51. Analyse de la composition corporelle, avant et après 1 ou 5 jours de suspension.
(a) *La masse corporelle (en g),* ***(b)*** *la masse grasse (en g),* ***(c)*** *la masse des liquides libres (en g) et* ***(d)*** *la masse maigre (en g) ont été mesurés par RMN bas champs chez la souris vigile avant la suspension (S0, barre grise, n=12), après un jour de suspension (S1, barre bleue, n=6) et après 5 jours de suspension (R+0, barre violette, n=6). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD. *p<0.05 pour la différence avec S0 ou S1.*

Analyse structurelle et fonctionnelle du cœur par échocardiographie

Dans le but de mieux comprendre les réponses cardiovasculaires obtenues dans notre modèle, la structure et de la fonction cardiaque ont été évaluées par échocardiographie chez les souris anesthésiées, au moment de la suspension (S0) et après 5 jours de suspension, à la dé-suspension (R+0).



Analyse de la structure

Plusieurs paramètres ont été mesurés afin d'évaluer la structure cardiaque, parmi lesquels on retrouve l'épaisseur du septum interventriculaire, le diamètre interne et l'épaisseur de la paroi postérieure du ventricule gauche (FIGURE 52).

Nos résultats montrent que les 5 jours de suspension induisent une augmentation significative de l'épaisseur du septum interventriculaire en diastole (IVS;d, FIGURE 52 A) de 13 % (R+0, 0.93 ± 0.11 mm vs S0, 0.82 ± 0.04 mm, Δ = 0.11 ± 0.07, *p<0.05) et en systole (IVS;s, FIGURE 52 B) de 16 % (R+0, 1.47 ± 0.09 mm vs S0, 1.27 ± 0.06 mm, Δ = 0.20 ± 0.03, *p<0.05) par rapport aux valeurs basales. Il n'y a pas de modification du diamètre interne du ventricule gauche en fin de diastole (LVID;d, FIGURE 52 C) en comparaison à C-0, en revanche, il est observé une diminution significative du diamètre en fin de systole (R+0, 2.51 ± 0.14 mm vs S0, 2.84 ± 0.15 mm, Δ = 0.33, *p<0.05) (LVID;s, FIGURE 52 D). La suspension induit une augmentation de l'épaisseur de la paroi postérieur du ventricule gauche en systole (R+0, 1.36 ± 0.08 mm) par rapport à la pré-suspension (S0, 1.21 ± 0.07 mm, Δ = 0.15 ± 0.01 ; *p<0.05) (LVPW;s, FIGURE 52 F) ce qui n'est pas observé en diastole (LVPW;d, FIGURE 52 E).

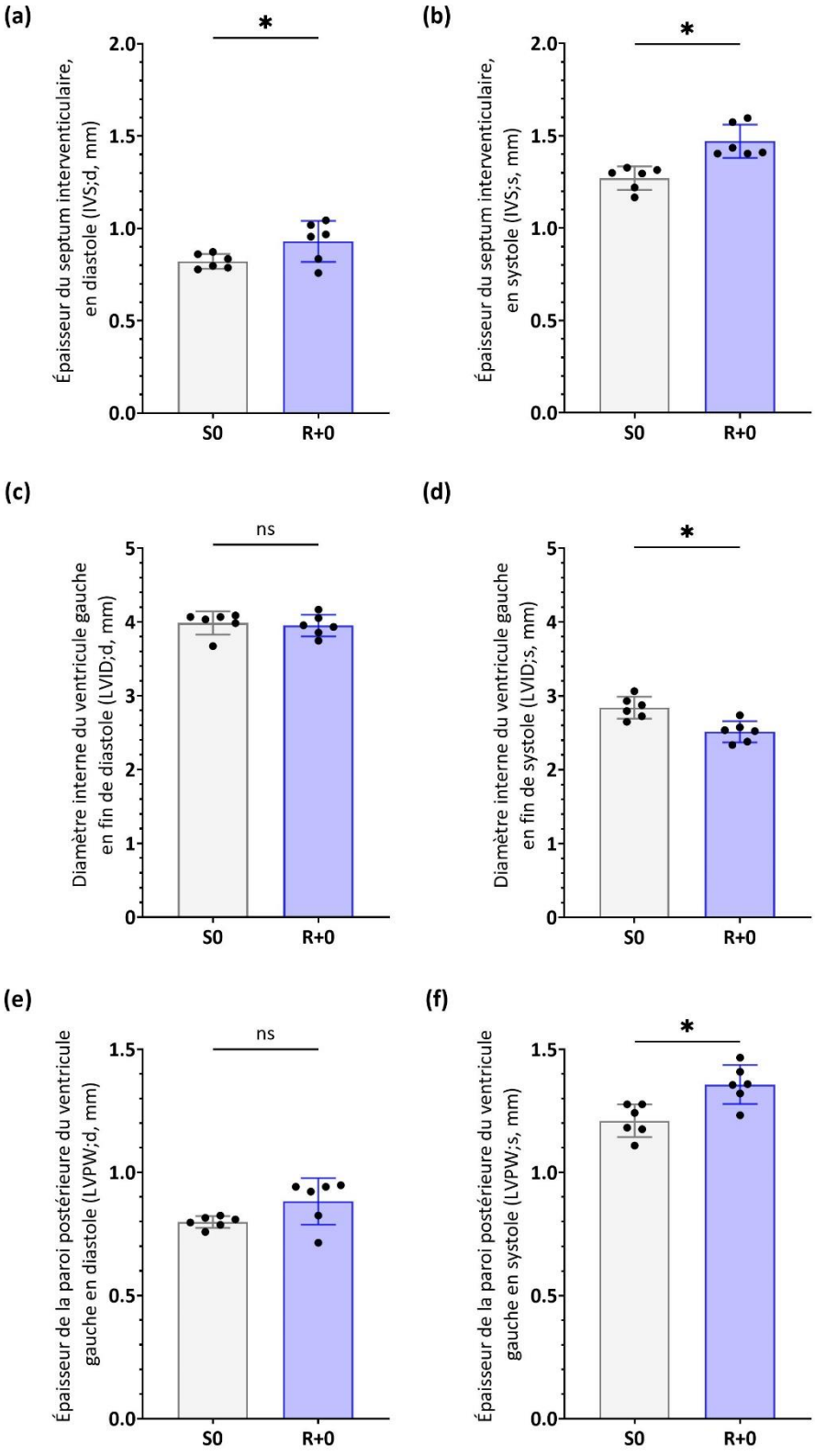


Figure 52. Analyse de la structure cardiaque avant et après la suspension de 5 jours.
(a) *L'épaisseur du septum interventriculaire en diastole (IVS;d, mm) et* ***(b)*** *en systole (IVS;s, mm),* ***(c)*** *le diamètre interne du ventricule gauche en fin de diastole (LVID;d, mm) et* ***(d)*** *en systole (LVID;d, mm),* ***(e)*** *l'épaisseur de la paroi postérieure du ventricule gauche en diastole (LVPW;d, mm) et* ***(f)*** *en systole (LVPW;s, mm) ont été mesurés par échocardiographie transthoracique chez les souris anesthésiées avant et après 5 jours de suspension, au moment de la suspension (S0, barre grise) et à la dé-suspension (R+0, barre bleue). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD pour n=6 souris. *p<0.05 pour la différence avec S0 (Paired t test).*

Analyse de la fonction

Fonction systolique

Les paramètres caractéristiques de la fonction systolique sont la FC et la fraction d'éjection, déterminées par échocardiographie transthoracique (FIGURE 53). Nos résultats démontrent une augmentation significative de la FC de 18 % après 5 jours de suspension (R+0, 534 ± 21 bpm), par rapport à S0 (452 ± 22 bpm, Δ = 82 ± 1, $**p<0.01$) (FIGURE 53 A). La fraction d'éjection n'est pas modifiée entre les deux conditions, étant comprise entre 58 et 60 % (FIGURE 53 B). De plus, les volumes de remplissage du ventricule gauche, en diastole et en systole, ne sont pas modifiés chez nos souris, avec des volumes moyennes de 76,71 ± 14.35 µL en diastole et 31.65 ± 6.11 µL en systole (FIGURE 53 C-D).

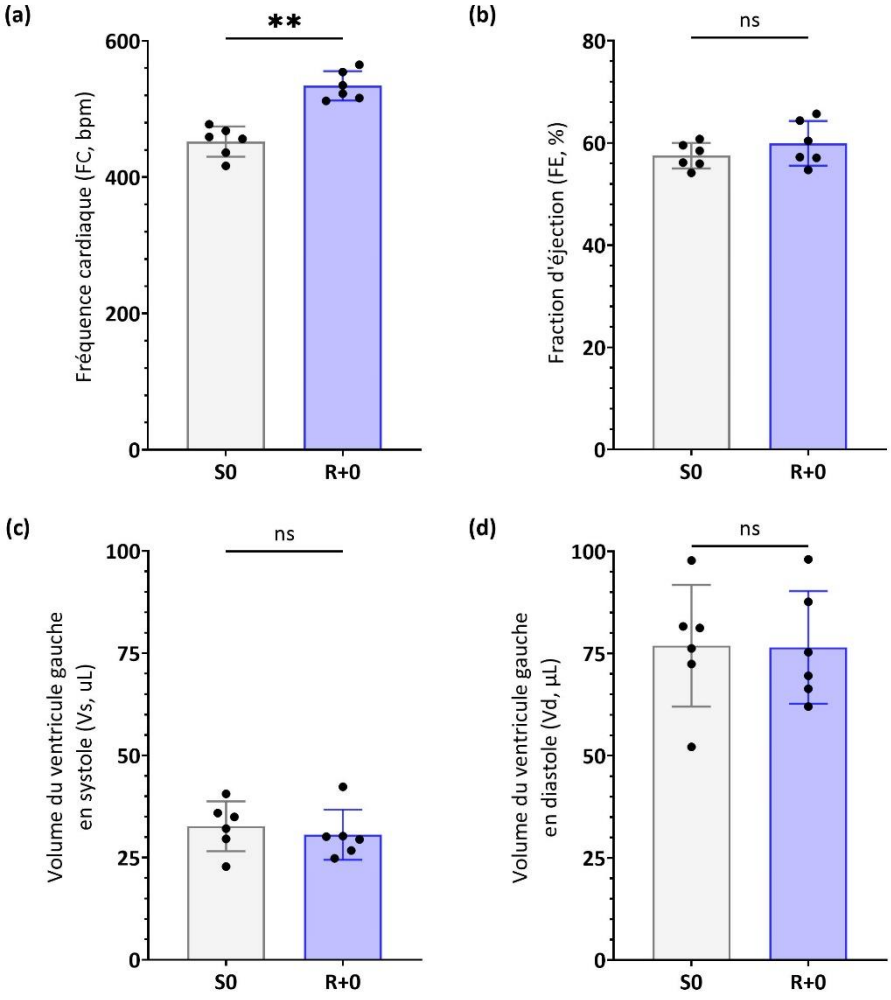


Figure 53. Analyse de la fonction systolique avant et après la suspension de 5 jours.
(a) *La fréquence cardiaque (FC, bpm),* ***(b)*** *la fraction d'éjection (FE, %),* ***(c)*** *le volume du ventricule gauche en systole (Vs, µL) et* ***(d)*** *en diastole (Vd, µL) ont été mesurés par échocardiographie transthoracique chez les souris anesthésiées avant et après 5 jours de suspension, au moment de la suspension (S0, barre grise) et à la dé-suspension (R+0, barre bleue). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD pour n=6 souris. **p<0.01 pour la différence avec S0 (Paired t test).*

Fonction diastolique

La fonction diastolique a été évaluée par imagerie Doppler à ondes pulsées et étudiée par l'analyse du temps de relaxation isovolumique, du flux mitral, de l'amplitude des ondes E et A (FIGURE 54). Nos résultats indiquent qu'il n'y a pas de modification du temps de relaxation isovolumique (IVRT, FIGURE 54 A) à R+0 comparé à S0, avec des moyennes comprises entre 15.07 ± 1.58 ms et 16.25 ± 4.15 ms respectivement. Les 5 jours de suspension n'induisent pas de changement significatif de la vélocité de l'onde A de la valve mitrale (MV A, FIGURE 54 B) malgré une tendance à la diminution par rapport au contrôle (R+0, 654.2 ± 204.6 mm/s vs S0, 744.7 ± 92.44 mm/s). En revanche, il est retrouvé une diminution significative de la vélocité de l'onde E (MV E, FIGURE 54 C), avec une diminution de -26 % par rapport au contrôle (R+0, 494.1 ± 86.98 mm/s vs S0, 666.8 ± 137.5 mm/s, **p<0.05*). Le ratio de la vélocité de l'onde E sur l'onde A (MV E/A, FIGURE 54 D) n'est pas modifié après les 5 jours suspension. De plus, l'onde protodiastolique recueillie en doppler tissulaire à l'anneau mitral (E', FIGURE 54 E) est modifié après la suspension, avec une diminution significative (R+0, -32.26 ± 7.65) par rapport au contrôle (S0, -21.55 ± 2.21, **p<0.05*). Le rapport MV E/E' (FIGURE 54 F) présente est quant à lui significativement augmenté (R+0, -16.10 ± 5.16 vs S0, -31.43 ± 8.21 vs, ***p<0.01*). Enfin, nos résultats indiquent que les 5 jours de suspension conduisent à une augmentation significative du diamètre de la valve aortique (Ao*,* FIGURE 54 G) par rapport au contrôle (R+0, 1.59 ± 0.08 mm, vs S0, 1.46 ± 0.09 mm, ***p<0.01*). En revanche, il n'y a pas de modification du diamètre de l'oreillette gauche (LA, FIGURE 54 H), avec une moyenne 1.39 ± 0.10 mm, et du ratio du diamètre de l'aorte et de l'oreillette gauche (Ao/LA, FIGURE 54 I), avec une moyenne de 1.10 ± 0.10.

Ce travail a été réalisé avec l'aide de Clément Karsenty, pour la réalisation des échocardiographies et l'analyse des résultats.

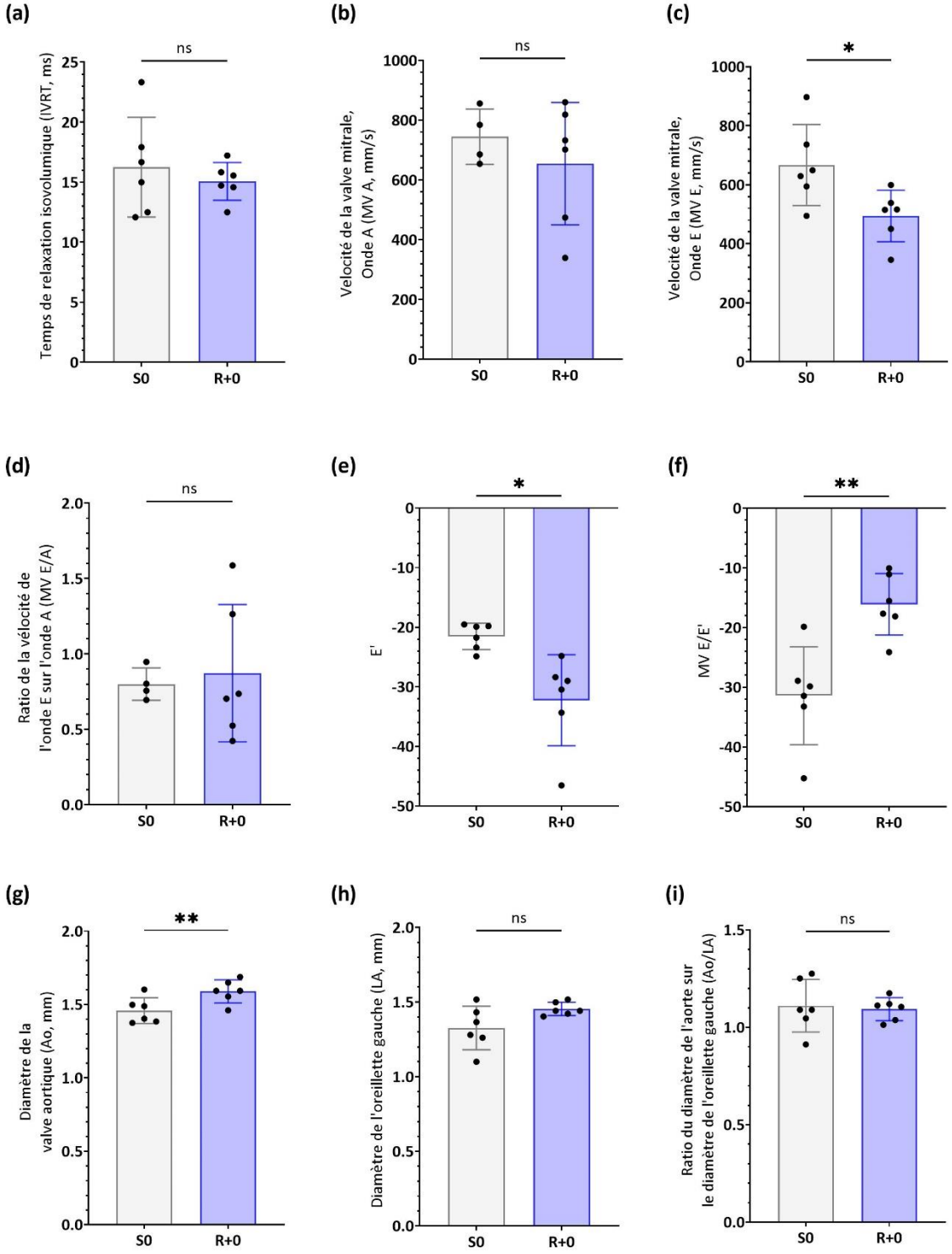


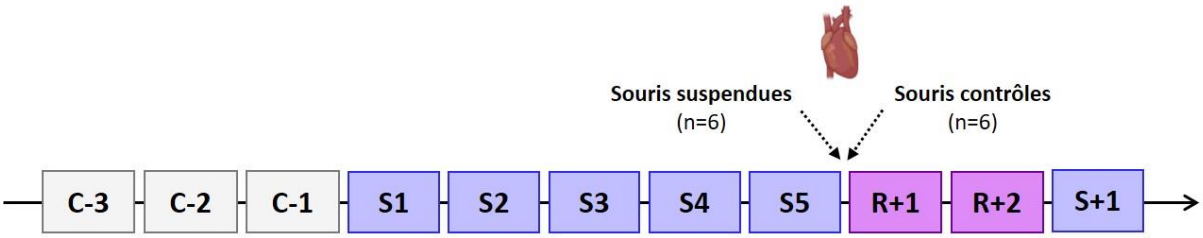
Figure 54. Analyse de la fonction diastolique avant et après la suspension de 5 jours.
(a) *Le temps de relaxation isovolumique (IVRT, ms),* ***(b)*** *la vélocité de la valve mitrale de l'onde A (MV A, mm/s),* ***(c)*** *de l'onde E (MV E, mm/s),* ***(d)*** *le ratio de la vélocité de l'onde E sur l'onde A (MV E/A),* ***(e)*** *l'onde E',* ***(f)*** *le rapport MV E/E',* ***(g)*** *le diamètre de la valve aortique (Ao, mm),* ***(h)*** *le diamètre de l'oreillette gauche (LA, mm) et* ***(i)*** *le ratio du diamètre de la valve aortique sur l'oreille gauche (Ao/LA), ont été mesurés par échocardiographie en imagerie Doppler à ondes pulsées chez les souris anesthésiées avant et après 5 jours de suspension, au moment de la suspension (S0, barre grise) et à la dé-suspension (R+0, barre bleue). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD pour n=6 souris. *p<0.05 et **p<0.01 pour la différence avec S0 (Paired t test) (sauf pour MV A et MV E/A, n=4 à S0, Unpaired t test).*

Analyses immunohistochimiques

Afin de mieux comprendre les réponses cardiovasculaires et autonomes médiées dans notre modèle et d'identifier les régions impliquées, des analyses plus précise à l'échelle du tissu ont été réalisées. D'une part, afin de compléter les résultats obtenus en échocardiographie, des analyses morphologiques du tissu cardiaque ont été réalisés, telles que l'analyse de la taille des cardiomyocytes ainsi que la fibrose. D'autre part, les régions cérébrales impliquées dans les réponses cardiovasculaires et autonomes, obtenues dans notre modèle, ont été analysées sur des cerveaux de souris.

Cœur

Des cœurs de souris témoins (« Contrôle ») et de souris suspendues pendant 5 jours (« Suspension ») ont été prélevés puis fixés dans du paraformaldéhyde avant d'être inclus en paraffine. Enfin, des analyses immunohistochimiques ont été réalisés sur les lames de tissu cardiaque puis ont été visualisées par microscopie optique.



Aire des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes ont été visualisés et co-marqués par immunofluorescence au WGA 488/DAPI (FIGURE 55) afin de pouvoir quantifier leur taille et notamment l'aire (FIGURE 56). Nos résultats indiquent que les 5 jours de suspension n'induisent pas de modification significative de la taille des cardiomyocytes du septum (suspension, 276.9 ± 30.22 µm² vs contrôle, 268.5 ± 25.53 µm², *Figure … a*), du ventricule gauche (suspension, 298.8 ± 20.89 µm² vs contrôle, 299.8 ± 43.89 µm², *Figure … b*) et du ventricule droit (suspension, 215.8 ± 57.98 µm² vs contrôle, 229.7 ± 26.86 µm², *Figure … c*) en comparaison au contrôle.

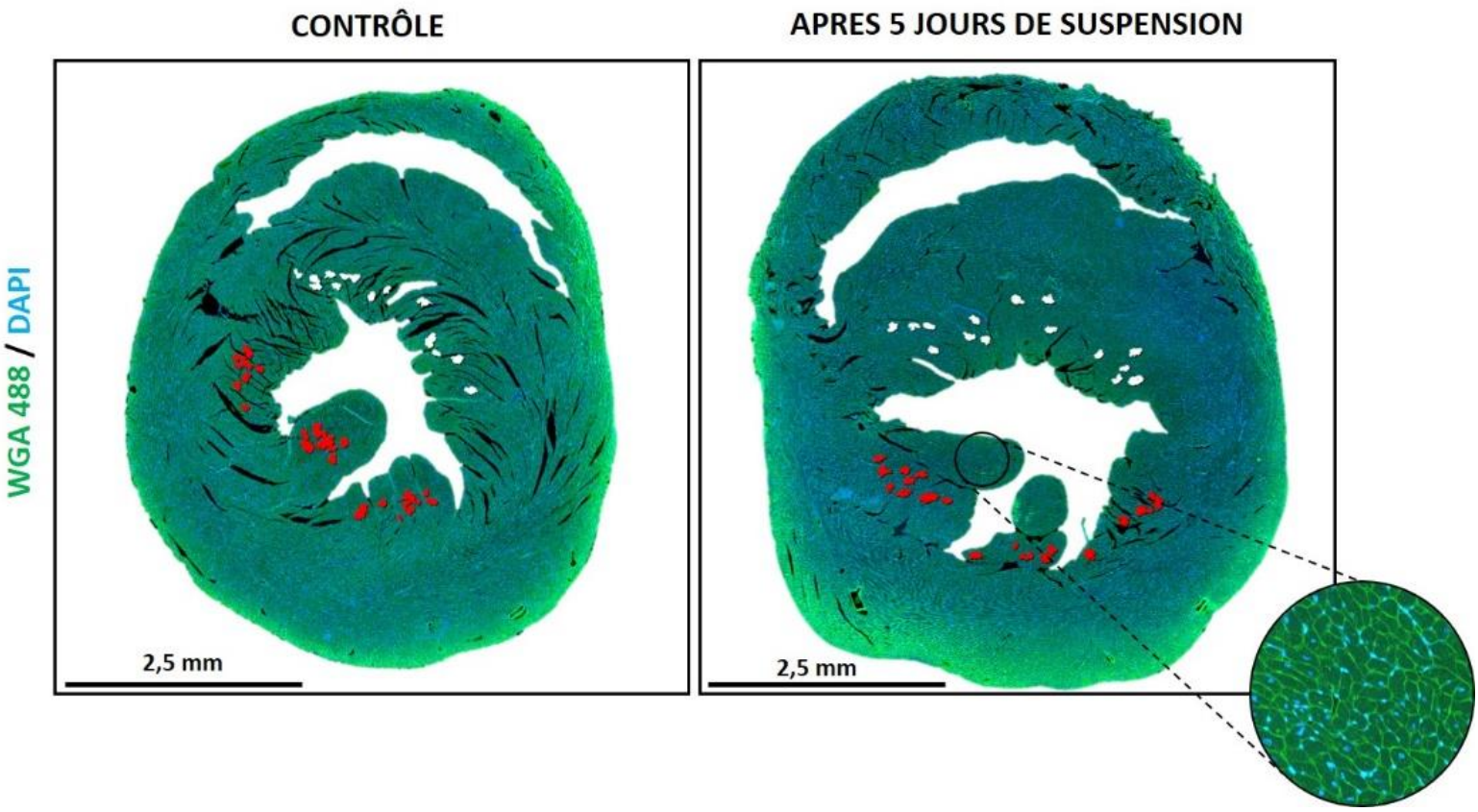


Figure 55. Marquage par immunofluorescence des coeurs de souris contrôle et de souris suspendues pendant 5 jours. *Les cœurs ont été co-marqués par le WGA 488 pour la visualisation des membranes cellulaires et par le DAPI pour la visualisation des noyaux. Les cercles rouges et blancs correspondent aux cardiomyoctytes quantifiés pour déterminer leur aire.*

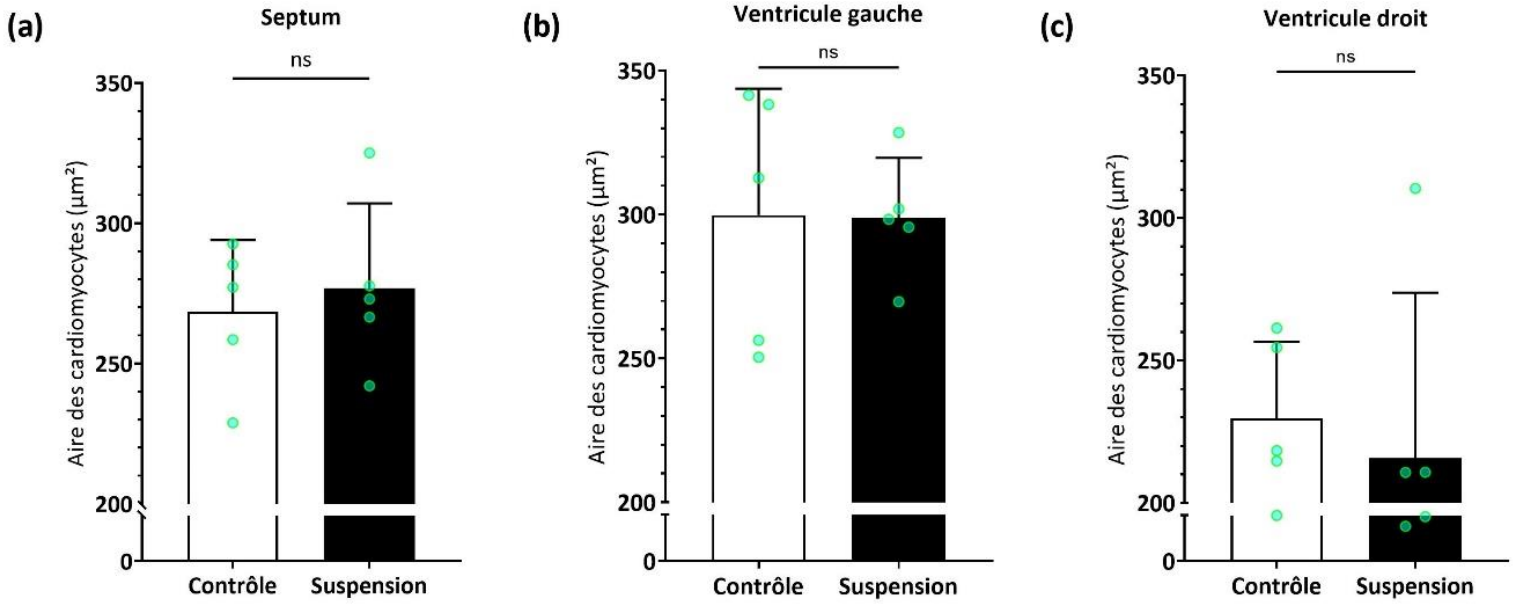


Figure 56. Quantification de l'aire des cardiomyocytes des coeurs de souris contrôle et de souris suspendues pendant 5 jours. *L'aire (µm²) des cardiomyocytes (a) du septum, (b) du ventricule gauche et (c) du ventricule droit a été mesuré pour les cœurs prélevés chez des souris témoins (Contrôle, n=5) et chez des souris suspendues après 5 jours (Suspension, n=5). Les valeurs sont expérimées en moyenne ± SD (Unpaired t test).*

Fibrose

La fibrose a été analysée suite à une coloration au trichrome (FIGURE 57 A), destiné à la visualisation et à la quantification (FIGURE 57 B) des fibres de collagène. Les 5 jours de suspension d'induisent pas de fibrose du tissu cardiaque puisqu'il n'est pas observé de différences entre la condition contrôle (0.49 ± 0.29 %) et la condition suspension (0.46 ± 0.34 %) dans notre modèle.

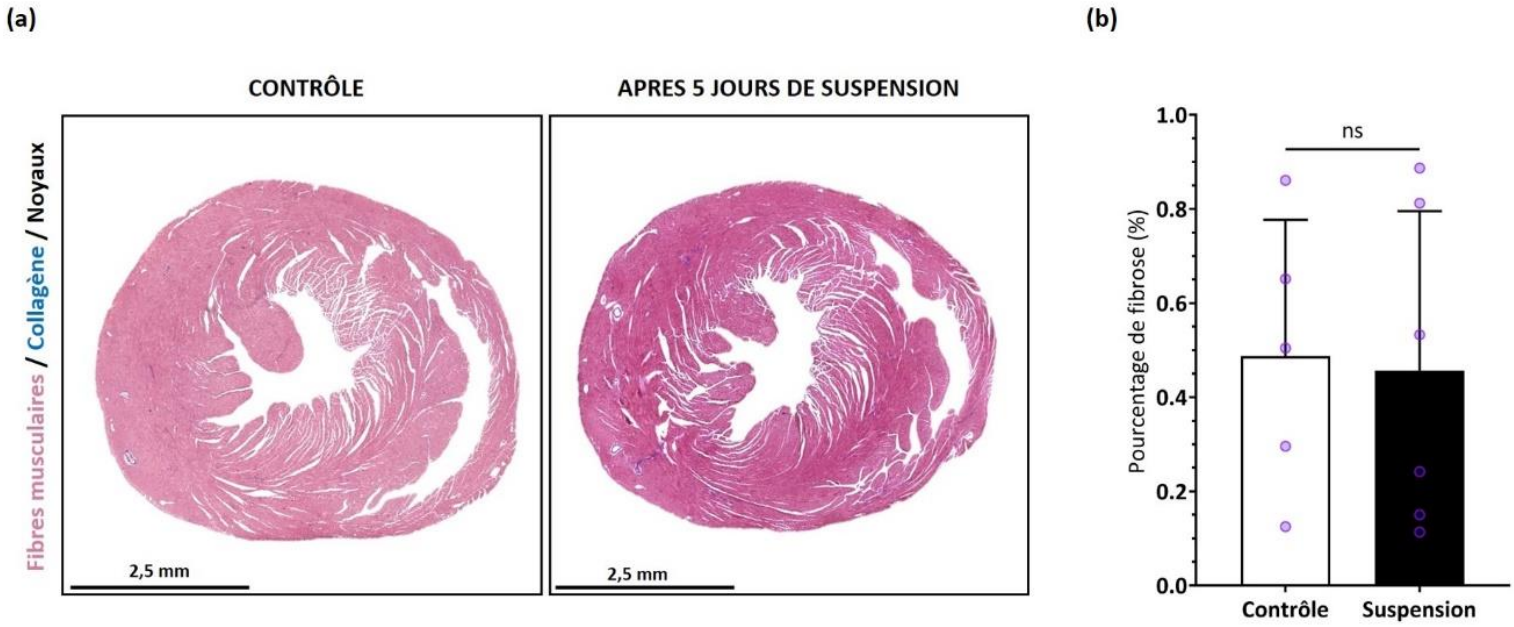
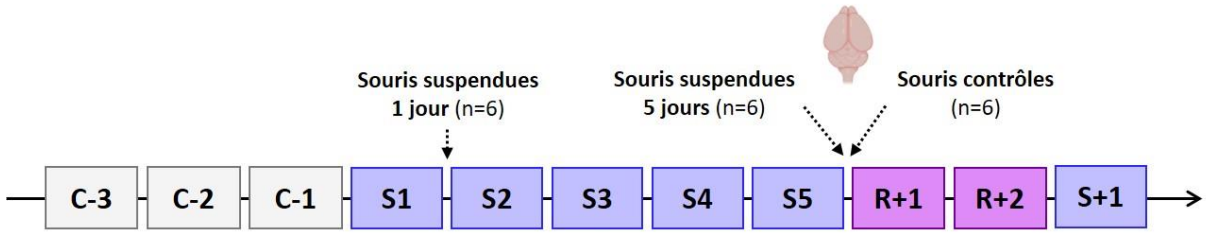


Figure 57. Visualisation et quantification de la fibrose des coeurs de souris contrôle et de souris suspendues pendant 5 jours. *Les lames de tissu cardiaque ont été (a) coloré par le Trichrome afin de (b) quantifier la fibrose cellulaire (en %) sur les cœurs prélevés chez des souris témoins (Contrôle, n=5) et chez des souris suspendues après 5 jours (Suspension, n=6). Les valeurs sont expérimées en moyenne ± SD (Unpaired t test).*

Ce travail a été réalisé avec l'aide de Nicolas Pataluch et Marie-Hélène Séguelas, pour le prélèvement, le marquage et le scan des lames.

Cerveau

Des analyses immunohistochimiques ont été réalisées sur des cerveaux de souris témoins et de souris suspendues pendant 1 jour et 5 jours, afin d'effectuer une analyse qualitative des régions activées en réponse à la suspension, à un temps précoce et tardif.



Afin d'identifier les régions cérébrales activées, les cerveaux ont été prélevés immédiatement au sacrifice, et fixés rapidement dans du paraformaldéhyde, dans les 15 minutes suivant le prélèvement. Cette durée doit être respectée, afin de ne pas biaiser la mesure de l'activation neuronale régions cérébrales activées, observée à l'aide du marquage au c-Fos. En effet, l'activation de c-Fos est induite après 30-60 minutes, c'est pourquoi il est nécessaire de fixer rapidement le cerveau pour conserver les réponses qui précèdent le sacrifice et donc qui sont retrouvées lors de la suspension (Gao and Ji, 2009). Les cerveaux ont été divisé en deux, au niveau de la ligne entre les deux hémisphères, gauche (HG) et droit (HD), puis ont été inclus en paraffine. Plusieurs lames des deux hémisphères ont été coupées (de 5 µm) dans le but de réaliser la cartographie du cerveau.

Activation neuronale

Dans un premier temps, une fois que les sections ont été préparées, la détection immunohistochimique de la protéine c-Fos a été faite afin d'identifier les groupes de cellules actives, et au DAPI, pour la visualisation des noyaux des cellules (contrôle +) (FIGURE 58). Nos images ne semblent pas montrer de grande différence entre les différentes conditions. En revanche, après un jour de suspension, il est retrouvé une augmentation de l'activité de c-fos dans toutes les zones corticales, y compris l'insula, les zones motrices, le cingulum antérieur et les zones dorsales restrospéniales, ainsi que dans l'hypothalamus et le tronc cérébral (FIGURE 59). L'activation de ces zones est réduite après 5 jours de suspension, et seules quelques zones se sont révélées positives avec une faible intensité, dans l'hypothalamus, le cortex et le thalamus.



Figure 58. Visualisation de l'activation neuronale des cerveaux de souris contrôle et de souris suspendues. *Images des lames de cerveaux (2.5 mm) de l'hémisphère droit ont été co-marqués par immunofluorescence au DAPI (noyaux, bleu) et au c-fos (neurones actifs, vert). Les cerveaux ont été prélevés chez des souris témoins (Contrôle), chez des souris suspendues 1 jour et 5 jours.*

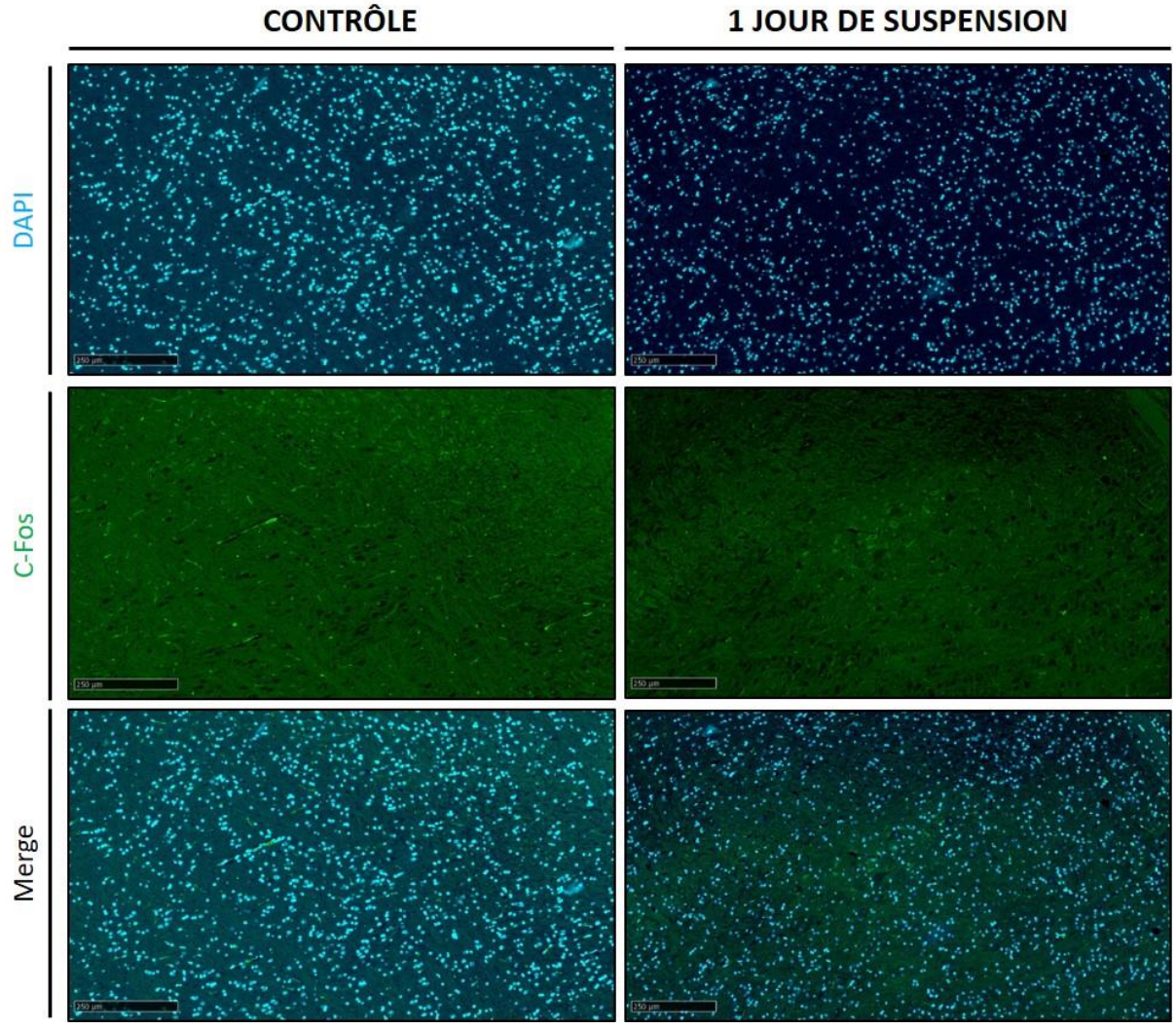


Figure 59. Images des lames de cerveau (250 µm) de souris contrôle (à gauche) et de souris suspendues pendant 1 jour (à droite).

Ce travail a été réalisé avec l'aide de Nicolas Pataluch et Marie-Hélène Séguelas, pour le prélèvement, le marquage et le scan des lames.

(E) Etude des réponses immédiates à la suspension

Cette deuxième partie est consacrée à l'étude des réponses immédiates à la suspension à -30° chez la souris, du système CV et du SNA. Afin de répondre aux objectifs de l'étude, et notamment d'évaluer l'impact des variations de la PIC sur le SNS en lien avec le déplacement des fluides corporels dans le modèle de microgravité simulée, nous avons réalisé une procédure dite « aiguë » qui consiste en l'enregistrement de manière invasive des différentes variables d'intérêt chez la souris anesthésiée inclinée à -30° : la PA, la PIC, la FC, la fréquence respiratoire (FR), la température, ou encore l'activité sympathique et vagale, mesurées au niveau du nerf rénal (RSNA) et du nerf vague respectivement.

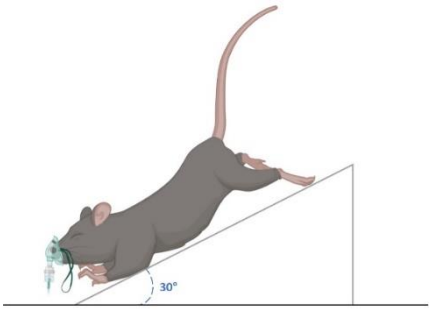


Figure 60. Schéma d'une souris inclinée à -30°.

Acquisitions des paramètres de manière invasive

Les paramètres ont été mesurés à l'état de base chez la souris à 0° pendant 30 minutes, avant que la souris soit inclinée à -30° pendant 30 minutes (Figure), puis remise à 0° pendant 30 minutes.

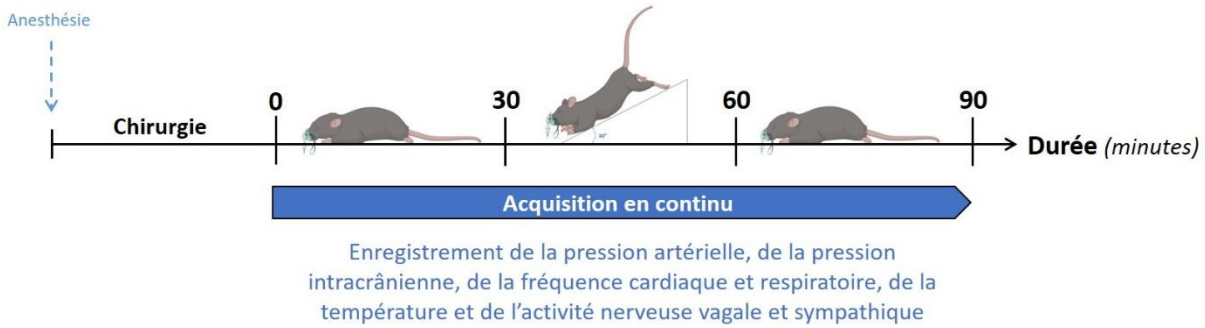


Figure 61. Design expérimental du protocole aigu.

Dans un premier temps, nous avons souhaité évaluer les variations directes de la PIC, de la PA, de la FC et de la température, dans notre modèle de souris suspendues par le train arrière. De nombreux essais ont été réalisées afin de mesurer de manière directe la pression intracrânienne chez nos souris. Pour se faire nous avons utilisé des sondes Sophysa®, qui sont utilisées en routine chez l'Homme, et qui nous ont été généreusement offertes (grâce à une collaboration avec le Dr Schmidt, Service de neurochirurgie – CHU Toulouse). Les variations de la pression intracrânienne sont représentées dans la FIGURE 62 a pour quelques souris de l'étude (n=5).

Les variations de la PIC à l'état de base, à une valeur moyenne de 6.43 ± 1.22 mmHg, ne sont pas stables, et ce, pendant toute la durée du protocole expérimental. Lors de l'inclinaison à -30°, nos résultats indiquent une augmentation des valeurs de la PIC par rapport aux valeurs de base, en passant à une valeur moyenne de 9.34 ± 0.36 mmHg (FIGURE 62 A). En revanche, nous ne pouvons conclure avec ce type de résultats, puisque les valeurs ne sont pas stables, répétables et le nombre d'animaux est insuffisant. Il en est de même pour la PA, puisque les valeurs obtenues sont très variables et faibles pendant toute la durée du protocole, avec une PAM d'environ 42.81 ± 3.96 mmHg (FIGURE 62 B). La FC a le même profil, sauf pour 3 individus, qui ont une fréquence cardiaque stable et inchangée pendant toute la durée de la procédure, avec une fréquence cardiaque de 489 ± 39 bpm en moyenne (FIGURE 62 C). Ici, seule la température corporelle est stable et constante, en étant en moyenne à 35.26 ± 0.28 °C (FIGURE 62 D).

