

Université de Montréal

La rigidité artérielle, induite par une calcification des carotides, altère l'homéostasie
cérébrale chez la souris

Par
Nataliya Sadekova

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc.)
en Pharmacologie

Avril 2013

©Nataliya Sadekova, 2013

RÉSUMÉ

La rigidité artérielle est considérée comme un facteur de risque important pour le développement du déclin cognitif. Toutefois, les effets précis de la rigidité artérielle sur le cerveau sont peu connus et, à ce jour, aucun modèle animal ne permet d'étudier l'effet isolé de ce facteur sur l'homéostasie cérébrale. Dans cette étude, nous avons développé un nouveau modèle de rigidité artérielle qui se base sur la calcification de l'artère carotide chez la souris. Au niveau artériel, ce modèle présente une fragmentation de l'élastine, une augmentation de la distribution du collagène et de l'épaisseur intima-média ainsi qu'une diminution de la compliance et de la distensibilité artérielles démontrant la rigidité artérielle. De plus, le modèle ne présente pas d'augmentation de pression artérielle ni de changement de rayon du lumen indiquant une absence d'hypoperfusion globale et d'anévrisme. Au niveau cérébral, les résultats montrent que la rigidité artérielle induit une augmentation de la pulsatilité du flux sanguin cérébral menant ainsi à une augmentation du stress oxydatif. Ce dernier induit une inflammation cérébrale, détectée par l'activation de la microglie et des astrocytes, induisant ultimement une neurodégénérescence. Ces effets sont surtout observés au niveau de l'hippocampe, la région cruciale pour la mémoire et la cognition. Ainsi, cette étude montre que la rigidité artérielle altère l'homéostasie cérébrale et mérite d'être considérée comme une cible potentielle dans la prévention et le traitement des dysfonctions cognitives chez les personnes âgées.

Mots clés : rigidité artérielle, artère carotide, calcification, cerveau, microglie, astrocytes, stress oxydatif

ABSTRACT

Arterial stiffness is considered as an important risk factor for the development of cognitive decline in the elderly population. However, its precise effects on the brain are unknown and, to date, no animal model allows to study the precise outcome of arterial stiffness on the brain homeostasis. In this study, we developed a new animal model of arterial stiffness based on the calcification of the carotid artery in mice. On the arterial level, this model shows a fragmentation of elastin, increased collagen distribution and intima-media thickness as well as decreased arterial compliance and distensibility, thus fulfilling the major arterial stiffness properties. In addition, this model does not show an increase in blood pressure or change in arterial lumen radius indicating a lack of global hypoperfusion and aneurysm. Regarding the brain, the results show that arterial stiffness induces an increase in cerebral blood flow pulsatility leading to increased oxidative stress. Oxidative stress induces brain inflammation, detected by the activation of microglia and astrocytes, ultimately leading to neurodegeneration. These effects are particularly observed in the hippocampus, a crucial area for memory and cognition. Thus, this study shows that arterial stiffness alters brain homeostasis and therefore should be considered as a potential therapeutic target for the prevention and treatment of cognitive dysfunction in the elderly.

Key words: arterial stiffness, carotid artery, calcification, brain, microglia, astrocytes, oxidative stress

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
ABSTRACT	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
REMERCIEMENTS	x
INTRODUCTION	1
1. Vaisseaux sanguins: propriétés et fonctions	2
1.1 Composition de la paroi vasculaire	2
1.2 Types de vaisseaux et leurs fonctions	5
2. Rigidité artérielle	7
2.1 Caractéristiques de la rigidité artérielle	7
2.2 Modèles animaux de rigidité artérielle.....	11
2.3 Calcification et rigidité artérielle	15
3. L'unité neurovasculaire	17
3.1 Les neurones	18
3.2 Les cellules gliales	19
3.3 Circulation cérébrale	21
4. Perturbations de l'homéostasie cérébrale	24
4.1 Stress oxydatif	24
4.2 La gliose.....	30
5. La cognition.....	33
5.1 Structures cérébrales impliquées dans la cognition	33
5.2 Rigidité artérielle et cognition	38
6. Hypothèses et Objectifs	41

ARTICLE 1	43
Abstract.....	45
Non-standard Abbreviations and Acronyms.....	46
Introduction	47
Methods	49
Results	55
Discussion.....	60
References.....	68
Tables	75
Figure Legends	76
Figures	78
Supplemental material	84
 ARTICLE 2	 91
Abstract.....	93
Non-standard Abbreviations.....	94
Introduction	95
Methods	97
Results	102
Discussion.....	107
References.....	114
Figure Legends	119
Figures	121
 DISCUSSION	 127
7. Résumé et importance des résultats.....	128
8. Calcification des carotides et rigidité artérielle : nouveau modèle animal	130
8.1 Altérations structurelles induites par une calcification de l'artère carotide ..	130
8.2 Altérations mécaniques induites par une calcification de l'artère carotide ..	132
8.3 Altérations de la pulsatilité du flux sanguin cérébral	134

8.4 Avantages et inconvénients du modèle	136
9. Les effets de la rigidité de l'artère carotide sur le cerveau	138
9.1 Augmentation de la production de l'anion superoxyde.....	138
9.2 Activation de la microglie et des astrocytes	140
9.3 Neurodégénérescence.....	144
10. Conclusions et perspectives.....	146
BIBLIOGRAPHIE.....	148
ANNEXE.....	163

LISTE DES FIGURES

Figure 1	4
Figure 2	17
Figure 3	18
Figure 4	23
Figure 5	27
Figure 6	32
Figure 7	33
Figure 8	34
Figure 9	37

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CA1	Corne d'Ammon 1 de l'hippocampe
CA3	Corne d'Ammon 3 de l'hippocampe
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CD68	<i>Cluster of differentiation 68</i>
DG	Gyrus denté de l'hippocampe
DHE	Dihydroéthidium
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> ou Protéine acide fibrillaire gliale
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HO ₂ [•]	Radical hydroperoxyl
HOBr	Acide hypobromeux
HOCl	Acide hypochloreux
Iba-1	<i>Ionized calcium-binding adapter protein molecule 1</i> ou Protéine adaptatrice ionisée liant le calcium 1
IL-1β	Interleukine 1β
IL-6	Interleukine 6
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
L [•]	Radical lipidique
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LO [•]	Radical alkoxyde lipidique
LOO [•]	Radical peroxyde lipidique
LOOH	Hydroperoxyde lipidique
MMP	Métalloprotéinases matricielles
MPTP	1-méthyle 4-phényl 1,2,3,6-tétrahydropyridine
MPO	Myéloperoxydase
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NO	Monoxyde d'azote
nNOS	Oxyde nitrique synthase neuronale
NO ₂	Dioxyde d'azote
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
OCT	Tomographie à cohérence optique
OH [•]	Radical hydroxyl
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PFA	Paraformaldehyde
RO [•]	Radical alkoxyde
RO ₂ [•]	Radical peroxyde
s100β	<i>s100 calcium binding protein β</i> ou Protéine liant le calcium s100β
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor α</i> ou Facteur de nécrose tumorale α

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidée et supportée durant la réalisation de ce projet. Premièrement, j'aimerais remercier ma directrice de maîtrise, Hélène Girouard, pour m'avoir donné la chance de travailler sur ce projet incroyablement stimulant et intéressant. J'aimerais également la remercier pour son support tout au long du projet. Elle a su me pousser et me motiver afin que je puisse me dépasser et atteindre des objectifs que je ne croyais pas possibles. Autant au niveau personnel que professionnel, cela a été un vrai plaisir de travailler avec elle. J'aimerais également remercier énormément Diane Vallerand. À part d'avoir appris beaucoup à ses côtés, elle a toujours su être là pour moi, toujours attentive et prête à écouter et à apporter son aide. Son expertise, son écoute et sa bienveillance ne l'ont pas juste rendue une bonne collègue, mais également une très bonne amie. Mon parcours n'aurait pas été le même si elle n'avait pas été là pour m'aider, m'écouter et me supporter. Finalement, j'aimerais remercier mes proches pour m'avoir fourni leurs supports et encouragements durant toutes ces années d'études. La présence et le support de toutes ces personnes ont été vitaux à la réalisation de ce projet et sans eux je ne serais pas rendu où je suis maintenant.

INTRODUCTION

1. Vaisseaux sanguins: propriétés et fonctions

La fonction première des vaisseaux sanguins est d'acheminer le sang contenant l'oxygène et les nutriments vers les divers organes de l'organisme et ensuite d'éliminer les déchets métaboliques et les composantes toxiques. Ceci est effectué de manière contrôlée et précise grâce à la structure des vaisseaux, plus précisément la composition de leur paroi vasculaire et la division des vaisseaux en différentes classes fonctionnelles (1).

1.1 Composition de la paroi vasculaire

La paroi des vaisseaux sanguins est composée de trois couches (Figure 1). Tout d'abord, l'intima (tunique interne) qui est constituée d'une couche de cellules endothéliales, directement en contact avec la circulation sanguine, suivie d'une lame basale et du tissu conjonctif (1). Les cellules endothéliales régulent l'homéostasie vasculaire en interagissant d'une part avec les composantes de la circulation sanguine et d'autre part avec les composantes de la paroi vasculaire. À cause de leur emplacement, les cellules endothéliales sont les premières cellules à répondre aux changements de la composition de la circulation sanguine et du flux sanguin. En effet, elles agissent comme une barrière entre le sang et les tissus contrôlant ainsi le passage des différentes composantes. Elles jouent également un rôle important dans l'angiogenèse, la coagulation et la fibrinolyse en fournissant une surface anticoagulante et anti-thrombotique. Les cellules endothéliales participent à la

régulation du tonus vasculaire en stimulant une vasoconstriction ou une vasodilatation selon le cas et jouent aussi un rôle dans les réactions inflammatoires (2, 3).

La deuxième couche est la média (tunique moyenne) qui est constituée de cellules musculaires lisses et de fibres d'élastine et de collagène qui sont contenues entre une limitante élastique interne et externe. Grâce à ces composantes, la fonction principale de la média est de fournir un support mécanique et une force contractile aux vaisseaux (1).

La troisième couche, l'adventice (tunique externe), est composée d'une gaine de tissu conjonctif contenant des fibres de collagène. Son rôle principal est de connecter les vaisseaux sanguins aux tissus environnants. Dans les gros vaisseaux comme l'aorte, l'adventice contient également un ensemble de petits vaisseaux appelés vasa vasorum qui permettent de fournir un apport sanguin et des nutriments pour la média (1).

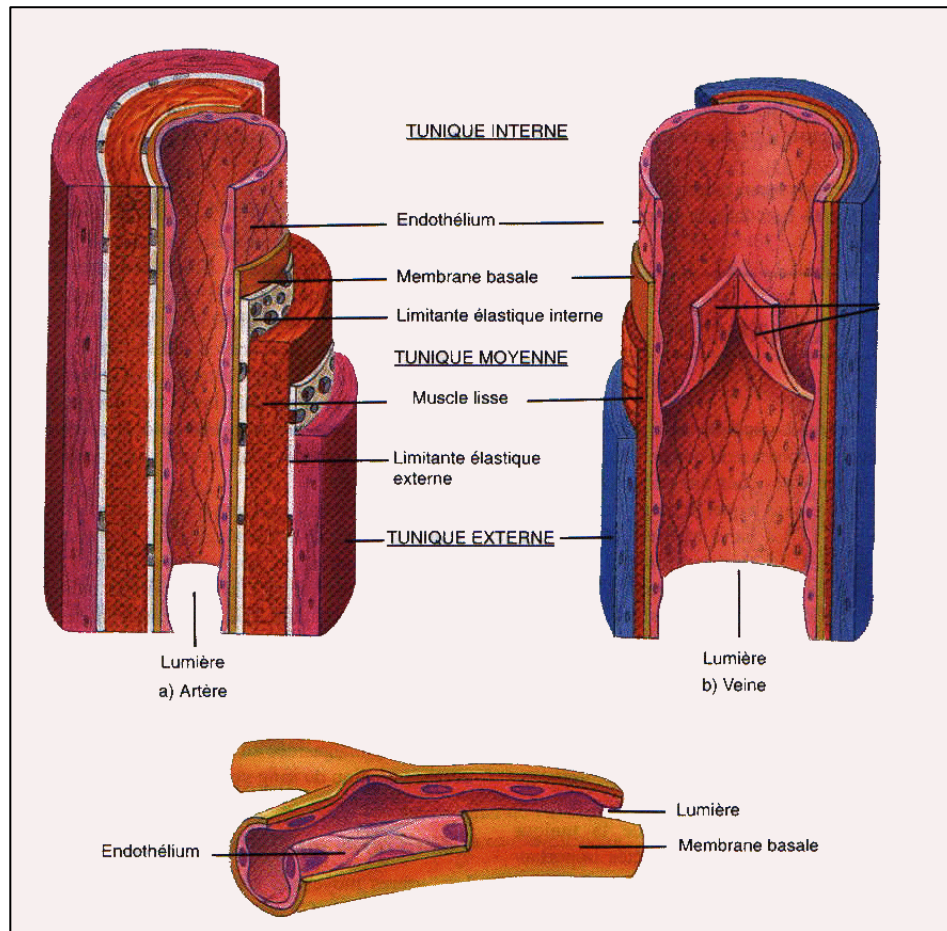


Figure 1. La structure de la paroi vasculaire. Trois couches principales composent la paroi : la tunique interne, en contact direct avec le sang, la tunique moyenne représentant la matrice structurale et contractile et la tunique externe qui connecte les vaisseaux aux tissus environnants (4).