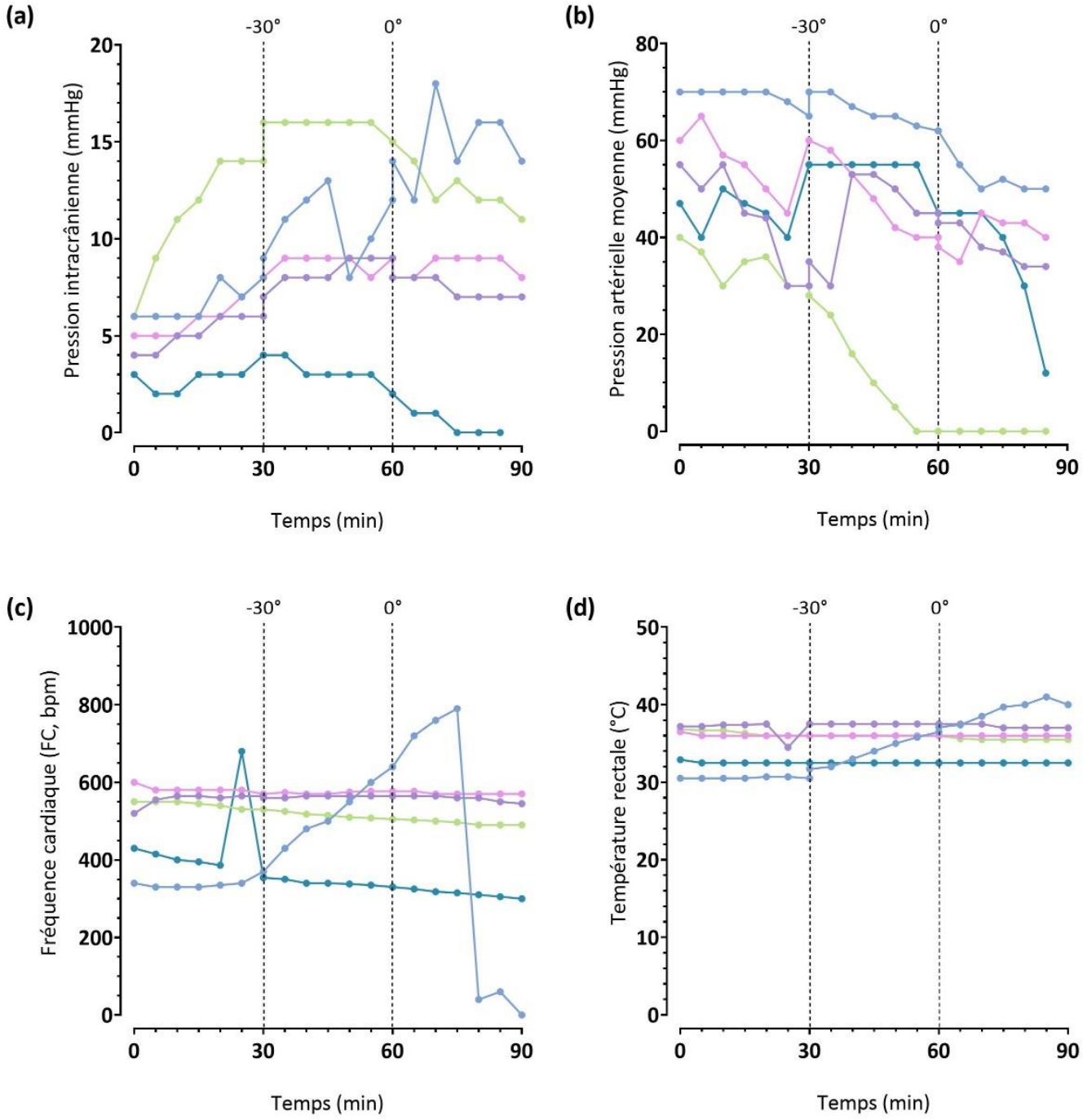


Figure 62. Variations de la pression intracrânienne et artérielle, de la fréquence cardiaque et de la température avant, pendant et après l'inclinaison à -30° chez la souris anesthésiée.

*Les variations de **(a)** la pression intracrânienne (mmHg), **(b)** de la pression artérielle moyenne (mmHg), **(c)** de la fréquence cardiaque (bpm) et de **(d)** la température (°C) ont été enregistrés en continu de manière invasive chez la souris. Ces paramètres ont été mesurés avant l'inclinaison à -30° (de 0 à 30 minutes), pendant (de 30 à 60 minutes) et après (de 60 à 90 minutes). Chaque courbre représente les variations pour une souris. Les données sont expérimées pour chaque 5 minutes (n=5).*

Résultats complémentaires

Un premier essai de ces mesures avait été réalisée au début du projet de thèse, avec une autre sonde et un ancien appareil d'enregistrement de la PIC (Codman®). Cette sonde avait déjà été utilisée pour des mesures chez la souris, et malheureusement n'a plus fonctionné par la suite, en raison d'un problème de capteur puis changement de matériel qui devenait obsolète.

Sur la FIGURE 63 (page suivante) est représenté un tracé chez une souris anesthésiée à l'isoflurane et inclinée à -30° durant 20 minutes. Ici, les résultats indiquent que la pression intracrânienne augmente rapidement au début du palier à -30°, en passant de 22 mmHg, à l'état basal, à 27 mmHg. La pression intracrânienne se stabilise au cours du temps et revient aux valeurs de base à la récupération. En revanche, lors de l'inclinaison à -30°, la pression artérielle et la fréquence cardiaque diminuent en continu par rapport aux valeurs de base, avec des valeurs de 45 mmHg par rapport à 80 mmHg pour la pression artérielle moyenne et de 425 bpm en comparaison à 503 bpm pour la fréquence cardiaque. Ces deux variables ne reviennent pas aux valeurs de base, même lorsque la souris est remise à 0° lors de la récupération. Par contre, l'amplitude respiratoire augmente de 35 % alors que la fréquence respiratoire diminue de 49 %.

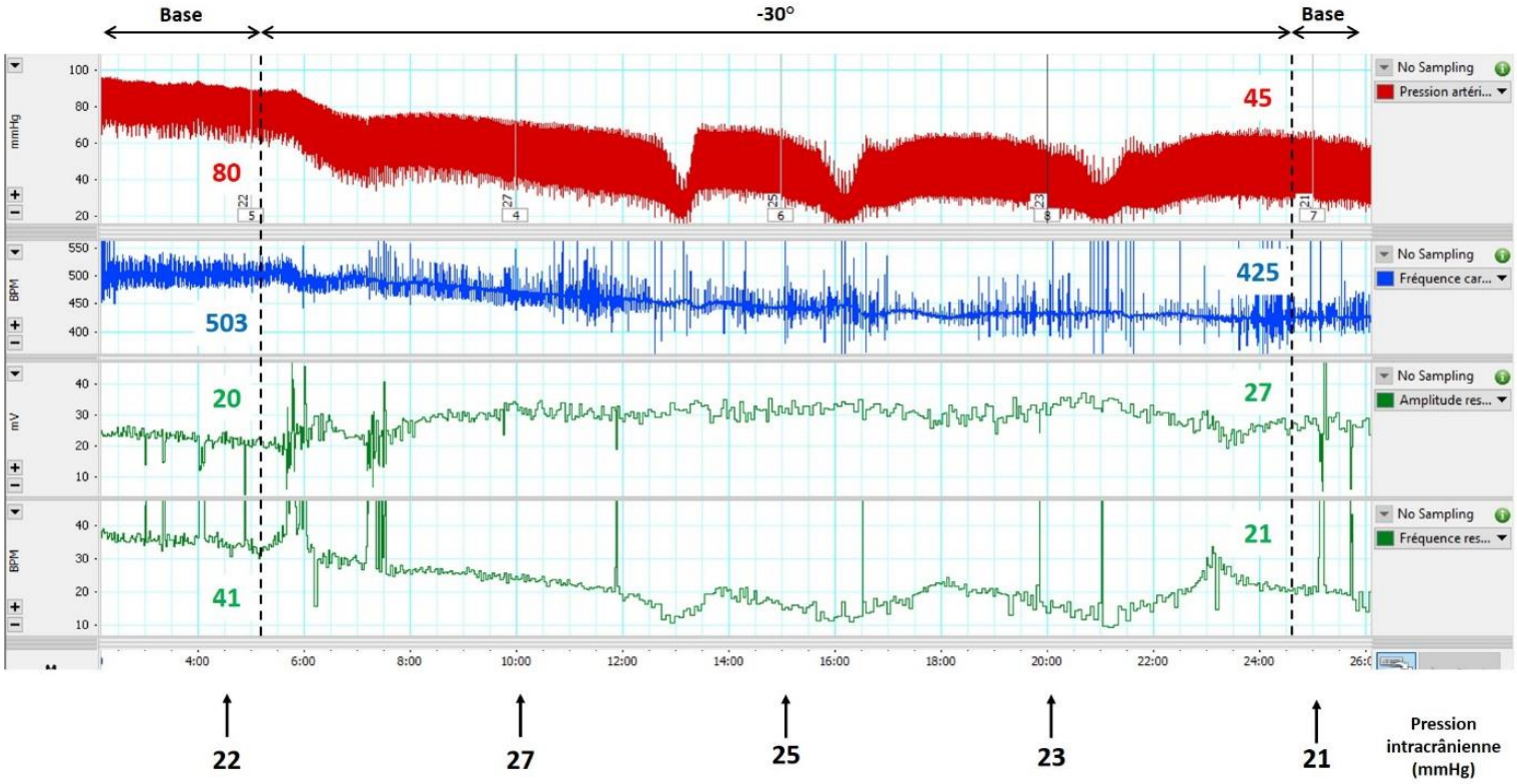


Figure 63. Tracé représentant les variations de pression intracranienne, pression artérielle, fréquence cardiaque et respiration, chez une souris avant, pendant et après l'inclinaison à -30°.

De haut en bas : Les variations de la pression artérielle (mmHg, courbe rouge), la fréquence cardiaque (bpm, courbe bleue), de l'amplitude et de la fréquence respiratoire (mV et bpm respectivement, courbes vertes) ont été mesurées de manière invasive chez la souris anesthésiée pendant une période de base à 0° de 5 minutes (à gauche), d'inclinaison à -30° de 20 minutes (au milieu) et de récupération de 5 minutes (à droite). Ces enregistrements ont été effectué à l'aide du logiciel LabChart. Les variations de la pression intracrânienne (mmHg), mesurées à l'aide de l'appareil Codman, ont été rapportées sur la figure (en bas) pour chaque condition.

Mesure de l'activité directe du SNA

Afin d'évaluer l'impact des variations potentielles de la pression intracrânienne sur le système nerveux autonome, et mieux comprendre les réponses cardiovasculaires obtenues dans notre modèle, nous avons souhaité mesurer l'activité nerveuse de manière directe dans notre modèle de microgravité simulée chez la souris éveillée et anesthésiée.

Dans cette partie, nous avons souhaité mesurer l'activité parasympathique et sympathique, au niveau du nerf vague et du nerf rénal respectivement. Pour se faire, nous avons utilisé des micro-implants composés d'électrodes, qui nous ont été fourni et développés par une équipe du LAAS (CNRS, Toulouse). Ces électrodes ont été dans un premier temps testé chez la souris anesthésiée au niveau du nerf vague. Le nerf vague, d'une part, est plus accessible et repérable plus facilement chez la souris, et d'autre part, permet la mise au point des enregistrements de l'amplitude, de la fréquence, des pics de l'activité nerveuse. En revanche, en raison de sa proximité avec le cœur, le signal est contaminé par des artéfacts cardiaques. Pour l'enregistrement *in vivo* des données télémétriques de l'activité nerveuse (FIGURE 64), la résolution était de 16 bit, la fréquence d'échantillonnage de 40 kHz, la gamme de tension d'entrée de ± 12.4 mV et une bande passante de 100 à 2000 Hz comme décrit dans la littérature (Malpas, 2010; Silverman et al., 2018).

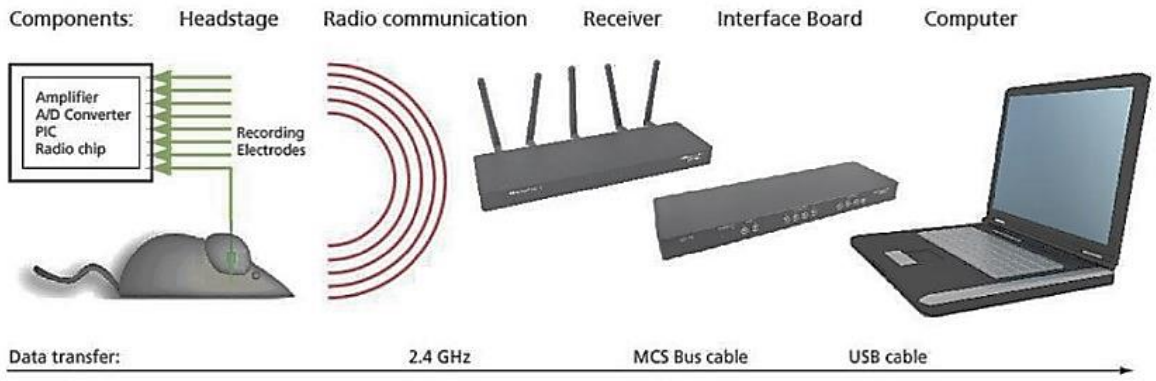


Figure 64. Processus d'enregistrement des données télémétriques de l'activité nerveuse.
(Source : C. Cointe, LAAS, 2020)

Test des implants pour la mesure de l'activité nerveuse parasympathique chez la souris anesthésiée.

Dans un premier temps, nous avons réalisé deux enregistrements sur deux souris différentes, avec le même implant (FIGURE 65). Pour les différents enregistrements, nous retenons le signal reçu de l'électrode 1 qui semble avoir le meilleur rapport signal/bruit.

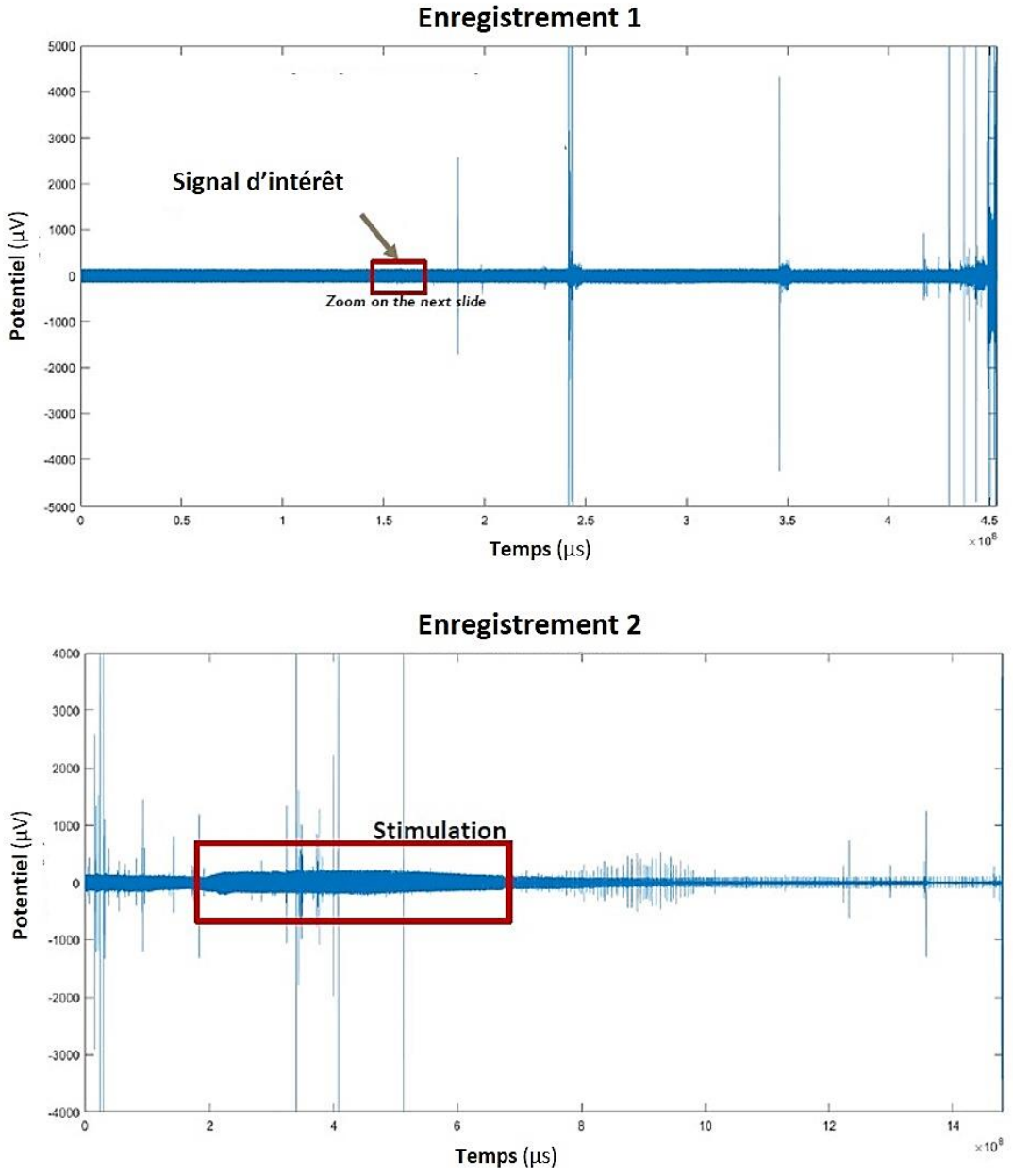


Figure 65. Extrait de deux enregistrements de l'activité nerveuse vagale, mesurée au niveau du nerf vague par télémétrie chez la souris anesthésiée.
(Source : C. Cointe, LAAS, 2020)

Lorsqu'on s'intéresse au signal de l'électrode 1, on peut voir la présence d'un signal intense mais majoritairement la présence des battements cardiaques de manière régulière et intense (FIGURE 66).

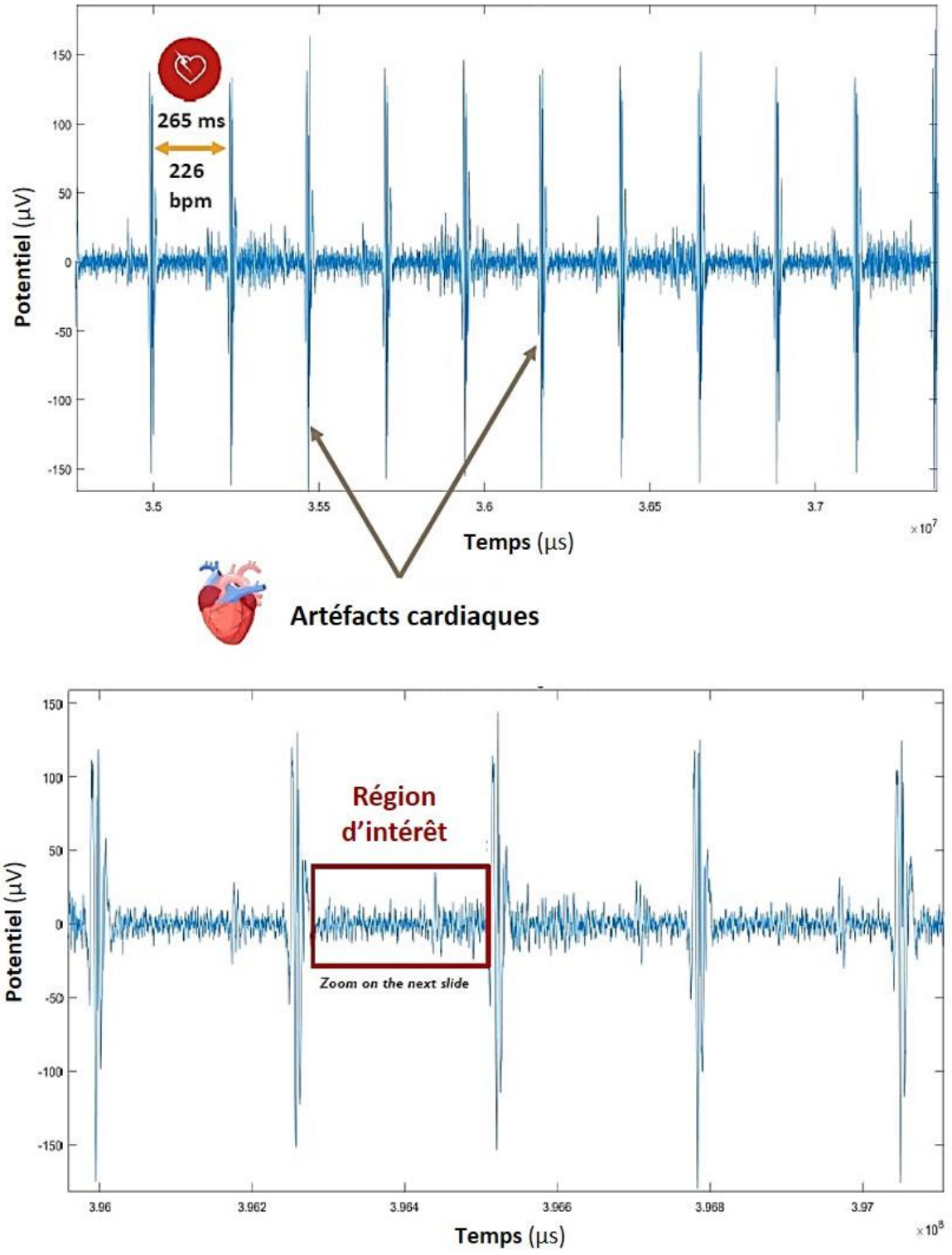


Figure 66. Mise en évidence du signal et de l'activité nerveuse ainsi que des artéfacts cardiaques.
(Source : C. Cointe, LAAS, 2020)

La zone d'intérêt recherchée est présente entre les artéfacts cardiaques. Lorsque l'on se focalise dans cette zone (FIGURE 67), on peut observer la présence de bruit, de faible amplitude (<30 µV), en raison de la présence de bruit dans la salle et de l'absence d'une cage de Faraday, ce qu'il faudrait améliorer.

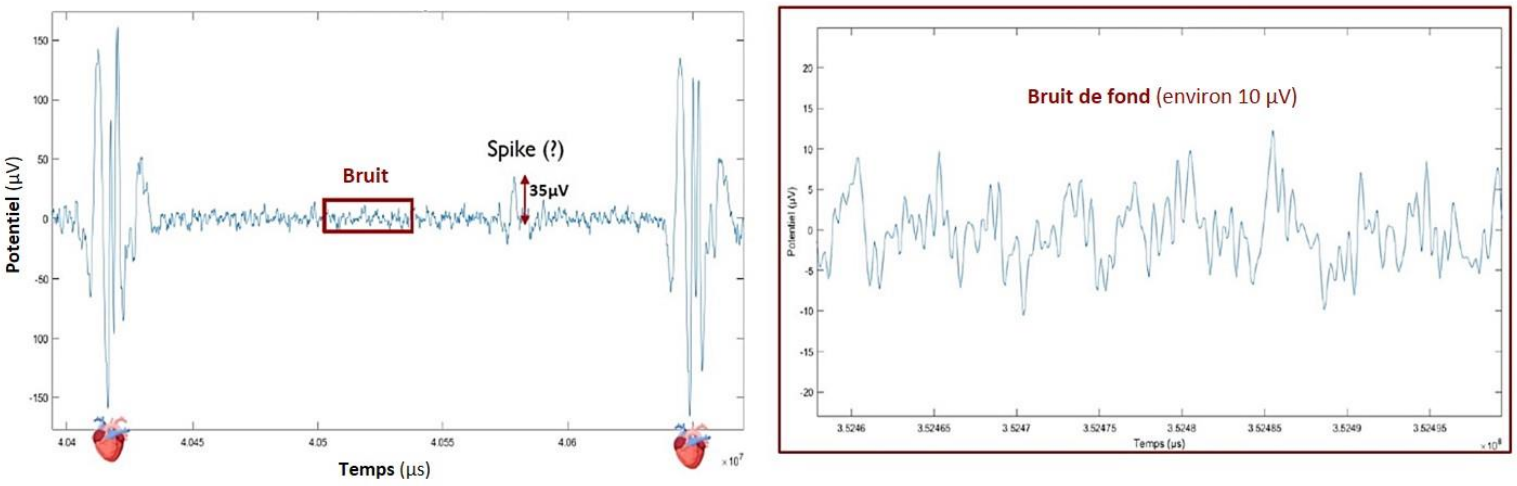


Figure 67. Focus sur la zone d'intérêt et la présence de bruit de fond.
(Source : C. Cointe, LAAS, 2020)

On peut également observer la présence de pics avec une plus grande amplitude, qui sont possiblement des pics d'activité nerveuse potentiels. Après une stimulation du nerf (via la manœuvre de Valsalva), on peut observer l'apparition d'une forte activité électrique, présente entre deux battements cardiaques (FIGURE 68).

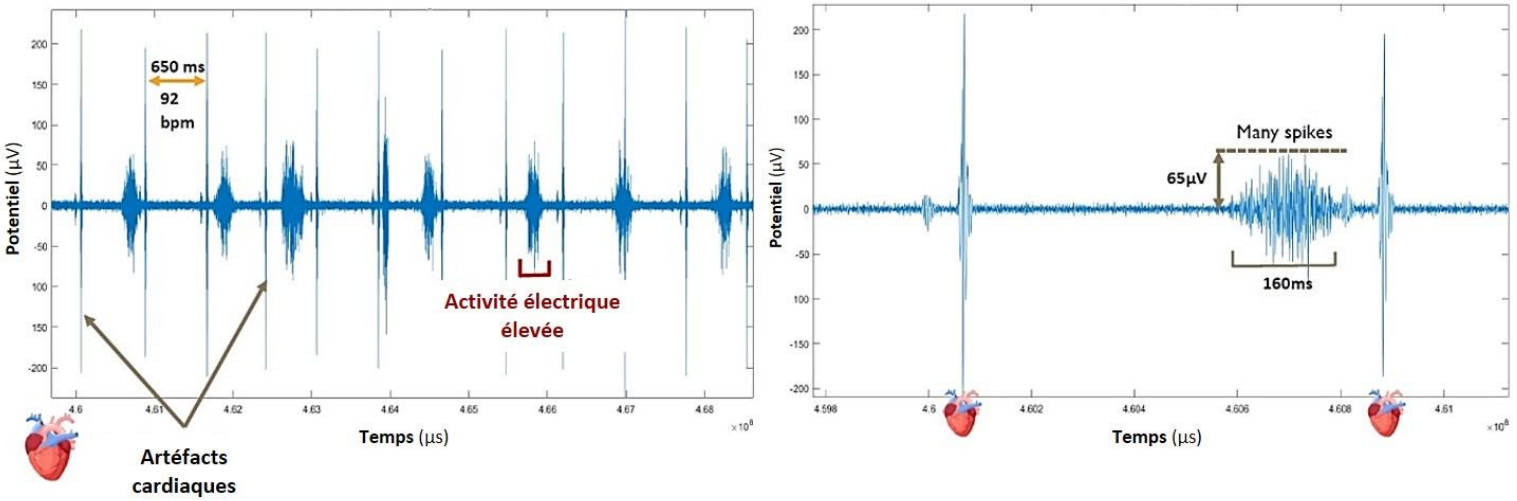


Figure 68. Focus sur la zone d'intérêt et la présence d'activité électrique intense.
(Source : C. Cointe, LAAS, 2020)

Au vu de ces résultats très encourageants, la deuxième étape était de designer des implants plus adaptés au nerf de la souris, pour qu'ils puissent être sécurisés et pour que nous puissions réaliser des mesures à long terme à l'aide d'un système de télémétrie.

Design de nouveaux implants pour la mesure de l'activité nerveuse

Afin de pouvoir utiliser ces implants dans notre modèle de microgravité simulée chez la souris, et d'évaluer l'activité nerveuse à court et à long terme, nous avons designé un nouvel implant (FIGURE 69).

Ce nouvel implant, en forme de fourches, permettrait d'avoir un maintien du nerf de manière stable pour l'enregistrement. Ce prototype a été testé chez la souris, et a été modélisé par l'équipe du LAAS.

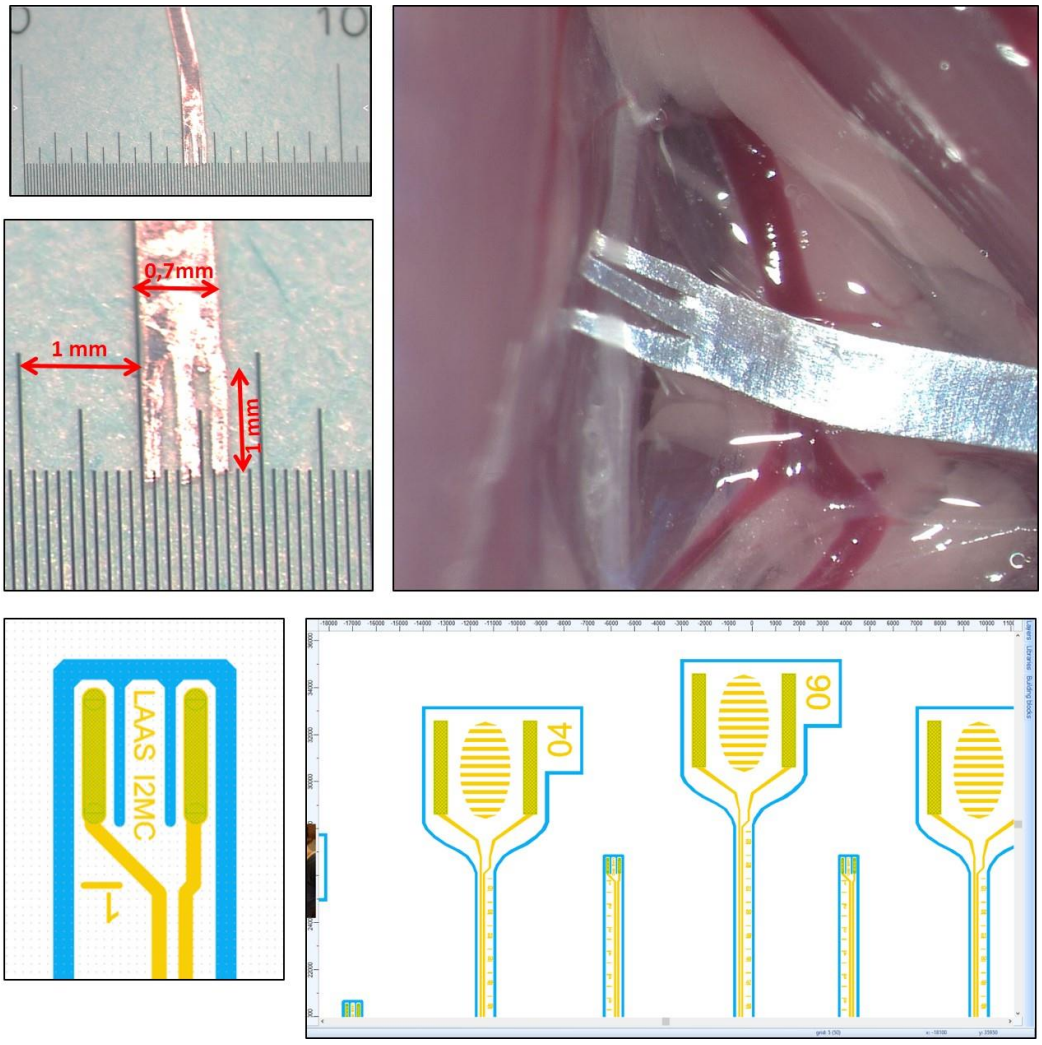


Figure 69. Design du nouvel implant pour la mesure de l'activité nerveuse chez la souris.
En haut à gauche : prototype du nouvel implant ; en haut à droit : essai du prototype au niveau du nerf vague chez une souris aneshtésie. En bas : protoype modélisé par le LAAS.

DISCUSSION

Discussion

Les différents objectifs de ce travail de thèse, réalisées à l'aide du modèle de microgravité simulée de suspension du train arrière à -30° chez la souris mâle C57BL/6J, étaient de :

1) Etudier la cinétique de l'adaptation CV, en particulier de la PA et de la FC, à la microgravité simulée à court et à long terme (5 jours) chez la souris
2) Evaluer la régulation du système CV par le SNA, notamment l'analyse de la VFC et de la SBR
3) Observer les conséquences au niveau cardiaque et cérébral par des analyses de la structure, de la fonction, immunohistochimiques
4) Etudier les variations de la PIC dans le modèle de microgravité simulée en lien avec la redistribution liquidienne vers la région céphalique

D'abord, les aspects liés à l'utilisation du modèle expérimental et les techniques de mesure seront discuté, puis de l'adaptation CV à la microgravité simulée et notamment des modifications des rythmes et des effets sur le cœur. La dernière partie traitera de la mesure de la PIC et de premiers résultats sur l'activation cérébrale.

Modèle expérimental

Dans cette étude, nous avons utilisé le modèle de suspension du train arrière chez la souris (Globus and Morey-Holton, 2016). Ce modèle, décrit pour la première fois dans les années 1970 (Morey, 1979), est largement utilisé par la communauté scientifique pour évaluer les modifications physiologiques survenant dans le corps entier, pendant et après l'exposition (NASA Ames Research Center, Standard Operation Procedure, Update 2004). Ce modèle est bien décrit et très souvent utilisé pour l'étude du déconditionnement physique, induisant une déminéralisation osseuse et une atrophie musculaire (Globus and Morey-Holton, 2016). Depuis quelques années, il a été décrit comme un modèle fidèle pour l'adaptation CV chez le rongeur, avec des réponses physiologiques similaires à celles survenant chez les grands mammifères lors d'une exposition réelle à la microgravité (Powers and Bernstein, 2004; Hawliczek et al., 2022).

Les données de la littérature sont cependant controversées en fonction du modèle (souris, rat, singe, Homme), de la souche génétique, mais surtout selon la durée du protocole, le sexe, l'âge, et l'angle de suspension, comme décrit dans la revue de Morey-Holton et de ses collaborateurs en 2005.

La durée du protocole de suspension à -30° chez le rongeur peut aller de 10 minutes à 14 semaines, mais la plupart des articles rapportent des durées comprises entre 1 et 4 semaines (Morey-Holton et al., 2005). Pour cette étude, nous avons choisi de réaliser un protocole de 5 jours, puisque nous souhaitons étudier les réponses à plus ou moins court (adaptation immédiate) et long terme (adaptation prolongée) du système CV et autonome, qui sont peu décrites dans la littérature chez la souris. En ce qui concerne le genre, les femelles et les mâles sont régulièrement utilisés, bien qu'ils soient rarement évalués dans une même étude et, que les mâles sont plus utilisés. Dans ce travail, nous avons exclusivement étudié les souris mâles, afin d'éviter la variabilité des paramètres du système nerveux autonome et les effets des hormones sexuelles liés au genre (Dart, 2002; Foley et al., 2005).

Concernant l'âge, celui-ci est peu renseigné dans les études, ce qui rend probablement les résultats controversés. Un rongeur âgé d'un an correspondrait à un humain de 30 ans, étant donné qu'il vivrait environ 2,5 ans alors qu'un humain vivrait environ 75 ans, si l'on suppose qu'il existe une relation linéaire entre les espèces. Ceci suggérait un rapport d'âge de 1/30, indiquant que les animaux d'un an pourraient constituer les meilleurs modèles pour les membres d'équipage adultes. Néanmoins, en raison des coûts d'entretien, les souris sont âgées de 4 mois en moyenne. Ici, les souris utilisées sont âgées de 20 semaines à la fin de l'expérimentation, âge pour lequel les animaux sont considérés comme adultes, où les systèmes nerveux, cardiovasculaire et musculo-squelettiques sont matures (Morey-Holton et al., 2005).

A propos de l'espèce, les rats sont couramment utilisés, à la fois pour la suspension du train arrière mais également pour les vols spatiaux. Ce sont des animaux robustes, de plus grande taille, permettant une facilité de manipulation et de chirurgie. En revanche, les souris peuvent être plus attrayantes pour les vols spatiaux en raison de leur taille et de leurs caractéristiques génétiques. En effet, les différentes caractéristiques génétiques de l'Homme peuvent contribuer à la variabilité des données provenant des membres d'équipage. Des souches de rongeur spécifique (consanguines, hybrides, mutantes…) peuvent être sélectionnées, afin de

réduire la variabilité interindividuelle, d'augmenter la reproductibilité et offre l'opportunité de produire des animaux génétiquement modifiés sur des gènes d'intérêt (Doevendans, 1998; Navarro, 2002). En effet, la souris a été acceptée comme un modèle expérimental raisonnable et fidèle pour l'étude des maladies cardiovasculaires (Powers and Bernstein, 2004; Globus and Morey-Holton, 2016). Dans cette étude, la souris C57Bl6/J a été utilisée et représente un modèle de souris consanguines, largement utilisées en recherche biologique et biomédicale (Waterston et al., 2002).

Pour finir, l'angle de déchargement est un point important dans ce modèle. Formé entre le torse de l'animal et le sol de la cage, il détermine la quantité de poids supportée par les membres antérieurs, ainsi que la tension appliquée par la queue. L'angle a été déterminé à -30° pour que le poids corporel appliqué sur les membres antérieurs soit de 50 % et que le déplacement des fluides corporels soit induit (Morey-Holton and Globus, 2002). Un écart important dans l'angle pourrait entraîner une augmentation ou une diminution de la charge, et donc modifier les réponses physiologiques obtenues. Chez le rongeur, la majorité des études réalise la suspension avec un angle de -30° chez la souris (Powers and Bernstein, 2004 ; Tahimic et al. 2019 ; Zhong et al. 2021) et chez le rat (Moffit et al. 2008, Foley et al. 2007 ; Andreev-Andrievsky et al. 2018), bien que d'autres études utilisent un angle de 20° (Musacchia et al. 1992), de 35° (Jung et al. 2005 ; Moffitt et al. 2008 ; Mueller et al. 2006) ou de 40/-45° (Woodman et al. 1991 ; Wilkerson et al. 1999 ; Ray et al. 2001 ; Tsvirkun et al. 2012).

L'ensemble de ces facteurs rendent la transposition des résultats d'une espèce à une autre délicate, et les résultats controversées dans l'ensemble de la littérature (TABLEAU I). Aussi, il faut souligner que le modèle de microgravité simulée est aujourd'hui couramment utilisé en recherche de physiologie spatiale, mais qu'il n'est que peu rapporté ou peu connu par la communauté scientifique globale.

Table I. Comparaison de certaines études évaluant le système cardiovasculaire dans le modèle de microgravité chez l'animal.

REFERENCES	**ANNEE**	**ANIMAL**	**AGE**	**SEXE**	**DUREE**	**MODELE**
ZHONG ET AL.	2021	Souris Singe	3 mois 4-8 ans	X	6 semaines	-30° HU --10° HU
TAHIMIC ET AL.	2019	Souris (C57BL/6J et /6JN)	16 semaines	Femelle	30 jours	-30° HU
ANDREEV-ANDRIEVSKY ET AL.	2018	Souris (BALB/C) Rat (Wistar) Lapin (NZ)	X	X	7 jours	-30° HU
LING ET AL.	2018	Singe	4-8 ans	X	42 jours	--10° HU
MORTREUX ET AL.	2018	Rat (Wistar)	14 semaines	Mâle	14 jours	PWB
ANDREEV-ANDRIEVSKY ET AL.	2017	Souris (C57BL/6)	9-10 semaines	Mâle	19-20 semaines	Vol (BION-M1)
MOFFITT ET AL.	2013	Rat (SD)	X	Mâle	14 jours	-30° HU
CHOWDURY ET AL.	2013	Rat (SD)	X	Mâle	14 jours	-30° HU
TSVIRKUN ET AL.	2012	Rat (Wistar)	5-6 semaines	Mâle	14 jours	-40° HU
EDGELL AND KAUFMAN	2008	Rat (LE)	X	Femelle et mâle	24 heures	-30° HU
MOFFITT ET AL.	2008	Rat (SD)	X	Mâle	14 jours	-30-35° HU
MUELLER ET AL.	2006	Rat (SD)	X	Mâle	14 jours	-30-35° HU
JUNG ET AL.	2005	Souris (C57BL/6)	8-10 semaines	X	14 et 21 jours	-35° HU
FOLEY ET AL.	2005	Rat (SD)	X	Femelle et mâle	14 jours	-30-35° HU
POWERS AND BERNSTEIN	2004	Souris (C57BL/6J/DBA)	12 semaines	Mâle	14 jours	-30° HU
RAY ET AL.	2001	Rat (SD)	6-8 mois	Mâle	7 et 28 jours	-40--45° HU
SOCCI ET AL.	2000	Rat (SD)	X	Mâle	7 jours	-30° HU
WILKERSON ET AL.	1999	Rat (SD)	X	Mâle	14 jours	-40--45° HU
MOFFITT ET AL.	1998	Rat (SD)	X	Mâle	14 jours	-30° HU
MUSACCHIA ET AL.	1992	Rat (SD)	X	Male	7 jours	20° HU
WOODMAN ET AL.	1991	Rat (SD)	10-13 semaines	Femelle et mâle	14 jours	--45° HU

HU, hindlimb unloading; LE, Long-Evans; NZ, New-Zealand; PWB, partial weight bearing; SD, Sprague Dawley.

Mesure des paramètres CV en continu par radio-télémétrie

Les récents progrès concernant les techniques microchirurgicales et de la micro-instrumentation, permettent de réaliser des mesures physiologiques très complexes dans le modèle murin (Powers and Bernstein, 2004). C'est une technologie sensible, permettant un phénotypage précis, fiable et haut débit (Butz and Davisson, 2001; Van Vliet et al., 2006), permettant une acquisition en temps réel et en continu. En effet, la télémétrie est un outil important pour le phénotype cardiovasculaire, offrant une surveillance cardiaque détaillée sur 24 heures et plus, chez des animaux éveillés, vigiles et libres de leur mouvements (Butz and Davisson, 2001; Wood, 2014; Popova et al., 2017). De manière intéressante dans notre modèle, le système de télémétrie (HD-X11, DSI) nous a permis de mesurer en continu les paramètres CV, tels que la PA et la FC, ainsi que les paramètres pouvant influencer le SNA, tels que la température et l'activité locomotrice, tout en laissant les souris en suspension à -30° et de limiter le biais dans les mesures et dans les réponses évaluées. Cette démarche a été réalisée comme décrit dans la littérature chez la souris vigiles (Butz and Davisson, 2001; Kramer and Remie, 2004; Cesarovic et al., 2010). Aussi, cette technologie permet de limiter les biais de la chirurgie, par l'anesthésie ou la contention. Enfin, la télémétrie nous permet de réaliser une mesure continue de ces paramètres pendant toute la durée du protocole de 11 jours.

En revanche, il faut souligner plusieurs points. Chaque intervention, qu'elle soit environnementale (changement de pression atmosphérique, cycle de lumière…) ou humaine (entrée dans la pièce, manipulation, changement de nourriture…), perturbera la souris et sera observée sur les signaux télémétriques. Egalement, il est important que les animaux aient suffisamment récupéré avant le début des enregistrements, que les sutures soient bien réalisées et contrôlées. En effet, des souris ont dues être exclues de cette étude, en raison de problèmes liées aux électrodes de l'implant (déplacée, plus suturées, placée à l'envers, ressorties de l'animal…).

Enfin, cette micro-instrumentation est régulièrement utilisée chez le grand mammifère (lapin, singe), plus souvent chez le rat, rarement chez la souris. C'est pourquoi, un certain nombre de mise au point a dû être réalisé pour notre étude, d'une part, pour le modèle de suspension du train arrière à -30° chez la souris, et d'autre part, pour la mesure de la PIC et de la PV.

La radio-télémétrie a été utilisée dans quelques études de microgravité simulée pour la mesure de la PA et de la FC en continu, réalisée chez le rat (Tsvirkun et al., 2012) et la souris suspendue (Powers and Bernstein, 2004). Cette technologie a été également utilisée lors de vols paraboliques chez le rat (Waki et al., 2000, 2002), en vol spatial chez la souris (Andreev-Andrievskiy, 2017) et chez le singe (McCutheon, 1977). Il est certain que cette technique est encore peu utilisée.

En outre, peu d'études ont réalisé la mesure directe et en continu de la PIC par télémétrie chez l'animal en microgravité réelle ou simulée. D'une part, que quelques études ont été réalisées pour la mesure de la PIC dans un modèle de microgravité simulée, chez le lapin suspendu à -45° pendant 7 jours (Tatebayashi et al., 2003) et chez le rat pendant 2 heures (Maurel et al., 1996), ou encore chez le singe en alitement à -6° (Keil et al., 1992). En outre, seules quelques études ont utilisé un système de télémétrie pour mesurer la PIC chez le rat, allant de 5-6 jours à 28-50 jours (Lin and Liu, 2010; Hiploylee and Colbourne, 2014; Gompf et al., 2016; Guild et al., 2018; Eftekhari et al., 2020). Une étude réalisée chez le macaque, a développé des capteurs piézo-électriques avec une faible dérive pour mesurer la PIC de 22 à 281 jours (Jasien et al., 2020). Néanmoins, cette méthode de mesure est également invasive, puisque le crâne doit être percé, du ciment dentaire et des vis doivent être utilisée (comme rapporté chez le rat), la taille du cathéter est trop important la souris pouvant léser le tissu cérébral… D'autres mises au point doivent être réalisées, en utilisant des implants télémétriques plus fins et plus sensibles, comme par exemple la sonde Millar®.