1.2 Types de vaisseaux et leurs fonctions

Les vaisseaux sont divisés en différents types tout dépendant de leur structure et de leurs fonctions. Ils se divisent principalement en trois grandes catégories : les artères, les veines et les capillaires.

Tout d'abord, les artères ont comme fonction primaire d'acheminer le sang du cœur vers les organes. Elles se divisent en différentes catégories permettant de remplir différentes fonctions. Tout d'abord, les artères élastiques, aussi appelées les artères de conduction, telles que l'artère carotide et l'aorte, permettent d'adapter le flux sanguin aux différentes demandes de l'organisme. Elles accomplissent cette fonction grâce à la composition de leur média qui est enrichie en élastine, permettant à ces artères de se dilater efficacement, et également par la présence du collagène qui fournit une rigidité à la paroi vasculaire empêchant ainsi une dilatation excessive (1). Au niveau des artères élastiques, l'élastine est présente en plus grande quantité que le collagène, mais plus on avance dans l'arbre artériel, plus la proportion du collagène augmente par rapport à celle de l'élastine. En effet, les artères élastiques se divisent pour donner des artères musculaires qui ont un diamètre plus petit. Les artères musculaires contiennent une proportion plus élevée en collagène et sont par conséquent plus rigides que les artères élastiques (5). Elles possèdent une média riche en cellules musculaires lisses permettant à ces artères de se contracter et de se relaxer face à différentes demandes de l'organisme. Les artères musculaires acheminent le sang des artères élastiques aux vaisseaux de résistance. Ces derniers

représentent les plus petits artères et artérioles et ont comme caractéristique d'offrir une résistance au flux sanguin permettant ainsi de le contrôler (1).

D'autre part, les veines, aussi appelées les vaisseaux de capacitance, ont comme fonction d'acheminer le sang des organes vers le cœur et servent de réservoir sanguin, fonction qu'elles exercent grâce à leur mince paroi. Finalement, les capillaires, les plus petits vaisseaux, représentent les vaisseaux d'échange de l'organisme et sont responsables des échanges d'oxygène et de gaz carbonique ainsi que des métabolites entre le sang et les tissus. Ainsi, ces différents types de vaisseaux sont organisés de manière précise et stratégique afin de permettre à l'organisme de fonctionner et de réagir aux différentes demandes physiologiques (1).

2. Rigidité artérielle

La rigidité vasculaire est un phénomène affectant particulièrement les artères de l'organisme. C'est une composante importante du vieillissement ainsi que de plusieurs conditions pathologiques telles l'athérosclérose, l'hypertension, les maladies chroniques rénales et le diabète (5-7). La rigidité artérielle est aussi considérée comme un facteur de risque important pour le développement des diverses complications cardiovasculaires et cérébrovasculaires (5).

2.1 Caractéristiques de la rigidité artérielle

Tout d'abord, les cinq facteurs principaux causant la rigidité artérielle sont le remodelage vasculaire, la fibrose, les plaques athéromateuses, la dysfonction endothéliale et les plaques calciques (5). Ces derniers induisent des altérations importantes au niveau des composantes anatomiques et physiologiques des artères. De plus, le développement de la rigidité artérielle est influencé par différents facteurs modifiables tels que la pression transmurale, les hormones, les lipides, le glucose, les niveaux de cholestérol, la pression artérielle et d'autres facteurs de risque cardiovasculaires. L'intégrité de la paroi vasculaire peut être aussi influencée par les différents facteurs non modifiables comme les prédispositions génétiques. Ces derniers peuvent agir directement sur la paroi vasculaire ou indirectement à travers le vieillissement (5, 6, 8).

2.1.1 Altérations structurelles

Il est largement reconnu que les composantes structurelles de la matrice extracellulaire, plus spécifiquement l'élastine et le collagène, contribuent de manière significative à la rigidité artérielle (5). En conditions physiologiques, l'élastine et le collagène permettent à la paroi artérielle de résister aux différentes tensions et de s'adapter au flux sanguin (6, 9). Une dynamique de formation et de dégradation de ces éléments existe et elle est contrôlée par les métalloprotéinases matricielles (MMP). Lorsque cette dynamique est altérée, une synthèse accrue du collagène et une fragmentation ou une dégradation de l'élastine en résultent (5-7, 9). Ceci active une réaction inflammatoire caractérisée surtout par une infiltration de cytokines et de monocytes au niveau de la paroi vasculaire. La présence de macrophages peut à son tour stimuler la production de différentes MMP menant ainsi à une désorganisation des fibres de collagène et d'élastine (5, 6). Le tout mène à une augmentation de l'épaisseur intima-média artérielle qui représente une des mesures cliniques de la rigidité. D'ailleurs, l'épaisseur intima-média est considérée comme un facteur de risque pour divers événements cardiovasculaires (5, 10).

Plusieurs autres facteurs sont également impliqués dans le développement de la rigidité vasculaire. D'une part, la dysfonction endothéliale, induite principalement par une augmentation du stress oxydatif et une diminution des propriétés anti-oxydantes de l'organisme, altère de manière significative la capacité des artères à se dilater efficacement (6, 11). D'autre part, les hormones comme l'angiotensine II stimule la formation de collagène, le remodelage vasculaire, augmente le stress oxydatif et

diminue la synthèse de l'élastine. Les produits de glycation avancée peuvent se lier au collagène et à l'élastine altérant les proportions de ces composantes au niveau de la paroi vasculaire. D'autres facteurs comme l'inflammation et le dépôt des ions de calcium, de magnésium et des phosphates favorisent également la rigidité vasculaire en stimulant les métalloprotéinases matricielles qui mènent à une désorganisation de la paroi vasculaire (5,6).

2.1.2 Altérations mécaniques

L'augmentation de la synthèse de collagène et de la fragmentation de l'élastine mène à une diminution de la compliance et de la distensibilité artérielles qui représentent les indices mécaniques de la rigidité artérielle. La compliance artérielle représente le changement absolu du diamètre artériel pour un intervalle de pression donné tandis que la distensibilité artérielle représente le changement relatif du diamètre artériel pour une augmentation de pression. Ainsi, la distensibilité et la compliance artérielles permettent d'évaluer la capacité des artères à se dilater en réponse aux différentes pressions physiologiques. Évidemment, plus l'artère en question est rigide, plus sa capacité de se dilater en réponse à une pression est diminuée.

Un autre indice important est la vitesse de propagation de l'onde de pouls à travers un segment artériel. En clinique, la vitesse de propagation de l'onde de pouls entre l'artère carotide et l'artère fémorale est une mesure commune. Plus l'artère est

rigide, plus la vitesse de propagation de l'onde de pouls est grande puisque l'artère a perdu sa capacité de se dilater et d'ajuster la vitesse.

Finalement, une altération mécanique importante est l'altération du module élastique. Ce dernier est une mesure représentant les propriétés élastiques intrinsèques des vaisseaux. Plus précisément, le module élastique représente la relation entre la contrainte (le stress) de la paroi artérielle et la pression à laquelle l'artère est soumise. Ce module dépend majoritairement de la composition de la paroi vasculaire, c'est-à-dire le contenu relatif en élastine, collagène et cellules musculaires lisses, ainsi que des interactions entre ces différents éléments. Lorsque les artères deviennent rigides, leurs composantes élastiques se dégradent, les empêchant ainsi de se dilater efficacement (5).

2.1.3 Altérations du flux sanguin

Une autre conséquence importante de la rigidité artérielle est l'augmentation de la pulsatilité du flux sanguin. Les grandes artères élastiques, telles que l'aorte et l'artère carotide, jouent un rôle considérable dans la régulation de la pulsatilité sanguine. Lors de la systole, les grandes artères élastiques se dilatent pour accommoder le volume sanguin et ainsi servir de réservoir élastique. Lors de la diastole, ces artères propulsent le sang vers les vaisseaux périphériques. Cette fonction, aussi appelée l'effet de Windkessel, permet d'éviter une augmentation excessive de la pression artérielle, d'assurer la perfusion des organes périphériques lors de la diastole et de transformer le débit sanguin pulsatile en un débit continu évitant ainsi d'endommager

les organes. La rigidité artérielle altère ce processus physiologique. En effet, il a été démontré que l'augmentation de la rigidité des grandes artères élastiques diminue leur capacité à tempérer la pulsativité du flux sanguin résultant ainsi en une transmission du débit sanguin pulsatile vers différents organes (5, 12, 13). Les organes les plus sensibles à la pulsativité du flux sanguin sont notamment les reins et le cerveau. Ces derniers reçoivent une fraction importante du débit sanguin et sont continuellement perfusés, durant la systole et la diastole, exposant ainsi leurs vaisseaux à des fluctuations importantes du débit sanguin (12, 14).

2.2 Modèles animaux de rigidité artérielle

Afin d'étudier les effets ou les mécanismes qui sous-tendent le développement de la rigidité artérielle, différents modèles animaux ont été développés. Ces derniers se regroupent principalement en deux catégories. La première comprend des modèles animaux dans lesquels la rigidité artérielle est secondaire à une autre pathologie et la deuxième catégorie englobe les animaux dont la rigidité artérielle est induite par des interventions chirurgicales, génétiques ou chimiques (5).

2.2.1 Modèles spontanés

Chez ces modèles animaux, la rigidité vasculaire apparaît de manière spontanée et est souvent secondaire à un autre état comme le vieillissement et l'athérosclérose (5). Chez l'humain, autant que chez les rongeurs, un remodelage vasculaire se produit avec l'âge menant à une augmentation de l'épaisseur de la paroi des gros

vaisseaux ainsi qu'à une fragmentation de l'élastine (11). La rigidité peut également se développer parallèlement ou comme conséquence de l'hypertension qui est aussi étroitement associée au vieillissement. L'augmentation de la pression artérielle induit un remodelage vasculaire. À son tour, la rigidité artérielle contribue à augmenter la pression artérielle formant ainsi un cycle menant à une plus grande rigidité et aux différentes conséquences systémiques de l'hypertension (15, 16). En effet, les rats spontanément hypertendus présentent des artères avec des parois plus rigides et un module élastique réduit (17) et peuvent ainsi être utilisés pour étudier cette condition dans le cadre de l'hypertension.

Finalement, la rigidité peut se produire dans le contexte de l'athérosclérose, également associée au vieillissement, et qui se caractérise par des dépôts de plaques composés de triglycérides et de cholestérol. Ces derniers se déposent au niveau de la paroi vasculaire et altèrent la composition de la média en la calcifiant et en augmentant l'épaisseur intima-média. Malgré le fait que la rigidité artérielle ne semble pas corrélérer directement avec la formation des plaques, elle est néanmoins reliée à leur développement (5). Les autres conditions pathologiques associées au développement de la rigidité sont les maladies inflammatoires chroniques (18), ainsi que le diabète (19). Pour ce qui est du diabète, il est suggéré que l'hyperglycémie, la dyslipidémie et l'hypertension mènent à la résistance à l'insuline, au stress oxydatif, à la dysfonction endothéliale ainsi qu'à la formation des cytokines pro-inflammatoires et des produits de glycation avancée, tous des événements menant à l'augmentation de la rigidité de la paroi vasculaire (5). Finalement, cette dernière peut également se

développer dans les conditions d'ostéoporose (20) associée étroitement à la calcification artérielle (21).

2.2.2 Modèles chirurgicaux

Les modèles chirurgicaux comprennent d'abord l'induction de la rigidité par une ischémie. Ceci permet de répliquer les conditions lors d'un infarctus du myocarde ou encore des ischémies cérébrales en bloquant les artères, comme l'aorte ou l'artère carotide afin d'empêcher le flux sanguin d'aller vers le cœur ou le cerveau. Les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire sont irriguées par le sang provenant du lumen artériel et du vasa vasorum de l'adventice. Il a été montré que l'interruption de cette circulation sanguine induit une dégénérescence de l'adventice et une diminution de la conductance de la média, deux phénomènes qui sont associés à l'augmentation de la rigidité artérielle (22-24). Un autre modèle est le remplacement de l'artère, telle que l'aorte, par un tube rigide altérant ainsi de manière importante le flux sanguin (5).

2.2.3 Modèles génétiques

Pour ce qui est des modèles génétiques, les mutations des gènes contrôlant les composantes de la paroi vasculaire représentent les modèles les plus communs. Par exemple, les souris avec une délétion du gène codant pour l'élastine présentent une altération importante des propriétés élastiques des artères menant ainsi à leur rigidité et à l'hypertension (25). Un autre modèle de souris génétiquement modifiées est la

souris mgR/mgR qui est un modèle pour le syndrome de Marfan présentant une mutation dans le gène de la fibrilline, une protéine impliquée dans la formation de la fibre élastique. Ce modèle montre une augmentation importante de la rigidité aortique, ainsi qu'une dilatation aortique (5, 26). Un autre modèle intéressant est la souris avec une délétion du gène codant pour le récepteur de lipoprotéines à basse densité et exprimant le gène humain de l'apolipoprotéine B-100. Ces souris développent l'athérosclérose qui altère de manière significative les propriétés élastiques de la paroi vasculaire tel que décrit précédemment. Finalement, un modèle important est la souris avec une délétion du gène codant pour la protéine matrice Gla, protéine régulatrice de la calcification (27), qui développe une calcification artérielle importante menant à la rigidité artérielle (5, 28, 29).

2.2.4 Modèles chimiques

Les modèles chimiques représentent les modèles les plus utilisés pour étudier la rigidité artérielle. Les plus couramment utilisés sont ceux qui consistent à administrer aux animaux la vitamine D et la nicotine (30) ou encore la vitamine K et la warfarine (31). La vitamine D et la nicotine induisent une calcification des fibres élastiques de la média artérielle menant ainsi à leur fragmentation (30). La vitamine K et la warfarine inhibent la maturation de la protéine Gla qui est nécessaire pour empêcher la calcification de la média artérielle (31). Ces conditions mènent toutes à une diminution de la capacité élastique des artères (28) .

2.3 Calcification et rigidité artérielle

La calcification artérielle est un processus physiologique qui apparaît naturellement avec l'âge. Malgré le fait que la calcification artérielle a été découverte cela fait plus de 200 ans, son mécanisme d'action est encore peu connu (29). La calcification peut être présente soit au niveau de l'intima ou de la média des artères. Au niveau de l'intima, la calcification est associée au développement de l'athérosclérose et résulte de l'accumulation de lipides, de médiateurs inflammatoires ainsi que de la formation des plaques. Pour ce qui est de la calcification de la média, elle est plutôt associée au mécanisme du vieillissement et de l'artériosclérose (5). L'artériosclérose représente les changements subis par les artères en fonction de l'âge et qui contribuent de manière importante à la rigidité artérielle. La calcification de la média augmente aussi avec la présence de certaines pathologies telles le diabète et la néphropathie. La calcification vasculaire reliée au vieillissement est d'ailleurs spécifique aux artères et n'affecte pas les veines (5, 28). La calcification de la média se manifeste d'abord par une calcification des fibres d'élastine menant à leur fragmentation et qui peut ensuite progresser vers des dépôts plus importants de calcium occupant le centre de la média artérielle. De plus, les artères qui subissent ce genre de calcification se trouvent à être le plus souvent des artères avec un contenu élevé en élastine, comme l'aorte par exemple. Les mécanismes proposés pour expliquer cette calcification sont d'abord la dégénérescence des fibres élastiques et l'apoptose de cellules musculaires lisses dont les corps apoptotiques servent de matrice pour l'accumulation de cristaux de calcium (5, 28, 29, 32, 33). De plus, il a été montré que l'expression de certaines protéines comme la protéine

matrice Gla, qui permet d'inhiber la calcification, est diminuée. En effet, les souris avec une délétion du gène codant pour la protéine matrice Gla développent une calcification artérielle importante menant à la rupture des artères suivie de la mort soulignant l'importance de cette protéine dans le processus de calcification (5, 28, 29).

Fait intéressant, la calcification de la média est directement corrélée à l'augmentation de la rigidité artérielle (5, 32) tel que montré dans les modèles d'administration de la vitamine D et de la nicotine et de la vitamine K et de la warfarine (30, 31). De plus, les patients hypertendus ainsi que les patients avec une insuffisance rénale chronique montrent une augmentation de la vitesse de propagation de l'onde de pouls aortique corrélée à la calcification de l'aorte. D'ailleurs, chez ces patients, la calcification de la média artérielle est considérée comme un facteur de risque important pour les complications cardiovasculaires (28). Ainsi, ces données soulignent l'importance de la calcification artérielle dans le développement de la rigidité artérielle particulièrement à ce qui a trait aux grandes artères élastiques.

3. L'unité neurovasculaire

Le système nerveux central, composé du cerveau et de la moelle épinière, est responsable du traitement des informations de l'environnement externe. Plus précisément, le cerveau est composé de différentes unités fonctionnelles (Figure 2) qui remplissent diverses fonctions permettant la perception, le traitement et la réponse aux différents stimuli de notre environnement. Afin de remplir ces fonctions, chaque composante de l'unité neurovasculaire est essentielle.

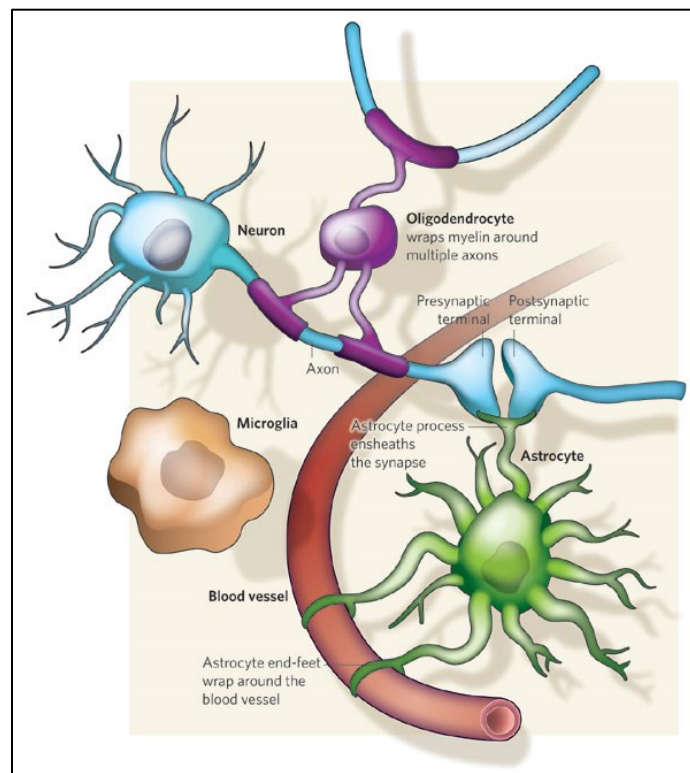


Figure 2. Composantes de l'unité neurovasculaire. Les composantes centrales de l'unité neurovasculaire sont les cellules vasculaires, les neurones et les cellules gliales comportant la microglie, les astrocytes et les oligodendrocytes (34).

3.1 Les neurones

Un neurone est formé d'un corps cellulaire, appelé le soma, suivi des dendrites et d'un axone (Figure 3). Le rôle principal du neurone est de transmettre l'information sous forme de signaux électriques et chimiques. Les dendrites sont responsables de recevoir l'information à travers les synapses tandis que l'axone constitue la partie du neurone qui transmet le signal électrique. Les neurones sont organisés sous forme de circuit ce qui leur permet de communiquer à travers les synapses qui sont des sites spécialisés de communication intercellulaire. Lors d'un dommage cérébral, certaines ou toutes les parties du neurone peuvent être affectées (34-37).

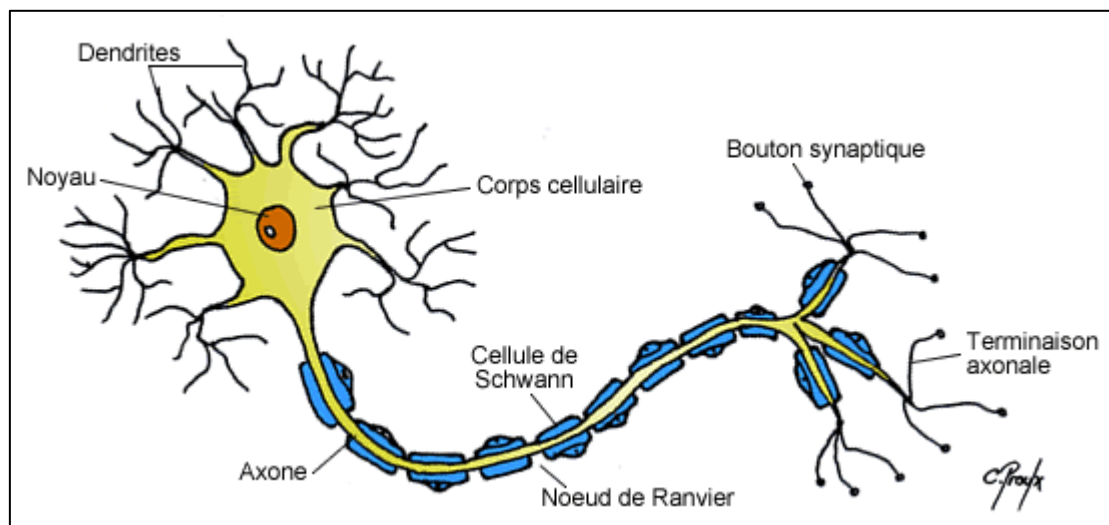


Figure 3. Structure d'un neurone. Un neurone est composé d'un noyau, du soma, des dendrites qui reçoivent l'information et d'un axone qui permet de transmettre l'information aux neurones avoisinants (38).

3.2 Les cellules gliales

Au niveau cérébral, le nombre de cellules gliales dépassent largement celui de neurones. Les cellules gliales ont été longtemps considérées uniquement comme des cellules de soutien, mais à part leur rôle de préservation de l'environnement adéquat pour les neurones, elles participent également à la neurotransmission et jouent un rôle important dans la défense immunitaire du cerveau. Il existe différents types de cellules gliales : la microglie, les astrocytes et les oligodendrocytes (34, 35, 37).

3.2.1 La microglie

Les cellules microgliales sont des cellules dérivées de la lignée hématopoïétique et sont considérées comme les cellules immunitaires résidentes du cerveau. Elles ne représentent qu'environ 10% de la population gliale, toutefois elles sont les principales cellules immunitaires effectrices du cerveau. Leurs rôles principaux sont d'assurer une surveillance continue de l'environnement cérébral afin de réagir lors de dommages ou d'infections ainsi que de débarrasser le système nerveux central des débris et des cellules mortes par phagocytose. Ce sont des cellules hautement dynamiques qui permettent de répondre rapidement à une infection ou une insulte cérébrale (34, 35, 37, 39-41).

D'un point de vue structurel, la microglie constitue des cellules ramifiées dont le corps cellulaire ainsi que les ramifications peuvent être visualisés à l'aide du marqueur Iba-1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1* ou protéine adaptatrice ionisée liant le calcium 1) exprimé spécifiquement au niveau de la microglie (40, 42,

43). La microglie peut être également identifiée, surtout lors d'un dommage, par des glycoprotéines telles que le CD68 (*cluster of differentiation* 68) qui joue un rôle dans la phagocytose (40).

3.2.2 Les astrocytes

Les astrocytes, caractérisés par leur forme étoilée, ont comme rôle de préserver le milieu chimique et ionique autour de neurones ainsi que leur fournir un support structurel qu'ils accomplissent en s'entrelaçant autour des neurones (34, 44). Ils peuvent participer à l'activité synaptique, en recyclant ainsi qu'en relâchant des neurotransmetteurs comme le glutamate (35, 45) et contribuent également au maintien de la barrière hématoencéphalique (41). De plus, ils sont une source d'énergie pour les neurones, un rôle qu'ils accomplissent grâce à leur proximité avec les vaisseaux sanguins (34, 44). Il existe deux types d'astrocytes, les astrocytes protoplasmiques qui se retrouvent au niveau de la matière grise cérébrale et les astrocytes fibreux qui se retrouvent au niveau de la matière blanche et également autour des vaisseaux (35).

Les marqueurs principaux et les plus utilisés des astrocytes sont le GFAP et le s100 β . Le GFAP (*glial fibrillary acidic protein* ou protéine acide fibrillaire gliale) est le composé principal des filaments intermédiaires qui se trouvent au niveau des astrocytes (46, 47). Le s100 β est une protéine liant le calcium qui se trouve principalement au niveau des astrocytes dans le système nerveux central (48, 49). Le s100 β a comme caractéristique de marquer plus spécifiquement les astrocytes

matures. La plupart des astrocytes expriment à la fois le GFAP et le s100 β , tandis que d'autres n'expriment que le s100 β (46, 50).

3.2.3 Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont d'abord responsables d'envelopper les axones avec de la myéline. Cette dernière influence la vitesse de conduction du potentiel d'action au niveau des axones (36, 37). De plus, lorsqu'un neurone est endommagé, les oligodendrocytes empêchent la croissance de l'axone, constituant ainsi un mécanisme de protection (37).

3.3 Circulation cérébrale

Le cerveau reçoit 14% du débit cardiaque total et est donc un organe hautement perfusé. De plus, le débit sanguin est sous contrôle étroit afin de répondre aux demandes métaboliques des neurones et ainsi préserver les neurones qui sont très sensibles à l'hypoxie. Ceci est accompli grâce à la structure et aux différentes fonctions des artères cérébrales. Tout d'abord, le flux sanguin arrive au cerveau par les artères carotides internes et les artères vertébrales qui joignent le cercle artériel au niveau cérébral nommé le polygone de Willis (Figure 4). À partir du polygone, le flux sanguin passe dans les artères cérébrales antérieures, postérieures et moyennes qui se divisent ensuite en artères piales puis en artérioles et capillaires.