Enfin, il n'a pas ou peu été mesuré la PV en condition de microgravité réelle ou simulée, ou par télémétrie, chez l'animal (Shellock et al., 1985; Robinson et al., 1996). Des mesures de l'hémodynamique centrale (pression de l'artère pulmonaire, atriale, ventriculaire, pleurale) ont été réalisées chez le babouin en vol parabolique (Latham et al., 1994). La PV est souvent mesurée de manière invasive par cathétérisme de la veine à l'aide d'un cathéter relié à un transducteur de pression, au niveau de la veine jugulaire ou fémorale, chez le rongeur anesthésié ou vigil (Shellock et al., 1985; Robinson et al., 1996; Parasuraman and Raveendran, 2012). Pour que la mesure soit réalisée en chronique, il aurait fallu laisser le cathéter sortir de l'animal, mais nous n'aurions pas pu réaliser cette procédure sur une souris vigile pendant une longue durée (10 jours). De plus, dans notre modèle, la mesure de la PV n'aurait pas pu être réalisée au niveau de la veine fémorale en raison de la suspension.

Notre étude a mis en évidence que les implants télémétriques (HD-X11, DSI), utilisés dans notre étude pour la PA, n'était pas adapté pour la mesure de « faibles pressions » comme pour la PIC et la PV. D'une part, nous sommes arrivés aux limites de l'utilisation de ces implants en raison de la dérive maximale et de la précision initiale du capteur de pression des implants télémétriques, étant de +/- 2 mmHg et de 3 mmHg respectivement. Dans certaines études, cette dérive (de +/- 4 mmHg pour les implants de Kaha Sciences) ne semble pas biaiser par les signaux mesurés, comme pour la PIC qui est resté stable après plusieurs mois (Eftekhari et al., 2020). D'autre part, la composition du cathéter de pression pour la détection de la PIC et le modèle d'inclinaison à -30° n'était peut-être pas assez appropriée. En effet, le cathéter de l'implant (HD-X11), composé d'un fluide et d'un gel permettant la détection de la pression pulsée, permet une acquisition précise de la PA à court terme et à long terme (Van Vliet et al., 2006). Dans notre étude, l'utilisation de cet implant nous a permis un enregistrement adapté et précis de la PA dans notre modèle de microgravité simulée. Néanmoins, pour la mesure de la PIC, qui présente une pression moins pulsatile et une faible valeur moyenne (environ 5 mmHg), cet implant n'était pas adapté. Nous avons obtenu des valeurs négatives, et, lors de l'inclinaison à -30°, les valeurs ont diminué, probablement en raison d'un déplacement du gel du cathéter ou encore d'une obstruction de l'extrémité. Une étude réalisée chez le rat vigile, a réalisé l'enregistrement de la PIC pendant 50 jours par l'utilisation d'implant télémétrique (Kaha Sciences) (Eftekhari et al., 2020). Malgré que les valeurs de la PIC soient faibles, avec une moyenne de 0.5 mmHg en position normale, ils ont démontré que lorsque le rat se levait, la PIC diminuait à -3.5 mmHg. A l'inverse, lorsque le rat avait la tête inclinée vers le bas (imposé par une suspension par la queue à 90°), la PIC augmentait rapidement (10 secondes) en revenant à des valeurs proches de 0 mmHg.

Mesure indirecte et directe de l'activité du SNA

Le système CV réalise en permanence des ajustements circulatoires réflexes par le SNA pour maintenir l'homéostasie, par conséquent, l'analyse des changements de la FC dans le temps fournit des informations sur le fonctionnement autonome (Stein and Pu, 2012). L'analyse de la VFC, mise au point pour évaluer les influences du système nerveux autonome sur le cœur et les vaisseaux sanguins chez les humains et les animaux, est un outil non invasif utilisé pour analyser l'activité électrique cardiaque (Elghozi et al., 2001; Thireau et al., 2008; Ferreira and Zanesco, 2016; Taralov et al., 2016; Behar et al., 2018) .

Cette analyse est utilisée afin de mieux caractériser le phénotype cardiaque, le rôle des médiateurs, des substances pharmacologiques et des voies de signalisation dans le rythme et la FC (Elghozi et al., 2001). De plus, les récents développements des systèmes d'enregistrement non invasifs de la PA ont offert de nouvelles possibilités d'étudier les fluctuations continues de la PA et du SNA au moyen de l'analyse spectrale. L'analyse spectrale permet de calculer les fonctions de transfert entre les spectres de la FC et de la PA, ou de la respiration, ce qui peut améliorer la compréhension de la dynamique du système CV et autonome (Elghozi and Julien, 2007; Laude et al., 2008). Aussi, l'approche temporelle appelée la technique de séquence qui identifie des séquences d'augmentations consécutives ou opposées de la PA et des intervalles RR de la FC, est également considérée comme une estimation instantanée du baroréflexe spontané (Baudrie et al., 2007; Elghozi and Julien, 2007). Les enregistrements microneurographiques des nerfs sympathiques ont été utilisés pour définir le rôle des différentes fréquences présentes dans les nerfs sympathiques dans la régulation de la PA. L'activité sympathique et les baroréflexes artériels sont des éléments critiques dans la production de la variabilité CV (Elghozi and Julien, 2007). Bien que diverses méthodes soient utilisées pour évaluer l'état du SNA (dosages biochimiques, tests pharmacologiques et réflexes cardiovasculaires), la plus couramment utilisée est l'analyse du VFC dans les domaines temporel et fréquentiel (Thireau et al., 2008). Cependant, étant donné l'importance potentielle des voies non baroréflexes ou non autonomes dans la variabilité CV, il est nécessaire de rester prudent en voulant établir des liens entre les modifications de la PA, de la FC, et l'activité du SNA (Malpas, 2002).

Bien que ces méthodes aient suscité un intérêt considérable, il est suggéré que la corrélation entre l'enregistrement directement du tonus nerveux et la détermination indirecte par la VFC mesurés chez l'animal, n'est pas toujours représentative de l'activité précise du SNA (Marmerstein et al., 2021). Par conséquent, la mesure directe de l'activité nerveuse fournit un aperçu important des mécanismes fondamentaux de la régulation du SNA sur les paramètres CV. L'évaluation du SNA via des enregistrements directs au niveau des fibres sympathiques ou parasympathiques s'est avérée intéressante dans le domaine de la recherche clinique (Bremner et al., 2020). De nos jours, beaucoup de progrès ont été réalisés afin d'élaborer des micro-technologies pour la réalisation d'enregistrements précis chez les petits mammifères. Dans ce projet, nous avons cherché à concevoir des micro-implants

flexibles, composés de microélectrodes sensibles permettant un enregistrement de haute qualité. Ces implants sont basés sur bio-sondes neuronales permettant l'enregistrement cérébral en télémétrie, élaborées par nos collaborateurs (Saunier et al., 2020; Vajrala et al., 2021). Un des points importants est qu'il est nécessaire d'utiliser des électrodes flexibles qui peuvent être interfacées avec les nerfs, afin d'obtenir un enregistrement et une stimulation de haute qualité sans causer de dommages et en limitant les artéfacts en lien avec les nerfs et aux tissus environnants. L'utilisation de matériaux flexibles, biocompatibles et extensibles, est une approche très prometteuse pour enregistrer et stimuler les nerfs avec des procédures de placement moins invasives. Ces dispositifs sont généralement constitués de polymères biocompatibles comme le parylène, le polyimide, ou des hydrogels avec des électrodes métalliques conductrices. Pour améliorer les interfaces bioélectroniques entre le nerf et le dispositif à la fois en termes d'enregistrement et de stimulation, des matériaux conducteurs micro- et nano-structurés biocompatibles tels que des polymères conducteurs sont utilisés à la place d'électrodes métalliques rigides (Cointe et al., 2022). L'enregistrement et la stimulation haute résolution sont des caractéristiques clés et un défi important consiste maintenant à récupérer des informations pertinentes codées dans des signaux à faible bruit.

Initialement, nous avons réalisé plusieurs essais avec les micro-implants conçus par nos collaborateurs, ce qui nous a permis d'obtenir des données d'enregistrement préliminaires sur l'activité directe du nerf vague gauche chez des souris anesthésiées (Cointe et al., 2022). Grâce à ces essais, nous avons participé à l'élaboration de nouveaux types d'implants adaptés pour la mesure de l'activité du SNS au niveau du nerf rénal et du PNS au niveau du nerf vague nous permettant de mesurer directement l'activité sympathique (au niveau du nerf rénal). Bien que la conception et la fabrication finales de ces microélectrodes dépassent la portée de cette thèse, les travaux réalisés ont permis de mesurer et de concevoir des microélectrodes qui peuvent être placées et sécurisées au niveau du nerf afin de réaliser un enregistrement à long terme des souris éveillées.

Adaptation CV dans le modèle de suspension chez la souris

La première partie de ce travail de thèse était consacrée à l'étude de la cinétique de l'adaptation CV, notamment de la PA et de la FC, et de sa régulation par le SNA, à la microgravité simulée à court et à long terme chez la souris.

En effet, le rôle du SNA dans l'adaptation CV lors des missions de courte et de longue durée, reste mal compris (Mandsager et al., 2015). En raison du nombre limité et du coût des vols spatiaux, les principales données sur les réponses cardiovasculaires et autonomes sont obtenues par les modèles de simulation sur Terre, chez l'Homme et chez le rongeur. Malgré qu'il a été reporté que le modèle de déchargement du train arrière chez le rongeur simule la microgravité et les adaptations physiologiques retrouvées chez les astronautes en vol (Globus and Morey-Holton, 2016; Hawliczek et al., 2022), les réponses hémodynamiques et autonomes rapportées dans la littérature sont parfois contradictoires. Ceci peut être retrouvé, non seulement en raison de la divergence entre les espèces, mais également en raison des différences dans la durée des protocoles et dans les points de mesure. De plus, les modifications de l'activité physique et des rythmes circadiens pendant la suspension pourraient également avoir un impact sur les réponses hémodynamiques et autonomes (Yamamoto et al., 2015; Brainard et al., 2016).

C'est pourquoi, dans cette première partie, afin de clarifier les données de la littérature concernant l'adaptation CV et sa régulation par SNA, la mesure en continu des paramètres physiologiques d'intérêt a été réalisée chez la souris vigile en utilisant le modèle de suspension du train arrière. Afin d'étudier la cinétique de l'adaptation CV le protocole expérimental, de 10 jours consécutifs, a été réalisé en trois phases distinctes : trois jours de contrôle, cinq jours de suspension, et deux jours de récupération. Au cours de cette période, le poids des souris ainsi que leur consommation d'eau et de nourriture ont été mesurés. À l'aide de dispositifs de radio-télémétrie implantables, les paramètres physiologiques ont été recueillis en continu les paramètres CV, tels que la PA et la FC, ainsi que les paramètres pouvant influencer l'activité du SNA, tels que l'activité locomotrice et la température centrale et sous-cutanée, ont été recueilli en continu pendant toute la durée du protocole. Afin d'étudier la régulation autonome des paramètres CV, la VFC et la sensibilité du baroréflexe ont été analysés.

Réponses dynamiques à la suspension et à la récupération

Nos résultats indiquent que les réponses CV étaient très dynamiques pendant la période de contrôle et, au cours de la phase de suspension de 5 jours, il y avait une adaptation initiale de la FC et de la PA, suivi d'un retour progressif aux valeurs contrôles. En effet, nos résultats montrent que la réponse initiale à la suspension conduit à une bradycardie significative, les 24 premières heures, accompagnée d'une augmentation du gain du baroréflexe et de l'activité vagale (déterminée par l'analyse de VFC). Précisément, le SDNN, un marqueur temporel de la VFC reflétant la variabilité totale du SNA (Thireau et al., 2008), démontre une augmentation marquée le 1er de la suspension, jusqu'au 2ème jour, par rapport aux valeurs de la période contrôle. De plus, le RMSSD, autre marqueur temporel de la VFC, représentant quant à lui exclusivement l'activité parasympathique cardiaque, était également élevé le 1er jour de suspension. Même si ces marqueurs temporels ont montré des changements pendant la suspension, il est intéressant de noter qu'il n'y a pas eu de changement significatif dans l'analyse du domaine fréquentiel de la LF, considérée comme un indice des tons sympathiques et parasympathiques cardiaques et de la HF, reflétant uniquement le tonus parasympathique cardiaque, par rapport à la période basale. Le HF tend à augmenter seulement le 1er jour de la suspension, parallèlement à la diminution de la FC, ce qui suggère également l'augmentation du tonus vagal. Cette absence de différences significatives des marqueurs fréquentiels pourrait être favorisée par la grande variabilité interindividuelle. Quant à la diminution initiale de la FC, celle-ci se stabilise à partir du 3ème jour et revient à des valeurs de base avant la fin de la suspension, malgré la persistance de la diminution drastique de l'activité locomotrice, retrouvée également pendant les vols spatiaux (Baran et al., 2021). La bradycardie est aussi accompagnée d'une diminution de la consommation d'eau, ce qui reflète une adaptation précoce à la redistribution des fluides vers la partie supérieure du corps, médiée par des mécanismes neurohormonaux (Antunes-Rodrigues et al., 1992). Effectivement, l'augmentation du volume sanguin central, avec une augmentation de la PV, et la distension du système vasculaire thoraco-céphalique, sollicite les récepteurs centraux carotidiens, aortiques et cardiaques qui vont activer les mécanismes réflexes visant à réduire la surcharge liquidienne. Il va être retrouver une augmentation de la libération du PNA plasmatique par le cœur, induisant une augmentation de la natriurèse et de la diurèse, conduisant à une véritable hypovolémie (Antunes-Rodrigues et al., 1992; Fortrat et al., 2017; Baran et al., 2021).

L’augmentation du PNA plasmatique a été rapportée après 2 heures de suspension à -30° HU chez le rat en réponse à l’hypovolémie centrale précoce (Gauquelin et al., 1987). De plus, des mesures directes de la pression veineuse centrale (PVC) chez les rats ont montré que l'augmentation de la PVC était liée au niveau d’hypervolémie et qu’elle restait élevée après 24 heures à -45° (Shellock et al., 1985). C’est pourquoi, nous supposons que les changements initiaux de la FC, observés dans notre étude seulement les 2 premiers jours de suspension, reflètent de l'adaptation initiale au déplacement central des fluides (Baran et al., 2021). À l'inverse, concernant les modifications éventuelles de l’activité sympathique, nos résultats montrent que la PA systolique et diastolique augmente progressivement jusqu’au 3ème jour de suspension, avant de revenir aux valeurs basales au 5ème jour de suspension. De plus, nos résultats indiquent qu’après 72 heures de suspension, la FC, les marqueurs indirectes de l’activité du SNA et le baroréflexe sont stables, et ne présentent pas de différence avec la période contrôle.

Finalement, peu d’études ont été réalisées chez la souris suspendues à -30°, et très peu d’études ont mesurés ces paramètres CV de manière continu chez l’animal vigil. Une étude menée chez la souris a également rapporté une bradycardie modérée, mesurée par télémétrie, au 2ème jour de suspension, persistant pendant 4 jours, pour ensuite revenir aux valeurs contrôle (Powers and Bernstein, 2004). En revanche, cette étude n’a pas montré de modification de la PA significative pendant le protocole de suspension chez ces souris. Une autre étude, menée chez le rat, a montré augmentation significative de la PA systolique pendant les 14 jours de suspension (Tsvirkun et al., 2012). Cependant, ces auteurs n'ont pas rapporté de diminution initiale de la FC.

Plusieurs raisons peuvent expliquer les résultats controversés de la littérature : 1) l’espèce et la taille de l’animal, qui peuvent influer l'ampleur et la réponse à la redistribution céphalique 2) la condition de mesure, si l'animal est détaché de la suspension, n’a pas été habitué à la procédure ou si le temps de récupération après la chirurgie n’est pas suffisant, si il y a le recourt à l’anesthésie ou à la chirurgie pour réaliser la mesure 3) si la mesure est effectuée après la suspension, comme beaucoup d’étude (Powers and Bernstein, 2004; Moffitt et al., 2008; Zhang et al., 2008; Tsvirkun et al., 2012; Hawliczek et al., 2022).

La période de récupération, qui représente le retour à la gravité normale avec le modèle de suspension, est également intéressante pour comprendre les adaptations post-vol chez les

astronautes. Nos résultats ont montré que, comme rapporté dans la littérature, le 1er jour de récupération induit une tachycardie de repos significative et une diminution de l'activité vagale. En effet, la tachycardie de repos dans les modèles de rongeurs a été précédemment décrite lors de la récupération, après 7 jours ou 14 jours de suspension chez les souris (Powers and Bernstein, 2004; Jung et al., 2005) et chez les rats (Foley et al., 2005; Mueller et al., 2006; Moffitt et al., 2008). Ces résultats sont en accord avec l'hypovolémie centrale induite par le retour à 1 G qui conduit également à l'augmentation significative de la consommation d'eau significative au 1er jour de récupération. Egalement, la PA est revenue aux valeurs de base, néanmoins, une diminution significative est observée au 2ème jour de récupération. Ces résultats sont en accords avec la littérature, concernant le retour aux valeurs de base de la PA à la récupération, puisque des études ont montré que la PA au repos était normale ou diminuée par rapport au contrôle, après 14 jours de suspension chez le rat (Fagette et al., 1995a; Foley et al., 2005; Moffitt et al., 2008). Chez la souris, Powers et Bernstein ont constaté que la PA moyenne diminuait légèrement mais n'était pas significativement différente (Powers and Bernstein, 2004). Au 2ème jour de récupération, la diminution significative de la PA peut refléter une réponse sympathique réduite au défi postural. Il a été suggéré que l'altération du baroréflexe et de la réponse sympathique pourrait jouer un rôle dans le déconditionnement CV et l'IO observés après une exposition à la microgravité simulée ou réelle (Brizzee and Walker, 1990; Moffitt et al., 1998, 2008; Powers and Bernstein, 2004; Foley et al., 2005; Jung et al., 2005; Eckberg et al., 2010). Foley et ses collaborateurs (2005) ont montré que l'augmentation de l'activité sympathique (mesurée par RSNA) médiée par le baroréflexe était atténuée après 14 jours de suspension chez les rats. Powers et Bernstein (2004) ont également montré une diminution du point opérationnel du baroréflexe (reflétant la sensibilité du baroréflexe), déterminé après l'injection de dose de nitroprussiate de sodium (vasodilatateur artériel, diminuant la PA) et phényléphrine (vasoconstricteur, augmentant la PA), après 14 jours de suspension chez la souris. Dans notre étude, nous avons également observé que les marqueurs indirects du SNA (via l'analyse de la VFC) et notamment le SDNN, était diminuée au 1er jour de récupération en comparaison au contrôle. En revanche, l'activité parasympathique cardiaque (RMSSD) et la SBR n'ont pas montré de changement significatif, malgré une tendance à la diminution de la SBR chez la majorité des souris (7 sur 8). La tendance à la baisse observée dans la SBR peut refléter un manque d'adaptation du SNA au défi postural.

Moffitt et ses collaborateurs (2008) ont montré une diminution du SDNN (déterminé par l'analyse de la VFC) après 14 jours de suspension chez le rat, et également une diminution des valeurs absolues du LF et du HF (déterminés par l'analyse spectrale de la PA). Cette étude a aussi démontré une augmentation du tonus sympathique, avec une augmentation favorisée de la FC en réponse à l'administration d'atroprine (bloqueur des récepteurs muscariniques cardiaques, reflétant le tonus parasympathique cardiaque) et au contraire, une diminution significative en réponse à l'administration de propanolol (bloqueur des récepteurs β-adrénergiques cardiaques, reflétant le tonus sympathique) (Moffitt et al., 2008).

Plusieurs études ont montré une augmentation du tonus sympathique ainsi qu'une altération de de l'activité du SNS médiée par le baroréflexe en réponse à la suspension (Makino et al., 1997; Jung et al., 2005; Stahn et al., 2017). Une étude a montré une augmentation de la concentration en norépinephrine, après 7 et 14 jours de suspension chez le rat, et en épinéphrine, après 7 jours (Woodman et al., 1991). Néanmoins, l'augmentation des catécholamines plasmatiques n'est que très peu rapportée, c'est la raison pour laquelle certains auteurs suggèrent que l'augmentation SNS est associée au stress du modèle, provoquant la dépression chez les animaux (Moffitt et al., 2008; Tsvirkun et al., 2012), avec une augmentation du taux de corticostérone sanguin rapportée après la suspension ou le vol à court et à long terme (Aviles et al., 2005; Wang et al., 2007; Globus and Morey-Holton, 2016). En revanche, d'autres études réalisées chez le rat suspendu ne montre pas de modification du taux de corticostérone (Moffitt et al., 2008; Chowdhury et al., 2013). Il est suggéré que l'augmentation du SNS serait en réponse au réajustements spécifiques associés au déconditionnement CV, en compensation à l'hypovolémie et à la dérégulation du SNA.

Enfin, le 2ème jour de récupération prouve l'importance des points de mesure. En effet, la plupart des études du déconditionnement CV sont réalisées immédiatement après la dé-suspension de l'animal. Nos résultats suggèrent que deux jours de récupération ne sont pas suffisant pour une récupération complète. Néanmoins, une étude menée chez le rat suspendu pendant 14 jours, a montré que l'activité sympathique centrale et périphérique, déterminée en mesurant le taux de norépinephrine dans des cellules du tronc cérébral, du cœur et du rein, reviennent à des valeurs normales les 24 heures qui suivent la dé-suspension, mais il y avait une hyperactivité après 6 heures de récupération (Fagette et al., 1995b). En revanche, ces auteurs soulignent l'importance des points mesures pour l'interprétation des résultats : « *This*

raises the problem of interperting the results obtained in animals killed few hours after return from spaceflight » (Fagette et al., 1995b). De manière contradictoire, une autre étude, menée chez la souris suspendue pendant 28 jours, indique que le remodelage et le dysfonctionnement cardiaque provoqué par la suspension est réversible, mais que ces effets sont intensifiés à la phase précoce de récupération (7 jours) et que les souris récupèrent seulement après 14 jours (Zhong et al., 2016).

Impact des cycles lumière/obscurité et variations des rythmes circadiens

La radio-télémétrie nous a permis d'évaluer l'impact de la suspension sur les variations circadiennes des paramètres mesurés chez les souris pendant et après la suspension. L'alternance des cycles de lumière et d'obscurité a été maintenue par la lumière de l'animalerie.

D'une part, l'activité locomotrice et la température corporelle, mesurées chez les souris vigiles par radio-télémétrie, démontrent des variations rythmiques quotidiennes marquées pendant la période contrôle, avec des valeurs plus élevées pendant les cycles d'obscurité et plus faible lors du cycle de lumière (Ripperger et al., 2011; Gordon, 2017). Ces différences dépendantes des cycles de lumière et d'obscurité reflètent les rythmes circadiens. Les rythmes circadiens ont des influences puissantes sur presque toutes les fonctions corporelles, telles que la température, l'activité, la consommation, la PA et la FC (Li et al. 1999). En tant qu'animaux à activité nocturne, les pics d'activité de locomotion et cardiovasculaires sont élevés pendant la période d'obscurité, ainsi l'augmentation de la PA et de la FC permet de répondre aux exigences d'une activité accrue chez les souris (Li et al. 1999). Nos données ont confirmé une corrélation claire entre la température et l'activité locomotrice, puisque l'élévation de l'activité est parallèlement corrélée avec l'élévation de la température. Ces deux paramètres ont également la même réponse pendant la suspension et pendant la récupération.

La suspension induit une diminution drastique et persistante de l'activité locomotrice, dès le jour jusqu'à la fin de la suspension. Également, dans notre étude, il y a une perte de la périodicité et des différences jour/nuit de l'activité (Tsvirkun et al., 2012). Cette réponse est dû à la contrainte de la suspension, puisque ces paramètres reviennent à la normale après la dé-suspension. Ces résultats sont supportés par quelques études ayant mesurés l'activité

locomotrice par télémétrie chez le rongeur subissant la suspension à -30°, rapportant une diminution spectaculaire de l'activité dès le 1er jour jusqu'à la fin du protocole de suspension de 14 jours chez le rat (Tsvirkun et al., 2012) et chez la souris (Powers and Bernstein, 2004). Il est bien connu que l'inactivité physique pendant la suspension participe au déconditionnement physique et CV (Moffitt et al., 2008; Tsvirkun et al., 2012; Hawliczek et al., 2022). Il a été démontré que l'inactivité physique modifie la régulation physiologique du système CV, en réduisant la tolérance à l'exercice, en provoquant un dysfonctionnement vasculaire périphérique et en altérant le contrôle des réflexes autonomes (par exemple, la fonction baroréflexe et la régulation de l'activité nerveuse sympathique) (Moffitt et al., 1998; Mueller et al., 2006; Just et al., 2015). Aussi, l'importance de l'activité locomotrice comme déterminant de la PA et de la FC chez la souris a été démontrée dans des études précédentes (Sheward et al., 2010).

La température corporelle suit une tendance très similaire à l'activité, avec une diminution marquée pendant les 5 jours de suspension. Dès le 1er jour de récupération, ces paramètres reviennent aux valeurs de base, et retrouvent leur rythmicité des cycles de lumière et d'obscurité. De plus, pendant la suspension, la diminution de la température centrale n'était significative que lors des cycles d'obscurité. Il est intéressant de noter que la consommation alimentaire des souris revient à des valeurs comparables à la période contrôle après le 3ème jour de suspension, ce qui suggère un mécanisme compensatoire de thermorégulation afin de maintenir la température corporelle (Gaskill et al., 2013). Également, dans des conditions où la nourriture est limitée et la température ambiante est basse, la souris entre facilement dans un état de torpeur, qui un état de suppression métabolique transitoire, caractérisé par une baisse contrôlée du taux métabolique, de la température corporelle centrale et de l'activité physique (Lo Martire et al., 2018). L'induction de la torpeur dépend de l'activité du SNA, et provoque une diminution de la FC et de la PA chez la souris (Swoap and Gutilla, 2009; Lo Martire et al., 2018).

Cette diminution de la température corporelle n'est pas observée chez les astronautes ou une étude récente rapporte une augmentation de la température corporelle centrale pendant les vols spatiaux (Stahn et al., 2017). Les changements de la température corporelle quotidienne présentent un intérêt considérable en matière de maladie et de santé (Kickhefel et al., 2011; Eggenberger et al., 2021). De nouvelles données montrent que l'augmentation de

la température corporelle, mesurée par imagerie thermographique chez la souris, n'est pas toujours associée à l'activité locomotrice mais aussi à des activités non locomotrices telles que le toilettage et les ajustements posturaux, qui induisent à elles seules une élévation considérable de la température corporelle (Shimatani et al., 2021). Une étude récente menée chez des souris femelles à bord de la Station Spatiale Internationale (mission RR-1), sacrifiées après 37 jours de vol, a démontré que la diminution des activités non locomotrices, telles que le toilettage et les ajustements posturaux, provoque également une thermogenèse adaptative (Wong et al., 2021). L'ensemble de ces résultats suggèrent que la thermorégulation, même si elle est spécifique à une espèce, joue un rôle important dans l'adaptation physiologique à la microgravité.

Notre étude montre que la PA et la FC ont un profil rythmique similaire à l'activité et à la température corporelle, suivant une rythmicité circadienne avec des valeurs plus élevées pendant la phase d'obscurité chez nos souris (Agarwal, 2010). Les variations jour-nuit de la PA et de la fréquence cardiaque FC font parties des rythmes circadiens les mieux connus de la physiologie (Chen and Yang, 2015). Pendant la période contrôle, les signaux de la PA présentent une rythmicité circadienne, avec un schéma précis et des valeurs plus élevées la nuit, mais les changements observés pendant les 5 jours de suspension sont plus subtils et difficiles à interpréter. En effet, la différence ainsi que l'amplitude des valeurs moyenne de la PA des cycles lumière/obscurité semblent distinctement modifiées. Aussi, lors de la phase de récupération, le signal de la PA ne revient pas à un profil similaire au contrôle. En ce qui concerne la FC, qui diminue immédiatement à la suspension et revient progressivement après aux valeurs de base à partir du 3ème jour, perd totalement ses variations circadiennes pendant cette période. Comme la PA pendant la période de récupération, la rythmicité circadienne de la FC ne revient pas à la normale après la dé-suspension et ce pendant les deux jours de récupération.

De manière intéressante, l'augmentation la plus significative de la PA se produit pendant le cycle de lumière, ce qui est opposé à ce qui est observé pendant la période contrôle. De plus, la diminution de la PA pendant le cycle de lumière est plus atténuée. Ce profil anormal de la PA et la perte des variations circadiennes est appelé le profil de « non-dipper ». Une forme extrême de non-dipper se produit lorsque la PA pendant le sommeil est plus élevée. La perte de cette variation diurne peut contribuer à l'apparition et au développement de

maladies cardiovasculaires (de la Sierra et al., 2010) mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas bien compris, bien qu'une dérégulation du SNA, une altération du système HPA et du système rénine-angiotensine-aldostérone ainsi que de la fonction rénale, semblent impliquées (Rhoads et al., 2020). Ce phénomène a déjà été décrit dans le modèle de suspension chez le rat isolé en cage individuelle par Tsvirkun et ses collaborateurs (2012). Il est suggéré que ce profil non-dipper peut être en lien avec l'augmentation de l'activité sympathique et aussi, l'inactivité physique. En effet, la variation de la PA circadienne dépend au moins de deux facteurs principaux : l'activité physique et la fonction autonome (Agarwal, 2010). Les changements possibles dans la régulation du baroréflexe et du SNA induits par l'HU peuvent également jouer un rôle. En effet, des études réalisées sur des rats dénervés au niveau sino-aortique ont montré que la perturbation du baroréflexe augmente la pression artérielle des rats pendant le cycle lumière, éliminant la rythmicité de 24 heures, bien que le niveau et le modèle des rythmes de l'activité locomotrice n'aient pas été modifiés par la dénervation sino-aortique (Makino et al., 1997; Ziegler et al., 2018). De plus, les profils non dipper de la PA peuvent également être favorisés par les troubles du sommeil comme les apnées du sommeil, associés à une augmentation de l'activité sympathique et également à une prévalence accrue d'hypertrophie du ventricule gauche (Rhoads et al., 2020). Même si l'activité locomotrice et le repos sont considérés comme un facteur important dans l'interprétation des résultats sur la PA circadienne chez l'Homme, les quadrupèdes ne présentent pas les changements posturaux associés au sommeil et à l'éveil, ce qui complique l'interprétation translationnelle de la façon dont l'horloge circadienne influence la régulation de la PA. De plus, il est rapporté que les effets de l'activité locomotrice et du repos sur les variations diurnes de la PA peuvent être exagérés chez les rongeurs (Chen and Yang, 2015; Rhoads et al., 2020).

En outre, la représentation graphique des variations temporelles des paramètres mesurés par radio-télémétrie, en fonction des conditions expérimentales incluant la suspension et la récupération associée aux variations des paramètres en fonction des cycles de lumière et d'obscurité, a permis de montrer : 1) une rythmicité circadienne pour tous les paramètres pendant la période contrôle, avec des valeurs plus élevées pendant la phase d'obscurité ; 2) une perturbation de ces rythmes pendant la suspension de 5 jours ; 3) un dérèglement des rythmes pendant les jours de récupération. Un des objectifs de la période de contrôle de 3

jours était d'établir la nature de la forme basale des signaux, avant que les souris ne soient soumises à la suspension et à la récupération, nous permettant de voir l'effets de ces périodes sur la rythmicité.

Afin d'évaluer plus précisément l'influence les rythmes circadiens et de déterminer les caractéristiques circadiennes spécifiques dans l'oscillation des données, l'analyse du profil des signaux sur 24 heures est nécessaire. Dans notre étude, cette analyse a été réalisé par la méthode Cosinor, comme décrite dans la littérature (Cornelissen, 2014; Moškon, 2020) et notamment chez la souris télémétrée (Hou et al., 2021b) qui a permis de déterminer : le MESOR, la moyenne ajustée au rythme ; l'amplitude, la demie-valeur entre le pic et le creux d'un rythme ; l'acrophase, le moment où le pic du rythme se produit. Nos résultats ont montré que la PAS était plus affectée par la suspension que la PAD. En effet, nos résultats montrent une augmentation significative du MESOR de la PAS pendant la suspension, ce qui n'est pas retrouvé pour la PAD. De manière étonnante, il n'y a pas de différence de l'amplitude et de l'acrophase pendant la suspension, même si une tendance à la diminution de l'amplitude de la PAS, la PAD et également de la FC, est observée pendant la suspension, mais la variabilité est trop importante. Nous pensons que l'analyse des données groupées par condition, et non pas jour, masque l'effet délétère de la suspension sur les rythmes. En effet, d'autres analyses indiquent la perte de la différence significative de la PAS entre le cycle de lumière et d'obscurité pour le 2ème et 4ème jour de suspension, suggérant le dérèglement des rythmes et une augmentation de la PAS pendant les cycles de lumière. De manière surprenante, nos analyses ont montré que les rythmes circadiens de la PA plus affectés pendant la période de récupération, avec une diminution de l'acrophase de la PAS et de la PAD par rapport à la suspension. Cela appui notre hypothèse précédente selon laquelle les deux jours de récupération ne sont pas suffisants pour que les systèmes physiologiques et CV récupèrent leur pleine capacité normale. Dans la plupart des études, afin d'étudier les variations des rythmes circadiens selon un protocole expérimental ou selon une souche de souris particulière (par exemple, souris knockout pour des gènes de l'horloge interne comme Per2, CLOCK ou BMAL1), des facteurs environnementaux sont modifiés comme le décalage des horaires d'exposition à la lumière dans la pièce d'hébergement ou encore le contrôle de la prise alimentaire dans le temps (Hamaguchi et al., 2015; Smolensky et al., 2017). Dans une étude qui utilise un modèle murin d'hypertrophie cardiaque induite par une surcharge de pression,

Martino et ses collaborateurs ont constaté que la perturbation du rythme en logeant des souris dans des conditions claires/sombres de 10 heures affectait négativement la structure et la fonction cardiaques ainsi que l'expression altérée des gènes de l'horloge et des gènes de remodelage cardiaque (Martino et al. 2007 ; Chen et Yang, 2015). Il est important de noter que dans notre plan expérimental, nous n'avons pas rien modifié et que, par conséquent, toute modification du cycle circadien a probablement été limitée par le maintien strict de la LC et de la DC.

Il a souvent été démontré que les conditions de microgravité entraînent des perturbations circadiennes dans plusieurs paramètres physiologiques, y compris, mais sans s'y limiter, le sommeil et l'immunité (Guo et al., 2014; Yamamoto et al., 2015; Brainard et al., 2016; ElGindi et al., 2021). Des études supplémentaires seront nécessaires pour comprendre les changements de la rythmicité circadienne de la FC et de la PA en microgravité.

Limites du modèle et des analyses

Bien que le protocole expérimental réalisé soit contrôlé un maximum afin de comprendre l'impact de la suspension sur l'adaptation CV, nous avons constaté une interaction considérable entre les paramètres mesurés par télémétrie, notamment la FC et la PA, et la masse corporelle, ainsi que la consommation en aliment et eau des souris pendant la suspension. La réponse à un stress est classiquement mesurée par la perte de masse corporelle, la consommation de nourriture et la diminution de la température corporelle centrale.

La suspension a induit une perte de masse corporelle, qui a persisté après 2 jours de récupération ; ceci est en accord avec d'autres études, qui ont montré que le poids corporel diminuait après 14 jours de suspension des membres postérieurs chez le rat (Moffitt et al., 2008; Tsvirkun et al., 2012) et les souris (Powers and Bernstein, 2004). Ce résultat confirme l'efficacité de la suspension des membres postérieurs, comme le suggère une étude réalisée sur des rats après 7 jours de suspension (Ray et al., 2001). La perte de masse corporelle peut s'expliquer par l'hypokinésie, mais aussi par un déficit calorique avec une accumulation de tissu adipeux et la perte de masse musculaire (Hawliczek et al., 2022). Toutefois, l'analyse de la composition corporelle n'a montré aucune différence dans la graisse, le tissu maigre et le fluide corporel libre, avant et après 5 jours d'HU chez nos souris. L'analyse de la consommation

alimentaire et hydrique a démontré une diminution significative les deux premiers jours de suspension. En plus d'une adaptation initiale en lien avec la redistribution des fluides corporels et une hypervolémie centrale vraie, les 2 premiers jours de suspension semblent être une période de stress et d'ajustement (Musacchia et al., 1992).

Aussi, il est important de souligner que les souris étaient hébergées individuellement pendant toute la durée du protocole expérimental. L'isolement social est connu pour induire un comportement anxieux et de type dépressif, ainsi que pour perturber les rythmes circadiens, provoquer des déficits de mémoire et augmenter les niveaux de facteurs pro-inflammatoires (Tahimic et al., 2019). La suspension du train arrière à -30° a également été décrite comme un modèle de stress et de dépression en raison de cet aspect d'isolement social et de la « contention », pouvant modifier les réponses de la FC et de la FC (Moffitt et al., 2008; Tsvirkun et al., 2012). Il existe un certain consensus sur le fait que les caractéristiques liées au stress sont évidentes dans les modèles de suspension (Musacchia et al., 1992). Bien que nous ayons essayé de réduire le stress, en habituant les souris aux manipulations et à l'isolement avant le début des mesures, nous ne pouvons exclure les effets du stress sur les réponses CV observées (Tsvirkun et al., 2012; Globus and Morey-Holton, 2016).

Enfin, il ne faut pas oublier que ce modèle ne supprime pas la gravité, et certaines des différences observées entre les humains et les rongeurs, peuvent refléter les différences entre les ajustements circulaires de bipèdes et quadrupèdes, ou entre la taille des mammifères. Dans la mesure où la redistribution des fluides vers la partie thoraco-céphalique joue un rôle dans l'adaptation à la microgravité, la petite taille des rongeurs peut-être un facteur limitant ces adaptations, et cette redistribution sera mois conséquente que celle observée chez les astronautes (Powers and Bernstein, 2004; Andreev-Andrievskiy, 2017). Par ailleurs, les analyses des différents paramètres du SNA nécessitent des signaux stables de la FC, ce qui est difficile à obtenir chez des animaux éveillés et libres de leur mouvement. L'analyse de la VFC est basée sur des analyses publiées précédemment chez la souris équipée d'implant télémétrique, pour des intervalles de 3 minutes en début de matinée (Thireau et al., 2008).

L'ensemble de ces résultats illustrent la cinétique d'adaptation CV, des variations la FC et de la PA, et de sa régulation indirecte par le SNA, dans le modèle de suspension chez la souris vigile, ce qui peut donner des réponses au caractère controversé de la littérature.

Effets de la suspension sur le cœur

En plus de la surveillance physiologique des animaux, nous avons cherché à comprendre comment les 5 jours de suspension affectaient la structure et la fonction cardiaque.

D'une part, nos résultats indiquent que les 5 jours de suspension provoquent des modifications structurelles du cœur, avec une augmentation de l'épaisseur du septum interventriculaire, une diminution du diamètre interne et une augmentation de l'épaisseur de la paroi postérieure du ventricule gauche (VG) en systole.

Nos résultats sont contradictoires avec les données de la littérature, qui indiquent que la microgravité réelle ou simulée provoque des anomalies myocardiques, telle des modifications de la structure cardiaque ainsi qu'une dépression fonctionnelle. En effet, chez l'Homme, il est décrit que les vols spatiaux de longue durée provoquent une atrophie cardiaque, accompagnée d'une diminution de la masse ventriculaire gauche, une augmentation de la déformation cardiaque (sphéricité du cœur) et d'un remodelage cardiaque (Perhonen et al., 2001; Zhong et al., 2016; Ling et al., 2018; Liang et al., 2019; Jirak et al., 2022). Ces adaptations à la microgravité participeraient au déconditionnement CV et cardiaque, ainsi qu'à l'IO, après le vol spatial (Zhong et al., 2016; Jirak et al., 2022). Il est suggéré que l'atrophie cardiaque peut-être provoquée par une diminution de la charge volumique relative (en lien avec la migration des fluides, la mise en place des mécanismes neurohormonaux et la diminution du volume plasmatique qui s'ensuit), à une diminution de la masse des compartiments myocardiques, de la taille des cardiomyocytes et à un remodelage cardiaque (Perhonen et al., 2001; Jirak et al., 2022). Egalement, la déformation cardiaque et les modifications de la distribution des forces de compression pourrait favoriser le remodelage structurel du cœur et la prédisposition aux maladies cardiaques. Les analogues des vols spatiaux chez l'homme montrent des effets similaires, puisqu'il a rapporté une diminution du volume et de la masse du ventricule gauche pendant un alitement de 18 jours (Levine et al., 1997).

Des études menées chez le rongeur ont mis en évidence une diminution de la masse cardiaque, de la taille des cardiomyocytes, la présence d'un remodelage cardiaque, suggérant une atrophie cardiaque après un vol ou une suspension de courte durée (7 jours) (Perhonen et al., 2001; Zhong et al., 2016) et de longue durée (14 à 28 jours) (Liang et al., 2019, 2020). Chez le rongeur, le remodelage cardiaque peut-être induit par l'activation signaux de

remodelage pathologique (ERK1/2, HDAC4, WWP1) et du stress oxydatif (phosphorylation de la p47phox, Ser345, NADPH oxydase), mais aussi l'inactivation des voies physiologiques de l'AMPK, retrouvé dans les cœurs de souris après 28 jours (Zhong et al., 2016; Liang et al., 2019) ou 6 semaines de suspension à -30° (Zhong et al., 2021). Il a été montré que ces réponses étaient rétablies à des valeurs normales qu'après 14 jours de récupération chez la souris (Zhong et al., 2016).

Au contraire, une autre étude menée chez le rat a montré qu'après un vol ou une suspension de 7 jours et de 28 jours n'induisait pas de modification de la masse cardiaque et de la fonction chez le rat (Ray et al., 2001). Ces auteurs suggèrent que l'atrophie cardiaque n'intervient pas après une exposition de courte durée d'une ou deux semaines de microgravité chez les rongeurs adultes. Nos résultats sont en accord avec les données de cette étude, puisque nous avons montré que 5 jours de suspension chez la souris n'induisaient pas de modification de la taille des cardiomyocytes, ni la présence de fibrose cardiaque. Néanmoins, ces résultats sont contradictoires avec la majorité des études de la littérature, peut-être parce qu'elles concernent des suspensions de plus longue durée pour la plupart.

D'après nos résultats, nous pouvons poser l'hypothèse que l'hypertrophie du septum interventriculaire et de la paroi postérieure du VG peuvent être en lien avec les éléments suivants : 1) l'augmentation de la PA et l'augmentation de l'activité orthosympathique ; 2) l'infiltration de sang dans les parois et les changements de force de compression 3) le stress de l'isolement social dans le modèle de suspension. Chez l'Homme, l'hypertrophie du VG chez l'Homme est souvent associée soit à un facteur d'induction physiologique, comme l'entraînement à l'exercice, ou d'induction pathologique, comme l'hypertension et la cardiomyopathie (Perhonen et al., 2001; Triposkiadis et al., 2022). Par exemple, l'augmentation de l'épaisseur de la paroi du VG est retrouvée lors de cardiomyopathie hypertrophique, maladie CV héréditaire, en lien avec l'hypertension artérielle ou la sténose de la valve aortique. Les patients atteint de cette cardiomyopathie, peuvent souffrir de dyspnée, d'intolérance à l'exercice, ou encore de syncope (Triposkiadis et al., 2022). Ses principales caractéristiques histologiques sont la désorganisation et la fibrose des cardiomyocytes (Triposkiadis et al., 2022), ce qui, en revanche, n'est pas retrouvé chez nos souris après la suspension. Également, il est rapporté que les vols de courte durée ont montré une augmentation de la filtration capillaire, ce qui pourrait expliquer l'hypertrophie retrouvée

dans nos résultats, puisque l'hypertrophie septale pourrait être due à une augmentation de l'infiltration liquidienne à travers la paroi (Triposkiadis et al., 2022). Chez les mammifères, la charge volumique chronique du VG est associée à une hypertrophie excentrique avec une augmentation de la masse et du volume, et une préservation du rapport masse/volume, ainsi qu'à une distension accrue des chambres (Perhonen et al., 2001; Basirun et al., 2021). Enfin, chez l'animal, l'hypertrophie du VG peut être aussi associée au stress psychosocial provoqué par le modèle de suspension et l'isolement. Chez les rats mâles, l'HU provoque un déconditionnement CV, un déséquilibre sympathovagal et une anhédonie, un indice comportemental de dépression psychologique (Moffitt et al., 2008; Tsvirkun et al., 2012). De plus, il a été décrit que l'isolement et le stress psychosocial d'une semaine chez les rats, provoque une hypertension réversible accompagnée de changements structurels CV, tels que l'hypertrophie du VG et du ventricule droit, ainsi que de l'aorte (Carlier et al., 1988; Tsvirkun et al., 2012). De plus, il a été montré chez le rat, que l'isolement et le stress entrainent la perturbation des rythmes circadiens de la FC et de la température centrale, une augmentation du rapport LF/HF au repos suggérant une prédominance sympathique accompagnée d'arythmies, ainsi qu'une hypertrophie cardiaque inadaptée (Wood, 2014).