Cet arrangement artériel cérébral permet de préserver la circulation sanguine et d'assurer la perfusion en tout temps. De plus, la grande densité des capillaires

présents au niveau du cerveau fournit un système d'échange hautement efficace permettant de répondre rapidement aux différentes demandes. L'acheminement de nutriments est contrôlé par la barrière hémato-encéphalique qui permet un passage libre aux molécules liposolubles telle l'oxygène, mais en bloquant le passage aux molécules qui ne sont pas liposolubles tel le glucose (1).

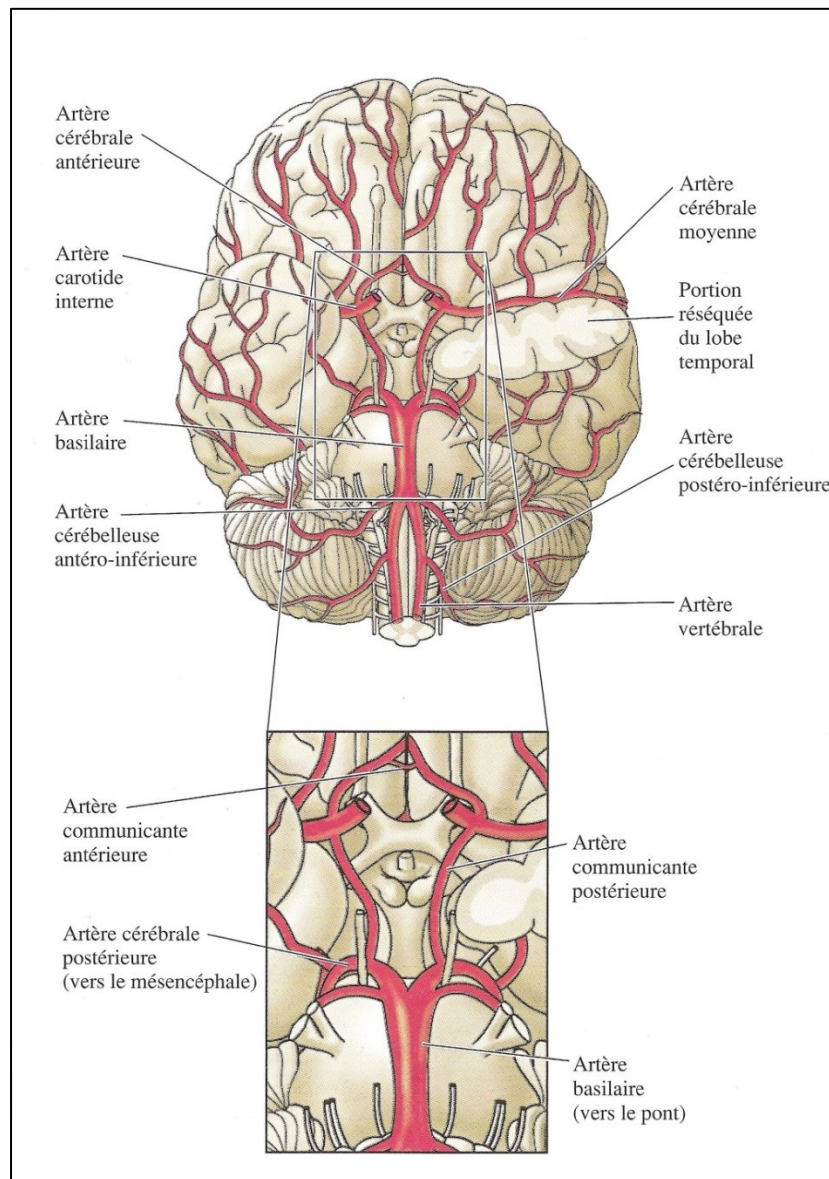


Figure 4. Polygone de Willis. Le polygone de Willis joint les artères carotides internes ainsi que les artères vertébrales, qui donnent lieu aux artères cérébrales antérieures, jointes par une artère communicante antérieure, et aux artères moyennes cérébrales. Les artères postérieures, recevant le sang principalement des artères vertébrales, donnent lieu aux artères communicantes postérieures (36).

4. Perturbations de l'homéostasie cérébrale

L'homéostasie cérébrale peut être altérée de différentes manières et en réponse à divers stimuli tels qu'une infection, une ischémie, un traumatisme crânien ou encore des stimuli plus discrets telle une augmentation du stress oxydatif ou des altérations du flux sanguin cérébral. Le cerveau répond d'abord par une inflammation cérébrale qui est caractérisée par une activation de la microglie et des astrocytes. Les dommages cérébraux peuvent mener à une dégénérescence neuronale ainsi qu'à des altérations cognitives dépendamment du type d'insulte et de la région cérébrale touchée.

4.1 Stress oxydatif

La théorie de l'accumulation des radicaux libres oxygénés lors du vieillissement a été avancée pour la première fois par Harman en 1956. Cette théorie indique que le vieillissement est un processus relié au dommage oxydatif au niveau des diverses molécules de l'organisme. Ce dernier est principalement causé par un déséquilibre entre la production de radicaux libres et la capacité anti-oxydante de l'organisme. La formation, la transformation et l'élimination des radicaux libres est au cœur des mécanismes qui sous-tendent le stress oxydatif (51).

4.1.1 Formation des radicaux libres

Les radicaux libres sont des substances très réactives et instables qui possèdent un électron non apparié et qui sont présents soit sous forme oxydée ou réduite. L'oxydation signifie le transfert d'électrons à un autre composé, ainsi une substance oxydée est une substance ayant perdue des électrons. Par opposition, la réduction désigne l'acceptation d'électrons et une substance réduite est une substance ayant acceptée des électrons (52). Les radicaux libres sont produits dans des conditions physiologiques et pathologiques et leur production dépend de plusieurs facteurs (51, 53). Les radicaux libres incluent les radicaux libres oxygénés, tels l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), les radicaux hydroxyl (OH^{\cdot}), peroxyde (RO_2^{\cdot}), alkoxy (RO^{\cdot}) et hydroperoxy (HO_2^{\cdot}). Les radicaux libres incluent également le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) et le dioxyde d'azote (NO_2^{\cdot}) représentant les radicaux libres d'azote. Les radicaux libres d'oxygène et d'azote peuvent être transformés en espèces réactives non radicales, telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux ($HOCl$), l'acide hypobromeux ($HOBr$) et le peroxynitrite ($ONOO^-$) (53).

Différents enzymes et composés sont responsables de la formation et de la transformation des radicaux libres, formant ainsi un processus complexe illustré à la Figure 5. L'oxygène est nécessaire pour la formation de toutes les espèces réactives et la mitochondrie est considérée comme la source principale de ces espèces. Tout d'abord, le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) est formé à partir de la L-arginine par la NO synthase (NOS). Il existe trois isoformes de cette enzyme : les NOS constitutives comprenant la NOS neuronale (nNOS) et la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS

inductible (iNOS). L'anion superoxyde est formé à partir de l'oxygène par l'intermédiaire de différentes enzymes. Ainsi, l'anion superoxyde peut être généré par : l'oxydation de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) par la NADPH oxydase, l'oxydation de la xanthine en acide urique par la xanthine oxydase, l'oxydation de NADH (nicotinamide adénine dinucléotide), NADPH et FADH₂ (flavine adénine dinucléotide) par la chaîne respiratoire de la mitochondrie, l'auto-oxydation des monoamines telles que la dopamine, la réduction de l'oxygène par le cytochrome P-450 et finalement par la réduction de l'oxygène par la nNOS ou eNOS. À partir de l'anion superoxyde, il y a formation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et du radical hydroxyl (OH[•]) produit à partir de H₂O₂ par la réaction de Fenton. Le radical hydroxyl est un des radicaux les plus nocifs pour l'organisme. Le NO[•] peut également réagir avec l'anion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène pour former le peroxynitrite (ONOO⁻) qui a un potentiel oxydant supérieur à l'anion superoxyde et au H₂O₂. Un autre oxydant puissant, le HOCl, est formé à partir du peroxyde d'hydrogène par la myéloperoxydase (MPO) (53).

La formation de ces radicaux libres peut mener à la peroxydation des lipides, une étape importante pouvant induire divers dommages. La peroxydation des lipides débute par la production du radical lipidique (L[•]) par le processus d'extraction d'un atome d'hydrogène des acides gras polyinsaturés par les espèces réactives. Ceci est suivi de la formation du radical peroxy lipidique (LOO[•]) par l'ajout d'oxygène au L[•] et de la formation de l'hydroperoxyde lipidique (LOOH) qui donne par la suite un radical alkoyle lipidique (LO[•]). Les radicaux libres peuvent également réagir avec les protéines et les acides nucléiques induisant également divers dommages (53).

L'élimination des radicaux libres se fait par l'intermédiaire d'enzymes ainsi que de composantes non-enzymatiques. La superoxyde dismutase, la glutathione, la glutathione peroxydase et réductase ainsi que la catalase constituent les principales enzymes qui permettent de convertir les radicaux libres d'oxygène et d'azote en substances non-radicalaires. De plus, la vitamine E et la vitamine C sont des antioxydants naturels qui permettent également l'élimination des radicaux libres (53).

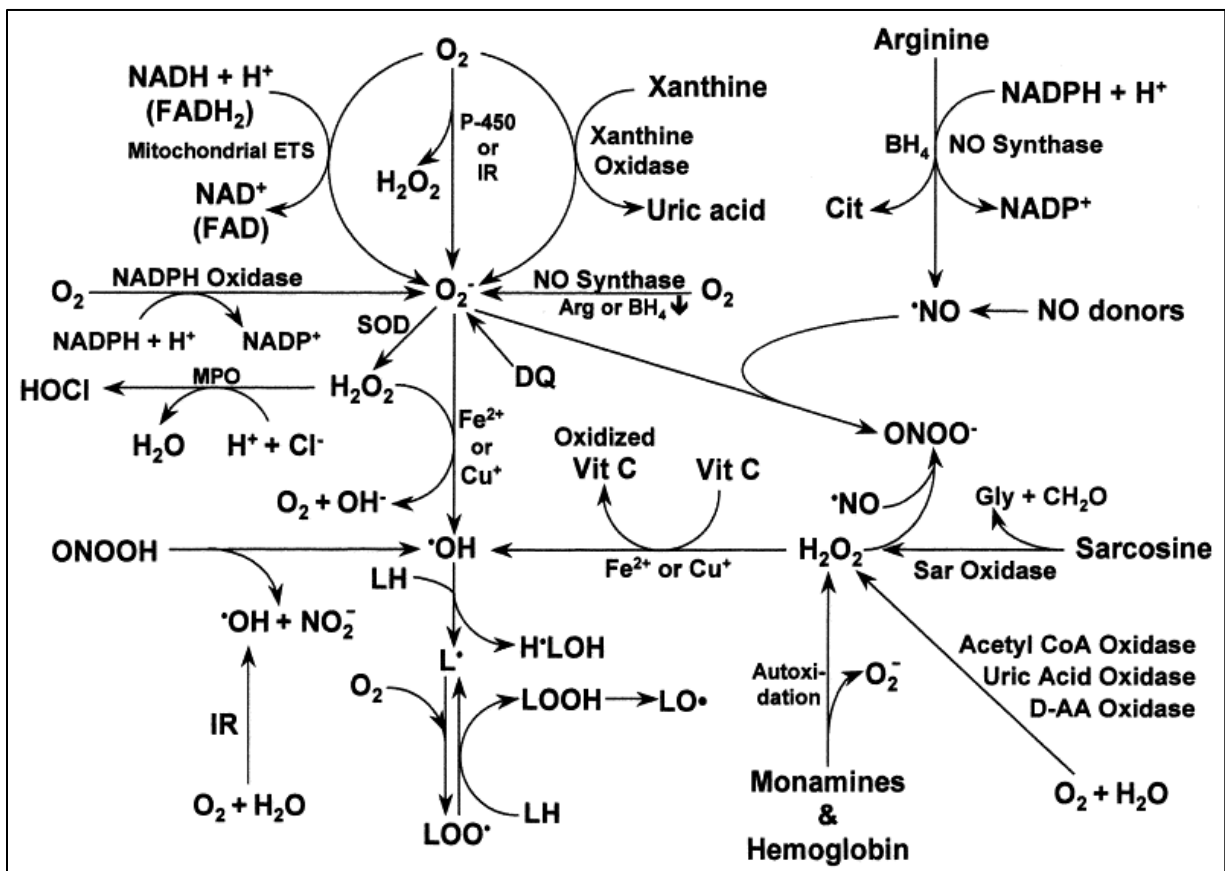


Figure 5. La production des espèces réactives d'oxygène et d'azote (53). AA : acide aminé; Arg : L-arginine; CH_2O : formaldéhyde; Cit : L-citrulline; DQ : diquat; Mitochondrial ETS : la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie; FAD : flavine adénine dinucléotide forme oxydée; $FADH_2$: flavine adénine dinucléotide

forme réduite; Gly : glycine; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène; HOCl : acide hypochloreux; H[•]LOH : radical lipidique hydroxyl; IR : irradiation; L[•] : radical lipidique; LH : lipide; LO[•] : radical alkoxyde lipidique; LOO[•] : radical peroxyde lipidique; LOOH : hydroperoxyde lipidique; MPO : myéloperoxydase; NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide forme oxydée; NADH : nicotinamide adénine dinucléotide forme réduite; NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme oxydée; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme réduite; NO : monoxyde d'azote; O₂^{•-} : anion superoxyde; [•]OH : radical hydroxyl; ONOO⁻ : peroxyde nitrite; P-450 : cytochrome P-450; PDG : glutaminase dépendante de phosphate; Sar : sarcosine; SOD : superoxyde dismutase.