D'autre part, nos résultats indiquent les 5 jours de suspension provoquent l'augmentation de la FC, sans modification significative de la fonction systolique, c'est-à-dire de la fraction d'éjection et des volumes de remplissage du VG. Nos résultats sont à nouveau en contradiction avec les données de la littérature probablement en raison, d'une part, de la durée relativement courte de la suspension réalisée, d'autre part, de la difficulté de mesure des paramètres fonctionnels du cœur, puisque le cœur bat très rapidement chez la souris, même anesthésie, et que la fonction diastolique est difficilement quantifiable chez le petit animal. Ainsi, après un vol de longue durée chez l'Homme, le déclin de la fonction cardiaque est retrouvé par : une diminution du débit et de la contractilité cardiaque, une augmentation possible de la susceptibilité aux arythmies en raison d'une augmentation des intervalles de contraction ventriculaire (QT) et d'un déséquilibre sympathovagal (Zhong et al., 2016; Ling et al., 2018; Liang et al., 2019; Walls et al., 2020). Chez l'animal, la suspension entraîne la diminution de la fonction myocardiaque ainsi qu'un déséquilibre sympathovagal cardiaque. Le déconditionnement CV entraîne la prédisposition aux arythmies cardiaques, avec l'augmentation de l'expression de la forme phosphorylée de la connexine 43 dans le ventricule

gauche, protéine de jonction cardiaque assurant le couplage électrique cellule/cellule (Moffitt et al., 2013; Liang et al., 2020). La fonction myocardique est réduite chez la souris, avec une diminution de la fonction de raccourcissement, après 14 ou 28 jours de suspension (Liang et al., 2020). Chez la souris, il a été montré qu'après 28 jours de suspension, la fraction d'éjection et la fonction de raccourcissement était diminué, ainsi qu'une augmentation du diamètre interne et du volume diastolique du ventricule droit (Zhong et al., 2016). Nos résultats refléteraient donc une phase d'adaptation précoce à la microgravité.

Microgravité simulée, redistribution liquidienne et PIC

Une augmentation de la PIC en lien avec la redistribution des fluides corporels est possible lors d'une exposition à la microgravité réelle et simulée, mais la cinétique précise et les mécanismes physiologiques sous-jacents sont mal compris (Nelson et al., 2014; Zhang and Hargens, 2018; Marshall-Goebel et al., 2019; Kermorgant et al., 2020; Roy-O'Reilly et al., 2021).

Un des objectifs de cette thèse était de mesurer les variations directes de la PIC pendant une exposition aiguë et chronique à la microgravité simulée. Comme décrit dans la section des résultats, nous avons essayé de déterminer si la distribution des fluides induite par la suspension des membres postérieurs chez la souris entraînait une augmentation modérée de la PIC.

Nos tentatives de mesures directes par télémétrie de la PIC ou de la PV jugulaire afin de comprendre comment le cerveau est affecté par le déplacement des fluides n'ont pas été concluantes, en raison de plages de sensibilité et de dérive du cathéter de l'implant télémétrique utilisé (HD-X11, DSI) supérieures ou égales aux valeurs moyenne de la PIC et la PV (Czosnyka and Pickard, 2004; Li et al., 2020). Aussi, l'enregistrement de la PIC chez l'animal est une mesure difficile à réaliser et à analyser, puisqu'elle présente des fluctuations constituées de deux composantes : 1) des ondes de faible amplitude avec une fréquence élevée en raison des pulsations artérielles et 2) des ondes de forte amplitude avec une fréquence faible en raison des mouvements respiratoires) (Doi and Kawai, 1998).

Très peu d'études ont mesurées les variations de PIC en microgravité simulée chez le petit mammifère. En exemple, la PIC a été mesurée par télémétrie chez le rat incliné à 45° (Maurel et al., 1996) ou de manière invasive chez le lapin incliné de -15° à -75° (Doi and Kawai, 1998).

L'étude menée chez le rat démontre que l'inclinaison à -45° induit une augmentation immédiate et significative de la PIC intra-cerebroventriculaire, qui était 2 fois plus élevée que la ligne de base dès les 30 premières minutes. Ensuite, la PIC diminue graduellement, en restant significativement élevée pendant la première heure, avant de revenir aux valeurs de base. Egalement, l'étude menée chez le lapin indique que l'inclinaison à -45° provoque une augmentation immédiate de la PIC, avec des valeurs 2 à 3 fois plus élevée, persistante pendant 8 heures avant de revenir aux valeurs pré-inclinaison. Ils suggèrent que l'augmentation de la PIC pourrait être due en raison à la formation d'œdème dans le tissu cérébral, de l'engorgement veineux, et de la redistribution du liquide cérébrospinal de l'espace sous-arachnoïdien spinal vers l'espace intracrânien, en lien avec le changement postural (Doi and Kawai, 1998). Ces études démontrent que l'augmentation de la PIC et de la PV centrale est un réponse d'adaptation initiale à la redistribution des fluides, mais rien ne contredit l'idée que celle-ci peut augmenter plus tardivement lors d'une exposition prolongée (Maurel et al., 1996). Notre équipe a montré que l'augmentation du diamètre de la gaine du nerf optique, reflet indirect de l'augmentation de la PIC n'apparaissait que tardivement en HDBR après environ 3 semaines d'alitement alors qu'elle apparaissait précocement dans le modèle d'immersion sèche (Kermorgant et al., 2021).

De plus, l'ICP a récemment été mesuré dans une étude pilote menée chez le rat de rat vigile dans un modèle de lésion cérébrale diffuse (Kozler et al., 2019). Cette étude a montré que les enregistrements de la PIC nécessitaient l'utilisation d'un manomètre supplémentaire, collé au crâne de l'animal, et que, même avec ce manomètre, les données recueillies sur la PIC étaient difficiles à interpréter. Les auteurs suggèrent que les enregistrements de la PIC doivent être évalués avec une surveillance simultanée du comportement car les données enregistrées étaient en grande partie indéchiffrables. Ces conclusions rejoignent les nôtres : nous avons constaté que les moindres mouvements de la sonde de mesure de la PIC en aiguë, entraînaient de grands changements dans les plages de PIC, ce qui rendait nos données difficilement interprétables.

Enfin, il faut souligner quelques études ont mesurés la PIC par radio-télémétrie chez le rat (Silasi et al., 2009; Lin and Liu, 2010; Hiploylee and Colbourne, 2014; Guild et al., 2015; Shen et al., 2018; Williamson et al., 2018) et de manière invasive chez le rat (Marina et al., 2020), la souris (Schmidt et al., 2018), le lapin (Miyazaki et al., 2021) et le mouton (Guild et al., 2018).

Ces études nous ont permis de mettre au point notre protocole expérimental pour la mesure aiguë et chronique de la PIC dans notre modèle.

En effet, une des hypothèses de notre projet était que l'augmentation modérée de la PIC induit une augmentation parallèle et réversible de l'activité du SNS, La PIC est considérée comme pathologique quand elle est supérieure à 20 mm Hg, alors qu'une PIC physiologique est comprise entre 5 et 15 mm Hg chez l'Homme et chez le petit mammifère. En effet, il a été montré qu'une augmentation aiguë de la PIC de manière artificielle par injection de liquide céphalo-rachidien de synthèse, provoque une augmentation de la PA ainsi que de l'activité sympathique, démontrée par l'absence d'augmentation de la PA suite à l'injection d' hexamethonium (bloqueur ganglionnaire, antagoniste des récepteurs nicotiniques à l'ACh) (Guild et al., 2018; Miyazaki et al., 2021). L'augmentation de l'activité sympathique mesurée de manière directe chez le rat (Guild et al., 2018) et chez la souris (Schmidt et al., 2018) a également été montrée. Ces récentes études, ainsi qu' une étude réalisée au sein de notre équipe de recherche, ont suggéré que la PIC est un déterminant de l'activité sympathique, et suggère que cette activité pourrait être modulée via un mécanisme réflexe intracrânien , un nouveau « baroréflexe intracrânien » (Guild et al., 2018; Schmidt et al., 2018; Marina et al., 2020).

De plus, lors des vols spatiaux, il est rapporté qu'il y a plusieurs modifications cérébrales et ophtalmiques en lien avec une augmentation possible de la PIC, participant par exemple au syndrome neuro-oculaire associé aux vols spatiaux. La redistribution du liquide céphalo-rachidien contribue à l'élargissement ventriculaire et à une déformation régionale du parenchyme cérébral. Ces résultats suggèrent que les vols spatiaux de longue durée provoquent des changements globaux et locaux dans la structure du cerveau (Van Ombergen et al., 2017; Roberts et al., 2019).

Afin d'identifier les zones sensibles aux changements de PIC en lien avec la redistribution des fluides corporels dans notre modèle de microgravité chez la souris, des analyses qualitatives ont été réalisée pour détecter l'activation neuronale par l'utilisation du c-Fos. C-Fos fait partie d'une famille de gènes précoces immédiats sont impliqués dans la cascade de transduction du signal couplant les stimuli extracellulaires aux événements. En particulier, c-Fos est impliqué dans la régulation de la transcription et peut médier les effets à long terme

des facteurs de croissance et des signaux de dépolarisation de la membrane sur l'activité neuronale (Gao and Ji, 2009; Bo et al. 2019).

Les cerveaux de souris exposées à la microgravité simulée à court terme (après 1 jour de suspension) et à long-terme (après 5 jours), ont été prélevés. Le tissu cérébral a été sectionné le long du plan sagittal, dans le but de séparer le cerveau en hémisphère gauche et droit et d'examiner plusieurs régions cérébrales en même temps. Les résultats de l'immunomarquage au c-Fos indiquent qu'après un jour de suspension il est retrouvé une augmentation de l'activité de c-fos dans toutes les zones corticales, y compris l'insula, les zones motrices, le cingulum antérieur et les zones dorsales restrospéniales, ainsi que dans l'hypothalamus et le tronc cérébral. Il est intéressant de noter que le tronc cérébral, l'hypothalamus et l'insula sont fortement impliqués dans la régulation du tonus autonome (Sheng and Greenberg, 1990; Rahmouni, 2016). L'activation de la région motrice est intéressante, bien qu'elle peut également représenter l'effet dû à la contrainte physique (Yoo et al., 2020) ou à la prise d'aliments et d'eau (Martin and Sessle, 1993). L'activation de ces zones a été réduite après 5 jours de suspension, et seules quelques zones se sont révélées positives avec une faible intensité, dans l'hypothalamus, le cortex et le thalamus.

Ces observations préliminaires sont intéressantes et suggèrent que le cerveau réagit à la suspension. Néanmoins, il a été récemment montré que l'immunoréactivité basale du c-Fos dans le cerveau des souris C57BL/6J dépendait des conditions d'hébergement et du rythme circadien (Robins et al., 2020). Dans cette étude, il est montré que la lumière ambiante, les conditions de logement, et l'influence sociale ont un effet sur l'expression de c-Fos dans le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus et le gyrus denté. En outre, le cortex, l'hypothalamus, le striatum ventral et le mésencéphale présentaient une activité accrue pendant la phase sombre du cycle circadien uniquement dans chez les souris hébergées à raison de plusieurs animaux par cage, mais pas chez les souris en hébergement individuel. En 2017, une revue sur ces changements IRM associés aux vols spatiaux (réels ou simulés) a été rapportée. Van Ombergen et ses collaborateurs ont discuté des changements neuroplastiques dans le SNC et ont conclu que le cervelet, les zones motrices corticales et les voies liées au vestibule sont fortement impliqués, démontrant que ces régions cérébrales sont effectivement affectées par les vols spatiaux réels (Van Ombergen et al., 2017).

Nos résultats suggèrent que la région motrice, du tronc cérébral, de l'hypothalamus et l'insula, sont impliquées dans l'adaptation immédiate à la suspension. L'ensemble de ces données indique que, malgré l'habituation bien connue de l'expression de c-Fos à une stimulation répétée, cette expression est sensible aux conditions basales de l'hébergement et que ces questions de sensibilité doivent être prises en compte lors de l'analyse des données. Il serait intéressant de réaliser une imagerie 3D spécialisée avec une quantification et une visualisation complète de l'activité c-fos dans le cerveau. Cette quantification est particulièrement difficile avec les méthodes standard de laboratoire car l'activité cérébrale est constante, notamment au niveau des centres de contrôle neurovégétatif du tronc cérébral : il est donc difficile d'identifier une sur-activation par des méthodes d'imagerie standard.

CONCLUSION

&

PERSPECTIVES

Conclusion

Nos résultats ont permis d'illustrer l'adaptation CV dans le modèle de suspension arrière chez la souris. Par cette étude, nous concluons que ce modèle est un bon modèle pour étudier l'adaptation CV à la microgravité simulée, avec des réponses similaires à celles observées chez l'Homme (Powers and Bernstein, 2004; Globus and Morey-Holton, 2016). Grâce au développement de micro-instrumentation, et notamment de la radio-télémétrie, les paramètres CV tels que la PA et la FC, ainsi que les paramètres pouvant influencer le SNA, tels que la température corporelle et l'activité locomotrice, ont pu être recueillis en continu pendant toute la durée du protocole chez la souris vigile, ce qui donne une puissance et une fiabilité aux données recueillies. En plus de l'acquisition de ces données, la modélisation informatique, les analyses statistiques ainsi que la détermination de l'activité indirecte du SNA par l'analyse de la VFC et de la SBR, ont permis d'étudier la régulation des paramètres CV par les rythmes circadiens et par le SNA. Cette étude nous a permis de mettre en évidence les différentes phases de l'adaptation de certains systèmes physiologiques à la suspension : l'adaptation immédiate, l'adaptation prolongée à plus long-terme, l'adaptation à la récupération et l'adaptation à une re-suspension. Nous avons confirmé que la suspension provoque une bradycardie initiale accompagnée d'une augmentation de l'activité vagale et de la sensibilité du baroréflexe aux premières 48 heures de suspension. Aussi, nous avons montré que la suspension induit la diminution drastique et persistante de l'activité locomotrice et de la température. Ces réponses étaient également accompagnées d'une perte des rythmes circadiens, exacerbée pendant la phase de récupération. Notre étude a montré que la PA, systolique et diastolique, augmente progressivement jusqu'au 3ème jour de suspension, avant de revenir à des valeurs normales. Ces résultats évoquent une augmentation de l'activité sympathique, soutenue par la dérégulation des rythmes circadiens toujours présents, comme suggéré dans la littérature, retrouvée en adaptation prolongée à la microgravité simulée (Tsvirkun et al., 2012). Nous avons aussi montré que l'adaptation du système CV est similaire lors d'une seconde et courte re-suspension d'un jour. L'hypertrophie cardiaque, caractérisée par l'augmentation de l'épaisseur du septum interventriculaire et de la paroi postérieure du VG, sans modifications fonctionnelles ou à l'échelle de la cellule, pourrait refléter une phase d'adaptation initiale du cœur (FIGURE 70).

Nos résultats concordent avec les études récentes sur la suspension à court terme montrant des adaptations similaires chez la souris. En outre, nos données montrent un écart entre les mesures de l'activité locomotrice et les paramètres CV. Ces résultats laissent perplexe étant donné la forte corrélation entre la FC et l'activité. Nous supposons que l'augmentation globale du tonus sympathique observée pendant la LC peut contribuer à ces résultats. Enfin, les essais de mesure de la PIC et de la PV dans le modèle de suspension n'ont pas été concluants en raison des problèmes de sensibilité et de la taille des implants disponibles utilisés, difficilement adaptables pour ce modèle expérimental. Des tests complémentaires sont nécessaires, avec des implants plus sensibles et petits. Nous avons également tenté de mesurer l'activité du SNA de manière directe chez le souris. Nos travaux sur la mise en place et le design d'implant permettant la mesure de l'activité nerveuse parasympathique et sympathique chez la souris sont très prometteurs et permettront dans des études futures d'évaluer les variations de l'activité vagale et orthosympathique de manière chronique dans le modèle de 5 jours de suspension.

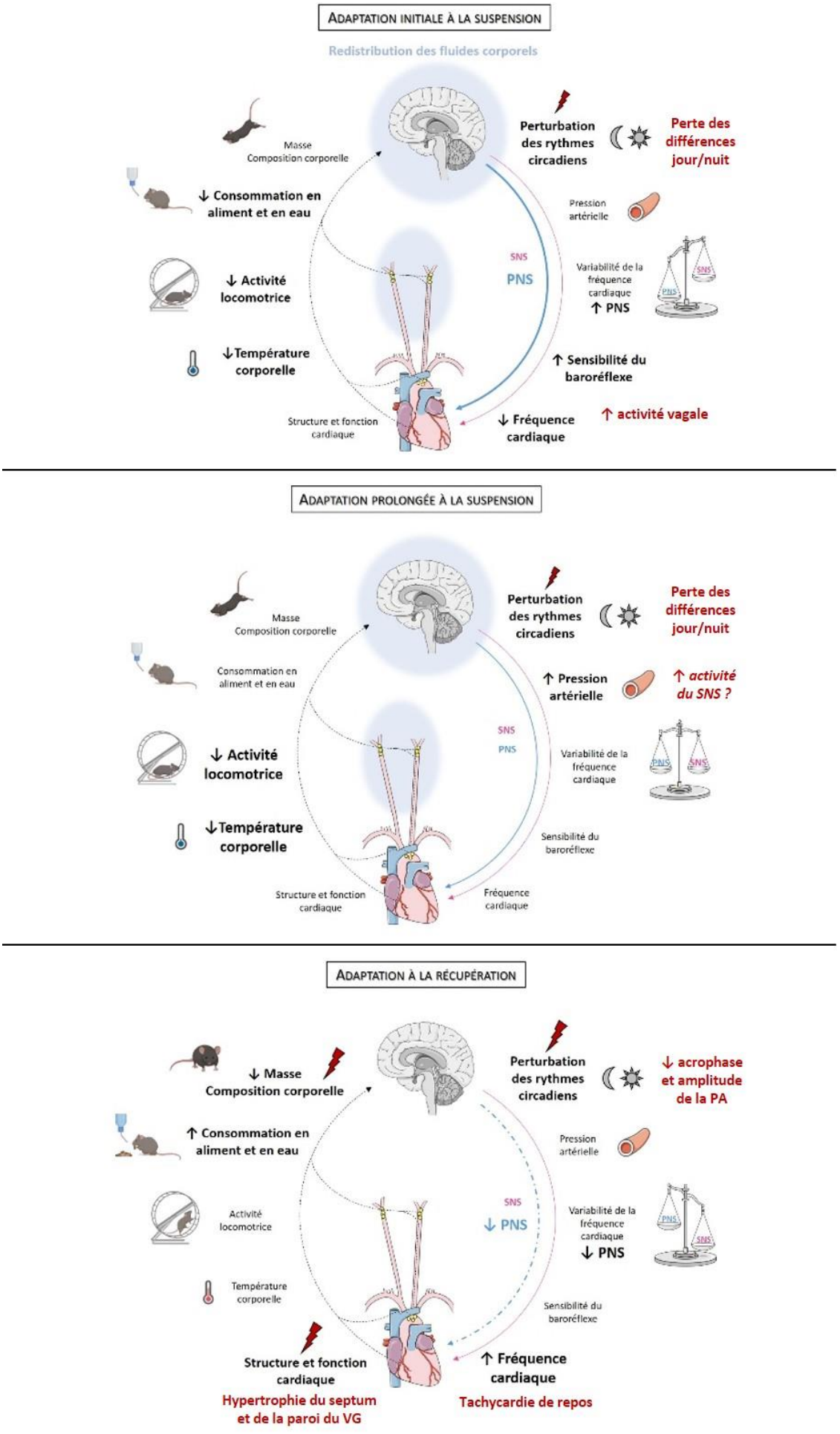


Figure 70. Synthèse des adaptations initiales et prolongées pendant et après l'exposition à la microgravité simulée chez la souris.

Perspectives

Pour aller plus loin dans l'évaluation de l'adaptation CV et plus précisément de sa régulation par le SNA, il serait intéressant de réaliser une étude complémentaire avec des souris femelles, afin d'étudier le déconditionnement CV et l'IO, notamment del la sensibilité du baroréflexe. En effet, les femelles semblent être moins tolérantes. Il est rapporté également que les femmes astronautes présentent une plus grande incidence à l'IO après un vol spatial, et au contraire, une incidence plus faible du SANS, possiblement liée aux effets protecteurs des hormones sexuelles féminines (Foley et al., 2005; Hawliczek et al., 2022).

L'activité nerveuse sympathique et parasympathique pourrait être mesurée de manière directe avec les micro-implants développés par nos collaborateurs, en inhibant le contrôle du cœur, par l'utilisation d'antagonistes cholinergiques (atropine, bloqueur des récepteurs muscariniques cardiaques) et noradrénergiques (propanolol, bloqueur des récepteurs β-adrénergiques cardiaques,) (Moffitt et al., 2008). Nous pourrions utiliser un modèle de dénervation sympathique cardiaque spécifique (par ablation du ganglion stellaire et moyen cervical de la chaine sympathique gauche) afin d'inhiber l'activité du SNS et d'évaluer les réponses CV à court terme, lors du protocole d'aiguë d'inclinaison, ou à long terme, pendant les 5 jours de suspension (Ziegler et al., 2018). Pour finir, le taux des catécholamines tissulaires ainsi que de la corticostérone plasmatique serait également pertinent afin de mieux comprendre nos réponses sur le stress CV réel et le stress imposé du modèle (Woodman et al., 1991; Moffitt et al., 2008), puisque ces hormones semblent augmenter lors des vols spatiaux (Lane et al., 1998).

D'autre part, il serait également intéressant d'évaluer l'inflammation, puisqu'il est rapporté que la suspension et les vols spatiaux chez les rongeurs affectent le système immunitaire inné et acquis, incluant une altération de l'expression des gènes et des profils des cytokines (Globus and Morey-Holton, 2016; Demontis et al., 2017). La suspension provoquerait une activation généralisée et transitoire des réponses immunitaires, qui seraient médiée par le stress anti-orthostatique, l'activation du SNA et/ou de l'axe HPA, et de l'inactivité physique (Globus and Morey-Holton, 2016). Il serait intéressant de faire un dosage des marqueurs des réponses pro-inflammatoires qui interviennent aussi en réponse à une situation stressante, tels que le TNF-α (Tumor Necrosis Factor), les cytokines IL-1 et IL-6 (interleukines 1 et 6) (Cardinali, 2018;

Hughson et al., 2018). En effet, les médiateurs inflammatoires semblent également intervenir dans certaines pathologies cérébrales, telles que l'hypertension intracrânienne idiopathique qui est définie par une augmentation de la PIC, par l'altération dans le drainage ou dans la production excessive de LCR. En effet, cette pathologie est associée à l'augmentation de l'expression de cytokines et de médiateurs inflammatoires, tels que le TNF-α, l'IL-6, mais également de la chimiokine CCL2, le cortisol glucocorticoïde (hydrocortisone) retrouvées dans le sérum sanguin ou le LCR de ces patients (Alimajstorovic et al., 2020).

En ce qui concerne les résultats obtenus pour le tissu cardiaque, il serait intéressant d'effectuer une analyse du remodelage cardiaque (analyse de la voie de l'AMPK, ERK1/2, HDAC4, par western blot), mais aussi du stress oxydant (ROS), de l'inflammation, ou encore de la dysfonction et la morphologie mitochondriale (pouvant être analysées par microscopie électronique, en cours), afin de mieux comprendre l'hypertrophie obtenue dans nos résultats (Ray et al., 2001; Hughson et al., 2018; Ling et al., 2018).

Pour aller plus loin concernant l'étude des rythmes circadiens dans notre modèle de microgravité simulée chez la souris, il serait intéressant d'évaluer d'une part, la consommation alimentaire et hydrique au passage au cycle d'obscurité afin de compléter nos résultats. Aussi, afin de contrôler que les souris ne rentrent pas en cycle de « torpeur », ce qui modifierait la rythmicité circadienne, il serait intéressant d'augmenter la température ambiante à une température thermoneutre. En effet, il a été montré que la température ambiante imposée dans les animaleries n'était pas une température adéquate pour l'étude des systèmes physiologiques, et qu'elle pouvait être un biais dans les réponses obtenues. En effet, Garg et ses collaborateurs ont montré qu'un environnement expérimental froid, à des températures comprises entre 20 et 22°C (température réglementaire des pièces d'hébergement), en dessous des températures thermoneutres, comprises entre 28 et 32°C, exacerbaient la perte osseuse chez la souris suspendue (Garg et al., 2021). Le dosage d'hormones connues dans la régulation des cycles circadiens, et étudiées également dans les études cliniques, tels que le corticostérone (i.e. cortisol chez l'Homme), la leptine ou encore la mélatonine, pourrait également nous renseigner. La mélatonine qui joue un rôle dans les variations jour/nuit de la PA mais également dans la régulation de la synthèse de catécholamines. L'utilisation de souris génétiquement modifiée pour la délétion de l'expression de gènes spécifiques (i.e. souris K.O.) de l'horloge interne, comme les gênes Per (Per1, Per2 et Per3), Cry (Cry1 et Cry2) ou encore

des gènes CLOCK et BMAL1 (Smolensky et al., 2017), serait également intéressant pour étudier plus spécifiquement les rythmes dans notre modèle de suspension.

Enfin, il serait intéressant d'étudier le sommeil, notamment avec la mesure de l'électroencéphalogramme (EEG), qui pourrait être réalisée à l'aide des implants télémétriques utilisés dans notre modèle ou d'autres types d'implant proposé par cette même entreprise (DSI). Ces derniers sont déjà utilisé par la communauté scientifique chez la souris (Machida et al., 2021) et dans des protocoles chroniques, avec une acquisition en continu pendant 9 jours (Han et al., 2022). Ceci nous permettrait d'évaluer si la perte des rythmes circadiens dans notre modèle, est en lien avec l'absence de sommeil chez nos souris, et d'identifier quel est le type de sommeil (paradoxal, profond), afin de mieux comprendre nos résultats (Verret et al., 2003).

Afin d'identifier les régions cérébrales d'intérêt et participant aux mécanismes réflexes aux sensibles aux variations de pression et participant à l'activation des voies sympathiques, Il serait intéressant de réaliser une imagerie 3D spécialisée avec une quantification et une visualisation complète de l'activité c-Fos dans le cerveau. Cette quantification est particulièrement difficile avec les méthodes standard de laboratoire car l'activité cérébrale est constante, notamment au niveau des centres de contrôle neurovégétatif du tronc cérébral : il est donc difficile d'identifier une sur-activation par des méthodes d'imagerie standard. Un service hautement spécialisé pour la 3D, la quantification complète du cerveau et la visualisation de l'activité c-Fos est déjà disponible sur le marché (Perens et al., 2020; Hansen et al., 2021). Nous pouvons ensuite aller plus loin dans ces données et explorer s'il s'agit d'un événement spécifique localisé dans les neurones, les cellules gliales ou même les vaisseaux (par des analyses histologiques pour les marqueurs spécifiques neuronaux, gliaux ou endothéliaux). De récents travaux suggèrent que les astrocytes pourraient avoir des fonctions de barorécepteurs intracrâniens (Marina et al., 2020b; Turovsky et al., 2020). Aussi, il serait intéressant d'évaluer les marqueurs de l'activité du SNS et PNS, dans les zones d'intérêt, tels que le RVLM, le NTS, les parois des ventricules et l'hypothalamus par exemple.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques.

Afshinnekoo, E., Scott, R.T., MacKay, M.J., Pariset, E., Cekanaviciute, E., Barker, R., et al. (2020). Fundamental Biological Features of Spaceflight: Advancing the Field to Enable Deep-Space Exploration. Cell *183*: 1162–1184.

Agarwal, R. (2010). Regulation of circadian blood pressure: from mice to astronauts: Current Opinion in Nephrology and Hypertension *19*: 51–58.

Alimajstorovic, Z., Pascual-Baixauli, E., Hawkes, C.A., Sharrack, B., Loughlin, A.J., Romero, I.A., et al. (2020). Cerebrospinal fluid dynamics modulation by diet and cytokines in rats. Fluids Barriers CNS *17*: 10.

Amorim, E.D.T., Peras, V.R., Andrade, O. de, and Martins-Pinge, M.C. Functional evidence of paraventricular nucleus involvement in cardiovascular and autonomic modulation in response to acute microgravity (head-down tilt) in unanesthetized rats. Journal of Neuroscience Research 9.

Andreev-Andrievskiy, A. (2017). BION-M 1: First continuous blood pressure monitoring in mice during a 30-day spaceflight. Life Sciences in Space Research 8.

Antunes-Rodrigues, J., Machado, B.H., Andrade, H.A., Mauad, H., Ramalho, M.J., Reis, L.C., et al. (1992). Carotid-aortic and renal baroreceptors mediate the atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion. Proc Natl Acad Sci U S A *89*: 6828–6831.

Aviles, H., Belay, T., Vance, M., and Sonnenfeld, G. (2005). Effects of Space Flight Conditions on the Function of the Immune System and Catecholamine Production Simulated in a Rodent Model of Hindlimb Unloading. Neuroimmunomodulation *12*: 173–181.

Baran, R., Marchal, S., Garcia Campos, S., Rehnberg, E., Tabury, K., Baselet, B., et al. (2021). The Cardiovascular System in Space: Focus on In Vivo and In Vitro Studies. Biomedicines *10*: 59.

Basirun, C., Ferlazzo, M.L., Howell, N.R., Liu, G.-J., Middleton, R.J., Martinac, B., et al. (2021). Microgravity × Radiation: A Space Mechanobiology Approach Toward Cardiovascular Function and Disease. Front. Cell Dev. Biol. *9*: 750775.

Baudrie, V., Laude, D., and Elghozi, J.-L. (2007). Optimal frequency ranges for extracting information on cardiovascular autonomic control from the blood pressure and pulse interval spectrograms in mice. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology *292*: R904–R912.

Behar, J.A., Rosenberg, A.A., Weiser-Bitoun, I., Shemla, O., Alexandrovich, A., Konyukhov, E., et al. (2018). PhysioZoo: A Novel Open Access Platform for Heart Rate Variability Analysis of Mammalian Electrocardiographic Data. Front. Physiol. *9*: 1390.

Bo, C., Shi, Z.Y., George, L., Jun-Lae, C., Lin, D.Y., and Juan, L.Y. The Impacts of Simulated Microgravity on Rat Brain Depended on Durations and Regions. Biomed Environ Sci 12.

Bothwell, S.W. (2019). Cerebrospinal fluid dynamics and intracranial pressure elevation in neurological diseases. 18.

Brainard, G.C., Barger, L.K., Soler, R.R., and Hanifin, J.P. (2016). The development of lighting countermeasures for sleep disruption and circadian misalignment during spaceflight. Curr Opin Pulm Med *22*: 535–544.

Bremner, J.D., Gurel, N.Z., Wittbrodt, M.T., Shandhi, M.H., Rapaport, M.H., Nye, J.A., et al. (2020). Application of Noninvasive Vagal Nerve Stimulation to Stress-Related Psychiatric Disorders. J Pers Med *10*: E119.

Brizzee, B.L., and Walker, B.R. (1990). Altered baroreflex function after tail suspension in the conscious rat. Journal of Applied Physiology *69*: 2091–2096.

Buckey, J.C., and Homick, J.L. (2003). The Neurolab Spacelab mission: neuroscience research in space: results from the STS-90, Neurolab Spacelab mission (Houston, Tex: National Aeronautics and Space Administration, Lyndon B. Johnson Space Center).

Butz, G.M., and Davisson, R.L. (2001). Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice: a physiological genomics tool. Physiological Genomics *5*: 89–97.

Buuse, M. van den, and Malpas, S.C. (1997). 24-hour recordings of blood pressure, heart rate and behavioural activity in rabbits by radio-telemetry: effects of feeding and hypertension. Physiol Behav *62*: 83–89.

Cardinali, D.P. (2018). Autonomic Nervous System (Cham: Springer International Publishing).

Carlier, P.G., Crine, A.F., Yerna, N.M., and Rorive, G.L. (1988). Cardiovascular structural changes induced by isolation-stress hypertension in the rat. J Hypertens Suppl *6*: S112-115.

Cesarovic, N., Nicholls, F., Rettich, A., Kronen, P., Hässig, M., Jirkof, P., et al. (2010). Isoflurane and sevoflurane provide equally effective anaesthesia in laboratory mice. Lab Anim *44*: 329–336.

Chen, L., and Yang, G. (2015). Recent advances in circadian rhythms in cardiovascular system. Front. Pharmacol. *6*:.

Cho, D., Ham, J., Oh, J., Park, J., Kim, S., Lee, N.-K., et al. (2017). Detection of Stress Levels from Biosignals Measured in Virtual Reality Environments Using a Kernel-Based Extreme Learning Machine. Sensors *17*: 2435.

Chouchou, F., Pichot, V., Costes, F., Guillot, M., Barthélémy, J.-C., Bertoletti, L., et al. (2020). Autonomic cardiovascular adaptations to acute head-out water immersion, head-down tilt and supine position. Eur J Appl Physiol *120*: 337–347.

Chowdhury, P., Long, A., Harris, G., Soulsby, M.E., and Dobretsov, M. (2013). Animal model of simulated microgravity: a comparative study of hindlimb unloading via tail versus pelvic suspension. Physiol Rep *1*:.

Cleveland, W.S., and Devlin, S.J. (1988). Locally Weighted Regression: An Approach to Regression Analysis by Local Fitting. Journal of the American Statistical Association *83*: 596–610.

Cointe, C., Laborde, A., Nowak, L.G., Arvanitis, D.N., Bourrier, D., Bergaud, C., et al. (2022). Scalable batch fabrication of ultrathin flexible neural probes using a bioresorbable silk layer. Microsyst Nanoeng *8*: 21.

Comfort, P., McMahon, J.J., Jones, P.A., Cuthbert, M., Kendall, K., Lake, J.P., et al. (2021). Effects of Spaceflight on Musculoskeletal Health: A Systematic Review and Meta-analysis, Considerations for Interplanetary Travel. Sports Med *51*: 2097–2114.

Cornelissen, G. (2014). Cosinor-based rhythmometry. Theor Biol Med Model *11*: 16.

Cox, J.F., Tahvanainen, K.U.O., Kuusela, T.A., Levine, B.D., Cooke, W.H., Mano, T., et al. (2002). Influence of microgravity on astronauts' sympathetic and vagal responses to Valsalva's manoeuvre. The Journal of Physiology *538*: 309–320.

Custaud, M.-A., Vinogradova, O., Gharib, C., Delp, M., Guerrero, F., and Murphy, R. (2022). Editorial: Cardio-vascular Dysfunction and Physiological Manifestations Induced by Environmental Conditions. Front. Physiol. *13*: 870917.

Czosnyka, M., and Pickard, J.D. (2004). Monitoring and interpretation of intracranial pressure. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry *75*: 813–821.

Dart, A. (2002). Gender, sex hormones and autonomic nervous control of the cardiovascular system. Cardiovascular Research *53*: 678–687.

Decataldo, F., Cramer, T., Martelli, D., Gualandi, I., Korim, W.S., Yao, S.T., et al. (2019). Stretchable Low Impedance Electrodes for Bioelectronic Recording from Small Peripheral Nerves. Sci Rep *9*: 10598.

Demontis, G.C., Germani, M.M., Caiani, E.G., Barravecchia, I., Passino, C., and Angeloni, D. (2017). Human Pathophysiological Adaptations to the Space Environment. Front. Physiol. *8*: 547.

Doevendans, P. (1998). Cardiovascular phenotyping in mice. Cardiovascular Research *39*: 34–49.

Doi, M., and Kawai, Y. (1998). Mechanisms of increased intracranial pressure in rabbits exposed to head-down tilt. Jpn J Physiol *48*: 63–69.

Dorey, T.W., Moghtadaei, M., and Rose, R.A. (2020). Altered heart rate variability in angiotensin II–mediated hypertension is associated with impaired autonomic nervous system signaling and intrinsic sinoatrial node dysfunction. Heart Rhythm *17*: 1360–1370.

Du, J., Cui, J., Yang, J., Wang, P., Zhang, L., Luo, B., et al. (2021). Alterations in Cerebral Hemodynamics During Microgravity: A Literature Review. Med Sci Monit *27*: e928108.

Eckberg, D.L. (2003). Bursting into space: alterations of sympathetic control by space travel. Acta Physiol Scand 13.

Eckberg, D.L., Halliwill, J.R., Beightol, L.A., Brown, T.E., Taylor, J.A., and Goble, R. (2010). Human vagal baroreflex mechanisms in space: Autonomic responses to microgravity. The Journal of Physiology *588*: 1129–1138.

Eftekhari, S., Westgate, C.S.J., Johansen, K.P., Bruun, S.R., and Jensen, R.H. (2020). Long-term monitoring of intracranial pressure in freely-moving rats; impact of different physiological states. Fluids Barriers CNS *17*: 39.

Eggenberger, P., Bürgisser, M., Rossi, R.M., and Annaheim, S. (2021). Body Temperature Is Associated With Cognitive Performance in Older Adults With and Without Mild Cognitive Impairment: A Cross-sectional Analysis. Front. Aging Neurosci. *13*: 585904.

Elghozi, J.L., Girard, A., and Laude, D. (2001). Effects of drugs on the autonomic control of short-term heart rate variability. Auton Neurosci *90*: 116–121.

Elghozi, J.-L., and Julien, C. (2007). Sympathetic control of short-term heart rate variability and its pharmacological modulation. Fundam Clin Pharmacol *21*: 337–347.

ElGindi, M., Sapudom, J., Ibrahim, I.H., Al-Sayegh, M., Chen, W., Garcia-Sabaté, A., et al. (2021). May the Force Be with You (Or Not): The Immune System under Microgravity. Cells *10*: 1941.

Ertl, A.C., Diedrich, A., Biaggioni, I., Levine, B.D., Robertson, R.M., Cox, J.F., et al. (2002). Human muscle sympathetic nerve activity and plasma noradrenaline kinetics in space. The Journal of Physiology *538*: 321–329.

Even, N., Devaud, J.-M., and Barron, A. (2012). General Stress Responses in the Honey Bee. Insects *3*: 1271–1298.

Fagette, S., Lo, M., Gharib, C., and Gauquelin, G. (1995a). Cardiovascular variability and baroreceptor reflex sensitivity over a 14-day tail suspension in rats. Journal of Applied Physiology *78*: 717–724.

Fagette, S., Somody, L., Bouzeghrane, F., Cottet-Emard, J.M., Gharib, C., and Gauquelin, G. (1995b). Central and peripheral sympathetic activities in rats during recovery from simulated weightlessness. J Appl Physiol (1985) *79*: 1991–1997.

Ferranti, F., Del Bianco, M., and Pacelli, C. (2020). Advantages and Limitations of Current Microgravity Platforms for Space Biology Research. Applied Sciences *11*: 68.

Ferreira, M.J., and Zanesco, A. (2016). Heart rate variability as important approach for assessment autonomic modulation. Motriz: Rev. Educ. Fis. *22*: 3–8.

Foley, C.M., Mueller, P.J., Hasser, E.M., and Heesch, C.M. (2005). Hindlimb unloading and female gender attenuate baroreflex-mediated sympathoexcitation. *289*: 8.

Fortrat, J.-O., Holanda, A. de, Zuj, K., Gauquelin-Koch, G., and Gharib, C. (2017). Altered Venous Function during Long-Duration Spaceflights. Front Physiol *8*: 694.

Fossion, R., Rivera, A.L., Toledo-Roy, J.C., and Angelova, M. (2018). Quantification of Irregular Rhythms in Chronobiology: A Time- Series Perspective. In Circadian Rhythm - Cellular and Molecular Mechanisms, M.A. El-Esawi, ed. (InTech), p.

Gallo, C., Ridolfi, L., and Scarsoglio, S. (2020). Cardiovascular deconditioning during long-term spaceflight through multiscale modeling. Npj Microgravity *6*: 27.

Gao, Y.-J., and Ji, R.-R. (2009). c-Fos or pERK, Which is a Better Marker for Neuronal Activation and Central Sensitization After Noxious Stimulation and Tissue Injury? TOPAINJ *2*: 11–17.

Garg, P., Strigini, M., Peurière, L., Vico, L., and Iandolo, D. (2021). The Skeletal Cellular and Molecular Underpinning of the Murine Hindlimb Unloading Model. Front Physiol *12*: 749464.

Gaskill, B.N., Gordon, C.J., Pajor, E.A., Lucas, J.R., Davis, J.K., and Garner, J.P. (2013). Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology. Physiology & Behavior *110–111*: 87–95.

Gauquelin, G., Kazek, C., Allevard, A.-M., Garcin, R., Bonnod, J., and Gutkowska, J. (1987). EARLY (1 to 24h) PLASMA ATRIAL NATRIURETIC FACTOR CHANGES IN THE RAT DURING ANTIORTHOSTATIC HYPOKINETIC SUSPENSION. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS *148*: 7.

Gharib, C., and Hughson, R.L. (1992). Fluid and Electrolyte Regulation in Space. In Advances in Space Biology and Medicine, (Elsevier), pp 113–130.

Gibbons, C.H. (2019). Basics of autonomic nervous system function. In Handbook of Clinical Neurology, (Elsevier), pp 407–418.

Globus, R.K., and Morey-Holton, E. (2016). Hindlimb unloading: rodent analog for microgravity. Journal of Applied Physiology *120*: 1196–1206.

Gompf, H.S., Robinson, E.L., Hoban-Higgins, T.M., and Fuller, C.A. (2016). Intracranial Pressure Increases During Hindlimb Suspension. The FASEB Journal *30*:.

Gordon, C.J. (2017). The mouse thermoregulatory system: Its impact on translating biomedical data to humans. Physiology & Behavior *179*: 55–66.

Goswami, N., White, O., Blaber, A., Evans, J., Loon, J.J.W.A. van, and Clement, G. (2021). Human physiology adaptation to altered gravity environments. Acta Astronautica *189*: 216–221.

Graebe, A., Schuck, E.L., Lensing, P., Putcha, L., and Derendorf, H. (2004). Physiological, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Changes in Space. The Journal of Clinical Pharmacology *44*: 837–853.

Guilbeau-Frugier, C., Cauquil, M., Karsenty, C., Lairez, O., Dambrin, C., Payré, B., et al. (2019). Structural evidence for a new elaborate 3D-organization of the cardiomyocyte lateral membrane in adult mammalian cardiac tissues. Cardiovasc Res *115*: 1078–1091.

Guild, S.-J., Barrett, C.J., McBryde, F.D., Van Vliet, B.N., Head, G.A., Burke, S.L., et al. (2010). Quantifying sympathetic nerve activity: problems, pitfalls and the need for standardization: Quantifying sympathetic nerve activity. Experimental Physiology *95*: 41–50.

Guild, S.-J., McBryde, F.D., and Malpas, S.C. (2015). Recording of intracranial pressure in conscious rats via telemetry. Journal of Applied Physiology *119*: 576–581.

Guild, S.-J., Saxena, U.A., McBryde, F.D., Malpas, S.C., and Ramchandra, R. (2018). Intracranial pressure influences the level of sympathetic tone. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology *315*: R1049–R1053.

Guo, J.-H., Qu, W.-M., Chen, S.-G., Chen, X.-P., Lv, K., Huang, Z.-L., et al. (2014). Keeping the right time in space: importance of circadian clock and sleep for physiology and performance of astronauts. Military Med Res *1*: 23.

Hamaguchi, Y., Tahara, Y., Kuroda, H., Haraguchi, A., and Shibata, S. (2015). Entrainment of mouse peripheral circadian clocks to <24 h feeding/fasting cycles under 24 h light/dark conditions. Sci Rep *5*: 14207.

Han, H.-B., Kim, B., Kim, Y., Jeong, Y., and Choi, J.H. (2022). Nine-day continuous recording of EEG and 2-hour of high-density EEG under chronic sleep restriction in mice. Sci Data *9*: 225.

Häni, L., Fichtner, J., Raabe, A., and ZGraggen, W.J. (2019). Pression intracrânienne. Swiss Med Forum.

Hansen, H.H., Perens, J., Roostalu, U., Skytte, J.L., Salinas, C.G., Barkholt, P., et al. (2021). Whole-brain activation signatures of weight-lowering drugs. Mol Metab *47*: 101171.

Harary, M., Dolmans, R.G.F., and Gormley, W.B. (2018). Intracranial Pressure Monitoring—Review and Avenues for Development. 15.

Hargens, A.R., and Richardson, S. (2009a). Cardiovascular adaptations, fluid shifts, and countermeasures related to space flight. Respiratory Physiology & Neurobiology *169*: S30–S33.

Hargens, A.R., and Richardson, S. (2009b). Cardiovascular adaptations, fluid shifts, and countermeasures related to space flight. Respiratory Physiology & Neurobiology *169*: S30–S33.

Hargens, A.R., and Vico, L. (2016). Long-duration bed rest as an analog to microgravity. J Appl Physiol (1985) *120*: 891–903.

Hargens, A.R., and Watenpaugh, D.E. (1996). Cardiovascular adaptation to spaceflight: Medicine &amp Science in Sports &amp Exercise *28*: 977–982.

Hart, E.C., Head, G.A., Carter, J.R., Wallin, B.G., May, C.N., Hamza, S.M., et al. (2017). Recording sympathetic nerve activity in conscious humans and other mammals: guidelines and the road to standardization. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology *312*: H1031–H1051.

Hasser, E.M., and Moffitt, J.A. (2006). Regulation of Sympathetic Nervous System Function after Cardiovascular Deconditioning. Annals of the New York Academy of Sciences *940*: 454–468.

Hawliczek, A., Brix, B., Al Mutawa, S., Alsuwaidi, H., Du Plessis, S., Gao, Y., et al. (2022). Hind-limb unloading in rodents: Current evidence and perspectives. Acta Astronautica *195*: 574–582.

Hiploylee, C., and Colbourne, F. (2014). Intracranial pressure measured in freely moving rats for days after intracerebral hemorrhage. Experimental Neurology *255*: 49–55.

Hou, T., Su, W., Duncan, M.J., Olga, V.A., Guo, Z., and Gong, M.C. (2021a). Time-restricted feeding protects the blood pressure circadian rhythm in diabetic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *118*: e2015873118.

Hou, T., Su, W., Duncan, M.J., Olga, V.A., Guo, Z., and Gong, M.C. (2021b). Time-restricted feeding protects the blood pressure circadian rhythm in diabetic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *118*: e2015873118.

Hughson, R.L., Helm, A., and Durante, M. (2018). Heart in space: effect of the extraterrestrial environment on the cardiovascular system. Nat Rev Cardiol *15*: 167–180.

Iwase, S., Nishimura, N., Tanaka, K., and Mano, T. (2020). Effects of Microgravity on Human Physiology. In Beyond LEO - Human Health Issues for Deep Space Exploration [Working Title], (IntechOpen), p.

Jasien, J.V., Samuels, B.C., Johnston, J.M., and Downs, J.C. (2020). Diurnal Cycle of Translaminar Pressure in Nonhuman Primates Quantified With Continuous Wireless Telemetry. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. *61*: 37.

Jirak, P., Mirna, M., Rezar, R., Motloch, L.J., Lichtenauer, M., Jordan, J., et al. (2022). How spaceflight challenges human cardiovascular health. European Journal of Preventive Cardiology zwac029.

Jung, A.S., Harrison, R., Lee, K.H., Genut, J., Nyhan, D., Brooks-Asplund, E.M., et al. (2005). Simulated microgravity produces attenuated baroreflex-mediated pressor, chronotropic, and inotropic responses in mice. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology *289*: H600–H607.

Just, T.P., Jendzjowsky, N.G., and DeLorey, D.S. (2015). Hindlimb unweighting does not alter vasoconstrictor responsiveness and nitric oxide-mediated inhibition of sympathetic vasoconstriction: Physical inactivity and sympathetic vasoconstriction. J Physiol *593*: 2213–2224.

Keil, L.C.K. 1, K.H. McKeever, M.G. Skidmore, J. Hines, W.B. Severs (1992). The effect of head-down tilt and water immersion on intracranial pressure in nonhuman primates.

Kermorgant, M., Hammoud, S., Mahieu, L., Geeraerts, T., Beck, A., Bareille, M.-P., et al. (2021). Effects of Resistance Exercise with or without Whey Protein Supplementation on Ocular Changes after a 21-Day Head-Down Bed Rest. Life (Basel) *11*: 741.

Kermorgant, M., Leca, F., Nasr, N., Custaud, M.-A., Geeraerts, T., Czosnyka, M., et al. (2017). Impacts of Simulated Weightlessness by Dry Immersion on Optic Nerve Sheath Diameter and Cerebral Autoregulation. Front Physiol *8*: 780.

Kermorgant, M., Nasr, N., Czosnyka, M., Arvanitis, D.N., Hélissen, O., Senard, J.-M., et al. (2020). Impacts of Microgravity Analogs to Spaceflight on Cerebral Autoregulation. Front. Physiol. *11*: 778.

Kickhefel, A., Rosenberg, C., Weiss, C.R., Rempp, H., Roland, J., Schick, F., et al. (2011). Clinical evaluation of MR temperature monitoring of laser-induced thermotherapy in human liver using the proton-resonance-frequency method and predictive models of cell death. J. Magn. Reson. Imaging *33*: 704–709.

Kiessling, S., Eichele, G., and Oster, H. (2010). Adrenal glucocorticoids have a key role in circadian resynchronization in a mouse model of jet lag. J Clin Invest *120*: 2600–2609.

Kozler, P., Maresova, D., and Pokorny, J. (2019). Intracranial pressure and mean arterial pressure monitoring in freely moving rats via telemetry; pilot study. Neuro Endocrinol Lett *40*: 319–324.

Kramer, K., and Remie, R. (2004). Measuring Blood Pressure in Small Laboratory Animals. In Hypertension, (New Jersey: Humana Press), pp 051–062.

Lane, H.W., Gretebeck, R.J., and Smith, S.M. (1998). Nutrition, endocrinology, and body composition during space flight. Nutrition Research *18*: 1923–1934.

Laouafa, S. (2018). Rôle protecteur de l'estradiol contre les conséquences systémiques et cellulaires dans un modèle d'apnées obstructives du sommeil : implication des récepteurs nucléaires ERalpha et ERß (Lyon).

Latham, R.D., Fanton, J.W., Vernalis, M.N., Gaffney, F.A., and Crisman, R.P. (1994). Central hemodynamics in a baboon model during microgravity induced by parabolic flight. Advances in Space Research *14*: 349–358.

Laude, D., Baudrie, V., and Elghozi, J.-L. (2008). Applicability of recent methods used to estimate spontaneous baroreflex sensitivity to resting mice. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology *294*: R142–R150.

Lawley, J.S., Petersen, L.G., Howden, E.J., Sarma, S., Cornwell, W.K., Zhang, R., et al. (2017). Effect of gravity and microgravity on intracranial pressure. J Physiol 13.

Lecomte, A., Descamps, E., and Bergaud, C. (2018). A review on mechanical considerations for chronically-implanted neural probes. J Neural Eng *15*: 031001.

Lee, A.G., Mader, T.H., Gibson, C.R., Tarver, W., Rabiei, P., Riascos, R.F., et al. (2020). Spaceflight associated neuro-ocular syndrome (SANS) and the neuro-ophthalmologic effects of microgravity: a review and an update. Npj Microgravity *6*: 7.

Levine, B.D., Zuckerman, J.H., and Pawelczyk, J.A. (1997). Cardiac atrophy after bed-rest deconditioning: a nonneural mechanism for orthostatic intolerance. Circulation *96*: 517–525.

Li, H.P., Lin, Y.N., Cheng, Z.H., Qu, W., Zhang, L., and Li, Q.Y. (2020). Intracranial-to-central venous pressure gap predicts the responsiveness of intracranial pressure to PEEP in patients with traumatic brain injury: a prospective cohort study. BMC Neurol *20*: 234.

Li, P., Sur, S.H., Mistlberger, R.E., and Morris, M. (1999). Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice. 5.

Li, R., and Liu, J.H.K. (2008). Telemetric monitoring of 24 h intraocular pressure in conscious and freely moving C57BL/6J and CBA/CaJ mice. Molecular Vision 5.

Liang, L., Li, H., Cao, T., Qu, L., Zhang, L., Fan, G.-C., et al. (2020). Calpain activation mediates microgravity-induced myocardial abnormalities in mice via p38 and ERK1/2 MAPK pathways. Journal of Biological Chemistry *295*: 16840–16851.

Liang, L., Yuan, W., Qu, L., Li, H., Zhang, L., Fan, G.-C., et al. (2019). Administration of losartan preserves cardiomyocyte size and prevents myocardial dysfunction in tail-suspended mice by inhibiting p47phox phosphorylation, NADPH oxidase activation and MuRF1 expression. J Transl Med *17*: 279.

Lin, J.S., and Liu, J.H.K. (2010). Circadian Variations in Intracranial Pressure and Translaminar Pressure Difference in Sprague-Dawley Rats. *51*: 5.

Lindén, C., Qvarlander, S., Jóhannesson, G., Johansson, E., Östlund, F., Malm, J., et al. (2018). Normal-Tension Glaucoma Has Normal Intracranial Pressure: A Prospective Study of Intracranial Pressure and Intraocular Pressure in Different Body Positions. Ophthalmology *125*: 361–368.

Ling, S., Li, Y., Zhong, G., Zheng, Y., Xu, Q., Zhao, D., et al. (2018). Myocardial CKIP-1 Overexpression Protects from Simulated Microgravity-Induced Cardiac Remodeling. Front Physiol *9*: 40.

Lo Martire, V., Valli, A., Bingaman, M.J., Zoccoli, G., Silvani, A., and Swoap, S.J. (2018). Changes in blood glucose as a function of body temperature in laboratory mice: implications for daily torpor. Am J Physiol Endocrinol Metab *315*: E662–E670.

Machida, M., Sweeten, B.L.W., Adkins, A.M., Wellman, L.L., and Sanford, L.D. (2021). Basolateral Amygdala Regulates EEG Theta-activity During Rapid Eye Movement Sleep. Neuroscience *468*: 176–185.

Macias, B.R., Liu, J.H.K., Grande-Gutierrez, N., and Hargens, A.R. (2015). Intraocular and intracranial pressures during head-down tilt with lower body negative pressure. Aerosp Med Hum Perform *86*: 3–7.

Mader, T.H., Gibson, C.R., Pass, A.F., Kramer, L.A., Lee, A.G., Fogarty, J., et al. (2011). Optic disc edema, globe flattening, choroidal folds, and hyperopic shifts observed in astronauts after long-duration space flight. Ophthalmology *118*: 2058–2069.

Makino, M., Hayashi, H., Takezawa, H., Hirai, M., Saito, H., and Ebihara, S. (1997). Circadian rhythms of cardiovascular functions are modulated by the baroreflex and the autonomic nervous system in the rat. Circulation *96*: 1667–1674.

Malpas, S.C. (2002). Neural influences on cardiovascular variability: possibilities and pitfalls. Am J Physiol Heart Circ Physiol *282*: H6-20.

Malpas, S.C. (2010). Sympathetic Nervous System Overactivity and Its Role in the Development of Cardiovascular Disease. Physiological Reviews *90*: 513–557.

Mandsager, K.T., Robertson, D., and Diedrich, A. (2015). The function of the autonomic nervous system during spaceflight. Clin Auton Res *25*: 141–151.

Mano, T. (2005). Autonomic Neural Functions in Space. CPB *6*: 319–324.

Mano, T., and Iwase, S. (2003). Sympathetic nerve activity in hypotension and orthostatic intolerance: **Sympathetic activity in hypotension**. Acta Physiologica Scandinavica *177*: 359–365.

Marc-Antoine Custaud, Stephane Blanc, Guillemette Gauquelin-Koch, Claude Gharib (2020). L'humain et l'espace ; ses adaptations physiologiques.

Marina, N., Christie, I.N., Korsak, A., Doronin, M., Brazhe, A., Hosford, P.S., et al. (2020a). Astrocytes monitor cerebral perfusion and control systemic circulation to maintain brain blood flow. Nat Commun *11*: 131.

Marina, N., Christie, I.N., Korsak, A., Doronin, M., Brazhe, A., Hosford, P.S., et al. (2020b). Astrocytes monitor cerebral perfusion and control systemic circulation to maintain brain blood flow. Nat Commun *11*: 131.

Marmerstein, J.T., McCallum, G.A., and Durand, D.M. (2021). Direct measurement of vagal tone in rats does not show correlation to HRV. Sci Rep *11*: 1210.

Marsac, J. (2013). Variabilité de la fréquence cardiaque : un marqueur de risque cardiométabolique en santé publique. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine *197*: 175–186.

Marshall-Goebel, K., Damani, R., and Bershad, E.M. (2019). Brain Physiological Response and Adaptation During Spaceflight. Neurosurg. *85*: E815–E821.

Martin, R.E., and Sessle, B.J. (1993). The role of the cerebral cortex in swallowing. Dysphagia *8*: 195–202.

Maurel, D., Ixart, G., Barbanel, G., Mekaouche, M., and Assenmacher, I. (1996). Effects of acute tilt from orthostatic to head-down antiorthostatic restraint and of sustained restraint on the intra-cerebroventricular pressure in rats. Brain Res *736*: 165–173.

McBryde, F.D., Malpas, S.C., and Paton, J.F.R. (2017). Intracranial mechanisms for preserving brain blood flow in health and disease. Acta Physiol *219*: 274–287.

McCorry, L.K. (2007). Physiology of the Autonomic Nervous System. American Journal of Pharmaceutical Education 11.

McCrory, C., Berkman, L.F., Nolan, H., O'Leary, N., Foley, M., and Kenny, R.A. (2016). Speed of Heart Rate Recovery in Response to Orthostatic Challenge. Circ Res *119*: 666–675.

McCutheon, E.P. (1977). aircraft flight simulation of spacelab experiment using an implanted telemetry system to obtain cardiovascular data from the monkey. p.

Miyazaki, C., Shimizu, K., Nagasawa, Y., Chiba, T., Sakuma, K., Aimoto, M., et al. (2021). Effects of Enhanced Intracranial Pressure on Blood Pressure and the Cardio-Ankle Vascular Index in Rabbits. J Atheroscler Thromb *28*: 1241–1249.

Moffitt, J.A., Foley, C.M., Schadt, J.C., Laughlin, M.H., and Hasser, E.M. (1998). Attenuated baroreflex control of sympathetic nerve activity after cardiovascular deconditioning in rats. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology *274*: R1397–R1405.

Moffitt, J.A., Foley, C.M., Schadt, J.C., Laughlin, M.H., and Hasser, E.M. Attenuated baroreflex control of sympathetic nerve activity after cardiovascular deconditioning in rats. 9.

Moffitt, J.A., Grippo, A.J., Beltz, T.G., and Johnson, A.K. (2008). Hindlimb unloading elicits anhedonia and sympathovagal imbalance. Journal of Applied Physiology *105*: 1049–1059.

Moffitt, J.A., Henry, M.K., Welliver, K.C., Jepson, A.J., and Garnett, E.R. (2013). Hindlimb unloading results in increased predisposition to cardiac arrhythmias and alters left ventricular connexin 43 expression. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology *304*: R362–R373.

Mokri, B. (2001). The Monro-Kellie hypothesis: applications in CSF volume depletion. Neurology *56*: 1746–1748.

Monk, T.H., Kennedy, K.S., Rose, L.R., and Linenger, J.M. (2001). Decreased human circadian pacemaker influence after 100 days in space: a case study. Psychosom Med *63*: 881–885.

Morey, E.R. (1979). Spaceflight and Bone Turnover: Correlation with a New Rat Model of Weightlessness. BioScience *29*: 168–172.

Morey-Holton, E., Globus, R.K., Kaplansky, A., and Durnova, G. (2005). The Hindlimb Unloading Rat Model: Literature Overview, Technique Update and Comparison with Space Flight Data. 34.

Morey-Holton, E.R., and Globus, R.K. (2002). Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. J Appl Physiol *92*: 11.

Moškon, M. (2020). CosinorPy: a python package for cosinor-based rhythmometry. BMC Bioinformatics *21*: 485.

Mueller, P.J., Sullivan, M.J., Grindstaff, R.R., Cunningham, J.T., and Hasser, E.M. (2006). Regulation of plasma vasopressin and renin activity in conscious hindlimb-unloaded rats. *291*: 7.

Musacchia, X.J., Steffen, J.M., and Dombrowski, J. (1992). Rat cardiovascular responses to whole body suspension: head-down and non-head-down tilt. Journal of Applied Physiology *73*: 1504–1509.

Navarro, X. (2002). Fisiología del sistema nervioso autónomo. REV NEUROL 10.

Navasiolava, N.M., Dignat-George, F., Sabatier, F., Larina, I.M., Demiot, C., Fortrat, J.-O., et al. (2010). Enforced physical inactivity increases endothelial microparticle levels in healthy volunteers. Am J Physiol Heart Circ Physiol *299*: H248-256.

Nelson, E., Mulugeta, L., and Myers, J. (2014). Microgravity-Induced Fluid Shift and Ophthalmic Changes. Life *4*: 621–665.

Norsk, P. (2020). Adaptation of the cardiovascular system to weightlessness: Surprises, paradoxes and implications for deep space missions. Acta Physiol (Oxf) *228*: e13434.

Otsuka, K., Cornelissen, G., Kubo, Y., Shibata, K., Hayashi, M., Mizuno, K., et al. (2018). Circadian challenge of astronauts' unconscious mind adapting to microgravity in space, estimated by heart rate variability. Sci Rep *8*: 10381.

Pandiarajan, M., and Hargens, A.R. (2020). Ground-Based Analogs for Human Spaceflight. Front. Physiol. *11*: 716.

Parasuraman, S., and Raveendran, R. (2012). Measurement of invasive blood pressure in rats. J Pharmacol Pharmacother *3*: 172–177.

Patel, Z.S., Brunstetter, T.J., Tarver, W.J., Whitmire, A.M., Zwart, S.R., Smith, S.M., et al. (2020). Red risks for a journey to the red planet: The highest priority human health risks for a mission to Mars. Npj Microgravity *6*: 33.

Pavy-Le Traon, A., Heer, M., Narici, M.V., Rittweger, J., and Vernikos, J. (2007). From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986-2006). Eur J Appl Physiol *101*: 143–194.

Perens, J., Salinas, C.G., Skytte, J.L., Roostalu, U., Dahl, A.B., Dyrby, T.B., et al. (2020). An Optimized Mouse Brain Atlas for Automated Mapping and Quantification of Neuronal Activity Using iDISCO+ and Light Sheet Fluorescence Microscopy. Neuroinformatics.

Perhonen, M.A., Franco, F., Lane, L.D., Buckey, J.C., Blomqvist, C.G., Zerwekh, J.E., et al. (2001). Cardiac atrophy after bed rest and spaceflight. Journal of Applied Physiology *91*: 645–653.

Petersen, L.G., Lawley, J.S., Lilja-Cyron, A., Petersen, J.C.G., Howden, E.J., Sarma, S., et al. (2019). Lower body negative pressure to safely reduce intracranial pressure. J Physiol *597*: 237–248.

Popova, A., Tsvirkun, D., Dolgov, O., Anokhin, K., Alberts, J., Lagereva, E., et al. (2017). Adaptation to a blood pressure telemetry system revealed by measures of activity, agility and operant learning in mice. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods *85*: 29–37.

Powers, J., and Bernstein, D. (2004). The mouse as a model of cardiovascular adaptations to microgravity. Journal of Applied Physiology *97*: 1686–1692.

Raboel, P.H., Bartek, J., Andresen, M., Bellander, B.M., and Romner, B. (2012). Intracranial Pressure Monitoring: Invasive versus Non-Invasive Methods-A Review. Crit Care Res Pract *2012*: 950393.

Raffin, J. (2019). Effets d'un programme de marche « rapide » sur le système nerveux autonome chez le sujet âgé en EHPAD. Effet additif de la neurostimulation transcutanée du SNA. 225.

Rahmouni, K. (2016). Cardiovascular Regulation by the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus: Neurocircuitry and Signaling Systems. Hypertension *67*: 1064–1071.

Ray, C.A., Vasques, M., Miller, T.A., Wilkerson, M.K., and Delp, M.D. (2001). Effect of short-term microgravity and long-term hindlimb unloading on rat cardiac mass and function. Journal of Applied Physiology *91*: 1207–1213.

Rhoads, M.K., Balagee, V., and Thomas, S.J. (2020). Circadian Regulation of Blood Pressure: of Mice and Men. Curr Hypertens Rep *22*: 40.

Ribeiro, J.P., Chiappa, G.R., and Callegaro, C.C. (2012). The contribution of inspiratory muscles function to exercise limitation in heart failure: pathophysiological mechanisms. Rev Bras Fisioter *16*: 261–267.

Ripperger, J.A., Jud, C., and Albrecht, U. (2011). The daily rhythm of mice. FEBS Letters *585*: 1384–1392.

Riviere, D. (2009). Modifications physiologiques en microgravité. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine *193*: 1633–1644.

Roberts, D.R., Albrecht, M.H., Collins, H.R., Asemani, D., Chatterjee, A.R., Spampinato, M.V., et al. (2017). Effects of Spaceflight on Astronaut Brain Structure as Indicated on MRI. N Engl J Med *377*: 1746–1753.

Roberts, D.R., Brown, T.R., Nietert, P.J., Eckert, M.A., Inglesby, D.C., Bloomberg, J.J., et al. (2019). Prolonged Microgravity Affects Human Brain Structure and Function. AJNR Am J Neuroradiol ajnr;ajnr.A6249v1.

Robertson, D., and Biaggioni, I. (2012). Primer on the autonomic nervous system (Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP).

Robins, M.T., Li, J., and Ryabinin, A.E. (2020). Effects of Housing Conditions and Circadian Time on Baseline c-Fos Immunoreactivity in C57BL/6J Mice. Neuroscience *431*: 143–151.

Robinson, R.R., Doursout, M.F., Chelly, J.E., Powell, M.R., Little, T.M., and Butler, B.D. (1996). Cardiovascular deconditioning and venous air embolism in simulated microgravity in the rat. Aviat Space Environ Med *67*: 835–840.

Rodríguez-Boto, G., Rivero-Garvía, M., Gutiérrez-González, R., and Márquez-Rivas, J. (2015). Basic concepts about brain pathophysiology and intracranial pressure monitoring. Neurologia *30*: 16–22.

Rötzer, R.D., Brox, V.F., Hennis, K., Thalhammer, S.B., Biel, M., Wahl-Schott, C., et al. (2021). Implantation of Combined Telemetric ECG and Blood Pressure Transmitters to Determine Spontaneous Baroreflex Sensitivity in Conscious Mice. JoVE 62101.

Roy-O'Reilly, M., Mulavara, A., and Williams, T. (2021). A review of alterations to the brain during spaceflight and the potential relevance to crew in long-duration space exploration. Npj Microgravity *7*: 5.

Saunier, V., Flahaut, E., Blatché, M.-C., Bergaud, C., and Maziz, A. (2020). Carbon nanofiber-PEDOT composite films as novel microelectrode for neural interfaces and biosensing. Biosens Bioelectron *165*: 112413.

Schmidt, E.A., Despas, F., Pavy-Le Traon, A., Czosnyka, Z., Pickard, J.D., Rahmouni, K., et al. (2018). Intracranial Pressure Is a Determinant of Sympathetic Activity. Front. Physiol. *9*: 11.

Shellock, F.G., Swan, H.J., and Rubin, S.A. (1985). Early central venous pressure changes in the rat during two different levels of head-down suspension. Aviat Space Environ Med *56*: 791–795.

Shen, G., Link, S., Kumar, S., Nusbaum, D.M., Tse, D.Y., Fu, Y., et al. (2018). Characterization of Retinal Ganglion Cell and Optic Nerve Phenotypes Caused by Sustained Intracranial Pressure Elevation in Mice. Sci Rep *8*: 2856.

Sheng, M., and Greenberg, M.E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. Neuron *4*: 477–485.

Sheward, W.J., Naylor, E., Knowles-Barley, S., Armstrong, J.D., Brooker, G.A., Seckl, J.R., et al. (2010). Circadian Control of Mouse Heart Rate and Blood Pressure by the Suprachiasmatic Nuclei: Behavioral Effects Are More Significant than Direct Outputs. PLoS ONE *5*: e9783.

Shimatani, H., Inoue, Y., Maekawa, Y., Miyake, T., Yamaguchi, Y., and Doi, M. (2021). Thermographic imaging of mouse across circadian time reveals body surface temperature elevation associated with non-locomotor body movements. PLoS ONE *16*: e0252447.

Sierra, A. de la, Segura, J., Gorostidi, M., Banegas, J.R., Cruz, J.J. de la, and Ruilope, L.M. (2010). Diurnal blood pressure variation, risk categories and antihypertensive treatment. Hypertens Res *33*: 767–771.

Silasi, G., MacLellan, C., and Colbourne, F. (2009). Use of Telemetry Blood Pressure Transmitters to Measure Intracranial Pressure (ICP) in Freely Moving Rats. CNR *6*: 62–69.

Silverman, H.A., Stiegler, A., Tsaava, T., Newman, J., Steinberg, B.E., Masi, E.B., et al. (2018). Standardization of methods to record Vagus nerve activity in mice. Bioelectron Med *4*: 3.

Silvin, A., and Ginhoux, F. (2018). Microglia heterogeneity along a spatio-temporal axis: More questions than answers. Glia *66*: 2045–2057.

Slama, M., Susic, D., Varagic, J., Ahn, J., and Frohlich, E.D. (2003). Echocardiographic measurement of cardiac output in rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol *284*: H691-697.

Smolensky, M.H., Hermida, R.C., and Portaluppi, F. (2017). Circadian mechanisms of 24-hour blood pressure regulation and patterning. Sleep Medicine Reviews *33*: 4–16.

Solbiati, S., Martin-Yebra, A., Vaïda, P., and Caiani, E.G. (2021). Evaluation of Cardiac Circadian Rhythm Deconditioning Induced by 5-to-60 Days of Head-Down Bed Rest. Front. Physiol. *11*: 612188.

Stahn, A.C., Werner, A., Opatz, O., Maggioni, M.A., Steinach, M., Ahlefeld, V.W. von, et al. (2017). Increased core body temperature in astronauts during long-duration space missions. Sci Rep *7*: 16180.

Stein, P.K., and Pu, Y. (2012). Heart rate variability, sleep and sleep disorders. Sleep Medicine Reviews *16*: 47–66.

Swoap, S.J., and Gutilla, M.J. (2009). Cardiovascular changes during daily torpor in the laboratory mouse. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol *297*: R769-774.

Tahimic, C.G.T., Paul, A.M., Schreurs, A.-S., Torres, S.M., Rubinstein, L., Steczina, S., et al. (2019). Influence of Social Isolation During Prolonged Simulated Weightlessness by Hindlimb Unloading. Front. Physiol. *10*: 1147.

Tanaka, K., Nishimura, N., and Kawai, Y. (2017). Adaptation to microgravity, deconditioning, and countermeasures. J Physiol Sci *67*: 271–281.

Taralov, Z.Z., Terziyski, K.V., and Kostianev, S.S. (2016). Heart Rate Variability as a Method for Assessment of the Autonomic Nervous System and the Adaptations to Different Physiological and Pathological Conditions. Folia Medica *57*: 173–180.

Tatebayashi, K., Asai, Y., Maeda, T., Shiraishi, Y., Miyoshi, M., and Kawai, Y. (2003). Effects of head-down tilt on the intracranial pressure in conscious rabbits. Brain Research *977*: 55–61.

Thireau, J., Zhang, B.L., Poisson, D., and Babuty, D. (2008). Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide: Heart rate variability in mice. Experimental Physiology *93*: 83–94.

Tomilovskaya, E., Shigueva, T., Sayenko, D., Rukavishnikov, I., and Kozlovskaya, I. (2019). Dry Immersion as a Ground-Based Model of Microgravity Physiological Effects. Front Physiol *10*: 284.

Triposkiadis, F., Xanthopoulos, A., Boudoulas, K.D., Giamouzis, G., Boudoulas, H., and Skoularigis, J. (2022). The Interventricular Septum: Structure, Function, Dysfunction, and Diseases. JCM *11*: 3227.

Tsvirkun, D., Bourreau, J., Mieuset, A., Garo, F., Vinogradova, O., Larina, I., et al. (2012). Contribution of Social Isolation, Restraint, and Hindlimb Unloading to Changes in Hemodynamic Parameters and Motion Activity in Rats. PLoS ONE *7*: e39923.

Turovsky, E.A., Braga, A., Yu, Y., Esteras, N., Korsak, A., Theparambil, S.M., et al. (2020). Mechanosensory Signaling in Astrocytes. J Neurosci *40*: 9364–9371.

Vajrala, V.S., Saunier, V., Nowak, L.G., Flahaut, E., Bergaud, C., and Maziz, A. (2021). Nanofibrous PEDOT-Carbon Composite on Flexible Probes for Soft Neural Interfacing. Front Bioeng Biotechnol *9*: 780197.

Van Ombergen, A., Demertzi, A., Tomilovskaya, E., Jeurissen, B., Sijbers, J., Kozlovskaya, I.B., et al. (2017). The effect of spaceflight and microgravity on the human brain. J Neurol *264*: 18–22.

Van Vliet, B.N., McGuire, J., Chafe, L., Leonard, A., Joshi, A., and Montani, J.-P. (2006). PHENOTYPING THE LEVEL OF BLOOD PRESSURE BY TELEMETRY IN MICE. Clin Exp Pharmacol Physiol *33*: 1007–1015.

Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvert, D., Léger, L., et al. (2003). A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. BMC Neurosci *4*: 19.

Vico, L., and Pavy-Le Traon, A. (2010). Adaptation du squelette humain dans l'espace. EMC - Appareil locomoteur *5*: 1–8.

Waki, H., Shimizu, T., Katahira, K., Nagayama, T., Yamasaki, M., Katsuda, S.I., et al. (2000). Recording of blood pressure, heart rate and aortic nerve activity during parabolic flight in the rat via radio-telemetry. J Gravit Physiol *7*: P169-170.

Waki, H., Shimizu, T., Katahira, K., Nagayama, T., Yamasaki, M., and Katsuda, S.-I. (2002). Effects of microgravity elicited by parabolic flight on abdominal aortic pressure and heart rate in rats. Journal of Applied Physiology *93*: 1893–1899.

Walls, S., Diop, S., Birse, R., Elmen, L., Gan, Z., Kalvakuri, S., et al. (2020). Prolonged Exposure to Microgravity Reduces Cardiac Contractility and Initiates Remodeling in Drosophila. Cell Reports *33*: 108445.

Wang, K.X., Shi, Y., and Denhardt, D.T. (2007). Osteopontin regulates hindlimb-unloading-induced lymphoid organ atrophy and weight loss by modulating corticosteroid production. Proc Natl Acad Sci U S A *104*: 14777–14782.

Watenpaugh, D.E. (2016). Analogs of microgravity: head-down tilt and water immersion. Journal of Applied Physiology *120*: 904–914.

Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature *420*: 520–562.

Williamson, M.R., John, R.F., and Colbourne, F. (2018). Measurement of Intracranial Pressure in Freely Moving Rats. In Traumatic and Ischemic Injury, B. Tharakan, ed. (New York, NY: Springer New York), pp 17–25.

Wojcik, P., Kini, A., Al Othman, B., Galdamez, L.A., and Lee, A.G. (2020). Spaceflight associated neuro-ocular syndrome. Current Opinion in Neurology *33*: 62–67.

Wong, C.P., Iwaniec, U.T., and Turner, R.T. (2021). Evidence for increased thermogenesis in female C57BL/6J mice housed aboard the international space station. Npj Microgravity *7*: 23.

Wood, S.K. (2014). Cardiac autonomic imbalance by social stress in rodents: understanding putative biomarkers. Front. Psychol. *5*:.

Woodman, C.R., Stump, C.S., Stump, J.A., Sebastian, L.A., Rahman, Z., and Tipton, C.M. (1991). Influences of chemical sympathectomy and simulated weightlessness on male and female rats. Journal of Applied Physiology *71*: 1005–1014.

Yamamoto, N., Otsuka, K., Kubo, Y., Hayashi, M., Mizuno, K., Ohshima, H., et al. (2015). Effects of long-term microgravity exposure in space on circadian rhythms of heart rate variability. Chronobiology International *32*: 327–340.

Yamasaki, M., Shimizu, T., Katahira, K., Waki, H., Nagayama, T., O-Ishi, H., et al. (2004). Spaceflight alters the fiber composition of the aortic nerve in the developing rat. Neuroscience *128*: 819–829.

Yoo, P.E., Oxley, T.J., Hagan, M.A., John, S., Ronayne, S.M., Rind, G.S., et al. (2020). Distinct Neural Correlates Underlie Inhibitory Mechanisms of Motor Inhibition and Motor Imagery Restraint. Front Behav Neurosci *14*: 77.

Zhang, L.-F., Cheng, J.-H., Liu, X., Wang, S., Liu, Y., Lu, H.-B., et al. (2008). Cardiovascular changes of conscious rats after simulated microgravity with and without daily −G $_x$ gravitation. Journal of Applied Physiology *105*: 1134–1145.

Zhang, L.-F., and Hargens, A.R. (2018). Spaceflight-Induced Intracranial Hypertension and Visual Impairment: Pathophysiology and Countermeasures. Physiological Reviews *98*: 59–87.

Zhong, G., Li, Y., Li, H., Sun, W., Cao, D., Li, J., et al. (2016). Simulated Microgravity and Recovery-Induced Remodeling of the Left and Right Ventricle. Front. Physiol. *7*:.

Zhong, G., Zhao, D., Li, J., Liu, Z., Pan, J., Yuan, X., et al. (2021). WWP1 deficiency protects from cardiac remodeling induced by simulated microgravity (Physiology).

Ziegler, K.A., Ahles, A., Wille, T., Kerler, J., Ramanujam, D., and Engelhardt, S. (2018). Local sympathetic denervation attenuates myocardial inflammation and improves cardiac function after myocardial infarction in mice. Cardiovasc Res *114*: 291–299.

Ziegler, M.G. (2012). Psychological Stress and the Autonomic Nervous System. 2.

ANNEXES

Annexe I

Impacts of Microgravity Analogs to Spaceflight on Cerebral Autoregulation. (Revue) Kermorgant M, Nasr N, Czosnyka M, Arvanitis DN, Hélissen O, Senard J-M and Pavy-Le Traon A (2020) – Front. Physiol. 11:778. doi: 10.3389/fphys.2020.00778

Résumé

Il est bien connu que l'exposition des astronautes à la microgravité entraîne une myriade de réponses physiologiques, telles que le déplacement des fluides vers la tête, le déchargement du corps et le déconditionnement cardiovasculaire. Au retour sur Terre, certains astronautes rencontrent des problèmes liés à l'intolérance orthostatique (IO). Une altération de l'autorégulation cérébrale (AC), qui pourrait être compromise par les effets de la microgravité, a été proposée comme l'un des mécanismes responsables de l'IO. L'AC est un mécanisme homéostatique qui permet de maintenir le flux sanguin cérébral pour toute variation de la pression de perfusion cérébrale, en adaptant le tonus et le diamètre des vaisseaux cérébraux. Les modèles terrestres de simulation de la microgravité(analogue) sont des outils utiles pour déterminer l'impact gravitationnel des vols spatiaux sur le corps humain. L'alitement avec inclinaison tête déclive (HDTBR), où le sujet reste en position couchée à 6 degrés pendant des périodes allant de quelques jours à plusieurs semaines, est l'analogue le plus couramment utilisé au sol pour le déconditionnement cardiovasculaire. Ce modèle est capable de reproduire le déplacement des fluides céphaliques, l'immobilisation, le confinement et l'inconfort. Le modèle d'immersion sèche (DI) est une autre approche, dans laquelle le sujet reste immergé dans une baignoire d'eau thermoneutre, couverte d'un tissu élastique imperméable séparant le sujet de l'eau. En ce qui concerne la DI, cet analogue simule l'absence de toute structure de soutien pour le corps, la centralisation des fluides corporels, l'immobilisation et l'hypokinésie, observées lors des vols spatiaux. Cependant, peu de choses sont connues sur l'impact de la microgravité sur l'AC. Ici, nous passons en revue les principes fondamentaux et les différents mécanismes impliqués dans l'AC. Nous examinons également les différentes approches permettant de l'évaluer. Enfin, nous nous concentrons sur les effets des vols spatiaux à court et à long terme sur l'AC et comparons ces résultats avec deux analogues spécifiques à la microgravité : HDBR et DI.

Contribution **:** Dans l'écriture et la révision du manuscrit.

frontiers in Physiology

REVIEW
published: 03 July 2020
doi: 10.3389/fphys.2020.00778

Impacts of Microgravity Analogs to Spaceflight on Cerebral Autoregulation

Marc Kermorgant[1], Nathalie Nasr[1,2], Marek Czosnyka[3,4], Dina N. Arvanitis[1], Ophélie Hélissen[1], Jean-Michel Senard[1,5] and Anne Pavy-Le Traon[1,2]*

[1] INSERM UMR 1048, Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases (I2MC), Toulouse, France, [2] Department of Neurology, Institute for Neurosciences, Toulouse University Hospital, Toulouse, France, [3] Brain Physics Laboratory, Division of Neurosurgery, Department of Clinical Neurosciences, Cambridge University Hospital, Cambridge, United Kingdom, [4] Institute of Electronic Systems, Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland, [5] Department of Clinical Pharmacology, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

It is well known that exposure to microgravity in astronauts leads to a plethora physiological responses such as headward fluid shift, body unloading, and cardiovascular deconditioning. When astronauts return to Earth, some encounter problems related to orthostatic intolerance. An impaired cerebral autoregulation (CA), which could be compromised by the effects of microgravity, has been proposed as one of the mechanisms responsible for orthostatic intolerance. CA is a homeostatic mechanism that maintains cerebral blood flow for any variations in cerebral perfusion pressure by adapting the vascular tone and cerebral vessel diameter. The ground-based models of microgravity are useful tools for determining the gravitational impact of spaceflight on human body. The head-down tilt bed rest (HDTBR), where the subject remains in supine position at −6 degrees for periods ranging from few days to several weeks is the most commonly used ground-based model of microgravity for cardiovascular deconditioning. head-down bed rest (HDBR) is able to replicate cephalic fluid shift, immobilization, confinement, and inactivity. Dry immersion (DI) model is another approach where the subject remains immersed in thermoneutral water covered with an elastic waterproof fabric separating the subject from the water. Regarding DI, this analog imitates absence of any supporting structure for the body, centralization of body fluids, immobilization and hypokinesia observed during spaceflight. However, little is known about the impact of microgravity on CA. Here, we review the fundamental principles and the different mechanisms involved in CA. We also consider the different approaches in order to assess CA. Finally, we focus on the effects of short- and long-term spaceflight on CA and compare these findings with two specific analogs to microgravity: HDBR and DI.

Keywords: cerebral autoregulation, head-down bed rest, dry immersion, spaceflight analog, microgravity

OPEN ACCESS

Edited by:
Richard D. Boyle, National Aeronautics and Space Administration (NASA), United States

Reviewed by:
Ana Diaz Artiles, Texas A&M University, United States
Allison Paige Anderson, University of Colorado Boulder, United States

****Correspondence:***
Marc Kermorgant
marc.kermorgant@gmail.com

Specialty section:
This article was submitted to Environmental, Aviation and Space Physiology, a section of the journal Frontiers in Physiology

Received: *31 January 2020*
Accepted: *15 June 2020*
Published: *03 July 2020*

Citation:
Kermorgant M, Nasr N, Czosnyka M, Arvanitis DN, Hélissen O, Senard J-M and Pavy-Le Traon A (2020) Impacts of Microgravity Analogs to Spaceflight on Cerebral Autoregulation. Front. Physiol. 11:778. doi: 10.3389/fphys.2020.00778

INTRODUCTION

Analogs to microgravity for cardiovascular deconditioning such as head-down bed rest (HDBR) and dry immersion (DI) are essentials models for determining the effects of spaceflight on astronauts' body. Due to the cost and the limited number of space missions, these analogs are good alternatives for gravitational research (Herranz et al., 2013; Hargens and Vico, 2016). HDBR is

the most commonly used ground-based model of microgravity for cardiovascular deconditioning and the subject remains in supine position at −6 degrees head-down tilt bed rest (HDTBR) for either short periods (from 1 week to 1 month), or sometimes longer periods (>1 month). HDBR mimics cephalic fluid shift, immobilization, confinement, and inactivity. It would appear that vestibular function and gravitational stimuli are also affected, however to a lesser extent compared to those observed during spaceflight (Pavy-Le Traon et al., 2007). DI model is another approach where the subject remains immersed in thermoneutral water covered with an elastic waterproof fabric separating the subject from the water. Thus, the subject is freely suspended while remaining dry. One of the main features of DI is that imitates absence of any supporting structure for the body, centralization of body fluids, immobilization and hypokinesia observed during spaceflight (Navasiolava et al., 2011a). DI impacts a wide range of physiological mechanisms such as a diminution in neuromuscular system (Grigorieva and Kozlovskaya, 1983; Kozlovskaya et al., 1984), an alteration in cardiovascular system associated with sympathoexcitation (Iwase et al., 2000), a possible impact on intracranial pressure (ICP) (Avan et al., 2013; Rukavishnikov et al., 2013; Kermorgant et al., 2017). Tomilovskaya et al. (2019) emphasized the effectiveness of DI and its ability to induce rapid physiological changes more than others ground-based models of microgravity. During human spaceflight, the absence of gravity induces headward fluid shift and leads to cardiovascular deconditioning notably characterized by orthostatic intolerance when astronauts come back on Earth (Fritsch-Yelle et al., 1994, 1996a; Buckey et al., 1996; Meck et al., 2001; Levine et al., 2002; Blaber et al., 2011; Platts et al., 2014; Lee et al., 2015; Fu et al., 2019). Several mechanisms for post-flight orthostatic intolerance were suggested. Fritsch et al. (1992) proved that after 4- to 5-day space shuttle mission, a diminution in vagal control of the sinus node was observed in 12 astronauts. These findings suggest that an impaired vagal response may be involved in post-flight orthostatic intolerance. Buckey et al. (1996) showed that after 9–14 days of spaceflight, approximately two-thirds of the astronauts presented signs of orthostatic intolerance and those with severe signs of post-flight orthostatic intolerance had disturbed total peripheral resistances. Fritsch-Yelle et al. (1996b) corroborated these previous findings. Indeed after 8–16 days of spaceflight, approximately one-third of astronauts suffered from orthostatic intolerance had lower standing peripheral vascular resistance associated with smaller increases of plasma noradrenaline and greater decreases in systolic and diastolic pressures suggesting a hypoadrenergic responsiveness. Perhonen et al. (2001) demonstrated the reduction in left ventricular cardiac mass after a spaceflight of 10 days in four astronauts that suggesting that cardiac atrophy, by altering diastolic filling, may be involved in orthostatic intolerance. Some studies proposed that hypovolemia induces orthostatic intolerance (Waters et al., 2002; Shi et al., 2004). However, Shi et al. (2004) treated seven astronauts by restoring fluid volume with fludrocortisone (a synthetic mineralocorticoid) but this treatment failed to prevent the onset of orthostatic intolerance. The signals from vestibular system, and more specifically otolith organs, contributes to the arterial pressure control at the onset of standing (Yates and Kerman, 1998; Tanaka et al., 2009, 2012, 2014, 2017; Hallgren et al., 2015, 2016; Morita et al., 2016). Some studies also proposed that impairment of cerebral autoregulation (CA) may contribute to reduced orthostatic tolerance after spaceflight or ground-based of model microgravity (Zhang et al., 1997; Novak et al., 1998; Iwasaki et al., 2007). CA is a specific homeostatic mechanism that regulates and maintains CBF constant against any changes in fluctuation in arterial blood pressure (ABP) or ICP in order to preserve cerebral function (Lassen, 1959, 1964; Johnson, 1986; van Beek et al., 2008; Armstead, 2016; Claassen et al., 2016). Lassen (1959) described the autoregulation curve with three specific phases showing a CBF plateau distinguishing the lower limit from the upper limit of autoregulation. Above these limits, CA may be lost and CBF can no longer remain steady. **Figure 1** represents the theoretical autoregulation curve. In normal adults, an average CBF is 50 mL/min/100 g of brain tissue (Lassen et al., 1960; Lassen, 1985). In normotensive and healthy adults, the CBF is well maintained with cerebral perfusion pressure (CPP) between 50 and 150 mm Hg or mean arterial pressure between 60 and 160 mm Hg (Rosner and Becker, 1984; Paulson et al., 1990; Peterson et al., 2011; Armstead, 2016). However, normal value for ICP is difficult to define. Indeed in healthy conditions, this depends on age and posture (Czosnyka and Pickard, 2004). However, a normal range was defined for ICP values: 5–15 mm Hg (7.5–20 cm H_2O) in horizontal position (Rangel-Castillo et al., 2008) and around −10 mm Hg in vertical position (Chapman et al., 1990). CPP depends on two-factors, ABP and ICP and their relationship can be established as follows: CPP = ABP−ICP. Thus, an increased ICP would lead to a diminution in CPP which may induce a cerebral vasodilatation eliciting a reduction in CBF (Rangel-Castillo et al., 2008). The response of CA occurs in a few seconds after CPP changes in order to maintain CBF in a normal range of pressure (Paulson et al., 1990; Franco Folino, 2007; Zhang and Hargens, 2018).

In this review, we first recall the mechanisms involved in CA and the different approaches allowing to assess this homeostatic mechanism. Finally, we will seek to bring together information about the impacts of spaceflight and the most commonly used microgravity analogs on CA.