4.1.2 Les fonctions des radicaux libres d'oxygène et d'azote

Les radicaux libres ont des effets autant nocifs que bénéfiques sur l'organisme. D'abord, ils participent à plusieurs processus physiologiques tels que la transcription des gènes et la transduction des signaux. Le monoxyde d'azote participe à plusieurs fonctions dont la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires, l'adhésion plaquettaire, l'angiogenèse, le maintien du tonus vasculaire, la neurotransmission et plusieurs autres (53, 54). De l'autre côté, les radicaux libres peuvent mener à l'oxydation des lipides, des acides aminés et de l'ADN induisant ainsi des dommages cellulaires. Une production excessive de radicaux libres de l'oxygène et une diminution de la capacité anti-oxydante de l'organisme induit des dommages cellulaires qui peuvent progressivement mener à une détérioration des fonctions physiologiques (51, 53).

4.1.3 Le stress oxydatif et le cerveau

Il est amplement reconnu que le vieillissement s'accompagne d'une augmentation du stress oxydatif dans l'organisme. Le cerveau est particulièrement susceptible aux effets des divers radicaux libres. Ceci est causé d'abord par la présence de quantités élevées d'acides gras polyinsaturés qui sont sensibles à la peroxydation surtout en présence de hauts niveaux d'espèces réactives oxygénées. Deuxièmement, les enzymes anti-oxydantes comme la glutathione peroxydase et la catalase ont une activité réduite au niveau cérébral. De plus, la capacité anti-oxydante du cerveau diminue davantage avec l'âge (51).

Le stress oxydatif est associé à plusieurs maladies, dont les désordres neurodégénératifs. Il a été montré que le stress oxydatif est relié à la formation des plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer (51) et qu'un traitement avec la vitamine E, un antioxydant, est bénéfique chez les patients souffrant de ce désordre (55, 56). De plus, dans la maladie de Parkinson, on observe une augmentation de la peroxydation des lipides, une oxydation de la dopamine ainsi qu'une augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN. Il a été également montré que la maladie de Parkinson présente une dysfonction du complexe I de la mitochondrie menant à des dommages oxydatifs au niveau des lipides et de l'ADN (51, 55). Cette dysfonction peut être induite par l'administration de MPTP (1-méthyle 4-phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine), un modèle animal de la maladie (51). En outre, des mutations au niveau du gène de la superoxide dismutase, l'enzyme d'élimination de l'anion superoxyde, ont été observées chez les patients souffrant de la sclérose latérale amyotrophique, une

maladie neurodégénérative des motoneurones (51, 55). Finalement, une production excessive de radicaux libres est également associée à la pathogénèse des accidents cérébrovasculaires (51). Ainsi, ces données indiquent que le stress oxydatif joue un rôle important dans la pathogénèse des divers dommages cérébraux.

4.2 La gliose

Lors de toute perturbation cérébrale, les premières cellules à répondre sont les cellules gliales qui réagissent par un mécanisme appelé la gliose (Figure 6) (35). Suivant l'insulte initiale, les cellules microgliales répondent rapidement par un mécanisme d'activation. La microglie est considérée comme un détecteur pathologique car elle s'active même en réponse à des changements subtils qui n'induisent pas de dommage structurel évident. L'activation de la microglie consiste en un changement de morphologie, une prolifération ainsi qu'une production de diverses cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β . La fonction primaire de la microglie est de protéger le système nerveux central de l'attaque initiale. Le début de l'activation de la microglie, la durée ainsi que l'ampleur de l'activation dépendent toujours du type de dommage cérébral (39, 57-59). L'activation de la microglie peut être détectée par une expression élevée du marqueur Iba-1, résultante d'une prolifération et d'une hypertrophie microgliales, ainsi qu'une expression plus élevée de CD68, marqueur de la microglie activée (40, 60).

Les astrocytes vont également répondre au dommage cérébral par une hypertrophie de leur corps cellulaire ainsi que par une prolifération cellulaire (35) qui

constitue un mécanisme appelé astrogliose. En fonction du dommage cérébral, la sévérité de l'astrogliose va changer. Une astrogliose modérée est une réponse à un dommage subtil à modéré et consiste principalement à une augmentation de l'expression du marqueur GFAP et une hypertrophie du corps cellulaire sans induire de prolifération. Une astrogliose avancée consiste en une hypertrophie et une prolifération cellulaires pouvant mener à la formation d'une cicatrice gliale (61).

Lors de perturbations au niveau cérébral, les cellules gliales vont faciliter la guérison. Toutefois, lors d'une activation prolongée, elles peuvent également nuire au rétablissement (36). Par exemple, une activation chronique de la microglie mène à une sécrétion continue des radicaux libres oxygénés ainsi que des médiateurs inflammatoires qui peuvent avoir un effet toxique sur les neurones (39, 57, 58). De plus, l'activation chronique de la microglie et des astrocytes est considérée comme un médiateur inflammatoire des maladies neurodégénératives car ces composantes participent activement au développement des dysfonctions neuronales ainsi que de la dégénérescence qui sont présentes dans les désordres comme la maladie d'Alzheimer (41, 62).

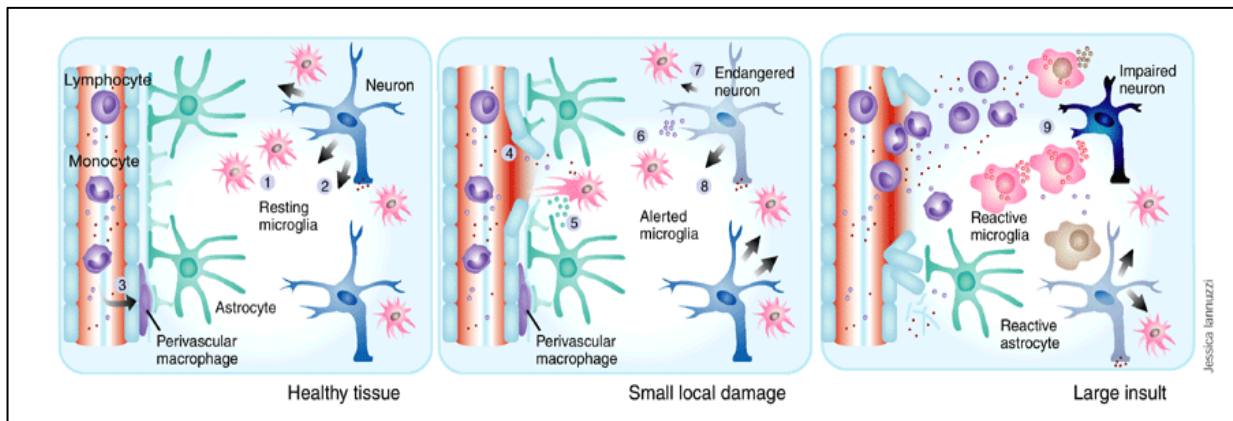


Figure 6. La gliose. Dans un tissu sain, les astrocytes et la microglie permettent de maintenir l'homéostasie cérébrale. Lors d'une insulte cérébrale, la microglie est la première à répondre en s'activant. Lors d'un dommage grave ou prolongé, la microglie et les astrocytes s'activent, sécrètent différents médiateurs inflammatoires et essaient de rétablir l'homéostasie cérébrale (63).

5. La cognition

Les divers dommages que peut subir le cerveau peuvent mener à des dysfonctions au niveau des structures cérébrales responsables de la cognition et de la mémoire et ainsi mener à des troubles cognitifs. Plusieurs composantes cardiovasculaires sont considérées comme des facteurs de risque pour le développement des troubles cognitifs et constituent des cibles potentielles pour la prévention des dysfonctions cognitives chez les personnes âgées (64, 65).

5.1 Structures cérébrales impliquées dans la cognition

Le système nerveux central est divisé en sept parties fondamentales qui sont traversées par des cavités appelées des ventricules: le pont, le bulbe et le mésencéphale représentant ensemble le tronc cérébral, la moelle épinière, le cervelet, le diencephale et les hémisphères cérébraux (Figure 7).

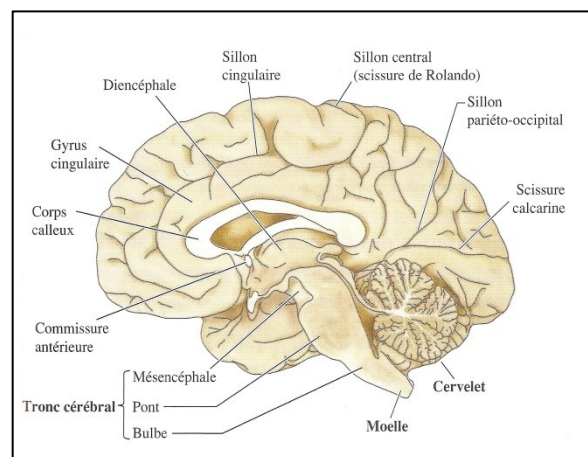
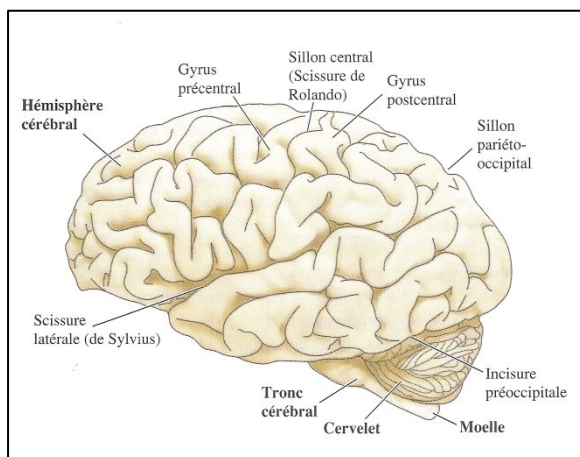


Figure 7. Les structures cérébrales. Le pont, le bulbe et le mésencéphale représentant ensemble le tronc cérébral, la moelle épinière, le cervelet, le diencephale et les hémisphères cérébraux constituent les parties principales du système nerveux central (36).

Le terme cerveau au sens strict représente le diencephale et les hémisphères cérébraux. Ces derniers sont constitués du cortex et contiennent plusieurs plis qui forment des structures nommées circonvolutions ou gyrus et qui sont divisées par des sillons. Les hémisphères cérébraux sont également divisés en quatre lobes, les lobes frontal, temporal, pariétal et occipital (Figure 8).

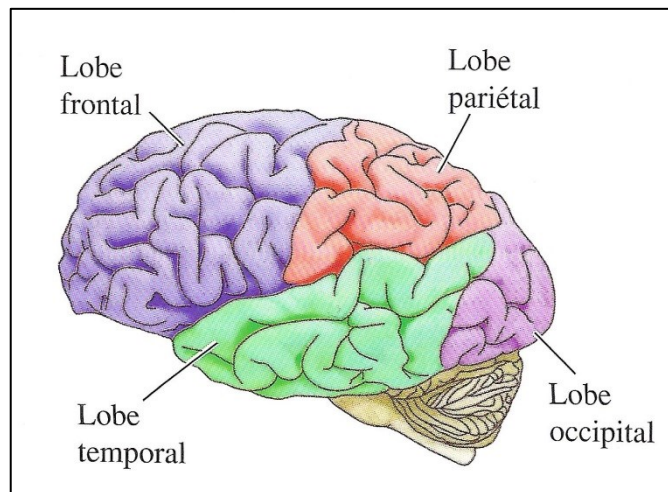


Figure 8. Les lobes cérébraux. Le cerveau est formé de quatre lobes : le lobe frontal, pariétal, temporal et occipital (36).

Une division importante, le sillon central, permet de séparer deux gyrus, le gyrus précentral contenant le cortex moteur primaire responsable du contrôle du mouvement et le gyrus postcentral contenant le cortex somesthésique primaire responsable de la

sensibilité du corps entier. Les hémisphères cérébraux sont également sous-divisés en d'autres structures dont l'hippocampe et l'amygdale qui jouent un rôle important dans la mémoire et les émotions, les ganglions de la base, importants dans les processus moteurs et cognitifs, le thalamus, important dans la transmission des informations sensorielles vers le cortex, ainsi que de multiples autres structures.

Pour ce qui est de la cognition, le cortex ou les aires associatives du cortex, constituant la partie superficielle du cerveau, sont responsables en partie des fonctions cognitives. En général, le cortex reçoit des afférences des cortex sensoriels et moteurs, du thalamus et du tronc cérébral qui transmettent l'information sur les sensations et sont responsables du contrôle du mouvement. Le cortex transmet les informations à l'hippocampe, aux ganglions de la base, au thalamus, ainsi qu'aux autres aires associatives. De plus, différentes parties du cortex ont des tâches qui leur sont spécifiques. Par exemple, le cortex pariétal est responsable de l'attention tandis que le cortex temporal est responsable de la reconnaissance et de l'identification des stimuli de l'environnement. Finalement, le cortex frontal permet d'intégrer les informations et de planifier le comportement en réponse aux différents stimuli (36, 37). Le système limbique est un système composé de plusieurs structures cérébrales responsables des fonctions de mémoire et d'apprentissage, de l'intégration des émotions ainsi que de la régulation du comportement et de la motivation. Le système limbique est composé d'abord du cortex limbique contenant la circonvolution cingulaire qui joue un rôle important dans l'intégration de l'émotion liée à la douleur. Les autres composantes du système limbique incluent l'amygdale, le noyau accumbens et l'hippocampe qui sont reliés aux corps mamillaires par le fornix. L'hippocampe est responsable de la mémoire

spatiale ainsi que de la mémoire à long-terme. L'hippocampe est également impliqué dans la dépression et est considéré comme la région cible pour le traitement des maladies avec troubles de mémoire comme la maladie d'Alzheimer (37).

La vascularisation de ces structures (Figure 9) dépend d'abord des deux sources majeures de la perfusion sanguine au niveau cérébral : les artères carotides internes et les artères vertébrales. Les artères carotides internes alimentent les artères antérieures cérébrales qui perfusent le cortex frontal et les artères orbitofrontales qui acheminent le sang vers le noyau accumbens. Les artères carotides internes donnent aussi naissance à l'artère moyenne cérébrale, qui perfuse le cortex frontal et les cortex pariétal et temporal. Les artères carotides internes acheminent le sang aux artères amygdaloïdes qui perfusent l'amygdale et aux artères thalamiques qui perfusent le thalamus. Les artères vertébrales alimentent les artères postérieures cérébrales qui perfusent plusieurs régions. Pour ce qui est de l'hippocampe, il est perfusé par les artères hippocampales dérivant de l'artère postérieure cérébrale, ainsi que par l'artère antérieure choroïde dérivant directement des artères carotides internes. Les artères postérieures perfusent aussi une partie du cortex et du thalamus (66).

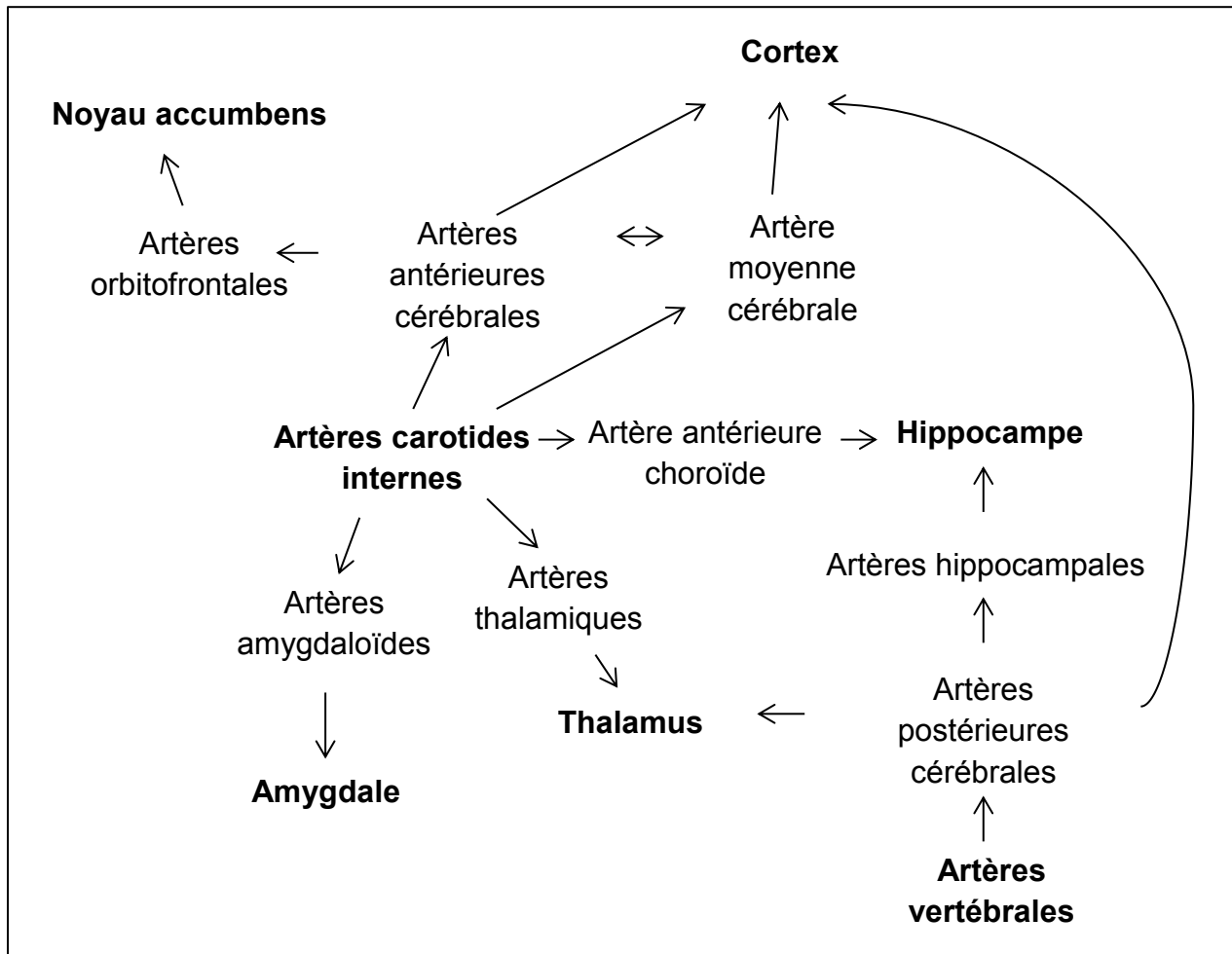


Figure 9. Vascularisation des structures cérébrales responsables de la cognition.

Les artères carotides internes et les artères vertébrales sont les artères principales responsables de la perfusion sanguine. Elles donnent naissance à diverses artères cérébrales qui perfusent le cortex, le noyau accumbens, l'amygdale, le thalamus et l'hippocampe.

5.2 Rigidité artérielle et cognition

5.2.1 Rigidité artérielle, facteur de risque pour les dysfonctions cognitives

De plus en plus d'études démontrent que la rigidité artérielle est un facteur de risque important pour le développement des dysfonctions cognitives chez la population âgée. Plusieurs études cliniques ont démontré qu'il existe une association étroite entre l'augmentation de la rigidité des artères élastiques centrales, déterminée par la vitesse de propagation de l'onde de pouls, et la diminution du fonctionnement cognitif chez les personnes âgées. Cette association est observée indépendamment de l'âge, du sexe, de la présence d'hypertension ou tout autre désordre cardiovasculaire (67-72). Ceci suggère que la rigidité artérielle peut influencer directement les structures cérébrales impliquées dans la cognition.

De plus, il a été montré que cette dernière est également associée à des anomalies de la substance blanche du cerveau qui sont reliées aux dysfonctions cognitives (72, 73). Les mécanismes derrière cette interaction sont encore peu connus. Il est largement reconnu que la rigidité artérielle mène à une augmentation de la pulsativité du flux sanguin et il a été suggéré que cette pulsativité est à l'origine du potentiel dommage cérébral. L'augmentation de la pulsativité du flux sanguin peut induire des dommages au niveau de la microvascularisation cérébrale qui est plus sensible et n'est pas protégée du flux pulsatile (12, 14, 68, 69, 71, 73). De plus, la pression pulsée, un indicateur de la rigidité artérielle, a été associée avec le développement des dysfonctions cognitives, de la démence ainsi qu'avec l'incidence des accidents cérébrovasculaires (71, 72). L'augmentation de la pression pulsée a été aussi reliée à un risque plus grand de

développement de la maladie d'Alzheimer (74). Ainsi, ces études suggèrent que la rigidité artérielle a des effets non négligeables sur l'homéostasie cérébrale et qu'un traitement des facteurs de risque reliés à la rigidité artérielle permettrait de protéger le cerveau et de prévenir les troubles cognitifs (71).

5.2.2 Étude des effets de la rigidité artérielle sur le cerveau

Malgré la présence de nombreux modèles de rigidité artérielle, à ce jour, aucun de ces modèles ne permet d'étudier les effets spécifiques de la rigidité artérielle sur le cerveau. Les animaux qui développent la rigidité artérielle dans le cadre de l'hypertension ou du vieillissement ne permettent pas de comprendre, de façon isolée, l'effet de la rigidité artérielle sur le cerveau. Les modèles chirurgicaux tel que le remplacement de l'artère par un tube rigide implique une interruption du débit sanguin cérébral durant la chirurgie menant ainsi à des altérations au niveau du cerveau (24, 75). Pour ce qui est des modèles qui consistent à administrer de la vitamine K et de la warfarine ou de la vitamine D et de la nicotine, ces traitements induisent également d'autres dysfonctions telle que l'hypertension systolique (5, 31). Le modèle de la vitamine D et nicotine induit aussi une hypertrophie ventriculaire gauche (30) et le modèle de la vitamine K et warfarine présente des signes de calcification cardiaque et une bradycardie qui peut conduire à une hypertrophie cardiaque (31). De plus, les vitamines D et K sont connues pour interagir avec le système nerveux central (76, 77). Pour ce qui est des modèles génétiques, la souris avec une délétion dans le gène codant pour l'élastine présente une augmentation de la pression artérielle, une sténose et une dilatation des vaisseaux. De plus, les souris homozygotes meurent dans les

quelques jours suivant leur naissance. Pour ce qui est des souris hétérozygotes (Eln +/-), elles présentent également une augmentation de la rigidité artérielle. Cependant, ces souris souffrent d'hypertension, de sténose aortique et présentent un remodelage artériel, tous des phénomènes pouvant influencer le cerveau (25). Pour ce qui est du modèle de syndrome de Marfan, en plus d'une rigidité artérielle, les souris présentent des complications cardiovasculaires ainsi que des anomalies oculaires et squelettiques (5, 26). Les souris souffrant d'athérosclérose ont aussi des niveaux élevés de LDL (lipoprotéine de basse densité), de cholestérol et de triglycérides (78) empêchant ainsi d'isoler la rigidité vasculaire.

6. Hypothèses et Objectifs

Malgré plusieurs corrélations entre la rigidité artérielle et les troubles cognitifs, le mécanisme par lequel la rigidité artérielle influence le cerveau n'est pas connu. De plus, à ce jour, aucun modèle animal ne permet d'étudier les effets spécifiques de la rigidité artérielle sur l'homéostasie cérébrale.

Ainsi, le premier objectif de l'étude est de développer un nouveau modèle animal de rigidité artérielle qui permettra l'étude spécifique de ce paramètre sur le cerveau. Afin de développer ce nouveau modèle, nous proposons d'adapter un modèle existant de calcification artérielle. Ce modèle consiste à appliquer du chlorure de calcium sur une artère afin de la calcifier et d'induire un anévrisme (79, 80). Le but de l'étude est donc d'exposer les artères carotides à des concentrations plus basses de chlorure de calcium afin d'induire une calcification artérielle sans induire un anévrisme ou d'autres effets telle que l'augmentation de la pression artérielle. L'hypothèse est que cette calcification artérielle va induire une rigidité de la carotide. Ainsi, les objectifs spécifiques sont de déterminer le niveau de rigidité artérielle en examinant les caractéristiques structurelles et mécaniques associées à cette condition.

Le deuxième objectif est d'utiliser ce modèle afin d'explorer les effets de la rigidité artérielle sur l'homéostasie cérébrale. L'hypothèse de l'étude est qu'une augmentation de la rigidité artérielle, induite par une calcification des carotides, augmente la pulsatilité du flux sanguin au niveau cérébral menant ainsi à une augmentation du stress oxydatif, une inflammation cérébrale et potentiellement aux dommages neuronaux. Ainsi, les

objectifs spécifiques sont d'évaluer : 1) l'accélération du flux sanguin entre chaque battement cardiaque (pulsatilité) au niveau cérébral; 2) le niveau de stress oxydatif par la production d'anion superoxyde; 3) l'inflammation cérébrale caractérisée par l'activation de la microglie et des astrocytes; 4) le rôle du stress oxydatif dans l'induction de l'inflammation cérébrale à l'aide du traitement avec un antioxydant (Tempol) et 5) la présence de la neurodégénérescence.

ARTICLE 1

Carotid calcification in mice: a new model to study the effects of arterial stiffness on the brain

Accepted for publication in the Journal of the American Heart Association (JAHA)

Nataliya Sadekova M.Sc.¹, Diane Vallerand B.Sc.¹, Edgar Guevara PhD², Frédéric Lesage PhD² and Hélène Girouard PhD¹

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

² Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Bélanger Est, Montreal, Quebec, Canada

Subject codes: 13, 66, 130, 97

Abstract

Background: Arterial stiffness has been identified as an important risk factor for cognitive decline. However, its effects on the brain's health are unknown and there is no animal model available to study the precise outcome of arterial stiffness on the brain. Therefore, the objective of the study is to develop and characterise a new model specific to arterial stiffness in order to study its effects on the brain.