MECHANISMS INVOLVED IN CEREBRAL BLOOD FLOW REGULATION

For decades, at least four theories are evoked to determine the mechanisms responsible for regulation of CBF: myogenic, neurogenic, metabolic and endothelial theories (Strandgaard and Paulson, 1984; Paulson et al., 1990; Peterson et al., 2011; Armstead, 2016; Rivera-Lara et al., 2017):

- The myogenic mechanism refers to the adaptation of the vascular smooth muscle to changes in transmural pressure with the corresponding vasoconstriction and vasodilatation in response to increased and reduced pressure (Ibrahim et al., 2006). Non-selective cation channels were found in vascular smooth muscle and they

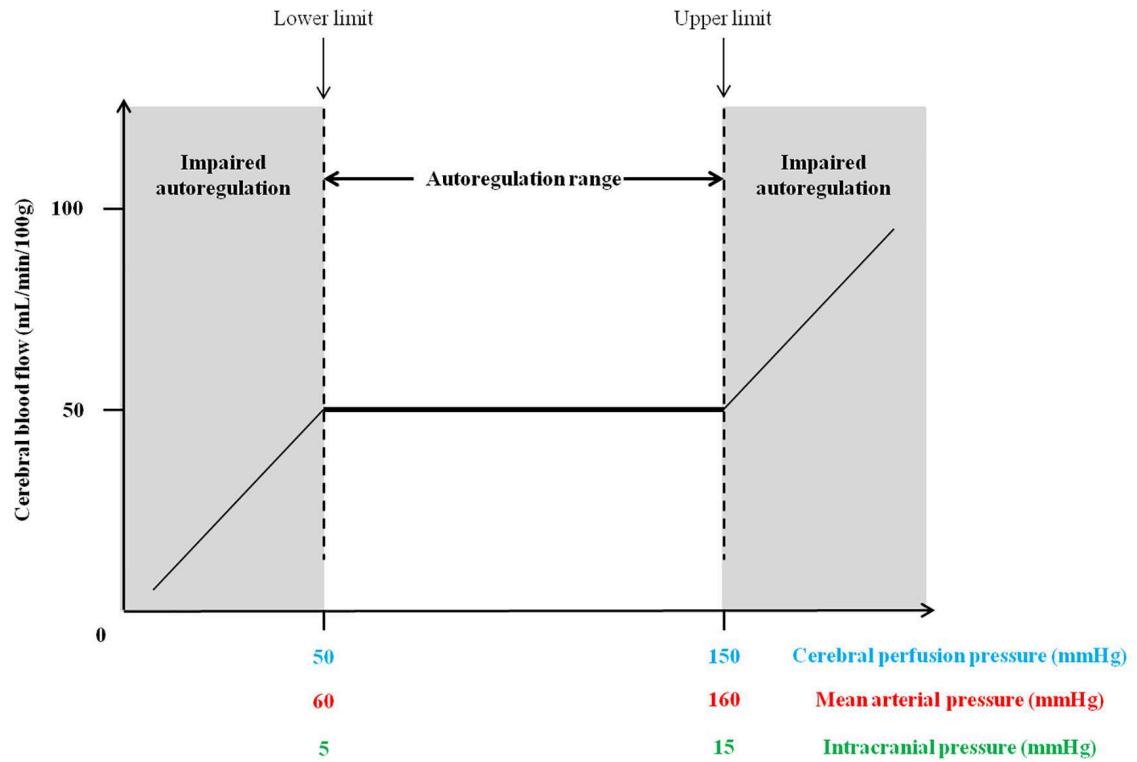


FIGURE 1 | Theoretical cerebral autoregulation curve with the autoregulation plateau where cerebral blood flow remains constant with the upper and lower limits of the autoregulatory range.

are strongly involved in myogenic mechanism. Indeed, a depolarization phenomenon will induce an influx of Ca^{2+} leading to vasoconstriction (Davis and Hill, 1999). The myogenic mechanism accounts for 31% of the pressure-flow relationship (Hamner and Tan, 2014).

- The neurogenic mechanism involves the innervation of the cerebral circulation with a broad panel of neurotransmitters with vasodilator and vasoconstrictor properties. Evidence shows the implication of sympathetic nervous system. Its activation shifts the upper limit of CA curve toward higher pressures in order to protect the brain against ABP increase. In parallel, it is believed that parasympathetic nervous system plays a minor role in CA. The latter, once activated, has cerebral vasodilatory effects (Hamel, 2006). Sympathetic and parasympathetic mechanisms account respectively for 20 and 11% of the pressure-flow relationship (Hamner and Tan, 2014). Perivascular nerves and astrocytes would have the ability to sense changes in CPP and adjust accordingly the sympathetic activity (Hamel, 2006; Marina et al., 2020). The astrocytes, due to their intrinsic function, may be considered as intracranial baroreceptors and play a major role in CA (Marina et al., 2020).
- The metabolic mechanism contributes to control CBF with the help of a plethora of vasoactive mediators (ions, metabolite byproducts, neurotransmitters, etc.). The vasoactive ions (K^+, H^+, Ca^{2+}) have mainly vasodilatory properties and an elevated concentrations of these ions may lead to vasodilatation (Faraci and Sobey, 1998; Nguyen et al., 2000). The metabolic factors (lactate, CO_2, adenosine) possess potent vasodilatory properties (Ko et al., 1990; Li and Iadecola, 1994; Attwell and Iadecola, 2002). The vasoactive neurotransmitters (dopamine, acetylcholine, gamma-amino butyric acid, vasoactive intestinal peptide) would also contribute to cerebral vasodilation (Girouard and Iadecola, 2006; Bor-Seng-Shu et al., 2012; Fantini et al., 2016).
- The endothelial mechanism, involving vasodilators (nitric oxide, carbon monoxide, prostacyclin) and vasoconstrictors (endothelin-1, thromboxane A2, angiotensin II) secreted by the endothelium in a paracrine fashion, may also play a key role in CA (Golding et al., 2002; Rivera-Lara et al., 2017; Silverman and Petersen, 2020).

DETERMINATION OF CEREBRAL AUTOREGULATION: STATIC AND DYNAMIC METHODS

Two methods can be applied in order to assess CA: static and dynamic methods. The static method assesses the global efficiency of the CA but not takes into account the latency, while dynamic method assesses latency and then efficiency of the CA (Tiecks et al., 1995).

The static approach consists to determine CBF changes in response to a steady-state change in ABP and necessitates the administration of vasoactive drugs (Tiecks et al., 1995). An autoregulatory index can be established as the percent change in cerebrovascular resistance related to the percent change in ABP (Tiecks et al., 1995) or percent change in CPP (Priesman et al., 2005). An autoregulatory index of 100% corresponds to perfect CA and 0% corresponds to absent CA. Microvascular CBF measurement in small cerebral arterioles can provide information about the state of CA. Continuous-wave near infrared spectroscopy and diffuse correlation spectroscopy are considered as robust quantitative method in the assessment of CA (Kim et al., 2010, 2018; Caicedo et al., 2012; Durduran and Yodh, 2014; Kainerstorfer et al., 2015; Armstead, 2016). As these methods assess CA from stabilized CBF over several minutes, these methods can be encompassed in the static approach of CA.

The dynamic approach relies on the rapid changes in ABP, the CBF response to these changes, and, in particular the time to return to its baseline values (Tiecks et al., 1995; Armstead, 2016). Several methods can be applied to determine dynamic CA. The first corresponds to the slope of cerebrovascular resistance recovery determined by the CPP to CBF ratio. An abrupt slope means an enhanced CA, while a gradual moderate slope indicates an impaired CA (Tiecks et al., 1995). A rise in CPP leads to a cerebral vasoconstriction, whereas a decline in CPP leads to cerebral vasodilation (Silverman and Petersen, 2020). CA can also be assessed by transfer function analysis between mean ABP and mean CBFV signals. A cross-spectral analysis is then applied to obtain three specific frequency-dependent parameters: transfer function coherence, gain and phase. The coherence measures the degree of linearity of the relationship between mean ABP and mean CBFV. The coherence value close to 1 indicates a strong linear relationship between mean ABP and mean CBFV with high signal-to-noise ratio, while the coherence approximating with value near zero may suggest a non-linear relationship, a presence of extraneous noise or other influencing variables (Marmarelis, 1988; Giller, 1990; Liu et al., 2015). Furthermore, a threshold of coherence over 0.5 depicts that transfer function gain and phase are valid (Diehl et al., 1995; Zhang et al., 1998). The gain reflects to what extent the transmission from the ABP signal variation impacts on the CBFV signal. The phase describes the delay between sinusoidal components of ABP signal and CBFV signal and was considered as temporal relation between these signals (Zhang et al., 1998; Liu et al., 2015). The mechanism of CA has the characteristics of a high-pass filter that dampens slow fluctuations of blood pressure (Zhang et al., 1998). The most commonly ranges used to calculate the mean values of the transfer function (coherence, phase and gain) are: very low frequency (VLF: 0.02–0.07 Hz), low frequency (LF: 0.07–0.20 Hz) and high frequency (HF: 0.20–0.35 Hz) (Zhang et al., 1998, 2009). It is now accepted that elevated coherence and gain with a reduced phase shift reflect an impaired CA (Giller, 1990; Immink et al., 2004; van Beek et al., 2008; Hamner et al., 2010; Donnelly et al., 2016). Several indices of dynamic CA have also been established and derived from transcranial Doppler and correspond to correlation coefficient of blood flow velocity with CPP (Mx) or ABP (Mxa), or slow waves in ICP with ABP (PRx). An unaltered CA is determined for $Mx < 0$, $Mxa < 0.3$, or $PRx < 0$, while CA is considered impaired for $Mx > 0$, $Mxa > 0.3$, or $PRx > 0$ (Czosnyka et al., 2001; Steiner et al., 2003; Sorrentino et al., 2011).

In addition, Nasr et al. (2014) found an inverse and strong correlation between baroreflex sensitivity and CA in healthy controls. This suggests that baroreflex modulation of the autonomic drive may play an important role on CA.

IMPACTS OF SPACEFLIGHT ON CEREBRAL AUTOREGULATION

Despite the numerous studies on spaceflight cardiovascular adaptation, the impact of microgravity on CA in astronauts remains unclear. **Table 1** summarizes methods used to assess CA in spaceflight.

Gazenko et al. (1981) reported that after spending several months in space, cosmonauts experienced a dramatic fall in pulse blood filling of cerebral vessels (similar to CBF pulsatility) corresponding to an improved cerebral vasoconstriction. Alternatively, during 6-months MIR spaceflights, the cerebral vascular resistance measured by resistance index was preserved in six cosmonauts (Herault et al., 2000). However, Arbeille et al. (2001) did not observe any significant changes in cerebral perfusion after short or long duration spaceflight despite a reduction in middle cerebral artery resistance index and middle cerebral artery mean flow velocity, as

TABLE 1 | List of authors and the methods used to assess cerebral autoregulation in spaceflight.

References	Methods	Subjects	Time duration
Gazenko et al., 1981	CBF	6 crewmembers	185 days
Bagian and Hackett, 1991	MCA blood flow velocity	4 crewmembers	N/A
Herault et al., 2000	CFR, Q_{CA}, R_{CA}	6 cosmonauts	6 months
Arbeille et al., 2001	Q_{CA}, R_{CA}	1–9 men + 1 woman	2 days to 6 months
Iwasaki et al., 2007	MCA blood flow velocity, CBFV, TFA (VLF, LF, HF)	6 men	1–2 weeks
Kotovskaia and Fomina, 2010	CBF	26 cosmonauts	8–438 days
Blaber et al., 2011	MCAv, CR, TFA (VLF, LF)	20 men + 7 women	8–16 days
Zuj et al., 2012	CBFV, CR, PI	6 men + 1 woman	58–199 days
Marshall-Goebel et al., 2019	JVBF	9 men + 2 women	210 ± 76 days

CBFV, cerebral blood flow velocity; CFR, cerebral to femoral flow ratio; CR, cerebrovascular resistance; HF, high frequency; JVBF, jugular venous blood flow; LF, low frequency; MCAv, middle cerebral artery velocity; PI, Gosling pulsatility index; Q_{CA}, middle cerebral artery mean flow velocity; R_{CA}, cerebral artery resistance index; TFA, transfer function analysis; VLF, very low frequency.

well as a diminution in cardiac volume, lower limb arterial resistance and an enlargement of jugular and femoral veins in cosmonauts. Bagian and Hackett (1991) did not see any significant modifications in CBFV directly measured by transcranial Doppler in crewmembers after 10 h in-flight. Iwasaki et al. (2007) also reported in six male crewmembers after a 1 and 2-week spaceflight, a reduction in gain function in the low frequency range (0.07–0.20 Hz) with no change in CBFV. These findings indicate a preserved or even better dynamic CA on landing day. Furthermore, a large hemodynamic dataset collected over 20 years in 26 cosmonauts aboard orbital stations Salyut 7 and Mir, show maintained cerebral circulation with a stabilized CBF even after long duration exposure to microgravity (Kotovskaia and Fomina, 2010). Several assumptions can be established to explain this enhancement in CA. First of all, Iwasaki et al. (2007) hypothesized that CA improvement would be due to the impact of microgravity which raises the responsiveness of cerebral vascular smooth muscle to changes of transmural pressure. Noteworthy is the cardiovascular autonomic nervous system which is known to be altered both in short- and long-duration space flight (Ertl et al., 2000; Sigaudo-Roussel et al., 2002; Eckberg et al., 2010) interacts with CA. Moreso, the baroreflex sensitivity which plays a key role in short-term blood pressure variations has been shown to be inversely correlated to CA in healthy individuals and the supposed mechanism for inverse correlation between baroreflex sensitivity and CA is an increased sympathetic tone associated with lower baroreflex sensitivity (Nasr et al., 2014). This suggests that baroreflex modulation of the autonomic drive may play a role on CA. These may indeed be one of the underlying physiological mechanisms explaining that CA was often preserved or even enhanced in spaceflight, and, could be related to changes in baroreflex sensitivity. However inter-individual variability of baroreflex sensitivity is known to be important and due to small numbers of individuals in space studies, this key interaction between impaired baroreflex sensitivity and preserved or even enhanced CA to date may have eluded identification. Pertaining to this mechanism of interaction between autonomic nervous system and CA, prior data have shown enhanced sympathetic nervous activity during prolonged exposure to microgravity (Ertl et al., 2002). This could explain preserved or better CA in most of the studies in space flight as CA is dependent on cerebral vasomotor tone which increases with afferent sympathetic drive.

A study performed in 27 astronauts, who took part in different shuttle missions lasting few days, described an impairment in CA reflected by an increase in the gain function between CBF and blood pressure (Blaber et al., 2011). This study showed that astronauts who were orthostatically tolerant presented no signs of an impaired CA, those who were orthostatically intolerant had a severe impairment in CA on landing day. These results suggest that one of the reasons leading to presyncope in astronauts is that there is a mismatch of blood pressure and CBF. Another study demonstrated in seven astronauts, which spent several days on the International Space Station, a decrease in cerebrovascular dynamic autoregulation and CO_2 reactivity, thus characterizing an altered CA (Zuj et al., 2012). A recent work revealed that among 11 healthy crewmembers who spent a mean of 210 days in spaceflight, 6 crewmembers presented stagnant or reverse flow in the internal jugular vein (Marshall-Goebel et al., 2019), which could jeopardize cerebral circulation (Zhou et al., 2018). They suggested that cerebrovascular alterations could be due to chronic elevation in cerebral blood pressure and chronic exposure to elevated atmospheric P_{CO2} as seen in long-duration spaceflight. Studies performed in animal models may provide an answer, though a partial one. In contrast to the hindlimb unloading in rodent, few of them were conducted during spaceflight. However, Taylor et al. (2013) demonstrated in female C57BL/6 mice that a 13-day spaceflight induced a diminished myogenic vasoconstriction and stiffness of posterior communicating arteries and an increased maximal diameter of basilar artery suggesting that cerebral perfusion could be altered. Another study showed that spaceflight induced an altered cerebral artery vasomotor in mice. Indeed, Sofronova et al. (2015) depicted in male C57BL/6N that a 30-day spaceflight attenuated vasoconstrictor and vasodilator properties in basilar artery thus likely impairing cerebral perfusion.

IMPACTS OF SPACEFLIGHT ANALOGS ON CEREBRAL AUTOREGULATION

Data on CA are controversial during ground-based model of microgravity. **Table 2** summarizes methods used to assess CA in analogs to spaceflight.

Guell et al. (1979) observed in four healthy subjects who underwent 4° HDT for 7 days, a rapid decrease *in loco*-regional CBF after 2 h followed by an increase after 48 h. In a similar study, these same authors only found in six healthy subjects an elevation *in loco*-regional CBF (Guell et al., 1982). These differences may be explained by the techniques used to measure loco-regional CBF which were different between these studies (respectively measured by transcranial Doppler and Xenon-133 techniques). Furthermore, another study also showed an increase in CBFV in six volunteers who underwent exposure to a 5-min 6° HDT (Kawai et al., 1992). These same authors described an increase in CBFV during HDT and a significant decrease in CBFV after 24 h of 6° HDT in eight healthy male subjects suggesting that CBFV may have a key role in syncope in astronauts when they come back on Earth (Kawai et al., 1993). Although Frey et al. (1993) found a diminution in blood flow velocity in the middle cerebral artery in nine men after 2 days of 10° HDT, but was inversely correlated with percent changes in retinal vascular diameters, suggested that CBF was not diminished. Satake et al. (1994), with the help of image analysis using single photon emission computer tomography, demonstrated that a significant increase in CBF in men was occurred in the basal ganglia and the cerebellum at 5 min after the onset of HDT, but not in the cerebral hemisphere. Pavy-Le Traon et al. (1995) showed in 12 healthy volunteers who underwent 28 days of HDBR, no changes in middle cerebral artery velocities recorded indirectly by transcranial Doppler indicating a preserved cerebral circulation. However, subjects

TABLE 2 | List of authors and the methods used to assess cerebral autoregulation in analogs to spaceflight.

References	Methods	Subjects	Time duration	Analogs
Guell et al., 1979	rCBF	4 men	7 days	4° HDT
Guell et al., 1982	rCBF	6 men	7 days	4° HDT
Kawai et al., 1992	CBFV	6 subjects	5 min	6° HDT
Frey et al., 1993	MCA blood flow velocity	9 men	2 days	10° HDT
Kawai et al., 1993	CBFV	8 men	1 day	6° HDT
Satake et al., 1994	CBF	Men	N/A	6° HDT
Pavy-Le Traon et al., 1995	MCAv, CR	12 men	28 days	6° HDT
Savin et al., 1995	MCAv	10 subjects	10 min	10° HDT
Zhang et al., 1997	CBFV	11 men + 1 woman	14 days	6° HDT
Arbeille et al., 1998	MCAv, CFR	8 men	4 days	6° HDT
Heckmann et al., 1999	CBFV, PI	11 men + 2 women	1 min	80° HDT
Arbeille et al., 2001	Q_{CA}, R_{CA}	6 to 19 men	1 h to 42 days	6° HDT
Sun et al., 2001	CBF, CR	12 men	21 days	6° HDT
Yao et al., 2001	ACAv, MCAv, PCAv, PI, RI	6 men	21 days	6° HDT
Pavy-Le Traon et al., 2002	MCAv, CR	8 women	7 days	6° HDT
Sun et al., 2002	MCAv	8 men	4 days	6° HDT
Yasumasa et al., 2002	CBFV	8 men	1 day	6° HDT
Sun et al., 2005	CBFV	12 men	21 days	6° HDT
Greaves et al., 2007	MCAv, CR, ARMA	24 women	60 days	6° HDT
Yang et al., 2011	CBFV, S/D, PI, RI	12 men	4 days	6° HDT
Geinas et al., 2012	MCAv, PCAv, CR, TFA (VLF, LF)	17 men + 4 women	>7–8 min	90°HDT
Jeong et al., 2014	TFA (VLF, LF, HF)	18 men + 3 women	18 days	6° HDT
Yang et al., 2015	CBFV	10 men and women	15 s	10°, 25°, and 55° HDT
Marshall-Goebel et al., 2016	Blood flow velocity	9 men	4.5 h	6°, 12°, and 18° HDT
Kermorgant et al., 2017	TFA (VLF, LF, HF), Mxa	12 men	3 days	DI
Ogoh et al., 2017	CBF	12 men	3 days	DI
Kermorgant et al., 2019	MCAv, TFA (VLF, LF), Mxa	12 men	21 days	6° HDT

ACAv, anterior cerebral artery velocity; ARMA, autoregressive moving average; CBFV, cerebral blood flow velocity; CFR, cerebral to femoral flow ratio; CR, cerebrovascular resistance; DI, dry immersion; HDT, head-down tilt; HF, high frequency; LF, low frequency; MCAv, middle cerebral artery velocity; Mxa, autoregulatory index; PCAv, posterior cerebral artery velocity; PI, Gosling pulsatility index; Q_{CA}, middle cerebral artery mean flow velocity; R_{CA}, cerebral artery resistance index; rCBF, loco-regional cerebral blood flow; RI, Pourcelot resistance index; S/D, CBFV systolic/CBFV diastolic; TFA, transfer function analysis; VLF, very low frequency.

presenting presyncopal symptoms had a drop in middle cerebral artery velocities indicating an impaired CA. An increase in middle cerebral artery velocity has also been observed in 10 subjects at during 10° HDT, which was restored at the end of the experiment (Savin et al., 1995). Heckmann et al. (1999) did not find any significant changes in CBFV measured by transcranial Doppler sonography but an increase pulsatility index after 1-min 80° HDT in 13 healthy volunteers. In a 4-day of HDBR study, no major changes were observed in dynamic CA in eight healthy volunteers during head-up tilt (Arbeille et al., 1998). The same authors did not find any significant changes in cerebral perfusion in men in a 42-day HDT despite an increase in cerebral artery resistance index and a decrease in middle cerebral artery mean flow velocity during the early phase of HDT (4–5 days) (Arbeille et al., 2001). Another study performed in eight healthy women showed that cerebrovascular resistance was preserved during and after a 7-day HDBR suggesting an unaltered CA. In this study, five of eight women who presented orthostatic intolerance had a time to maximum decrease in cerebrovascular resistance larger than the three women who did not, suggesting that some differences in CA may be related to orthostatic intolerance (Pavy-Le Traon et al., 2002). Consistently, Yasumasa et al. (2002) found an elevated CBFV in eight men, measured by transcranial Doppler, during the early phase (first 6 h) of 6° HDT. Moreover, a 60-day HDTBR study demonstrated that among 24 healthy women, those who exhibited few changes in orthostatic tolerance presented a preserved dynamic CA, determined by autoregressive moving average (Greaves et al., 2007). Also, Geinas et al. (2012) did not observe any significant changes in CBFV in 21 healthy young adults, even after severe changes in posture (90° HDT), although ABP was elevated compared to supine position. Similarly, a 18-day HDBR study performed in 14 healthy adults depicted a decrease in transfer function gain. These findings stated an improved dynamic CA (Jeong et al., 2014). Yang et al. (2015) found in 10 subjects an elevation in CBFV after acute consecutive exposure to randomized 10°, 25°, and 55° HDT; however, an autoregulatory correction index was applied in this study and revealed a modified but an unimpaired cerebrovascular autoregulation. Moreover, a recent work in 12 healthy male subjects who underwent 21 days of HDBR showed that autoregulatory index Mxa was reduced reflecting an enhanced dynamic CA (Kermorgant et al., 2019). Following an extensive literature search, we found only few studies that measured CA after DI. Kermorgant et al. (2017) demonstrated that the effects of

3-day DI would improve CA. Indeed, a decrease in autoregulatory index Mxa associated with an increase in the cross-spectral phase shift were observed in 12 healthy male subjects. Ogoh et al. (2017) showed in the same study that DI affected both anterior and posterior cerebral vasculature, but did not provoke a heterogeneous CBF response in each cerebral artery (internal carotid, external carotid, common carotid, and vertebral arteries) measured by Doppler ultrasonography. As previously suggested for spaceflight, one suggestion for CA improvement is that microgravity could increase the responsiveness of cerebral vascular smooth muscle to changes of transmural pressure (Iwasaki et al., 2007). However, plasma volume may also play a key role in this enhancement. Indeed, previous authors found that a diminution in plasma volume provoked a reduction in transfer function gain (corresponding to an enhanced CA), while when plasma volume was restored by volume loading, transfer function gain was increased (corresponding to an impaired CA) (Ogawa et al., 2007, 2009; Jeong et al., 2014). Consistently, several studies showed a reduction in plasma volume both in HDBR (Convertino et al., 1990; Iwasaki et al., 2000; Belin de Chantemèle et al., 2004) and in DI (Navasiolava et al., 2011b; de Abreu et al., 2017).

However, although Zhang et al. (1997) did not observe any significant modifications in CBFV in 12 subjects. The authors documented an impaired CA reflected by a greater decline in CBF during lower body negative pressure after 2 weeks of HDBR. They also speculated that impairment of CA may be involved in orthostatic intolerance after bed rest. Sun et al. (2001) performed a 21-day HDT study with or without the effects of lower body negative pressure in 12 healthy male subjects in order to investigate potential changes of CBF. Six of twelve subjects were allocated in control group (without lower body negative pressure) and they exhibited an increase in cerebral vascular resistance and a decrease in CBF measured by rheoencephalogram. They further showed, a diminution in CBFV measured by transcranial Doppler sonography, on the last day of a 4-day HDT study conducted in eight healthy male volunteers. The same authors further identified a reduction in CBFV determined by transcranial Doppler technique in 12 healthy male volunteers during a 21-day 6° HDTBR study (Sun et al., 2005). Yao et al. (2001) confirmed these previous reports with a 21-day HDT study performed in six healthy male. Indeed, they described in these subjects a reduced systolic blood velocity of both side middle cerebral artery and mean blood velocity of right middle cerebral artery. Moreover, Yang et al. (2011) found changes in cerebrovascular functions in six healthy male subjects after a 4-day HDT with reductions in CBFV, pulsatility index, resistance index, and S/D (corresponding to CBFV systolic/CBFV diastolic). All these parameters returned to basal values after HDBR. Similar findings were observed with a reduction in CBFV, measured with phase-contrast magnetic resonance imaging, in nine healthy male subjects after short-term exposure (∼4.5 h) to randomized 6°, 12°, and 18° HDT angles (Marshall-Goebel et al., 2016). The mechanisms involved in this impairment remain unclear. However, alterations in CA may be explained by a potential rise in ICP. Indeed, Kermorgant et al. (2017) found that ICP (indirectly measured by optic nerve sheath diameter) was negatively correlated with the autoregulatory index (Mxa) and coherence after 3-day DI in healthy volunteers. Despite an overall improvement in CA, subjects with low values of optic nerve sheath diameter (corresponding to low values of ICP) presented a better CA than subjects with high values of optic nerve sheath diameter (corresponding to high values of ICP). Moreover, it has been shown that patients with head-injury with the presence of an elevated ICP presented an impaired CA (Czosnyka et al., 2001). However, many studies showed that pronounced HDT led to a rise in ICP. Chin et al. (2015) showed that 3 min Trendelenburg position (corresponding to ∼30° HDT) were sufficient to induce an elevation in optic nerve sheath diameter compared to supine position in anesthetized patients. Another study performed in healthy subjects showed an elevation in optic nerve sheath diameter after 5 h in 18° HDT position (Marshall-Goebel et al., 2017). Petersen et al. (2016) also demonstrated in ambulatory neurosurgical patients that ICP (measured directly by tip-transducer) was significantly increased with HDT (10°: 14.3 mm Hg and 20°: 19.0 mm Hg) compared to supine position (0°: 9.4 mm Hg). Animal models may provide further explanations. Indeed, tail-suspended rat model is an efficiency method to reproduce major physiological changes observed in space flight, just as long-term bed rest (Morey-Holton and Globus, 2002; Morey-Holton et al., 2005; Carpenter et al., 2010; Chowdury et al., 2013). Studies performed in hindlimb suspension in rat showed that this alteration can originate from several factors including, an elevation in cerebrovascular resistance accompanied by a reduction in blood flow, hypertrophy phenomenon, a rise in myogenic tone. and vasoreactivity in cerebral arteries (Geary et al., 1998; Wilkerson et al., 1999; Morey-Holton and Globus, 2002; Morey-Holton et al., 2005; Lin et al., 2009).

CONCLUSION

Either in spaceflight or in ground-based model of microgravity, most of short-term studies show a preserved or even an improved CA. However, long-term studies depict an impairment in CA. One of the main reasons for the discrepancy may depend on baseline orthostatic tolerance. Indeed, it would seem that subjects who are orthostatically tolerant have a preserved or even an enhanced CA. In contrast, subjects who are orthostatically intolerant would present an impaired CA (Blaber et al., 2011). These differences can also be attributed to the methods used to assess CA and the interpretation of each measure should be made cautiously (Tzeng et al., 2012). Furthermore, as highlighted by Armstead (2016) and Zhang and Hargens (2018), none efficient methods exist to accurately measure CBFV. The assessment of CA should be compared by gender. In fact, several studies showed gender differences in CBFV (Ackerstaff et al., 1990; Marinoni et al., 1998), cerebral vasomotor (Karnik et al., 1996) and cerebrovascular reactivities (Kastrup et al., 1997), CA both in young and old adults (Wang et al., 2005; Deegan et al., 2009). Moreover, regional differences were observed between

anterior and posterior cerebral circulation and this should have been taken into account during the assessment of CA (Roth et al., 2017). Petersen and Ogoh (2019) also suggested that dynamic CA could be over- or underestimated due to the fact that gravitational stress may alter regional arterial pressure and ICP/CPP differently. Additional studies are needed in order to determine more accurately the impact of microgravity on CA. Finally, although residual effects of gravity remain, HDBR and DI could be considered as robust ground-based analogs to spaceflight for studying CA in humans during microgravity.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MK, NN, MC, DA, OH, J-MS, and AP-L wrote and edited the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

ACKNOWLEDGMENTS

OH was supported by Centre National d'Etudes Spatiales (CNES).

REFERENCES

Ackerstaff, R. G., Keunen, R. W., van Pelt, W., Montauban van Swijndregt, A. D., and Stijnen, T. (1990). Influence of biological factors on changes in mean cerebral blood flow velocity in normal ageing: a transcranial doppler study. *Neurol. Res.* 12, 187–191. doi: 10.1080/01616412.1990.11739941

Arbeille, P., Fomina, G., Roumy, J., Alferova, I., Tobal, N., and Herault, S. (2001). Adaptation of the left heart, cerebral and femoral arteries, and jugular veins during short- and long-term head-down tilt and spaceflights. *Eur. J. Appl.Physiol.* 86, 157–168. doi: 10.1007/s004210100473

Arbeille, P., Sigaudo, D., Pavy-Le Traon, A., Herault, S., Porcher, M., and Gharib, C. (1998). Femoral to cerebral arterial blood flow redistribution and femoral vein distension during orthostatic tests after 4 days in the head-down tilt position or confinement. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 78, 208–218. doi: 10.1007/s004210050409

Armstead, W. M. (2016). Cerebral blood flow autoregulation and dysautoregulation. *Anesthesiol. Clin.* 34, 465–477. doi: 10.1016/j.anclin.2016.04.002

Attwell, D., and Iadecola, C. (2002). The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci.* 25, 621–625. doi: 10.1016/s0166-2236(02)02264-6

Avan, P., Rukavishnikov, I., Madero, B., Tomilovskaya, E., Normand, H., Kozlovskaya, I., et al. (2013). "Assessment of intracranial pressure changes with otoacoustic emission under conditions of simulated microgravity," in *Proceedings of 19th IAA Humans in Space Symposium*, Cologne.

Bagian, J. P., and Hackett, P. (1991). Cerebral blood flow: comparison of ground-based and spaceflight data and correlation with space adaptation syndrome. *J. Clin. Pharmacol.* 31, 1036–1040. doi: 10.1002/j.1552-4604.1991.tb03668.x

Belin de Chantemèle, E., Blanc, S., Pellet, N., Duvareille, M., Ferretti, G., Gauquelin-Koch, G., et al. (2004). Does resistance exercise prevent body fluid changes after a 90-day bed rest? *Eur. J. Appl. Physiol.* 92, 555–564. doi: 10.1007/s00421-004-1121-6

Blaber, A. P., Goswami, N., Bondar, R. L., and Kassam, M. S. (2011). Impairment of cerebral blood flow regulation in astronauts with orthostatic intolerance after flight. *Stroke* 42, 1844–1850. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.610576

Bor-Seng-Shu, E., Kita, W. S., Figueiredo, E. G., Paiva, W. S., Fonoff, E. T., Teixeira, M. J., et al. (2012). Cerebral hemodynamics: concepts of clinical importance. *Arq. Neuropsiquiatr.* 70, 352–356. doi: 10.1590/s0004-282x2012000500010

Buckey, J. C. Jr., Lane, L. D., Levine, B. D., Watenpaugh, D. E., Wright, S. J., Moore, W. E., et al. (1996). Orthostatic intolerance after spaceflight. *J. Appl. Physiol. (1985)* 81, 7–18. doi: 10.1152/jappl.1996.81.1.7

Caicedo, A., Naulaers, G., Lemmers, P., van Bel, F., Wolf, M., and Van Huffel, S. (2012). Detection of cerebral autoregulation by near-infrared spectroscopy in neonates: performance analysis of measurement methods. *J. Biomed. Opt.* 17:117003. doi: 10.1117/1.JBO.17.11.117003

Carpenter, R. D., Lang, T. F., Bloomfield, S. A., Bloomberg, J. J., Judex, S., Keyak, J. H., et al. (2010). Effects of long-duration spaceflight, microgravity, and radiation on the neuromuscular, sensorimotor, and skeletal systems. *J. Cosmol.* 12, 3778–3780.

Chapman, P. H., Cosman, E. R., and Arnold, M. A. (1990). The relationship between ventricular fluid pressure and body position in normal subjects and subjects with shunts: a telemetric study. *Neurosurgery* 26, 181–189. doi: 10.1097/00006123-199002000-00001

Chin, J.-H., Seo, H., Lee, E. H., Lee, J., Hyuk, J., Hwang, J. H., et al. (2015). Sonographic optic nerve sheath diameter as a surrogate measure for intracranial pressure in anesthetized patients in the Trendelenburg position. *BMC Anesthesiol.* 15:43. doi: 10.1186/s12871-015-0025-9

Chowdury, P., Long, A., Harris, G., Soulsby, M. E., and Dobretsov, M. (2013). Animal models of simulated microgravity: a comparative study of hindlimb unloading via tail versus pelvic suspension. *Physiol. Rev.* 1:e00012. doi: 10.1002/phy2.12

Claassen, J. A., Meel-van den Abeelen, A. S., Simpson, D. M., Panerai, R. B., and international Cerebral Autoregulation Research Network (CARNet), (2016). Transfer function analysis of dynamic cerebral autoregulation: a white paper from the international cerebral autoregulation research network. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 36, 665–680. doi: 10.1177/0271678X15626425

Convertino, V. A., Doerr, D. F., Eckberg, D. L., Fritsch, J. M., and Vernikos-Danellis, J. (1990). Head-down bed rest impairs vagal baroreflex responses and provokes orthostatic hypotension. *J. Appl. Physiol.* 68, 1458–1464. doi: 10.1152/jappl.1990.68.4.1458

Czosnyka, M., and Pickard, J. D. (2004). Monitoring and interpretation of intracranial pressure. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, 813–821. doi: 10.1136/jnnp.2003.033126

Czosnyka, M., Smielewski, P., Piechnik, S., Steiner, L. A., and Pickard, J. D. (2001). Cerebral autoregulation following head injury. *J. Neurosurg.* 2001, 756–763. doi: 10.3171/jns.2001.95.5.0756

Davis, M. J., and Hill, M. A. (1999). Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol. Rev.* 79, 387–423. doi: 10.1152/physrev.1999.79.2.387

de Abreu, S., Amirova, L., Murphy, R., Wallace, R., Twomey, L., Gauquelin-Koch, G., et al. (2017). Multi-system deconditioning in 3-day dry immersion without daily rise. *Front. Physiol.* 8:799. doi: 10.3389/fphys.2017.00799

Deegan, B. M., Sorond, F. A., Lipsitz, L. A., Olaighin, G., and Serrador, J. M. (2009). Gender related differences in cerebral autoregulation in older healthy subjects. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2009, 2859–2862. doi: 10.1109/IEMBS.2009.5333604

Diehl, R. R., Linden, D., Lücke, D., and Berlit, P. (1995). Phase relationship between cerebral blood flow velocity and blood pressure. A clinical test of autoregulation. *Stroke.* 26, 1801–1804. doi: 10.1161/01.str.26.10.1801

Donnelly, J., Budohoski, K. P., Smielewski, P., and Czosnyka, M. (2016). Regulation of the cerebral circulation: bedside assessment and clinical implications. *Crit. Care.* 20:129. doi: 10.1186/s13054-016-1293-6

Durduran, T., and Yodh, A. G. (2014). Diffuse correlation spectroscopy for non invasive, microvascular cerebral blood flow measurement. *NeuroImage* 85, 51–63. doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.06.017

Eckberg, D. L., Halliwill, J. R., Beightol, L. A., Brown, T. E., Taylor, J. A., and Goble, R. (2010). Human vagal baroreflex mechanisms in space. *J. Physiol.* 588, 1129–1138. doi: 10.1113/jphysiol.2009.186650

Ertl, A. C., Diedrich, A., and Biaggioni, I. (2000). Baroreflex dysfunction induced by microgravity: potential relevance to postflight orthostatic intolerance. *Clin. Auton. Res.* 10, 269–277. doi: 10.1007/bf02281109

Ertl, A. C., Diedrich, A., Biaggioni, I., Levine, B. D., Robertson, R. M., Cox, J. F., et al. (2002). Human muscle sympathetic nerve activity and plasma noradrenaline kinetics in space. *J. Physiol.* 538, 321–329. doi: 10.1113/jphysiol.2001.012576

Fantini, S., Sassaroli, A., Tgavalekos, K. T., and Kornbluth, J. (2016). Cerebral blood flow and autoregulation: current measurement techniques and prospects for noninvasive optical methods. *Neurophotonics* 3:031411. doi: 10.1117/1.NPh.3.3.031411

Faraci, F. M., and Sobey, C. G. (1998). Role of potassium channels in regulation of cerebral vascular tone. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 1047–1063. doi: 10.1097/00004647-199810000-00001

Franco Folino, A. (2007). Cerebral autoregulation and syncope. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 50, 49–80. doi: 10.1016/j.pcad.2007.01.001

Frey, M. A. B., Mader, T. H., Bagian, J. P., Charles, J. B., and Meehan, R. T. (1993). Cerebral blood velocity and other cardiovascular-responses to 2 days of head-down tilt. *J. Appl. Physiol.* 74, 319–325. doi: 10.1152/jappl.1993.74.1.319

Fritsch, J. M., Charles, J. B., Bennett, B. S., Jones, M. M., and Eckberg, D. L. (1992). Short-duration spaceflight impairs human carotid baroreceptor-cardiac reflex responses. *J. Appl. Physiol. (1985)* 73, 664–671. doi: 10.1152/jappl.1992.73.2.664

Fritsch-Yelle, J. M., Charles, J. B., Jones, M. M., Beightol, L. A., and Eckberg, D. L. (1994). Spaceflight alters autonomic regulation of arterial pressure in humans. *J. Appl. Physiol. (1985)* 77, 1776–1783. doi: 10.1152/jappl.1994.77.4.1776

Fritsch-Yelle, J. M., Charles, J. B., Jones, M. M., and Wood, M. L. (1996a). Microgravity decreases heart rate and arterial pressure in humans. *J. Appl. Physiol. (1985)* 80, 910–914. doi: 10.1152/jappl.1996.80.3.910

Fritsch-Yelle, J. M., Whitson, P. A., Bondar, R. L., and Brown, T. E. (1996b). Subnormal norepinephrine release relates to presyncope in astronauts after spaceflight. *J. Appl. Physiol. (1985)* 81, 2134–2141. doi: 10.1152/jappl.1996.81.5.2134

Fu, Q., Shibata, S., Hastings, J. L., Platts, S. H., Hamilton, D. M., Bungo, M. W., et al. (2019). Impacts of prolonged spaceflight on orthostatic tolerance during ambulation and blood pressure profiles in astronauts. *Circulation* 140, 729–738. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041050

Gazenko, O. G., Genin, A. M., and Egorov, A. D. (1981). Summary of medical investigations in the U.S.S.R. manned space missions. *Acta Astronaut.* 8, 907–917. doi: 10.1016/0094-5765(81)90061-8

Geary, G. G., Krause, D. N., Purdy, R. E., and Duckles, S. P. (1998). Simulated microgravity increases myogenic tone in rat cerebral arteries. *J. Appl. Physiol. (1985)* 85, 1615–1621. doi: 10.1152/jappl.1998.85.5.1615

Geinas, J. C., Marsden, K. R., Tzeng, Y. C., Smirl, J. D., Smith, K. J., Willie, C. K., et al. (2012). Influence of posture on the regulation of cerebral perfusion. *Aviat. Space Environ. Med.* 83, 751–757. doi: 10.3357/asem.3269.2012

Giller, C. A. (1990). The frequency-dependent behavior of cerebral autoregulation. *Neurosurgery* 27, 362–368. doi: 10.1227/00006123-199009000-00004

Girouard, H., and Iadecola, C. (2006). Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J. Appl. Physiol. (1985)* 100, 328–335. doi: 10.1152/japplphysiol.00966.2005

Golding, E. M., Marrelli, S. P., You, J., and Bryan, R. M. Jr. (2002). Endothelium-derived hyperpolarizing factor in the brain: a new regulator of cerebral blood flow? *Stroke* 33, 661–663. doi: 10.1161/str.33.3.661

Greaves, D. K., Arbeille, P., and Hughson, R. L. (2007). WISE 2005: altered cerebrovascular autoregulation after 60 day head-down bed rest. *J. Gravit. Physiol.* 14, 61–62.

Grigorieva, H. P., and Kozlovskaya, I. B. (1983). Influence 7-day immersion unloading on speed-strength properties of skeletal muscle. *Space Biol. Aerospace Med.* 4, 21–25.

Guell, A., Bes, A., Braak, L., and Barrère, M. (1979). Effects of a weightlessness simulation on the velocity curves measured by Doppler sonography at the level of the carotid system. *Physiologist* 22, 25–26.

Guell, A., Dupui, P., Barrère, M., Fanjaud, A., Bes, A., and Kotowskaia, A. (1982). Changes in the loco-regional cerebral blood flow (r.C.B.F.) during a simulation of weightlessness. *Acta Astronaut.* 9, 689–690. doi: 10.1016/0094-5765(82)90049-2

Hallgren, E., Kornilova, L., Fransen, E., Glukhikh, D., Moore, S. T., Clément, G., et al. (2016). Decreased otolith-mediated vestibular response in 25 astronauts induced by long-duration spaceflight. *J. Neurophysiol.* 115, 3045–3051. doi: 10.1152/jn.00065.2016

Hallgren, E., Migeotte, P. F., Kornilova, L., Delière, Q., Fransen, E., Glukhikh, D., et al. (2015). Dysfunctional vestibular system causes a blood pressure drop in astronauts returning from space. *Sci. Rep.* 5:17627. doi: 10.1038/srep17627

Hamel, E. (2006). Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J. Appl. Physiol. (1985)* 100, 1059–1064. doi: 10.1152/japplphysiol.00954.2005

Hamner, J. W., and Tan, C. O. (2014). Relative contributions of sympathetic, cholinergic, and myogenic mechanisms to cerebral autoregulation. *Stroke* 45, 1771–1777. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.005293

Hamner, J. W., Tan, C. O., Lee, K., Cohen, M. A., and Taylor, J. A. (2010). Sympathetic control of the cerebral vasculature in humans. *Stroke* 41, 102–109. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.557132

Hargens, A. R., and Vico, L. (2016). Long-duration bed rest as an analog to microgravity. *J. Appl. Physiol.* 120, 891–903. doi: 10.1152/japplphysiol.00935.2015

Heckmann, J. G., Hilz, M. J., Hagler, H., Mück-Weymann, M., and Neundijrfer, B. (1999). Transcranial Doppler sonography during acute 80° head-down tilt (HDT) for the assessment of cerebral autoregulation in humans. *Neurol. Res.* 21, 457–462. doi: 10.1080/01616412.1999.11740959

Herault, S., Fomina, G., Alferova, I., Kotovskaya, A., and Arbeille, P. (2000). Cardiac, arterial and venous adaptation to weightlessness during 6-month MIR spaceflights with and without thigh cuffs (bracelets). *Eur. J. Appl. Physiol.* 81, 384–390. doi: 10.1007/s004210050058

Herranz, R., Anken, R., Boonstra, J., Braun, M., Christiansen, P. C., de Geest, M., et al. (2013). Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specifications for their use, and recommended terminology. *Astrobiology* 13, 1–17. doi: 10.1089/ast.2012.0876

Ibrahim, J., McGee, A., Graham, D., McGrath, J. C., and Dominiczak, A. F. (2006). Sex-specific differences in cerebral arterial myogenic tone in hypertensive and normotensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, 1081–1089. doi: 10.1152/ajpheart.00752.2005

Immink, R. V., van den Born, B. J., van Montfrans, G. A., Koopmans, R. P., Karemaker, J. M., and van Lieshout, J. J. (2004). Impaired cerebral autoregulation in patients with malignant hypertension. *Circulation* 110, 2241–2245. doi: 10.1161/01.CIR.0000144472.08647.40

Iwasaki, K., Levine, B. D., Zhang, R., Zuckerman, J. H., Pawelczyk, J. A., Diedrich, A., et al. (2007). Human cerebral autoregulation before, during and after spaceflight. *J. Physiol.* 579, 799–810. doi: 10.1113/jphysiol.2006.119636

Iwasaki, K., Zhang, R., Zuckerman, J. H., Pawelczyk, J. A., and Levine, B. D. (2000). Effect of head-down-tilt bed rest and hypovolemia on dynamic regulation of heart rate and blood pressure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, 189–199. doi: 10.1152/ajpregu.2000.279.6.R2189

Iwase, S., Sugiyama, Y., Miwa, C., Kamiya, A., Mano, T., Ohira, Y., et al. (2000). Effects of three days of dry immersion on muscle sympathetic nerve activity and arterial blood pressure in humans. *J. Auton. Nerv. Syst.* 79, 156–164. doi: 10.1016/S0165-1838(99)00076-4

Jeong, S. M., Hwang, G. S., Kim, S. O., Levine, B. D., and Zhang, R. (2014). Dynamic cerebral autoregulation after bed rest: effects of volume and exercise countermeasures. *J. Appl. Physiol.* 116, 24–31. doi: 10.1152/japplphysiol.00710.2013

Johnson, P. C. (1986). Autoregulation of blood flow. *Circ. Res.* 59, 483–495. doi: 10.1161/01.res.59.5.483

Kainerstorfer, J. M., Sassaroli, A., Tgavalekos, K. T., and Fantini, S. (2015). Cerebral autoregulation in the microvasculature measured with near-infrared spectroscopy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 959–966. doi: 10.1038/jcbfm.2015.5

Karnik, R., Valentin, A., Winkler, W. B., Khaffaf, N., Donath, P., and Slany, J. (1996). Sex-related differences in acetazolamide-induced cerebral vasomotor reactivity. *Stroke* 27, 56–58. doi: 10.1161/01.str.27.1.56

Kastrup, A., Thomas, C., Hartmann, C., and Schabet, M. (1997). Sex dependency of cerebrovascular CO2 reactivity in normal subjects. *Stroke* 28, 2353–2356. doi: 10.1161/01.str.28.12.2353

Kawai, Y., Murthy, G., Watenpaugh, D. E., and Hargens, A. R. (1992). Cerebral blood flow velocity increases with acute head-down tilt of humans. *Physiologist* 35, 186–187.