Methods and Results: Calcium chloride (CaCl_2) was applied to carotid arteries of mice inducing an increase in collagen distribution and intima-media thickness, a fragmentation of elastin, a decrease in arterial compliance and distensibility and an increase in cerebral blood flow pulsatility (n=3 to 11). Calcium deposits were only present at the site of CaCl_2 application and there were no increase in systemic blood pressure or change in vessel radius making this model specific for arterial stiffness. The effects of carotid stiffness were then assessed in the brain. Carotid calcification induces an increase in production of cerebral superoxide anion and neurodegeneration, detected with Fluoro-Jade B staining, in the hippocampus (n=3 to 5), a key region for memory and cognition.

Conclusions: A new model of arterial stiffness based on carotid calcification was developed and characterized. This new model meets all the characteristics of arterial stiffness and its specificity allows the study of the effects of arterial stiffness on the brain.

Keywords: arterial stiffness, carotid, calcium chloride, brain

Non-standard Abbreviations and Acronyms

CaCl₂: calcium chloride

PFA: paraformaldehyde

DHE: dihydroethidium

CA1: cornu ammonis 1 area of hippocampus

CA3: cornu ammonis 3 area of hippocampus

DG: dentate gyrus area of hippocampus

OCT: optical coherence tomography

Introduction

Arterial stiffness is an important risk factor and a predictor of cognitive impairment and dementia in the elderly (1-3). It has been shown that central arterial stiffness, evaluated by pulse wave velocity between carotid and femoral arteries, independently of hypertension and other vascular factors, has an important impact on cognitive function in the aging population (4-6). Hence, these studies stress the need to better understand how arterial stiffness affects brain homeostasis in order to establish preventive interventions and treatments that will protect cognitive function in the elderly.

Although it is now well recognized that arterial stiffness could lead to end-organ damage, there is currently no animal model to study its effects on the brain. The existing animal models of arterial stiffness fall in two main categories. The first category includes animal models in which arterial stiffening is secondary to another condition such as aging and atherosclerosis, while the second one encompasses animals in which arterial stiffness is induced by chemical, surgical or genetic means (7). However, in all these models the proposed interventions can parallelly affect the brain. For example, the frequently used vitamin D/nicotine and vitamin K/warfarin models achieve arterial stiffness by arterial calcification (8-10). It is believed that vascular calcification directly induces arterial stiffness as it has been shown in these models as well as in hypertensive and diabetic patients (7). However, compounds such as vitamin D and K are known to directly interact with the central nervous system (11, 12). The surgical models of induction of arterial stiffness, such as ischemia and the replacement of an artery by a stiff tube, substantially decrease the cerebral blood flow during the surgery

which may thus affect the brain (13, 14). Finally, the genetic modifications specific to the extracellular matrix (elastin or fibrillin) or the ones inducing general arterial calcification are not specific to blood vessels or to a precise segment of the arterial tree, therefore affecting simultaneously many organ functions (15). Although all these animal models can be used to study arterial stiffness, they all lack an important feature which is the specificity for arterial stiffness. Moreover, arterial stiffness can also be accompanied by other confounding variables such as physiological changes induced by systemic high blood pressure, vessel stenosis leading to cerebral hypoperfusion, high levels of circulating lipids as well as heart calcification and bradycardia (7, 9, 16-19). Therefore, there is a need to develop a new model that would allow to study the precise outcome of arterial stiffness on brain's health.

Hence, we have developed a new murine model of arterial stiffness that has been adapted from an existing model of elastocalcinosis and aneurysm in which a periadventitial application of calcium chloride (CaCl_2) to the carotid artery or aorta induces calcification of elastic fibers (20-23). This is the first model allowing the study of the specific role of arterial stiffness on brain structure and homeostasis. Here, we show that periarterial application of CaCl_2 to carotid arteries induces arterial stiffness as shown by decreased compliance of calcified arteries, enhanced collagen distribution, fragmentation of elastin and increased intima-media thickness. Regarding the brain, this model exhibits an increase in cerebral blood flow pulsatility, increased superoxide anion production and neurodegeneration. Therefore, we demonstrate here that this new model of arterial stiffness can be used to assess the specific effects of carotid stiffening on brain's health.

Methods

Animals

Ten to twelve-week old male C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (Saint-Constant, QC, Canada) and housed individually in a temperature-controlled room with 12 hours light-dark cycles. Following acclimatization, the mice were divided into groups of 3 to 12 mice each before being treated for 2 weeks. The study was approved by the Animal Care and Use Committee of Université de Montréal and performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care.

Periarterial application of CaCl₂

Anesthesia was induced by placing mice in a closed chamber containing 5% isoflurane and 3 L/min of oxygen and maintained with a mixture of 1.5%-2% isoflurane and 1.5-2 L/min of oxygen. Throughout the surgery, the level of anesthesia was monitored by testing corneal reflexes and motor responses to tail pinch. Animal's temperature was maintained using a heating pad and the procedure was performed in sterile conditions. The incision site was sanitized with a solution of povidone-iodine and 70% isopropyl alcohol. An incision of approximately 1.5 cm was made and the trachea was exposed by carefully separating submandibular glands with sterile cotton swabs. Tissue hydration was maintained throughout the procedure with a sterile saline solution. The right common carotid artery was carefully isolated by sliding a small piece of sterile parafilm underneath it. A sterile cotton gaze soaked in 0.2 mol/L, 0.3 mol/L, 0.4 mol/L CaCl₂ or 0.9% NaCl (control) was placed directly on the carotid artery for 20 minutes. The gaze was then removed and the incision was closed using 6-0 silk stitches and

tissue glue Vetbond. The entire procedure lasts 40 minutes. The discomfort caused by the incision was prevented by the administration of Bupivacaine hydrochloride (Marcaine, 4 mg/kg subcutaneous injection at the site of the incision) and Carprofen (Rimadyl, 5 mg/kg subcutaneous injection) immediately after surgery. In addition, Carprofen (5 mg/kg subcutaneous injection) was administered every 24 hours for 2 days following surgery. Infections were prevented by the administration of Trimethoprim Sulfadiazine (Tribrissen, 30 mg/kg subcutaneous injection) immediately after surgery and every 24 hours for 3 days. The calcification of both carotid arteries at the same time was tested but discontinued because of the high rate of mortality.

Carotid artery histological assessment

Carotid arteries were embedded in paraffin, cut on a microtome (10 µm) and processed for Von Kossa and Masson's Trichrome stains (Histology core facility of the Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada). Images were acquired with a Leica DM200 microscope (40X magnification). Carotid intima-media thickness was measured in arteries stained with Masson's Trichrome. Carotid sections were deparaffinised and used to detect the presence of macrophages by immunofluorescence using the rat anti-mouse macrophages/monocytes antibody (MOMA-2) coupled to Alexa Fluor 647 (AbD Serotec, Raleigh, NC) (24, 25). To assure uniformity of the immunolabel, sections from all groups were processed together. Elastin distribution was determined by autofluorescence using an Olympus laser scanning confocal microscope (488 nm excitation/550-600 nm emission). Image acquisitions were performed with the same fluorescence settings in all

cases with a computer-controlled digital camera. Data were expressed in arbitrary fluorescence unit.

Carotid compliance studies

Compliance was measured in passive conditions to reflect mechanical properties of the vascular wall. Carotid arteries were mounted on a pressure myograph (Living Systems Instrumentation, Burlington, Vermont) and pressurized at 60 mm Hg. Diameter changes were measured by video microscopy from 60 to 180 mm Hg with 20 mm Hg steps in a Ca²⁺-free physiological salt solution (PSS, pH 7.4, mmol/L: 130 NaCl, 4.7 KCl, 1.18 KH₂PO₄, 1.17 MgSO₄, 14.9 NaHCO₃, 0.023 EDTA, and 10 glucose) containing 1 mmol/L EGTA to abolish myogenic tone and to uniquely assess the mechanical properties of the arteries (19, 26). The initial diameter, at 60 mm Hg, was noted to assess carotid's radius. The circumferential wall strain (%) was determined by $(D - D_{\text{initial}}) / D_{\text{initial}}$ where D is the diameter at a given pressure and D_{initial} mm Hg is the initial diameter at 60 mm Hg. The incremental distensibility (%/mm Hg) was determined by $(D_1 - D_0) / (D_1 \times \Delta P) \times 100$ where D₀ and D₁ are the internal diameters before and after pressure increment respectively and ΔP is the change in pressure (20 mm Hg) (19). The β index of stiffness was determined by $\beta = \ln(P_s/P_d) / (D_s - D_d) / D_d$ where P_s and P_d are the in vivo systolic and diastolic pressures and D_s and D_d are the carotid diameters corresponding to these pressures (27).

Flow pulsatility studies

Doppler optical coherence tomography (OCT) was used to measure blood flow changes in different areas of the brain. Two weeks following periarterial application of 0.3 mol/L CaCl₂ or 0.9% NaCl (control), the mice were anesthetized with urethane 10% weight/volume (200 µl/10 g) and placed in a stereotaxic stage (Harvard Apparatus, Holliston, MA). A total of 22 mice were studied, 11 for each group. Mice body temperature was maintained using a heating pad (MouseSTAT, Kent Scientific, Torrington, CT) and heart rate and temperature were carefully monitored throughout the experience. Following removal of the skin, the brain was exposed and the imaging was performed over frontal and temporal lobes. For each mouse, between 4 and 6 vessels were imaged under the OCT system. For each artery, two perpendicular B-mode scans were performed and the blood speed profile was obtained during a single cardiac cycle. Two pulsatility metrics were obtained from the cardiac cycle profile of each slice. First, the relative blood speed increase from the minimum speed to the maximum and second, the blood speed variability, defined as the standard deviation divided by the mean. Vessel diameter was estimated as the smallest cross section of the vessel measured in both perpendicular scans (28).

Blood pressure assessment

Blood pressure was monitored by a non-invasive volumetric tail-cuff method (Coda Kent Scientific Corporation, Torrington, CT) every four days from the day of surgery until the end of the 2 weeks treatment. Mice were placed on a heating platform for 10 to 15 minutes before assessment of blood pressure. A minimum of 5 measurements were

taken until the blood pressure stabilized and a minimum of 10 measurements were taken per mouse. The measurements were taken at the same time of the day.

Dihydroethidium staining

Frozen brains were cut on a cryostat (20 μm) and sections were stained with fluorescent-labeled dihydroethidium (DHE) solution (2 $\mu\text{mol/L}$, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Images were acquired using an epifluorescence microscope Leica DM200 (40X magnification) with the same fluorescence settings. Analysis of relative fluorescence was achieved using Image J software (version 1.47, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Fluoro-Jade B staining

The method was adapted from Schmued et al. (29). Briefly, frozen brain sections were immersed in 0.06% potassium permanganate followed by Fluoro-Jade B 0.0008% solution (Millipore, Temecula, CA) in 0.1% acetic acid vehicle. Images were acquired with an epifluorescence microscope Leica DM200 (40X magnification) with the same fluorescence settings. Analysis of percentage of the total area occupied by Fluoro-Jade B positive cells was achieved using Image J software (version 1.47, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm standard error of mean. Multiple comparisons were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post-hoc analysis

and two-group comparisons of independent samples were analyzed by unpaired Student's two-tail t test. Analysis was achieved using GraphPad Prism 5.01 (La Jolla, CA). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Periarterial application of CaCl₂ to carotid arteries modifies their composition

To assess the efficiency of periarterial application of CaCl₂ to induce calcium incorporation into the vasculature, the presence of calcium deposits was confirmed by Von Kossa stain. As shown in Figure 1, periarterial application of 0.3 mol/L and 0.4 mol/L CaCl₂ induces formation of calcium deposits (black spots in the carotid tissue) as compared to control 0.9% NaCl where the tissue remains intact (Fig. 1 A). These calcium deposits were observed only in the carotid artery area where the calcium soaked gaze was applied (data not shown). To assess histological characteristics of arterial stiffness, collagen and elastin distribution were evaluated. Application of CaCl₂ increases collagen deposits for all of the CaCl₂ doses but more considerably for the higher doses of 0.3 mol/L and 0.4 mol/L (Fig. 1 B). As for elastin, visualised by autofluorescence, a fragmentation of elastin is observed for 0.3 mol/L and 0.4 mol/L of CaCl₂ (Fig. 1 C). Finally, periarterial application of CaCl₂ induces an infiltration of macrophages (Fig. 1 D) indicating the presence of inflammation at the sites where CaCl₂ was applied. These effects were observed at 2 weeks following carotid calcification. This time point was chosen due to the fact that at 1 week following CaCl₂ application, no difference in collagen or elastin distribution was observed compared to controls and at 3 weeks, calcium deposits and collagen increases tended to resorb (data not shown).

Periarterial application of CaCl₂ increases the intima-media thickness of carotid arteries without affecting its radius

To evaluate the geometric properties of arterial stiffness, carotid radius and its intima-media thickness were measured. CaCl₂ application induces a significant increase in intima-media thickness for all doses of CaCl₂ with higher increases observed for higher doses of 0.3 mol/L and 0.4 mol/L CaCl₂ (Fig. 2 A, p<0.05). However, the arterial radius was not altered by CaCl₂ treatment (Fig. 2 B).