Kawai, Y., Murthy, G., Watenpaugh, D. E., Breit, G. A., Deroshia, C. W., and Hargens, A. R. (1993). Cerebral blood flow velocity in humans exposed to 24h head-down tilt. *J. Appl. Physiol. (1985)* 74, 3046–3051. doi: 10.1152/jappl.1993.74.6.3046

Kermorgant, M., Leca, F., Nasr, N., Custaud, M.-A., Geeraerts, T., Czosnyka, M., et al. (2017). Impacts of simulated weightlessness by dry immersion on optic

nerve sheath diameter and cerebral autoregulation. *Front. Physiol.* 8:780. doi: 10.3389/fphys.2017.00780

Kermorgant, M., Nasr, N., Custaud, M.-A., Navasiolava, N., Arbeille, P., Guinet, P., et al. (2019). Effects of resistance exercise and nutritional supplementation on dynamic cerebral autoregulation in head-down bed rest. *Front. Physiol.* 10:1114. doi: 10.3389/fphys.2019.01114

Kim, J. M., Choi, J. K., Choi, M., Ji, M., Hwang, G., Ko, S. B., et al. (2018). Assessment of cerebral autoregulation using continuous-wave near-infrared spectroscopy during squat-stand maneuvers in subjects with symptoms of orthostatic intolerance. *Sci. Rep.* 8:13257. doi: 10.1038/s41598-018-31685-y

Kim, M. N., Durduran, T., Frangos, S., Edlow, B. L., Buckely, E. M., Moss, H. E., et al. (2010). Noninvasive measurement of cerebral blood flow and blood oxygenation using near infrared and diffuse correlation spectroscopies in critically brain injured adults. *Neurocrit. Care* 12, 173–180. doi: 10.1007/s12028-009-9305-x

Ko, R. K., Ngai, A. C., and Winn, H. R. (1990). Role of adenosine in regulation of regional cerebral blood flow in sensory cortex. *Am. J. Physiol.* 259, 1703–1708. doi: 10.1152/ajpheart.1990.259.6.H1703

Kotovskaia, A. R., and Fomina, G. A. (2010). [The features of adaptation and disadaptation of the human cardiovascular system in the space flight conditions]. *Fiziol. Cheloveka.* 36, 78–86.

Kozlovskaya, I. B., Grigoriev, H. P., and Gevlich, A. I. (1984). Comparative analysis of the influences of weightlessness and its models on speed-strength properties and skeletal muscle tone. *Russ. Biol. Aerospace Med.* 6, 22–25.

Lassen, N. A. (1959). Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiol. Rev.* 39, 183–238. doi: 10.1152/physrev.1959.39.2.183

Lassen, N. A. (1964). Autoregulation of cerebral blood flow. *Circ. Res.* 15, 201–204.

Lassen, N. A. (1985). Normal average value of cerebral blood flow in younger adults is 50 ml/100 g/min. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 5, 347–349. doi: 10.1038/jcbfm.1985.48

Lassen, N. A., Feinberg, I., and Lane, M. H. (1960). Bilateral studies of cerebral oxygen uptake in young and aged normal subjects and in patients with organic dementia. *J. Clin. Invest.* 39, 491–500. doi: 10.1172/JCI104063

Lee, S. M. C., Feiveson, A. H., Stein, S., Stenger, M. B., and Platts, S. H. (2015). Orthostatic intolerance after ISS and space shuttle missions. *Aerosp. Med. Hum. Perform.* 86, 54–67. doi: 10.3357/AMHP.EC08.2015

Levine, B. D., Pawelczyk, J. A., Ertl, A. C., Cox, J. F., Zuckerman, J. H., Diedrich, A., et al. (2002). Human muscle sympathetic neural and haemodynamic responses to tilt following spaceflight. *J. Physiol.* 538, 331–340. doi: 10.1113/jphysiol.2001.012575

Li, J., and Iadecola, C. (1994). Nitric oxide and adenosine mediate vasodilation during functional activation in cerebellar cortex. *Neuropharmacology* 33, 1453–1461. doi: 10.1016/0028-3908(94)90049-3

Lin, L. J., Gao, F., Bai, Y. G., Bao, J. X., Huang, X. F., Ma, J., et al. (2009). Contrasting effects of simulated microgravity with and without daily -Gx gravitation on structure and function of cerebral and mesenteric small arteries in rats. *J. Appl. Physiol. (1985)* 107, 1710–1721. doi: 10.1152/japplphysiol.00493.2009

Liu, X., Czosnyka, M., Donnelly, J., Budohoski, K. P., Varsos, G. V., Nasr, N., et al. (2015). Comparison of frequency and time domain methods of assessment of cerebral autoregulation in traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 248–256. doi: 10.1038/jcbfm.2014.192

Marina, N., Christie, I. N., Korsak, A., Doronin, M., Brazhe, A., Hosford, P. S., et al. (2020). Astrocytes monitor cerebral perfusion and control systemic circulation to maintain brain blood flow. *Nat. Commun.* 11:131. doi: 10.1038/s41467-019-13956-y

Marinoni, M., Ginanneschi, A., Inzitari, D., Mugnai, S., and Amaducci, L. (1998). Sex-related differences in human cerebral hemodynamics. *Acta Neurol. Scand.* 97, 324–327. doi: 10.1111/j.1600-0404.1998.tb05961.x

Marmarelis, V. Z. (1988). Coherence and apparent transfer function measurements for nonlinear physiological systems. *Ann. Biomed. Eng.* 16, 143–157. doi: 10.1007/bf02367386

Marshall-Goebel, K., Ambarki, K., Eklund, A., Malm, J., Mulder, E., Gerlach, D., et al. (2016). Effects of short-term exposure to head-down tilt on cerebral hemodynamics: a prospective evaluation of a spaceflight analog using phase-contrast MRI. *J. Appl. Physiol. (1985)* 120, 1466–1473. doi: 10.1152/japplphysiol.00841.2015

Marshall-Goebel, K., Laurie, S. S., Alferova, I. V., Arbeille, P., Auñón-Chancellor, S. M., Ebert, D. J., et al. (2019). Assessment of jugular venous blood flow stasis and thrombosis during spaceflight. *JAMA Netw. Open.* 2:e1915011. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.15011

Marshall-Goebel, K., Mulder, E., Donoviel, D., Strangman, G., Suarez, J. I., Venkatasubba Rao, C., et al. (2017). An international collaboration studying the physiological and anatomical cerebral effects of carbon dioxide during head-down tilt bed rest: the SPACECOT study. *J. Appl. Physiol. (1985)* 122, 1398–1405. doi: 10.1152/japplphysiol.00885.2016

Meck, J. V., Reyes, C. J., Perez, S. A., Goldberger, A. L., and Ziegler, M. G. (2001). Marked exacerbation of orthostatic intolerance after long- vs. short-duration spaceflight in veteran astronauts. *Psychosom. Med.* 63, 865–873. doi: 10.1097/00006842-200111000-00003

Morey-Holton, E., and Globus, R. K. (2002). Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J. Appl. Physiol. (1985)* 92, 1367–1377. doi: 10.1152/japplphysiol.00969.2001

Morey-Holton, E., Globus, R. K., Kaplansky, A., and Durnova, G. (2005). The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data. *Adv. Space Biol. Med.* 10, 7–40. doi: 10.1016/s1569-2574(05)10002-1

Morita, H., Abe, C., and Tanaka, K. (2016). Long-term exposure to microgravity impairs vestibulo-cardiovascular reflex. *Sci. Rep.* 6:33405. doi: 10.1038/srep33405

Nasr, N., Czosnyka, M., Pavy-Le Traon, A., Custaud, M.-A., Liu, X., Varsos, G. V., et al. (2014). Baroreflex and cerebral autoregulation are inversely correlated. *Circ. J.* 78, 2460–2467. doi: 10.1253/circj.cj-14-0445

Navasiolava, N. M., Custaud, M. A., Tomilovskaya, E. S., Larina, I. M., Mano, T., Gauquelin-Koch, G., et al. (2011a). Long-term dry immersion: review and prospects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 111, 1235–1260. doi: 10.1007/s00421-010-1750-x

Navasiolava, N. M., Pajot, A., Gallois, Y., Pastushkova, L., Kulchitsky, V. A., Gauquelin-Koch, G., et al. (2011b). NT-ProBNP levels, water and sodium homeostasis in healthy men: effects of 7 days of dry immersion. *Eur. J. Appl. Physiol.* 111, 2229–2237. doi: 10.1007/s00421-011-1858-7

Nguyen, T. S., Winn, H. R., and Janigro, D. (2000). ATP-sensitive potassium channels may participate in the coupling of neuronal activity and cerebrovascular tone. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, 878–885. doi: 10.1152/ajpheart.2000.278.3.H878

Novak, V., Novak, P., Spies, J. M., and Low, P. A. (1998). Autoregulation of cerebral blood flow in orthostatic hypotension. *Stroke* 29, 104–111. doi: 10.1161/01.str.29.1.104

Ogawa, Y., Iwasaki, K., Aoki, K., Saitoh, T., Kato, J., and Ogawa, S. (2009). Dynamic cerebral autoregulation after mild dehydration to simulate microgravity effects. *Aviat. Space Environ. Med.* 80, 443–447. doi: 10.3357/asem.2449.2009

Ogawa, Y., Iwasaki, K., Aoki, K., Shibata, S., Kato, J., and Ogawa, S. (2007). Central hypervolemia with hemodilution impairs dynamic cerebral autoregulation. *Anesth. Analg.* 105, 1389–1396. doi: 10.1213/01.ane.0000281910.95740.e4

Ogoh, S., Hirasawa, A., de Abreu, S., Denise, P., and Normand, H. (2017). Internal carotid, external carotid and vertebral artery blood flow responses to 3 days of head-out dry immersion. *Exp. Physiol.* 102, 1278–1287. doi: 10.1113/EP086507

Paulson, O. B., Strandgaard, S., and Edvinsson, L. (1990). Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 2, 161–192.

Pavy-Le Traon, A., Costes-Salon, M. C., Vasseur-Clausen, P., Bareille, M.-P., Maillet, A., and Parant, M. (2002). Changes in kinetics of cerebral autoregulation with head-down bed rest. *Clin. Physiol. Func. Imaging* 22, 108–114. doi: 10.1046/j.1365-2281.2002.00403.x

Pavy-Le Traon, A., Heer, M., Narici, M. V., Rittweger, J., and Vernikos, J. (2007). From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986-2006). *Eur. J. Appl. Physiol.* 101, 143–194. doi: 10.1007/s00421-007-0474-z

Pavy-Le Traon, A., Vasseur, P., Arbeille, P., Güell, A., Bes, A., and Gharib, C. (1995). Effects of 28-day head-down tilt with and without countermeasures on lower body negative pressure responses. *Aviat. Space Environ. Med.* 66, 982–991.

Perhonen, M. A., Franco, F., Lane, L. D., Buckey, J. C., Blomqvist, C. G., Zerwekh, J. E., et al. (2001). Cardiac atrophy after bed rest and spaceflight. *J. Appl. Physiol. (1985)* 91, 645–653. doi: 10.1152/jappl.2001.91.2.645

Petersen, L. G., and Ogoh, S. (2019). Gravity, intracranial pressure, and cerebral autoregulation. *Physiol. Rep.* 7:e14039. doi: 10.14814/phy2.14039

Petersen, L. G., Petersen, J. C., Andresen, M., Secher, N. H., and Juhler, M. (2016). Postural influence on intracranial and cerebral perfusion pressure in ambulatory neurosurgical patients. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 310, 100–104. doi: 10.1152/ajpregu.00302.2015

Peterson, E. C., Wang, Z., and Britz, G. (2011). Regulation of cerebral blood flow. *Int. J. Vasc. Med.* 2011:823525. doi: 10.1155/2011/823525

Platts, S. H., Bairey Merz, C. N., Barr, Y., Fu, Q., Gulati, M., Hughson, R., et al. (2014). Effects of sex and gender on adaptation to space: cardiovascular alterations. *J. Womens Health (Larchmt)* 23, 950–955. doi: 10.1089/jwh.2014.4912

Priesman, S., Marks, R., Nahtomi-Shick, O., and Sidi, A. (2005). Preservation of static and dynamic cerebral autoregulation after mild hypothermic cardiopulmonary bypass. *Br. J. Anaesth.* 95, 207–211. doi: 10.1093/bja/aei147

Rangel-Castillo, L., Gopinath, S., and Robertson, C. S. (2008). Management of intracranial hypertension. *Neurol. Clin.* 26, 521–541. doi: 10.1016/j.ncl.2008.02.003

Rivera-Lara, L., Zorrilla-Vaca, A., Geocadin, R. G., Healy, R. J., Ziai, W., and Mirski, M. A. (2017). Cerebral autoregulation-oriented therapy at the bedside: a comprehensive review. *Anesthesiology* 126, 1187–1199. doi: 10.1097/ALN.0000000000001625

Rosner, M. J., and Becker, D. P. (1984). Origin and evolution of plateau waves. Experimental observations and a theoretical model. *J. Neurosurg.* 60, 312–324. doi: 10.3171/jns.1984.60.2.0312

Roth, W., Morgello, S., Goldman, J., Mohr, J. P., Elkind, M. S., Marshall, R. S., et al. (2017). Histopathological differences between the anterior and posterior brain arteries as a function of aging. *Stroke* 48, 638–644. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.015630

Rukavishnikov, I. V., Tomilovskaya, E. S., Matsnev, E. I., Denise, P., and Avan, P. (2013). Otoacoustic emission as a mediate method of intracranial pressure assesement under conditions of simulation of microgravity physiological effects. *Aviakosm Ekolog. Med.* 47:130.

Satake, H., Konishi, T., Kawashima, T., Matsunami, K., Uno, T., and Imai, S., et al. (1994). Intracranial blood flow measured with single photon emission computer tomography (SPECT) during transient -6 degrees head-down tilt. *Aviat. Space. Environ. Med.* 65, 117–122.

Savin, E., Bailliart, O., Checoury, A., Bonnin, P., Grossin, C., and Martineaud, J. P. (1995). Influence of posture on middle cerebral artery mean flow velocity in humans. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 71, 161–165. doi: 10.1007/bf00854974

Shi, S. J., South, D. A., and Meck, J. V. (2004). Fludrocortisone does not prevent orthostatic hypotension in astronauts after spaceflight. *Aviat. Space Environ. Med.* 75, 235–239.

Sigaudo-Roussel, D., Custaud, M.-A., Maillet, A., Guell, A., Kaspranski, R., Hughson, R. L., et al. (2002). Heart rate variability after prolonged spaceflights. *Eur. J. Appl. Physiol.* 86, 258–265. doi: 10.1007/s00421-001-0551-7

Silverman, A., and Petersen, N. H. (2020). *Physiology, Cerebral Autoregulation*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing.

Sofronova, S. I., Tarasova, O. S., Gaynullina, D., Borzykh, A. A., Behnke, B. J., Stabley, J. N., et al. (2015). Spaceflight on the Bion-M1 biosatellite alters cerebral artery vasomotor and mechanical properties in mice. *J. Appl. Physiol. (1985)* 118, 830–838. doi: 10.1152/japplphysiol.00976.2014

Sorrentino, E., Budohoski, K. P., Kasprowicz, M., Smielewski, P., Matta, B., Pickard, J. D., et al. (2011). Critical thresholds for transcranial Doppler indices of cerebral autoregulation in traumatic brain injury. *Neurocrit. Care* 14, 188–193. doi: 10.1007/s12028-010-9492-5

Steiner, L. A., Coles, J. P., Czosnyka, M., Minhas, P. S., Fryer, T. D., Aigbirhio, F. I., et al. (2003). Cerebrovascular pressure reactivity is related to global cerebral oxygen metabolism after head injury. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74, 765–770. doi: 10.1136/jnnp.74.6.765

Strandgaard, S., and Paulson, O. B. (1984). Cerebral autoregulation. *Stroke* 15, 413–416. doi: 10.1161/01.str.15.3.413

Sun, X. Q., Pavy-Le Traon, A., and Gharib, C. (2002). Change of cerebral blood flow velocity during 4 d head-down tilt bed rest. *Space Med. Med. Eng. (Beijing)* 15, 163–166.

Sun, X. Q., Yao, Y. J., Wu, X. Y., Hao, W. Y., Jiang, S. Z., and Qiao, Z. L. (2001). Changes of cerebral blood flow during 21 d head-down tilt bed rest and the effect of lower body negative pressure during the last week. *Space Med. Med. Eng. (Beijing)* 14, 92–96.

Sun, X. Q., Yao, Y. J., Yang, C. B., Jiang, S. Z., Jiang, C. L., and Liang, W. B. (2005). Effect of lower-body negative pressure on cerebral blood flow velocity during 21 days head-down tilt bed rest. *Med. Sci. Monit.* 11, CR1–CR5.

Tanaka, K., Abe, C., Awazu, C., and Morita, H. (2009). Vestibular system plays a significant role in arterial pressure control during head-up tilt in young subjects. *Auton. Neurosci.* 148, 90–96. doi: 10.1016/j.autneu.2009.03.007

Tanaka, K., Abe, C., Sakaida, Y., Aoki, M., Iwata, C., and Morita, H. (2012). Subsensory galvanic vestibular stimulation augments arterial pressure control upon head-up tilt in human subjects. *Auton. Neurosci.* 166, 66–71. doi: 10.1016/j.autneu.2011.10.003

Tanaka, K., Ito, Y., Ikeda, M., and Katafuchi, T. (2014). RR interval variability during galvanic vestibular stimulation correlates with arterial pressure upon head-up tilt. *Auton. Neurosci.* 18, 100–106. doi: 10.1016/j.autneu.2014.04.001

Tanaka, K., Nishimura, N., and Kawai, Y. (2017). Adaptation to microgravity, deconditioning, and countermeasures. *J. Physiol. Sci.* 67, 271–281. doi: 10.1007/s12576-016-0514-8

Taylor, C. R., Hanna, M., Behnke, B. J., Stabley, J. N., McCullough, D. J., Davis, R. T. III, et al. (2013). Spaceflight-induced alterations in cerebral artery vasoconstrictor, mechanical, and structural properties: implications for elevated cerebral perfusion and intracranial pressure. *FASEB J.* 27, 2282–2292. doi: 10.1096/fj.12-222687

Tiecks, F. P., Lam, A. M., Aaslid, R., and Newell, D. W. (1995). Comparison of static and dynamic cerebral autoregulation measurements. *Stroke* 26, 1014–1019. doi: 10.1161/01.str.26.6.1014

Tomilovskaya, E., Shigueva, T., Sayenko, D., Rukavishnikov, I., and Kozlovskaya, I. (2019). Dry immersion as a ground-based model of microgravity physiological effects. *Front. Physiol.* 10:284. doi: 10.3389/fphys.2019.00284

Tzeng, Y. C., Ainslie, P. N., Cooke, W. H., Peebles, K. C., Willie, C. K., MacRae, B. A., et al. (2012). Assessment of cerebral autoregulation: the quandary of quantification. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 303, 658–671. doi: 10.1152/ajpheart.00328.2012

van Beek, A. H., Claassen, J. A., Rikkert, M. G., and Jansen, R. W. (2008). Cerebral autoregulation: an overview of current concepts and methodology with special focus on the elderly. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1071–1085. doi: 10.1038/jcbfm.2008.13

Wang, X., Krishnamurthy, S., Evans, J., Bhakta, D., Justice, L., Bruce, E., et al. (2005). Transfer function analysis of gender-related differences in cerebral autoregulation. *Biomed. Sci. Instrum.* 41, 48–53.

Waters, W. W., Ziegler, M. G., and Meck, J. V. (2002). Postspaceflight orthostatic hypotension occurs mostly in women and is predicted by low vascular resistance. *J. Appl. Physiol. (1985)* 92, 586–594. doi: 10.1152/japplphysiol.00544.2001

Wilkerson, M. K., Muller-Derp, J., Colleran, P. N., and Delp, M. D. (1999). Effects of hindlimb unloading on rat cerebral, splenic, and mesenteric resistance artery morphology. *J. Appl. Physiol. (1985)* 87, 2115–2121. doi: 10.1152/jappl.1999.87.6.2115

Yang, C., Gao, Y., Greaves, D. K., Villar, R., Beltrame, T., Fraser, K. S., et al. (2015). Prior head-down tilt does not impair the cerebrovascular response to head-up tilt. *J. Appl. Physiol. (1985)* 118, 1356–1363. doi: 10.1152/japplphysiol.00871.2014

Yang, C. B., Wang, Y. C., Gao, Y., Geng, J., Wu, Y. H., Zhang, Y., et al. (2011). Artificial gravity with ergometric exercise preserves the cardiac, but not cerebrovascular, functions during 4 days of head-down bed rest. *Cytokine* 56, 648–655. doi: 10.1016/j.cyto.2011.09.004

Yao, Y. J., Wu, X. Y., Sun, X. Q., Wang, Z. B., Jiang, C. L., and Jiang, S. Z. (2001). Changes of human cerebral bottom arterial hemodynamics during 21 d head-down tilt (-6 degrees) bed-rest. *Space Med. Med. Eng. (Beijing)* 14, 11–16.

Yasumasa, A., Inoue, S., Tatebayashi, K., Shiraishi, Y., and Kawai, Y. (2002). Effects of head-down tilt on cerebral blood flow in humans and rabbits. *J. Gravit. Physiol.* 9, 89–90.

Yates, B. J., and Kerman, I. A. (1998). Post-spaceflight orthostatic intolerance: possible relationship to microgravity-induced plasticity in the vestibular system. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 28, 73–82. doi: 10.1016/s0165-0173(98)00028-9

Zhang, L. F., and Hargens, A. R. (2018). Spaceflight-induced intracranial hypertension and visual impairment: pathophysiology and countermeasures. *Physiol. Rev.* 98, 59–87. doi: 10.1152/physrev.00017.2016

Zhang, R., Behbehani, K., and Levine, B. D. (2009). Dynamic pressure–flow relationship of the cerebral circulation during acute increase in arterial pressure. *J. Physiol.* 587, 2567–2577. doi: 10.1113/jphysiol.2008.168302

Zhang, R., Zuckerman, J. H., Giller, C. A., and Levine, B. D. (1998). Transfer function analysis of dynamic cerebral autoregulation in humans. *Am. J. Physiol.* 274, 233–241.

Zhang, R., Zuckerman, J. H., Pawelczyk, J. A., and Levine, B. D. (1997). Effects of head-down-tilt bed rest on cerebral hemodynamics during orthostatic stress. *J. Appl. Physiol. (1985)* 83, 2139–2145. doi: 10.1152/jappl.1997.83.6.2139

Zhou, D., Ding, J.-Y., Ya, J.-Y., Pan, L.-Q., Yan, F., Yang, Q., et al. (2018). Understanding jugular venous outflow disturbance. *CNS Neurosci. Ther.* 24, 473–482. doi: 10.1111/cns.12859

Zuj, K. A., Arbeille, P., Shoemaker, J. K., Blaber, A. P., Greaves, D. K., Xu, D., et al. (2012). Impaired cerebrovascular autoregulation and reduced co(2)reactivity after long duration spaceflight. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, 2592–2598. doi: 10.1152/ajpheart.00029.2012

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Kermorgant, Nasr, Czosnyka, Arvanitis, Hélissen, Senard and Pavy-Le Traon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe II

Effects of Venoconstrictive Thigh Cuffs on Dry Immersion-Induced Ophthalmological Changes. (Article) Kermorgant M, Sadegh A, Geeraerts T, Varenne F, Liberto J, Roubelat F-P, Bataille N, Bareille M-P, Beck A, Godard B, Golemis A, Nasr N, Arvanitis DN, Hélissen O, Senard J-M, Pavy-Le Traon A and Soler V (2021) –Front. Physiol. 12:692361. doi: 10.3389/fphys.2021.692361

Résumé :

Les changements neuro-ophtalmologiques nommés syndrome neuro-oculaire associé aux vols spatiaux (SANS) signalés après des vols, sont des problèmes médicaux importants. L'immersion sèche (« dry immersion », DI), analogue à la microgravité, induit rapidement une centralisation des fluides corporels, une immobilisation et une hypokinésie similaires à celles observées lors des vols spatiaux. Les principaux objectifs de l'étude étaient : 1) d'évaluer l'impact de 5 jours de DI sur les modifications neuro-ophtalmiques ; 2) de déterminer les effets des brassards de cuisse veino-constricteurs (VTC), utilisés comme contre-mesure pour limiter le déplacement des fluides vers la tête, sur les changements neuro-ophtalmologiques induits par l'immersion. Dix-huit sujets masculins sains ont subi 5 jours de DI et ont été répartis au hasard en deux groupes de 9, avec ou sans contre-mesures VTC. L'épaisseur de la rétine et du nerf optique a été évaluée par tomographie de la cohérence optique à domaine spectral (OCT). Le diamètre de la gaine du nerf optique (ONSD) a été mesuré par ultrasonographie oculaire et utilisé pour évaluer les changements indirects de la pression intracrânienne (ICP). La pression intraoculaire (IOP) a été évaluée par tonométrie d'aplanation. Une augmentation de l'épaisseur de la couche de fibres nerveuses de la rétine (RNFL) dans le quadrant temporal a été observée après la DI. L'ONSD a augmenté de manière significative pendant la DI et est resté plus élevé pendant la phase de récupération. L'IOP n'a pas changé de manière significative pendant et après la DI. L'utilisation de VTC a eu tendance à limiter l'élargissement de l'ONSD mais pas l'augmentation de l'épaisseur du RNFL induite par la DI. Ces résultats suggèrent que 5 jours de DI induisent des changements ophtalmologiques significatifs. Les VTC ont atténué l'élargissement de l'ONSD induit par la DI.

Contribution **:** Dans l'écriture et la révision du manuscrit.

frontiers in Physiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 14 July 2021
doi: 10.3389/fphys.2021.692361

Effects of Venoconstrictive Thigh Cuffs on Dry Immersion-Induced Ophthalmological Changes

Marc Kermorgant[1†], Ayria Sadegh[2†], Thomas Geeraerts[3], Fanny Varenne[2], Jérémy Liberto[2], François-Philippe Roubelat[2], Noémie Bataille[2], Marie-Pierre Bareille[4], Arnaud Beck[4], Brigitte Godard[4], Adrianos Golemis[4], Nathalie Nasr[1,5], Dina N. Arvanitis[1], Ophélie Hélissen[1], Jean-Michel Senard[1,6], Anne Pavy-Le Traon[1,5] and Vincent Soler[2]*

[1] INSERM DR Midi-Pyrénées Limousin, Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases (I2MC) UMR1297, University Hospital of Toulouse, Toulouse, France, [2] Department of Ophthalmology, University Hospital of Toulouse, Toulouse, France, [3] Department of Anaesthesiology and Critical Care, University Hospital of Toulouse, Toulouse, France, [4] Institute for Space Medicine and Physiology (MEDES), Toulouse, France, [5] Department of Neurology, University Hospital of Toulouse, Toulouse, France, [6] Department of Clinical Pharmacology, University Hospital of Toulouse, Toulouse, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Jörn Rittweger, German Aerospace Center, Germany

Reviewed by:
Ronan Padraic Murphy, Dublin City University, Ireland
Satoshi Iwase, Aichi Medical University, Japan

***Correspondence:**
Marc Kermorgant
marc.kermorgant@gmail.com

† These authors have contributed equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to Environmental, Aviation and Space Physiology, a section of the journal Frontiers in Physiology

Received: *08 April 2021*
Accepted: *10 June 2021*
Published: *14 July 2021*

Citation:
Kermorgant M, Sadegh A, Geeraerts T, Varenne F, Liberto J, Roubelat F-P, Bataille N, Bareille M-P, Beck A, Godard B, Golemis A, Nasr N, Arvanitis DN, Hélissen O, Senard J-M, Pavy-Le Traon A and Soler V (2021) Effects of Venoconstrictive Thigh Cuffs on Dry Immersion-Induced Ophthalmological Changes. Front. Physiol. 12:692361. doi: 10.3389/fphys.2021.692361

Neuro-ophthalmological changes named spaceflight associated neuro-ocular syndrome (SANS) reported after spaceflights are important medical issues. Dry immersion (DI), an analog to microgravity, rapidly induces a centralization of body fluids, immobilization, and hypokinesia similar to that observed during spaceflight. The main objectives of the present study were 2-fold: (1) to assess the neuro-ophthalmological impact during 5 days of DI and (2) to determine the effects of venoconstrictive thigh cuffs (VTC), used as a countermeasure to limit headward fluid shift, on DI-induced ophthalmological adaptations. Eighteen healthy male subjects underwent 5 days of DI with or without VTC countermeasures. The subjects were randomly assigned into two groups of 9: a control and cuffs group. Retinal and optic nerve thickness were assessed with spectral-domain optical coherence tomography (OCT). Optic nerve sheath diameter (ONSD) was measured by ocular ultrasonography and used to assess indirect changes in intracranial pressure (ICP). Intraocular pressure (IOP) was assessed by applanation tonometry. A higher thickness of the retinal nerve fiber layer (RNFL) in the temporal quadrant was observed after DI. ONSD increased significantly during DI and remained higher during the recovery phase. IOP did not significantly change during and after DI. VTC tended to limit the ONSD enlargement but not the higher thickness of an RNFL induced by DI. These findings suggest that 5 days of DI induced significant ophthalmological changes. VTC were found to dampen the ONSD enlargement induced by DI.

Keywords: optical coherence tomography, optic nerve sheath diameter, intraocular pressure, intracranial pressure, dry immersion, microgravity, countermeasures, thigh cuff

INTRODUCTION

During the last decade, some studies reported ophthalmic abnormalities in astronauts who spent several months onboard the International Space Station (Lee et al., 2016). Today, these neuro-ophthalmological changes have been more clearly defined as spaceflight associated neuro-ocular syndrome (SANS). After long-duration flights, some astronauts exhibited persistent

ophthalmologic disorders characterized by hyperopic shift. High inter-individual variability in ophthalmological findings was observed, such as an enlargement in optic nerve sheath diameter (ONSD), papilledema, globe flattening, increase in circumpapillary retinal nerve fiber layer thickness (RNFLT), and optic disc edema (Mader et al., 2011; Kramer et al., 2012; Laurie et al., 2020; Lee et al., 2020; Macias et al., 2020). Recent studies using optical coherence tomography (OCT) have shown some level of optic disc edema in nearly all astronauts when comparing pre-flight and in-flight OCT, suggesting that subclinical SANS involvement may occur in the majority of astronauts (Lee et al., 2020). Some of these changes are similar to those observed in idiopathic intracranial hypertension (Nelson et al., 2014). However, the pathophysiology of SANS remains unresolved. One previous hypothesis suggested localized events occurring at the level of the intra-orbital optic nerve with the possible implication of elevated intracranial pressure (ICP) (Roberts et al., 2017; Zhang and Hargens, 2018; Mader et al., 2019).

Analogs of microgravity such as head-down bed rest (HDBR) and dry immersion (DI) are valuable models for determining the effects of spaceflight on the health of the astronauts; however, in contrast to the other ground-based models of microgravity, DI is renowned for its effectiveness by eliciting rapid physiological changes (Tomilovskaya et al., 2019). In a short period, DI mimics the absence of any supporting structure for the body, immobilization, hypokinesia, and centralization of body fluids by transmural hydrostatic pressure, observed during human spaceflight (Navasiolava et al., 2011). DI impacts a wide range of physiological mechanisms in particular a potential impact on ICP (Arbeille et al., 2017; Kermorgant et al., 2017).

Several preventive countermeasures (nutritional supplementation, muscular exercise, thigh cuffs, etc.) have been tried to prevent post-flight orthostatic intolerance, yet most of these have shown only partial efficacy. In the 1960s, several studies focused on specific venous occlusion bracelets named venoconstrictive thigh cuffs (VTC) with a beneficial decrease of facial edema and congestion (Lindgren et al., 1998). VTC are strips worn around thighs for several hours per day. These countermeasures are commonly used by cosmonauts to mitigate the symptoms related to the headward fluid shift. VTC have also been applied during ground-based models of microgravity whereby they were shown to dampen hypovolemia after microgravity exposure but failed to prevent orthostatic intolerance (Arbeille et al., 1999; Custaud et al., 2000; Millet et al., 2000; Pavy-Le Traon et al., 2001).

This study aimed to evaluate the neuro-ophthalmological changes induced by a 5 day DI and to determine the potential beneficial effects of VTC on these DI-induced ophthalmological adaptations. We postulated that DI-elicited cephalad fluid shift will result in ICP increase as reflected by ophthalmological changes and that VTC countermeasures could dampen the effects of DI on ICP by mitigating the cranial fluid shift.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The clinical trial (ID-RCB 2018-A01470-55; Clinical Trial Identifier: NCT03915457) was conducted in accordance with the principles laid down by the Declaration of Helsinki after approval by both the CPP Est III Ethics Committee (October 2, 2018) and the French Health Authority, ANSM (August 13, 2018). Twenty healthy men participated in the study and gave their written consent. Two subjects withdrew before the 5 days of ambulatory baseline data collection (BDC) for reasons unrelated to the protocol. At BDC-2, 18 subjects were included in the study and randomly allocated into two groups of 9: a control (34 ± 7 years; 176 ± 6 cm; 74 ± 8 kg) and cuffs (34 ± 4 years; 180 ± 4 cm; 74 ± 9 kg) group. The inclusion and non-inclusion criteria are presented in **Table 1**.

General Protocol

The study was carried out at the Institut de Médecine et de Physiologie Spatiales (MEDES) in Toulouse, France, between November 2018 and March 2019. The detailed protocol was described by Robin et al. (2020). The protocol included 4 days of ambulatory BDC before DI (BDC-4 to BDC-1), 5 days of DI (DI 1 to DI 5), and 2 days of ambulatory recovery (R 0 to R+1). Subjects included in the cuffs group wore VTC throughout DI (from 10:00 a.m. to 06:00 p.m. at DI 1 and from 08:00 a.m. to 06:00 p.m. at DI 2–DI 5). At DI 1 (10:00 a.m.), VTC were placed on subjects immediately prior to immersion. VTC was adjusted for each subject to obtain an occlusion pressure of about 30 mmHg (**Figure 1**). Briefly, the DI model consists of placing the body of the subject in thermoneutral water (32–34.5°C) covered with an elastic waterproof fabric; thus, the subject is in a semi-recumbent position and freely suspended while remaining dry (**Figure 2**). The study was carried out in a quiet room and where the air temperature was ∼24°C. All subjects remained under continual medical observation. The subjects woke up at 07:00 a.m., and the light was switched off at 11:00 p.m. The subjects were allowed to get out of the DI container for daily hygiene procedures, weighing, and other specific measurements. During this period, subjects were maintained in a six degree HDBR position. Overall, out-of-bath time for the 120 h of immersion was 9.7 ± 1.3 h. Each subject had a daily medical follow-up including body weight, blood pressure (BP), heart rate (HR), and tympanic body temperature by permanent MEDES staff. A flow chart of the study is presented in **Figure 3**.

Hemodynamics Parameters

Continuous finger BP (Nexfin, BMeye, US) and standard ECG (Biopac, ECG 100C, US) were non-invasively monitored and recorded.

Optical Coherence Tomography

Optical coherence tomography was performed at rest during BDC-2 and R+1 by trained ophthalmologists. OCT was performed with iVue spectral-domain OCT (Optovue iVue®, Fremont, CA). The quality for each measurement was determined by a quality index provided by the OCT device. Measurements not fulfilling this condition were automatically eliminated and repeated. The right and left eyes were assessed. The final measure corresponds to the average of the two measures. All OCT measurements were validated by an expert (Vincent Soler) blinded to the condition. The following parameters were measured:

TABLE 1 | Inclusion and non-inclusion criteria.

Inclusion criteria	Non-inclusion criteria
• Healthy male participant, age between 20 and 45 years, height between 158 and 185 cm, body mass index (BMI) between 20 and 26 kg/m².	• Past record of orthostatic intolerance, arterial hypertension, and cardiac rhythm disorders.
• No personal nor family record of a chronic or acute disease or psychological disturbances.	• Chronic back pains, vertebral fracture, scoliosis or herniated disc, history of knee problems, or joint surgery/broken leg.
• Fitness level assessment:	• History of hiatus hernia or gastro-esophageal reflux, thyroid dysfunction, renal stones, diabetes, glaucoma, and migraines.
✓ if age < 35 years: 35 ml/min/kg < VO_2 max < 60 ml/min/kg.	• Past records of thrombophlebitis, family history of thrombosis, or positive response in the thrombosis screening procedure.
✓ if age > 35 years: 30 ml/min/kg < VO_2 max < 60 ml/min/kg.	• Abnormal result for lower limbs in Doppler ultrasound.
• Active and free from any orthopedic, musculoskeletal, and cardiovascular disorders.	• Bone mineral density: T-score ≤ −1.5, osteosynthesis material, presence of metallic implants.
• No history of regular smoking, no alcohol, no drug dependence, and no medical treatment (2 months before the beginning of the study).	• Poor tolerance to blood sampling and having donated blood (more than 8 ml/kg) in a period of 8 weeks or less before the start of the experiment.

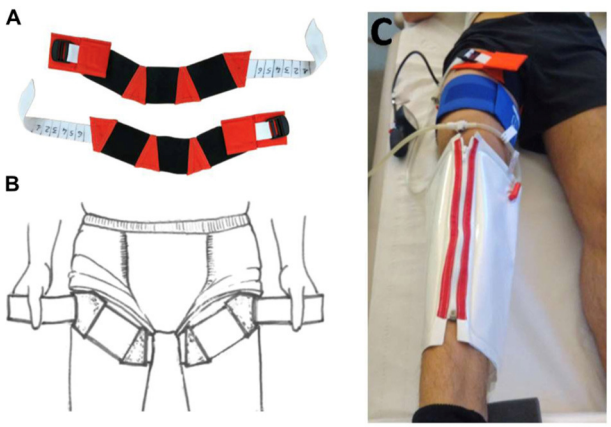


FIGURE 1 | Venoconstrictive thigh cuffs (VTC) countermeasure (photo MEDES). **(A)** Venoconstrictive thigh cuffs are elastic strips, adjustable to the size of the thigh with clamping segment (white segment). **(B)** VTC are worn on the upper part of the thigh. **(C)** Individual adjustment of VTC with plethysmography to apply a 30 mmHg pressure on the upper thigh and performed at BDC-2.

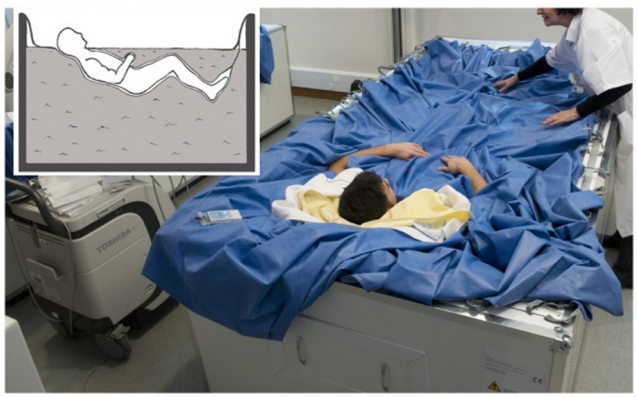


FIGURE 2 | The subject was immersed slowly in a supine position covered with an elastic waterproof fabric in MEDES dry immersion (DI) facility.

- ✓ The retinal map corresponded to the average macular thickness (**Figure 4A**)
- ✓ Ganglion cell complex (GCC) thickness was divided into three measurements: average, superior- and inferior-retina (**Figure 4B**)
- ✓ Optic nerve head (ONH) thickness was divided into four quadrants: temporal, nasal, superior, and inferior (**Figure 4C**)

Retinal map and GCC images were acquired on a 6 × 6 mm mapping square centered on the fovea, with 5 to 10 µm resolution horizontal B-scans. ONH and RNFLT measures were acquired with horizontal B-scans centered on the optic disc. Segmentation of the internal limiting membrane and the Bruch membrane opening were verified manually.

Indirect Assessment of ICP by Ocular Ultrasonography

Ocular examination was performed at rest during BDC-2, DI 1, DI 3, DI 5, and R+1 by investigators trained for ocular ultrasonography. Ultrasound was performed with a linear high-frequency probe (Orcheo^{Lite}, Sonoscanner, Paris, France). First, a thick layer of gel was applied over the closed upper eyelid. The probe was placed on the eyelid and adjusted to obtain an appropriate display of the optic nerve into the globe. The assessment was realized in a two-dimensional mode and ONSD was measured 3 mm behind the ocular globe (**Figure 5**). The right and left optic nerves were assessed, and one measure was performed for each eye in the sagittal plane. The final measure corresponds to the average of these two measures. All ONSD measurements were validated by an expert (Thomas Geeraerts) blinded to the condition.

Intraocular Pressure (IOP) by Applanation Tonometry

A topical local anesthetic solution (Tetracaïne, 1% per ophthalmic drops) was instilled in each eye just prior to evaluation. The IOP measurements were performed in both eyes with a Tono-Pen® tonometer during BDC-2, DI 1, DI 3, DI 5, and R+1. The final measure corresponds to the average of these two measures.

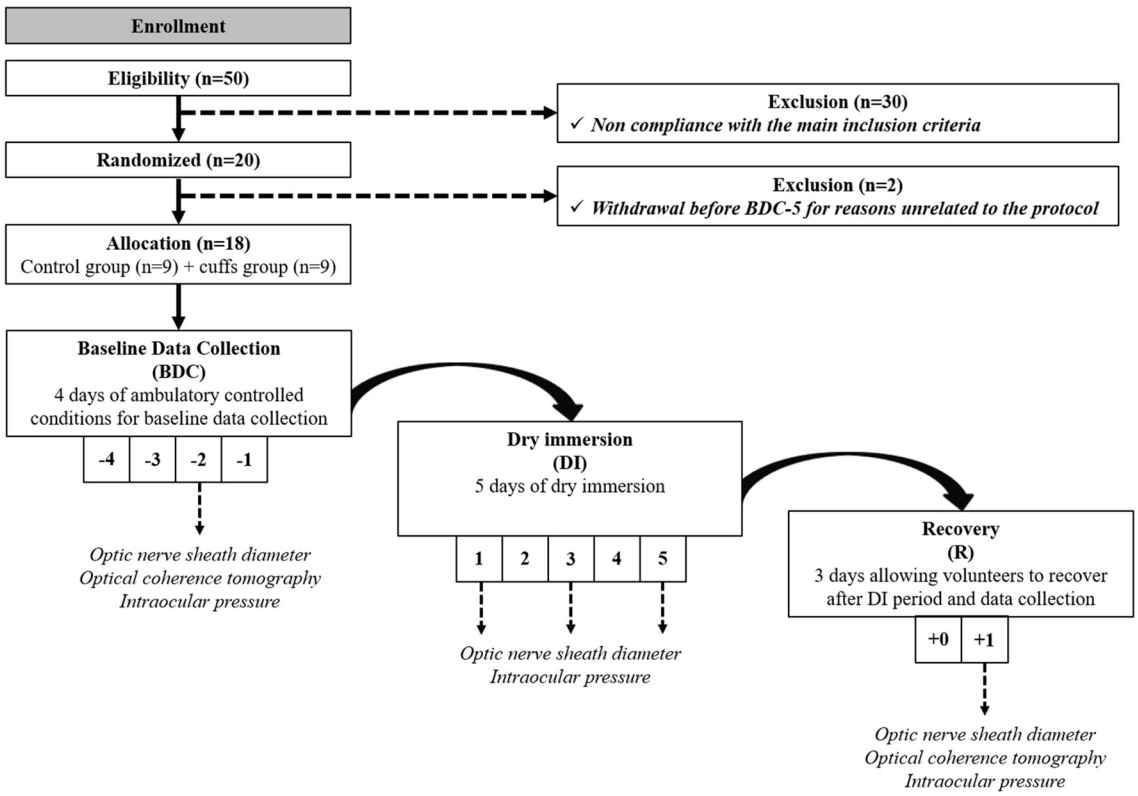


FIGURE 3 | Flow chart of the study and timeline of ophthalmological data collection.

Statistical Evaluation

The primary endpoint was the ONSD increase under DI. Based on the previous study (Kermorgant et al., 2017), we suggested that VTC will limit the ONSD increase. A limitation of ONSD increase by 50% seemed clinically relevant. With a statistical power of (1–β) 90% and α risk of 0.05 in a bilateral hypothesis, we hypothesized that for a 50% change in ONSD, we needed 20 participants (10 in a control group and 10 in the cuffs group). Hemodynamics parameters, OCT, ONSD, and IOP data were expressed as mean ± SD. The normality of the distributions was assessed with the Shapiro-Wilk normality test. Two-way repeated-measures ANOVA was used with Dunnett's and Bonferroni's multiple comparisons test. The day of measurements and countermeasure condition were included, respectively, within-subjects and between-subjects factors. Differences were considered statistically significant when p-value was adjusted to ≤ 0.05. All statistical analyses were performed with Prism GraphPad 9.0.0.

RESULTS

Hemodynamics Parameters

Hemodynamics parameters are summarized in **Table 2**. Systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), and heart rate (HR) were not significantly modified throughout the experiment both in the control and cuffs groups.

Optical Coherence Tomography

In the control group, one subject was removed from ONH analysis due to technical glitches. In the cuffs group, one subject was removed from OCT data analysis, and 2 other subjects were also removed from ONH analysis due to low-quality index. **Table 3** summarizes the ocular characteristics of the volunteers.

Average Macular Thickness by Retinal Map

Average macular thickness was not significantly modified after DI in both groups (**Table 3**).

GCC Thickness

Average, superior, and inferior GCC thickness were preserved after DI in both groups (**Table 3**).

Retinal Nerve Fiber Layer Thickness

We observed the thickest RNFLT in the temporal quadrant both in the control and cuffs groups after DI with $P = 0.050$ and $P = 0.002$, respectively; however, the average RNFLT was preserved. Neither did we notice any significant changes in RNFLT in the superior, nasal, or inferior quadrants (**Table 3**).

Optic Nerve Sheath Diameter

Globally, VTC tended to dampen the ONSD enlargement induced by DI ($P = 0.066$). In the control group, ONSD increased significantly by 11% during DI 1 (5.4 ± 0.3 mm; $P < 0.001$), 15% during DI 3 (5.6 ± 0.3 mm; $P < 0.001$), 20% during DI 5 (5.9 ±

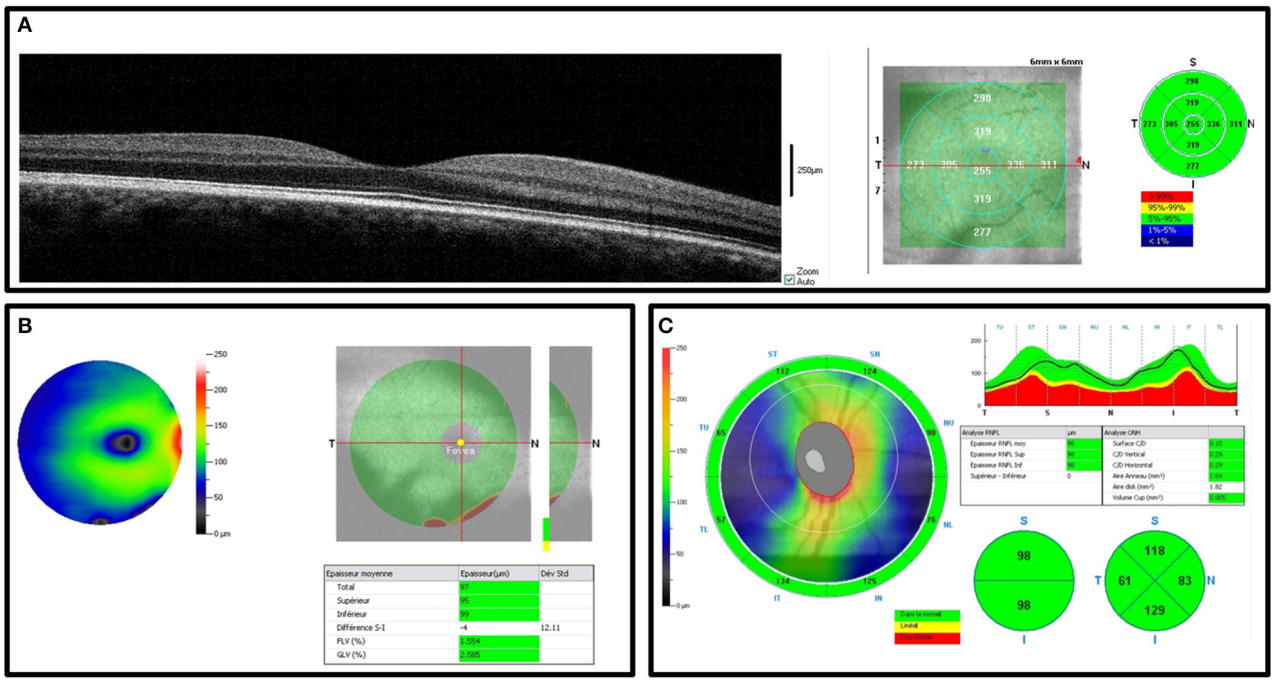


FIGURE 4 | Spectral-domain OCT showing the right eye in one subject before DI. **(A)** Macular thickness. **(B)** Ganglion cell complex (GCC) and significance maps. **(C)** Optic nerve head (ONH) and retinal nerve fiber thickness.

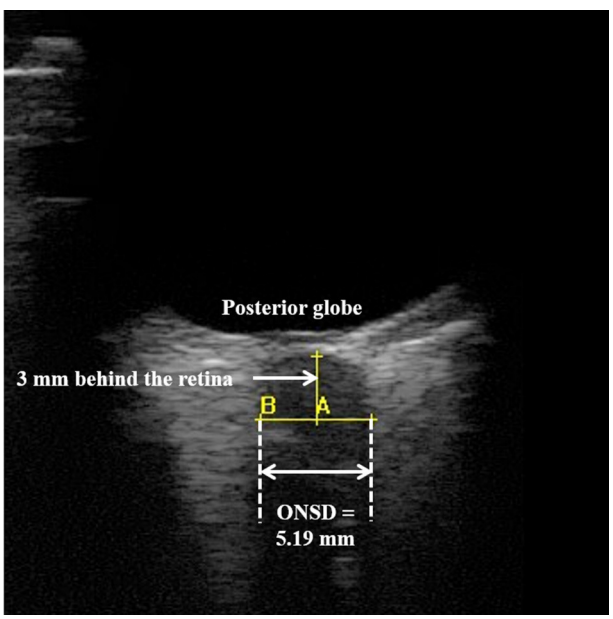


FIGURE 5 | Two-dimensional ocular ultrasonography. Optic nerve sheath diameter (ONSD) was measured 3 mm behind the posterior globe.

0.3 mm; $P < 0.001$), and 12% at R+1 (5.5 ± 0.2 mm; $P < 0.001$) vs. BDC-2 (4.9 ± 0.2 mm) (**Figure 6A**). In the cuffs group, ONSD increased significantly by 12% during DI 1 (5.4 ± 0.6 mm; $P <$ 0.001), 14% during DI 3 (5.5 ± 0.5 mm; $P < 0.001$), 14% during DI 5 (5.5 ± 0.6 mm; $P < 0.001$), and 6% at R+1 (5.1 ± 0.5 mm; $P = 0.024$) vs. BDC-2 (4.8 ± 0.4 mm) (**Figure 6B**).

Intraocular Pressure

One subject in the control group and one subject in the cuffs group were excluded from IOP data analysis due to technical glitches.

No difference was observed between the control and cuffs groups ($P = 0.876$). In the control group, IOP was not significantly modified during DI 1 (16.9 ± 2.8 mmHg; $P = 0.392$), DI 3 (16.6 ± 2.5 mmHg; $P = 0.052$), DI 5 (17.4 ± 2.7 mmHg; $P = 0.941$), and R+1 (18.4 ± 4.1 mmHg; $P > 0.999$) vs. BDC-2 (18.1 ± 2.1 mmHg) (**Figure 7A**). In the cuffs group, IOP was not significantly changed during DI 1 (16.8 ± 3.2 mmHg; $P = 0.822$), DI 3 (16.3 ± 1.9 mmHg; $P = 0.654$), DI 5 (16.9 ± 2.7 mmHg; $P = 0.986$), and R+1 (16.8 ± 2.0 mmHg; $P = 0.840$) vs. BDC-2 (17.4 ± 2.7 mmHg) (**Figure 7B**).

DISCUSSION

This study shows that 5 days of DI induces ophthalmological changes, such as a slight but significant increase in RNFLT in the temporal quadrant and an enlargement in ONSD. VTC countermeasures seem to have minor impacts on these ophthalmological modifications.

TABLE 2 | General hemodynamic parameters.

	Control					Cuffs				
	BDC-2	***DI 1***	***DI 3***	***DI 5***	***R+1***	***BDC-2***	***DI 1***	***DI 3***	***DI 5***	***R+1***
SBP (mmHg)	115 ± 11	111 ± 10	116 ± 12	117 ± 10	119 ± 9	117 ± 10	113 ± 9	112 ± 4	122 ± 7	119 ± 9
	(107–124)	(104–119)	(107–125)	(109–125)	(112–126)	(109–125)	(106–120)	(109–115)	(117–128)	(112–126)
DBP (mmHg)	68 ± 5	66 ± 6	66 ± 6	69 ± 9	70 ± 8	68 ± 9	67 ± 4	68 ± 7	69 ± 8	71 ± 5
	(64–72)	(62–71)	(62–71)	(61–76)	(64–76)	(61–74)	(64–70)	(62–73)	(63–75)	(67–75)
HR (bpm)	57 ± 6	57 ± 8	51 ± 4	57 ± 8	63 ± 5	58 ± 8	59 ± 7	57 ± 10	60 ± 8	64 ± 9
	(52–61)	(51–64)	(48–55)	(50–63)	(59–67)	(52–65)	(53–64)	(49–65)	(53–66)	(56–71)

BDC-2, 2 days before DI; DBP, diastolic blood pressure; DI 1, first day of DI; DI 3, third day of DI; DI 5, fifth day of DI; HR, heart rate; R+1, first day after DI; SBP, systolic blood pressure. Values in parentheses represent 95% CI of the mean.

TABLE 3 | Optical coherence tomography data.

	Control		Cuffs		ANOVA table (condition, time, condition by time)
	BDC-2	***R+1***	***BDC-2***	***R+1***	
AMT (μm)	270.1 ± 20.5	267.2 ± 17.2	269.9 ± 14.6	268.4 ± 16.1	$P = 0.948$, $P = 0.339$, $P = 0.768$
	(254.3–285.8)	(254.0–280.5)	(257.8–282.1)	(255.0–281.9)	
GCC					
Average (μm)	102.8 ± 6.9	101.5 ± 7.0	97.8 ± 5.8	97.2 ± 5.0	$P = 0.139$, $P = 0.250$, $P = 0.684$
	(97.5–108.1)	(96.1–106.8)	(93.0–102.7)	(93.0–101.4)	
Superior (μm)	101.1 ± 6.4	101.0 ± 7.8	96.4 ± 4.9	96.5 ± 6.1	$P = 0.149$, $P = 0.995$, $P = 0.924$
	(96.1–106.0)	(94.9–107.0)	(92.3–100.5)	(91.4–101.6)	
Inferior (μm)	104.1 ± 7.4	101.9 ± 6.8	99.3 ± 7.3	97.9 ± 4.1	$P = 0.163$, $P = 0.104$, $P = 0.684$
	(98.4–109.9)	(96.7–107.1)	(93.2–105.3)	(94.5–101.3)	
RNFLT					
Average (μm)	103.3 ± 5.3	103.0 ± 8.7	99.4 ± 6.7	101.4 ± 9.8	$P = 0.488$, $P = 0.608$, $P = 0.470$
	(98.9–107.8)	(95.7–110.2)	(92.3–106.4)	(91.2–111.7)	
Temporal (μm)	73.6 ± 9.1	75.3 ± 8.3*	72.2 ± 9.3	75.7 ± 9.1††	$P = 0.922$, $P < 0.001$, $P = 0.119$
	(66.0–81.2)	(68.4–82.3)	(62.5–82.0)	(66.1–85.3)	
Superior (μm)	126.3 ± 6.6	122.8 ± 6.9	123.7 ± 12.5	121.7 ± 14.1	$P = 0.716$, $P = 0.189$, $P = 0.726$
	(120.8–131.8)	(117.1–128.6)	(110.6–136.8)	(106.9–136.4)	
Nasal (μm)	89.9 ± 18.0	87.2 ± 11.7	85.7 ± 14.3	80.6 ± 17.0	$P = 0.482$, $P = 0.316$, $P = 0.750$
	(74.9–104.8)	(77.3–97.0)	(70.7–100.7)	(62.7–98.4)	
Inferior (μm)	124.5 ± 12.6	124.9 ± 17.3	122.3 ± 14.5	128.4 ± 9.1	$P = 0.917$, $P = 0.491$, $P = 0.541$
	(114.0–135.0)	(110.4–139.4)	(107.1–137.5)	(118.8–138.0)	

*AMT, average macular thickness; BDC-2, 2 days before DI; GCC, ganglion cell complex; RNFLT, retinal nerve fiber layer thickness; R+1, first day after DI. Values in parentheses represent 95% CI of the mean. *$P < 0.05$ vs. BDC-2 in control group, ††$P < 0.01$ vs. BDC-2 in cuffs group.*

Thickening of Retinal Nerve Fiber Layer in the Temporal Quadrant After DI, No Effect of VTC

Spectral-domain OCT is a fast, accurate, and non-invasive imaging technique that uses infrared light waves to take high-resolution cross-section pictures of the retina, choroid, and ONH. This method allows for the early detection of optic nerve edema. New high-resolution spectral-domain OCT technology has had a significant impact on quantifying early morphological changes of the posterior ocular structures even before the onset of symptoms or clinical signs, such as papilledema. As such, OCT has become the primary diagnostic tool for the early detection and monitoring of SANS before, during, and after spaceflight. These results indicate that 5 days of DI induces the thickest RNFL in the temporal quadrant; however, the resolution limit of spectral-domain OCT is between 5 and 10 μm. This limit could compromise the significance of this study results.

Previous studies demonstrated that astronauts presented degradation in visual acuity, such as hyperopic shift or residual choroidal folds during either short- or long-duration spaceflight (Mader et al., 2011; Lee et al., 2016). Moreover, a case report performed on a 57 year-old astronaut, who underwent 2 long-duration spaceflights, showed that the second mission has worsened the ophthalmological outcomes observed during the

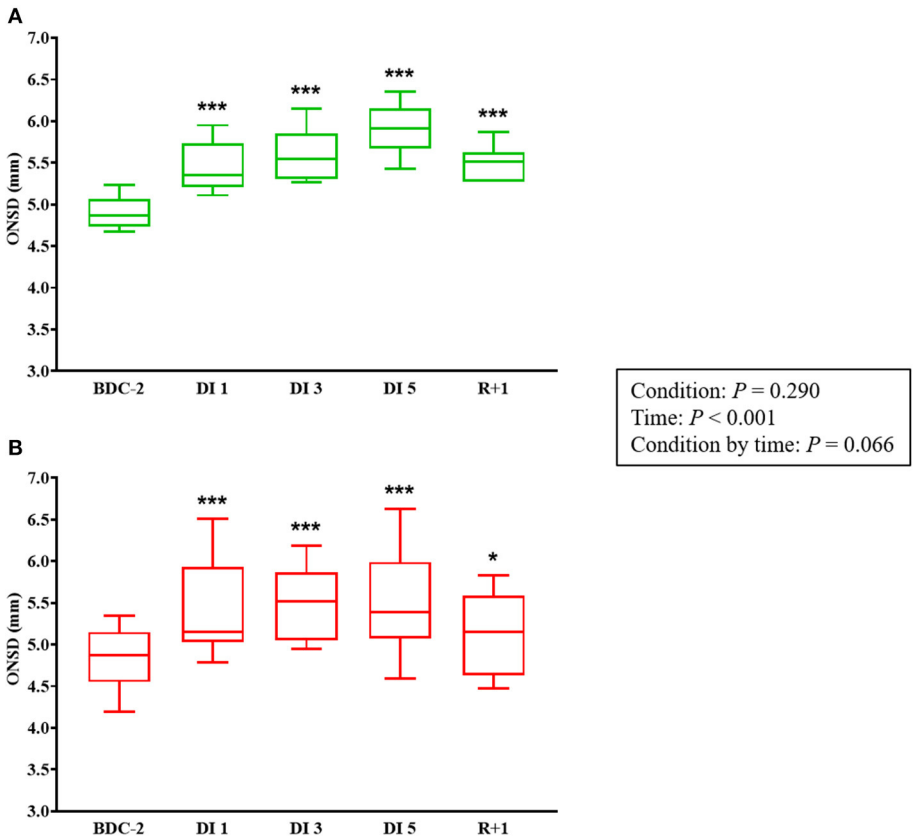


FIGURE 6 | ONSD measurements before, during, and after DI in control **(A)** and cuffs **(B)** groups. BDC-2, 2 days before DI; DI 1, first day of DI; DI 3, third day of DI; DI 5, fifth day of DI; ONSD, optic nerve sheath diameter; R+1, first day after DI. *$P < 0.05$ vs. BDC-2, ***$P < 0.001$ vs. BDC-2.

first mission (unilateral choroidal folds and a single cotton wool spot) (Mader et al., 2013). Lee et al. (2016) showed that 29 and 60% of crewmembers who underwent short- and long-duration spaceflights, respectively, presented degradation in distant and near visual acuity. Another case report on a healthy 45 year-old male astronaut, who spent ∼6 months on the International Space Station, depicted an increase in total retinal thickness and remained high even after 1 year (Mader et al., 2017). Furthermore, in a retrospective study, Patel et al. (2018) also described ophthalmological changes in astronauts measured by OCT scans. Indeed, 15 astronauts exhibited an increase in total retinal thickness and a greater global circumpapillary RNFLT (about 20 μm) with a larger increase in the inferior RNFL quadrant after long-duration spaceflight. Macias et al. (2020) found similar findings. Indeed, 11 astronauts, who spent an average duration of 170 days on the International Space Station, exhibited an increase in global total retinal thickness that persisted throughout the mission. Macias et al. (2021) evaluated ophthalmologic changes, before, during, and after spaceflight (up to 1 year) in 11 crewmembers. Only 2 of 11 crewmembers developed ocular outcomes with an increase in total retinal thickness. The authors denoted the importance of taking into account the high interindividual variability of ocular changes encountered during long-duration spaceflight. It is noteworthy that crewmembers may develop choroidal folds and optic disc edema over 1 year.

In a 30 day HDBR study, spectralis OCT unveiled an average increase in peripapillary retinal thickness of about 19.4 μm in a healthy 25 year old male astronaut. However, no clear evidence of optic disc edema was detected (Taibbi et al., 2013). Cases of papilledema and a significant increase in peripapillary total retinal thickness have recently been described after 30 days of strict HDBR (Laurie et al., 2019). Interestingly, they also found major differences with a greater peripapillary total retinal thickness in individuals who underwent 30 day HDBR vs. astronauts during short-duration spaceflight (22 to 47 days) (Laurie et al., 2020); however, we did not find such changes in OCT data compared with HDBR and spaceflight. One assumption explaining these differences would come from the time duration of the experiment. Another hypothesis put forward by Laurie et al. (2020) is that the position of the torso would mitigate cephalad venous congestion and thus reducing ICP. Indeed, as a reminder in this study, the subjects immersed are in a semi-recumbent position. Taibbi et al. (2016) have compared the effects of a 14 and 70 day HDBR by OCT; they found that 70 day HDBR induced greater peripapillary retinal thickening than 14 day HDBR, suggesting that time might also affect the amount of optic disc swelling. In this study, these

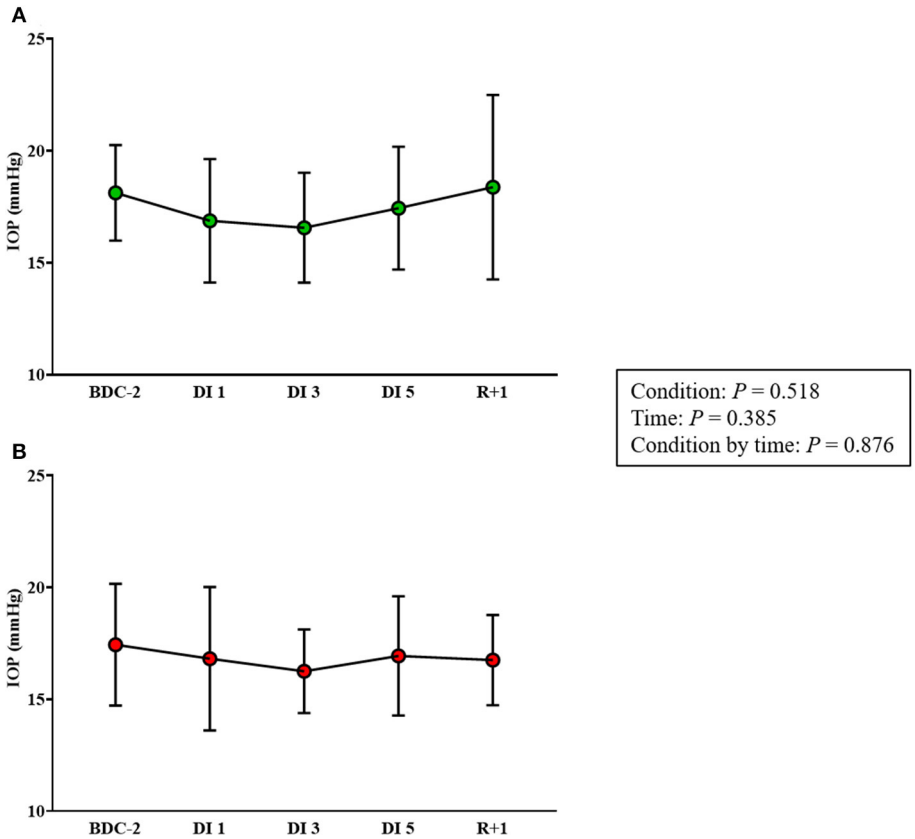


FIGURE 7 | Intraocular pressure (IOP) measurements before, during, and after DI in control **(A)** and cuffs **(B)** groups. BDC-2, 2 days before DI; DI 1, first day of DI; DI 3, third day of DI; DI 5, fifth day of DI; IOP, intraocular pressure; R+1, first day after DI.

structural ophthalmological changes could be due to the elevation in ICP from microgravity-induced thoraco-cephalic fluid shift during DI.

VTC are mechanical countermeasures commonly used by cosmonauts to offset thoraco-cephalic fluid shift with reduction of facial edema and congestion (Lindgren et al., 1998). VTC have already been tested during short-term bed rest studies. Although their daily use proved their efficiency to limit hypovolemia and/or baroreflex impairment, VTC failed to prevent orthostatic intolerance (Arbeille et al., 1999; Custaud et al., 2000; Millet et al., 2000; Pavy-Le Traon et al., 2001; Robin et al., 2020); however, little is known about the impact of mechanical countermeasures on ocular changes. This study shows that VTC failed to prevent the increase in RNFLT in the temporal quadrant induced by DI.

ONSD Enlargement During and After DI, VTC Dampened the ONSD Changes

To date, very few studies assessed ONSD in astronauts after spaceflight. For instance, Mader et al. (2011) revealed globe flattening, determined by magnetic resonance imaging (MRI) in some astronauts. Interestingly in this cohort, a persistent rise in ICP (up to 28.5 cm H_2O corresponding to ∼20 mmHg) was observed several weeks after spaceflight. Furthermore, Kramer et al. (2012) showed that after long-duration spaceflight, ONSD varied greatly according to the presence of globe flattening. Indeed, 20 astronauts with no globe flattening had a lower average ONSD (5.8 ± 0.6 mm) as opposed to a higher average ONSD (7.2 ± 1.5 mm) in 7 astronauts who exhibited globe flattening. Similar observations were reported in astronauts with nerve kinking who exhibited a greater ONSD, in contrast to those who did not, with value of 7.5 ± 1.1 mm vs. 5.9 ± 0.8 mm, respectively. Mader et al. (2013) also described that in a 57 year-old astronaut who underwent several consecutive long-duration missions to the International Space Station, an enlargement in ONSD during a post-mission examination was observed. In a study performed with 2D ultrasound, Sirek et al. (2014) measured ONSD in 13 astronauts from different cohorts, before, during, and after long-duration spaceflight. In-flight ONSD values were increased about 11% relative to pre-flight ONSD values without an immediate recovery post-flight. Mader et al. (2017) also found in a 45 year-old astronaut an increased ONSD bilaterally, measured by orbital 3T MRI, after a 6 month mission to the International Space Station. In contrast, 10 astronauts experiencing a 6 month spaceflight did not exhibit any changes in ONSD determined by quantitative MRI, suggesting that ICP did not reach a pathological threshold (Rohr et al., 2020).

It is now well-recognized that ONSD is a surrogate marker for elevated ICP (Geeraerts et al., 2007). These findings are consistent

with the previous study, where we found an elevation in ONSD (up to 30%) in 12 healthy male subjects during 3 days of DI (Kermorgant et al., 2017). Ophthalmological changes are rapidly observed in DI whereas they were reported much later in HDBR. Indeed, the authors found a significant increase in ONSD at day 57 of HDBR (unpublished data in collaboration with Pr. Jean-Claude Quintyn). The normal ICP range was determined from 5 to 15 mmHg in a horizontal position (Rangel-Castilla et al., 2008). Even if no predetermined ONSD cut-off value is formally established to define intracranial hypertension (elevated ICP is defined as ICP $\geq$ 20 mmHg), the threshold of ONSD distension to define elevated ICP could vary between 5 and 5.9 mm (Moretti and Pizzi, 2011). Moreover, Geeraerts et al. (2008) demonstrated that ONSD values above 5.82 mm could reflect intracranial hypertension with a 90% probability. Analogously, Soldatos et al. (2008) found a cut-off ONSD value of about 5.70 mm with sensitivity = 74% and specificity = 100% for predicting high ICP. The ONSD values found in the control group could correspond to values reflecting intracranial hypertension (Geeraerts et al., 2008; Soldatos et al., 2008).

Several mechanisms may explain the enlargement in ONSD. With the presence of an increased ICP induced by microgravity-associated thoraco-cephalic fluid shift, the hydrostatic transmittance of cerebrospinal fluid traveling within the subarachnoid space may expand the retrobulbar part; thus leading to a local ONSD enlargement (Stenger et al., 2017). This enlargement phenomenon would occur before the onset of papilledema (Hansen et al., 2011). Venous-drainage pathways may play a key role in elevated ICP (Beggs, 2013). Venous-drainage impairment has been confirmed in a recent work, where 6 of 11 healthy crewmembers, who spent a mean of 210 days in spaceflight, presented stagnant or reverse flow in the internal jugular vein measured by Doppler ultrasonography (Marshall-Goebel et al., 2019). In addition, Arbeille et al. (2017; 2020) described in healthy subjects who underwent several days of DI, changes in venous redistribution, especially an increase in jugular vein volume during the first 2–3 h of DI; however, only a residual effect in jugular vein volume was found during the 4th day of DI (Arbeille et al., 2020). Still, the same authors assessed indirectly the ICP by using the cochlear response to auditory stimulation and only half of them depicted a rise in ICP suggesting that an increased venous pooling was not the only criterion explaining an increased ICP (Arbeille et al., 2017). What pleads in favor of this assumption is the fact that cerebrospinal fluid may have been compartmentalized and sequestered in the orbital subarachnoid space. Impaired venous and lymphatic drainage may alter cerebrospinal fluid absorption within the orbit leading to a distended subarachnoid space (Geeraerts et al., 2008; Stenger et al., 2017). Subjects genetically predisposed may also develop ophthalmic outcomes. For instance, Zwart et al. (2012) demonstrated differences in circulating concentrations of the folate and B12-dependent 1-carbon metabolic pathway between crew members.

While we did not observe significant differences in ONSD between control and cuffs groups, VTC seem to alleviate microgravity-induced ONSD changes. Indeed, ONSD values in the cuffs group may indicate a moderate rise in ICP (Geeraerts et al., 2008; Soldatos et al., 2008). As we previously hypothesized, the venous fluid shift may be involved in ONSD enlargement. Thus, VTC should sequester venous flow in the lower limbs and may limit venous congestion. Furthermore, it has been demonstrated that during short-duration spaceflights, thigh cuffs decreased cervico-cephalic hemodynamics with a reduction of venous stasis (Fomina et al., 2004).

No Effect of DI on IOP

An 8 day German Spacelab mission revealed an increase in IOP about 5 mmHg immediately after exposure to weightlessness (Draeger et al., 1993). Similar results were found in a 10 day Spacelab D2 mission. Indeed, IOP was increased by ∼22–23 mmHg in the early phase of the launch, remained high for 1 day but returned to pre-flight values on the 4th day (Draeger et al., 1994). A compilation of IOP data from 6 shuttle missions and performed on 11 astronauts showed similar trends (Stenger et al., 2017). Although an increase in IOP after entering microgravity was observed, these findings suggested a normalization of IOP values either after short- or long-duration spaceflight despite a maintained cranial venous fluid shift (Huang et al., 2019).

In this study, we found a decrease in IOP during DI, yet, this change did not reach significance and remained unchanged after DI. Consistently, Chiquet et al. (2003) reported in a 7 day HDBR, which was performed in young healthy volunteers, a drop in IOP associated with hypovolemia related to cephalad fluid shifts produced by HDBR. The authors suggested that these ocular changes were mainly due to ocular dehydration or to systemic cardiovascular and hormonal variations during HDBR. The measurement of IOP in the same study is important since the pressure gradient between ICP (which would increase) and IOP (which would remain stable or decrease) may be one of the factors favoring optic nerve edema (Jóhannesson et al., 2018). A case report performed on a 25 year-old Caucasian man who underwent a 30 day HDBR displayed the same trend with a diminution in IOP. This phenomenon could contribute to a decreased translaminar pressure (Taibbi et al., 2013). In contrast, Taibbi et al. showed that 14 and 70 day HDBR provoked an increase in IOP, respectively, of +1.42 and +1.79 mmHg but returned to baseline values after HDBR. The magnitude of the increase observed during HDBR was not associated with the campaign durations (Taibbi et al., 2016).

Subjects wearing VTC did not exhibit any modifications in IOP. In a recent report, acute use of VTC during a 15° tilt reversed tilt-induced increased IOP and subfoveal choroidal thickness (Balasubramanian et al., 2018). In this study, VTC is likely to tend to limit the reduction in IOP by preventing hypovolemia (previously demonstrated in this same study by Robin et al., 2020) thus diminishing ocular dehydration.

CONCLUSION

Overall, DI provoked ophthalmological changes, such as the thickest RNFL in the temporal quadrant and enlargement in ONSD. These changes seem to occur more rapidly than

during HDBR. Primarily, VTC had few impacts on the DI-induced neuro-ophthalmological changes. Further studies will require the identification of the underlying mechanisms and the kinetics involved to fully understand the physiological responses of DI on the ophthalmological changes. The development of an optimized countermeasure needs to be further studied to assess and mitigate the ocular changes induced by microgravity. Finally, DI can be considered as an efficient model simulating neuro-ophthalmological changes observed after short-term exposure to microgravity; however, it is difficult to extrapolate these findings on the neuro-ophthalmological consequences of long-term exposure to microgravity.

Limitations

Limitations must be acknowledged in this study since that could affect these findings: (1) The sample size in this study could dampen the statistical significance of these results; however, the subjects served as their own control. (2) The low resolution of the OCT device could affect these findings. (3) The standard OCT examination in clinical uses or different studies is usually performed in the upright sitting position. The effects of position on the measurement, especially, on quadrant segmentation are unknown. The change of position is likely to alter RNFLT values; however, the measurements have been conducted in a semi-recumbent position, similar to that found during DI. (4) Subjects wore VTC for only 10 h per day; however, a longer application of VTC may induce detrimental venous effects. (5) The out-of-bath time performed for reasons related to the health of the subject may affect these findings by reducing the headward fluid shift and thus limiting ophthalmological changes.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by both the CPP Est III Ethic Committee (October 2, 2018) and the French Health Authority, ANSM (August 13, 2018). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AP-LT and VS equally supervised the research. M-PB, AB, BG, AG, AP-LT, and VS designed the research. MK, AS, JL, F-PR, NB, AB, BG, AG, and AP-LT performed the research. MK, AS, TG, FV, NN, J-MS, AP-LT, and VS analyzed the data. MK, AS, TG, FV, AG, NN, DA, OH, J-MS, AP-LT, and VS wrote and revised the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was supported by CNES (N° 2018 – 4800000970). OH was supported by CNES.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the volunteers and MEDES staff who participated in this study.

REFERENCES

Arbeille, P., Avan, P., Treffel, L., Zuj, K., Normand, H., and Denise, P. (2017). Jugular and portal vein volume, middle cerebral vein velocity, and intracranial pressure in dry immersion. *Aerosp. Med. Hum. Perform.* 88, 457–462. doi: 10.3357/AMHP.4762.2017

Arbeille, P., Greaves, D., Guillon, L., and Besnard, S. (2020). Thigh cuff effects on venous flow redistribution during 4 days in dry immersion. *Aerosp. Med. Hum. Perform.* 91, 697–702. doi: 10.3357/AMHP.5524.2020

Arbeille, P., Herault, S., Fomina, G., Roumy, J., Alferova, I., and Gharib, C. (1999). Influences of thigh cuffs on the cardiovascular system during 7-day head-down bed rest. *J. Appl. Physiol.* 87, 2168–2176. doi: 10.1152/jappl.1999.87.6.2168

Balasubramanian, S., Tepelus, T., Stenger, M. B., Lee, S. M. C., Laurie, S. S., Liu, J. H. K., et al. (2018). Thigh cuffs as a countermeasure for ocular changes in simulated weightlessness. *Ophthalmology* 125, 459–460. doi: 10.1016/j.ophtha.2017.10.023

Beggs, C. B. (2013). Venous hemodynamics in neurological disorders: an analytical review with hydrodynamic analysis. *BMC Med.* 11:142. doi: 10.1186/1741-7015-11-142

Chiquet, C., Custaud, M.-A., Pavy-Le Traon, A., Millet, C., Gharib, C., and Denis, P. (2003). Changes in intraocular pressure during prolonged (7 day) head-down tilt bedrest. *J. Glaucoma* 12, 204–208. doi: 10.1097/00061198-200306000-00004

Custaud, M.-A., Millet, C., Frutoso, J., Maillet, A., Gauquelin, G., Gharib, C., et al. (2000). No effect of venoconstrictive thigh cuffs on orthostatic hypotension induced by head-down bed rest. *Acta Physiol. Scand.* 170, 77–85. doi: 10.1046/j.1365-201x.2000.00763.x

Draeger, J., Schwartz, R., Groenhoff, S., and Stern, C. (1993). Self-tonometry under microgravity conditions. *Clin. Investig.* 71, 700–703. doi: 10.1007/BF00209723

Draeger, J., Schwartz, R., Groenhoff, S., and Stern, C. (1994). Self-tonometry during the German 1993 Spacelab D2 mission. *Ophthalmologe* 91, 697–699.

Fomina, G., Kotovskaya, A., Arbeille, P., Pochuev, V., Zhernavkov, A., and Ivanovskaya, T. (2004). Changes in hemodynamic and post-flights orthostatic tolerance of cosmonauts under application of the preventive device - - thigh cuffs bracelets in short-term flights. *J. Gravit. Physiol.* 11, 229–230.

Geeraerts, T., Launey, Y., Martin, L., Pottecher, J., Vigué, B., Duranteau, J., et al. (2007). Ultrasonography of the optic nerve sheath may be useful for detecting raised intracranial pressure after severe brain injury. *Intens. Care Med.* 33, 1704–1711. doi: 10.1007/s00134-007-0797-6

Geeraerts, T., Newcombe, V. F. J., Coles, J. P., Abate, M. G., Perkes, I. E., Hutchinson, P. J. A., et al. (2008). Use of T2-weighted magnetic resonance imaging of the optic nerve sheath to detect raised intracranial pressure. *Crit. Care* 12:114. doi: 10.1186/cc7006

Hansen, H.-C., Lagrèze, W., Krueger, O., and Helmke, K. (2011). Dependence of the optic nerve sheath diameter on acutely applied subarachnoidal pressure – an experimental ultrasound study. *Acta Ophthalmol.* 89, 528–532. doi: 10.1111/j.1755-3768.2011.02159.x

Huang, A. S., Stenger, M. B., and Macias, B. R. (2019). Gravitational influence on intraocular pressure. *J. Glaucoma* 28, 756–764. doi: 10.1097/IJG.0000000000001293

Jóhannesson, G., Eklund, A., and Lindén, C. (2018). Intracranial and intraocular pressure at the lamina cribrosa: gradient effects. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 18:25. doi: 10.1007/s11910-018-0831-9

Kermorgant, M., Leca, F., Nasr, N., Custaud, M.-A., Geeraerts, T., Czosnyka, M., et al. (2017). Impacts of simulated weightlessness by dry immersion on optic nerve sheath diameter and cerebral autoregulation. *Front. Physiol.* 8:780. doi: 10.3389/fphys.2017.00780

Kramer, L. A., Sargsyan, A. E., Hasan, K. M., Polk, J. D., and Hamilton, D. R. (2012). Orbital and intracranial effects of microgravity: findings at 3-T MR imaging. *Radiology* 263, 819–827. doi: 10.1148/radiol.12111986

Laurie, S. S., Lee, S. M. C., Macias, B. R., Patel, N., Stern, C., Young, M., et al. (2020). Optic disc edema and choroidal engorgement in astronauts during spaceflight and individuals exposed to bed rest. *JAMA Ophthalmol.* 138,165–172. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2019.5261

Laurie, S. S., Macias, B. R., Dunn, J. T., Young, M., Stern, C., Lee, S. M. C., et al. (2019). Optic disc edema after 30 days of strict head-down tilt bed rest. *Ophthalmology* 126, 467–468. doi: 10.1016/j.ophtha.2018.09.042

Lee, A. G., Mader, T. H., Gibson, C. R., Tarver, W., Rabiei, P., Riascos, R. F., et al. (2020). Spaceflight associated neuro-ocular syndrome (SANS) and the neuro-ophthalmologic effects of microgravity: a review and an update. *NPJ Micrograv.* 6:7. doi: 10.1038/s41526-020-0097-9

Lee, A. G., Tarver, W. J., Mader, T. H., Gibson, C. R., Hart, S. F., and Otto, C. A. (2016). Neuro-ophthalmology of space flight. *J. Neuroophthalmol.* 36, 85–91. doi: 10.1097/WNO.0000000000000334

Lindgren, K. N., Kraft, D., Ballard, R. E., Tucker, A., and Hargens, A. R. (1998). Venoconstrictive thigh cuffs impede fluid shifts during simulated microgravity. *Aviat. Space Environ. Med.* 69, 1052–1058.

Macias, B. R., Ferguson, C. R., Patel, N., Gibson, C., Samuels, B. C., Laurie, S. S., et al. (2021). Changes in the optic nerve head and choroid over 1 year spaceflight. *JAMA Ophthalmol.* 139, 663–667. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2021.0931

Macias, B. R., Patel, N. B., Gibson, C. R., Samuels, B. C., Laurie, S. S., Otto, C., et al. (2020). Association of long-duration spaceflight with anterior and posterior ocular structure changes in astronauts and their recovery. *JAMA Ophthalmol.* 138, 553–559. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2020.0673

Mader, T. H., Gibson, C. R., Miller, N. R., Subramanian, P. S., Patel, N. B., and Lee, A. G. (2019). An overview of spaceflight-associated neuro-ocular syndrome (SANS). *Neurol. India* 67, 206–211. doi: 10.4103/0028-3886.259126

Mader, T. H., Gibson, C. R., Otto, C. A., Sargsyan, A. E., Miller, N. R., Subramanian, P. S., et al. (2017). Persistent asymmetric optic disc swelling after long-duration spaceflight: implications for pathogenesis. *J. Neuroophthalmol.* 37, 133–139. doi: 10.1097/WNO.0000000000000467

Mader, T. H., Gibson, C. R., Pass, A. F., Kramer, L. A., Lee, A. G., et al. (2011). Optic disc edema, globe flattening, choroidal folds, and hyperopic shifts observed in astronauts after long-duration space flight. *Ophthalmology* 118, 2058–2069. doi: 10.1016/j.ophtha.2011.06.021

Mader, T. H., Gibson, C. R., Pass, A. F., Lee, A. G., Killer, H. E., Hansen, H.-C., et al. (2013). Optic dis edema in an astronaut after repeat long-duration space flight. *J. Neuroophthalmol.* 33, 249–255. doi: 10.1097/WNO.0b013e31829b41a6

Marshall-Goebel, K., Laurie, S. S., Alferova, I. V., Arbeille, P., Auñón-Chancellor, S. M., Ebert, D. J., et al. (2019). Assessment of jugular venous blood flow stasis and thrombosis during spaceflight. *JAMA Netw. Open* 2:e1915011. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.15011

Millet, C., Custaud, M.-A., Allevard, A. M., Gharib, C., Gauquelin-Koch, G., and Fortrat, J.-O. (2000). Adaptations to a 7-day head-down bed rest with thigh cuffs. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32, 1748–1756. doi: 10.1097/00005768-200010000-00014

Moretti, R., and Pizzi, B. (2011). Ultrasonography of the optic nerve in neurocritically ill patients. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 55, 644–652. doi: 10.1111/j.1399-6576.2011.02432.x

Navasiolava, N. M., Custaud, M.-A., Tomilovskaya, E. S., Larina, I. M., Mano, T., Gauquelin-Koch, G., et al. (2011). Long-term dry immersion: review and prospects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 111, 1235–1260. doi: 10.1007/s00421-010-1750-x

Nelson, E. S., Mulugeta, L., and Myers, J. G. (2014). Microgravity-induced fluid shift and ophthalmic changes. *Life* 4, 621–665. doi: 10.3390/life4040621

Patel, N., Pass, A., Mason, S., Gibson, C. R., and Otto, C. (2018). Optical coherence tomography analysis of the optic nerve head and surrounding structures in long-duration International Space Station astronauts. *JAMA Ophthalmol.* 136, 193–200. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2017.6226

Pavy-Le Traon, A., Maillet, A., Vasseur-Clausen, P., Custaud, M.-A., Alferova, I., Gharib, C., et al. (2001). Clinical effects of thigh cuffs during a 7-day 6 degrees head-down bed rest. *Acta Astronaut.* 49, 145–151. doi: 10.1016/S0094-5765(01)00092-3

Rangel-Castilla, L., Gopinath, S., and Robertson, C. S. (2008). Management of intracranial hypertension. *Neurol. Clin.* 26, 521–541. doi: 10.1016/j.ncl.2008.02.003

Roberts, D. R., Albrecht, M. H., Collins, H. R., Asemani, D., Chatterjee, A. R., Spampinato, M. V., et al. (2017). Effects of spaceflight on astronaut brain structure as indicated on MRI. *N. Engl. J. Med.* 377, 1746–1753. doi: 10.1056/NEJMoa1705129

Robin, A., Auvinet, A., Degryse, B., Murphy, R., Bareille, M.-P., Beck, A., et al. (2020). DI-5-CUFFS: venoconstrictive thigh cuffs limit body fluid changes but not orthostatic intolerance induced by a 5-day dry immersion. *Front. Physiol.* 11:383. doi: 10.3389/fphys.2020.00383

Rohr, J. J., Sater, S., Sass, A. M., Marshall-Goebel, K., Ploutz-Snyder, R. J., Ethier, C. R., et al. (2020). Quantitative magnetic resonance image assessment of the optic nerve and surrounding sheath after spaceflight. *NPJ Micrograv.* 6:30. doi: 10.1038/s41526-020-00119-3

Sirek, A. S., Garcia, K., Foy, M., Ebert, D., Sargsyan, A., Wu, J. H., et al. (2014). Doppler ultrasound of the central retinal artery in microgravity. *Aviat. Space Environ. Med.* 85, 3–8. doi: 10.3357/ASEM.3750.2014

Soldatos, T., Karakitsos, D., Chatzimichail, K., Papathanasiou, M., Gouliamos, A., and Karabinis, A. (2008). Optic nerve sonography in the diagnostic evaluation of adult brain injury. *Crit. Care* 12:67. doi: 10.1186/cc6897

Stenger, M. B., Tarver, W. J., Brunstetter, T., Gibson, C. R., Laurie, S. S., Lee, S. M. C., et al. (2017). *Evidence Report: Risk of Spaceflight Associated neuro-Ocular Syndrome (SANS)*. NASA.

Taibbi, G., Cromwell, R. L., Zanello, S. B., Yarbough, P. O., Ploutz-Snyder, R. J., Godley, B. F., et al. (2016). Ocular outcomes comparison between 14- and 70-day head-down-tilt bed rest. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57, 495–501. doi: 10.1167/iovs.15-18530

Taibbi, G., Kaplowitz, K., Cromwell, R. L., Godley, B. F., Zanello, S. B., and Vizzeri, G. (2013). Effects of 30-day head-down bed rest on ocular structures and visual function in a healthy subject. *Aviat. Space Environ. Med.* 84, 148–154. doi: 10.3357/ASEM.3520.2013

Tomilovskaya, E., Shigueva, T., Sayenko, D., Rukavishnikov, I., and Kozlovskaya, I. (2019). Dry immersion as a ground-based model of microgravity physiological effects. *Front. Physiol.* 10:284. doi: 10.3389/fphys.2019.00284

Zhang, L.-F., and Hargens, A. R. (2018). Spaceflight-induced intracranial hypertension and visual impairment: pathophysiology and countermeasures. *Physiol. Rev.* 98, 59–87. doi: 10.1152/physrev.00017.2016

Zwart, S. R., Gibson, C. R., Mader, T. H., Ericson, K., Ploutz-Snyder, R., Heer, M., et al. (2012). Vision changes after spaceflight are related to alterations in folate- and vitamin B-12-dependent one-carbon metabolism. *J. Nutr.* 142, 427–431. doi: 10.3945/jn.111.154245

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Kermorgant, Sadegh, Geeraerts, Varenne, Liberto, Roubelat, Bataille, Bareille, Beck, Godard, Golemis, Nasr, Arvanitis, Hélissen, Senard, Pavy-Le Traon and Soler. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.