Carotid calcification decreases carotid compliance and distensibility

To evaluate mechanical properties of arterial stiffness, carotid compliance and distensibility were determined. Compared to controls (0.9% NaCl), carotid arteries subjected to periarterial application of 0.3 mol/L and 0.4 mol/L CaCl₂ are less compliant, as illustrated by a decrease in circumferential strain for pressures varying from 100 to 180 mm Hg (Fig. 3 A, p<0.05). Moreover, carotid calcification induces a significant decrease in incremental distensibility between 60 and 100 mm Hg for the doses of 0.3 mol/L and 0.4 mol/L (Fig. 3 B, p<0.05). Finally, periarterial application of 0.3 mol/L and 0.4 mol/L CaCl₂ induces an important and significant increase in β index, an index of arterial stiffness, compared to controls (0.9 % NaCl) (Fig. 3 C, p<0.05). Overall, these data indicate an increase in carotid stiffness induced by carotid calcification.

Carotid calcification increases cerebral blood flow pulsatility

Upstream blood flow pulsatility, also an important component of stiffness in large arteries, was assessed in the brain by measuring blood speed increases in different arterial segments. Based on histological and mechanical assessment of arterial stiffness, the dose of 0.3 mol/L CaCl₂ was chosen as an optimal dose to induce carotid artery stiffness. For analysis, vessels were divided in 2 groups: medium-sized arteries with a diameter less than 95 μm and large arteries with a diameter higher than 95 μm. Hence, carotid stiffness induced by its calcification significantly increases blood flow pulsatility in upstream medium-sized arteries with a diameter varying from 50 μm to 95 μm and in large arteries with a diameter over 95 μm (Fig. 4 A, p<0.05). In medium-sized arteries, blood speed increase changes from 17.2% for the control group (0.9% NaCl) to 23.1% for the CaCl₂ group. As for the large arteries, blood speed increase evolves from 15.1% for the control to 18.7% for CaCl₂ group. Moreover, the right side of the brain corresponding to the right common carotid artery that was calcified shows a significant increase in blood speed, shifting from 16.9% for control to 23.5% for CaCl₂ group (Fig. 4 B, p<0.05). The left side of the brain corresponding to the intact carotid artery shows a non-significant increase in blood speed (Fig. 4 B). As for the specific regions of the brain, carotid calcification induces a significant increase in blood speed in the middle cerebral artery and its branches, measured in the parietal cortex (Fig. 4 C, p<0.05), while there is no significant increase in blood speed observed in the vessels of the somatosensory cortex (Fig. 4 D). These data show that the carotid stiffness-induced increase in cerebral blood flow pulsatility differs according to the different arterial segments and probably depending on the distance.

Blood pressure assessment

To alleviate the possibility that the effects of carotid stiffness observed in the brain are related to increased systemic blood pressure and its associated physiological responses, systolic blood pressure was measured every 4 days from the day of surgery until the end of the treatment (Table 1). As shown, before surgery (day 0), the pressure is similar between controls (0.9% NaCl) and different groups of CaCl₂. The blood pressure remains stable without any increase during the whole treatment period (14 days) indicating that CaCl₂ does not alter blood pressure.

Carotid stiffness, induced by its calcification, increases superoxide anion production in the hippocampus

Next, we sought to determine whether arterial stiffness alters brain homeostasis. Therefore, superoxide anion levels were quantified to evaluate the degree of oxidative stress present in the brain. As shown, carotid stiffness induces a significant increase in superoxide anion production, a reactive oxygen specie, for the dose of 0.3 mol/L CaCl₂ in all regions of the hippocampus, cornu ammonis 1 and 3 (CA1 and CA3) and dentate gyrus (DG) (Fig. 5, $p < 0.05$). An increase in superoxide anion levels is also noted for the doses of 0.2 mol/L and 0.4 mol/L in CA1 and DG regions of the hippocampus (Fig. 5 B, $p < 0.05$). The left and right side of the brain were compared for superoxide anion levels and no side-to-side difference is observed (Fig. 5 C). As for the cortical areas of the brain, such as the frontal and somatosensory cortices, no increase in superoxide anion production is found (data not shown).

Fluoro-Jade B staining reveals presence of neurodegeneration

The increased oxidative stress in the hippocampus suggests that neurons might also be affected. The presence of degenerative neurons was assessed with Fluoro-Jade B stain. Periarterial application of CaCl_2 induces neurodegeneration in CA1 region of the hippocampus, as shown by increases in the percentage of area occupied by Fluoro-Jade B positive cells, for the doses of 0.3 mol/L and 0.4 mol/L CaCl_2 compared to controls (Fig. 6, $p < 0.05$). No difference is observed between the sides of the brain, left or right hemisphere (data not shown). The presence of degenerative neurons is specific to a sub-area of CA1 region called lacunosum moleculare. Moreover, the dose of 0.3 mol/L displays more degenerative neurons than the dose of 0.4 mol/L. No neurodegeneration was found in the cortex or in other regions of the hippocampus, such as DG and CA3 (data not shown).

Discussion

Studying the effect of arterial stiffness on brain's health has been difficult due to the lack of good animal models. In the present study, we developed a new model that meets all the characteristics of arterial stiffness in large arteries without any unspecific effects such as global brain hypoperfusion or increased systemic blood pressure. This new model, induced by application of CaCl_2 to carotid arteries of mice, displays increased arterial collagen deposition and intima-media thickness as well as elastin fragmentation leading to decreased arterial compliance. This model also exhibits an altered brain homeostasis. Indeed, the study of the cerebral effects shows increased cerebral blood flow pulsatility and increased oxidative stress accompanied by neuronal damage.

Recently, arterial stiffness has been shown to be an important predictor of cognitive decline in the elderly, as well as an independent predictor of stroke (1-6). Therefore, its effect on brain homeostasis needs to be further explored. To allow this kind of study, an efficient model of arterial stiffness needed to be developed in order to study the precise outcome of arterial stiffness on the brain without any interaction with other cardiovascular factors. Hence, we developed a new model of arterial stiffness based on the calcification of carotid arteries in mice. Carotid arteries were chosen due to their proximity to the brain as well as studies that show that carotid atherosclerosis is an important predictor of stroke and that the role of carotid stiffness in cerebrovascular function needs to be further examined (7, 30).

The new model was characterized based on different characteristics of arterial stiffness. First, the efficiency of the periarterial application of CaCl_2 to carotid arteries was confirmed by calcium deposits at higher doses of CaCl_2 . It is important to note that these calcium deposits were only present at the site of the application of the calcium soaked gaze. Therefore, the calcification of carotid arteries did not affect the entire arterial segment and is concentrated at the site of carotid injury as opposite to other models such as vitamin D/nicotine model which lacks specificity for a particular arterial segment (8). The anatomical characteristics of arterial stiffness were confirmed by increased collagen deposition, especially for the doses of 0.3 mol/L and 0.4 mol/L CaCl_2 . Collagen increases wall thickness which contributes greatly to arterial stiffness (7, 31). Elastin may be fragmented or its content reduced in stiff arteries. Moreover, it has been shown that direct calcium deposition on arteries induces elastin fragmentation at the site of calcium deposits (21). Indeed, in our model, elastin fragmentation can be seen at the sites of calcium deposits for the higher doses of CaCl_2 . Elastin distribution remains intact for the rest of the artery wall where calcium deposits are absent. Moreover, the periarterial application of CaCl_2 induces an increase in macrophages infiltration leading to local inflammation, also a component of arterial stiffness (32). Two weeks were chosen as an optimal follow up time as it is at that period that calcium deposits were clearly distinct and collagen and elastin distribution were significantly altered. At three weeks, these effects began to resorb. This is a limitation in this model for the study of more chronic effects on the brain.

To further characterise arterial stiffness, the geometry of carotid arteries was evaluated. Carotid calcification increases the intima-media thickness without affecting

its radius. It has been shown that common carotid intima-media thickness is strongly correlated with the risk of stroke (7). Therefore, this model encompasses different components of arterial stiffness related to increased risk of cerebrovascular events. As the carotid artery radius remains unchanged, this indicates that the doses of CaCl₂ used do not induce aneurysm as in previous models of periadventitial application of higher doses of CaCl₂ (20, 23) and that the effects observed in the brain are due particularly to the induced stiffness rather than global brain hypoperfusion. However, it does not exclude the possibility that the cerebral blood flow is altered at the level of arterioles or capillaries. Hence, an assessment of cerebral blood flow would be interesting in order to examine this possibility.

To further confirm that the carotid arteries are stiff, its mechanical properties were assessed. Carotid arteries show a decreased arterial compliance, indicating that the calcified arteries do not dilate as much as controls especially at higher pressures (100 to 180 mm Hg). The calcified carotids also show decreased distensibility, which represents the relative diameter change for a pressure increment. Hence, these data confirm that periarterial application of CaCl₂ induces carotid stiffness. Moreover, carotid stiffness increases β index which is a common clinical marker used to assess arterial mechanical properties and is considered, with intima-media thickness measurement, as an early marker and predictor of atherosclerosis (33). Moreover, Jurasic et al. conducted a study in order to measure β stiffness index in young and elderly population with no serious cardiovascular conditions. The study shows that the elderly population (65-75 years) has a β index approximately 1.6 times higher than the young population (25-35 years). By comparing this to mice, the control group of adult mice (0.9% NaCl)

corresponds to the young population. As data shows, the group of mice with calcified and stiffened arteries (0.3 mol/L and 0.4 mol/L CaCl₂) has a β index approximately 1.6 times higher than the control group. This indicates that, based on β stiffness index, this new animal model of arterial stiffness may clinically relate to a population of 65 to 75 years old. Therefore, based on histological and mechanical assessment of arterial stiffness, the dose of 0.3 mol/L CaCl₂ was chosen as the optimal dose to induce arterial calcification leading to its stiffness. Arterial stiffness can also be influenced by functional components such as smooth muscle reactivity mediated by nitric oxide and sympathetic innervation. However, vasoconstrictor tone exerted by the smooth muscle cells as well as the endothelial function is much less important in a conduit artery such as the carotid (34). Indeed, in conduit arteries, structural factors dominate over functional ones in determining arterial stiffness, because the smaller amount and different arrangement of smooth muscle in the wall may not exert significant influence on vessel diameter and distending pressure. In addition, arterial stiffness can be often accompanied by a narrowing of the lumen caused by vascular remodelling or atherosclerotic plaques and also by effects on systolic blood pressure. However, many studies also demonstrated that some individuals can present high arterial stiffness which is not accompanied by systolic hypertension (35-37). Hence, the global clinical application of this study is to find a parameter that occurs before increases in blood pressure and that can be acted upon to reduce the risk or to prevent the effects on the brain (38).

A third important component of arterial stiffness is the increased blood flow pulsatility. More specifically, large elastic arteries, such as the carotid and aorta, regulate pulsatile flow in order to maintain the integrity of the microvasculature. When

these arteries become stiff, their capacity to dampen pulsatile flow is reduced. There is a growing number of evidence showing that increased large artery stiffness induces excessive flow pulsatility that contributes to dysfunction especially in the brain and kidneys that represent high blood flow organs and which are more sensitive to excessive flow pulsatility (39-41). Our data shows that carotid stiffness induces an increase in blood flow pulsatility in the brain; it affects medium-sized and large arterial segments. Moreover, the side of the brain corresponding to the carotid artery that was calcified shows a more important increase in flow pulsatility as opposed to the side of the brain corresponding to the intact carotid. These results are compatible with the principle that flow pulsatility decreases with the distance from the central arteries (42). Heart rate was monitored during the procedure and did not differ between the control group and the group with carotid calcification. Blood pressure was assessed to confirm that the increased blood flow pulsatility seen in the brain is not due to increased systemic blood pressure. As data shows, blood pressure remains constant among control and mice that received CaCl_2 application, indicating that carotid stiffness is the only factor contributing to increased flow pulsatility in the brain. This also adds to the strength of this new model; carotid calcification induces arterial stiffness without affecting systemic blood pressure which can trigger many neuronal and hormonal responses, therefore isolating arterial stiffness in order to study its effects on the brain.

Previous studies showed that blood flow pulsatility induces an increase in oxidative stress which is the first step of potential damage (43, 44). Therefore, the levels of superoxide anion were determined in different brain regions. Data shows that carotid stiffness induces a significant increase in the production of superoxide anion in all

regions of the hippocampus. The presence of increased oxidative stress in the hippocampus suggests that brain homeostasis is disturbed and that neurons might be affected. To assess more precisely the potential neuronal damage, the presence of neurodegeneration was determined. Indeed, carotid calcification induces neurodegeneration in the hippocampus. Interestingly, the presence of degenerative neurons is specific to a sub-area of CA1 region called lacunosum moleculare. This region contains interneurons that integrate signals between entorhinal cortex and CA1 region of the hippocampus which are important for episodic and spatial memory. It has been shown that entorhinal neurons that project to the hippocampus are among the first cells that are affected in Alzheimer's disease (45). However, the effect on oxidative stress and neurons is absent in the frontal and in the somatosensory cortices. These results are also compatible with the observation that the pulsatility decreases with the distance from central vessels (42) and could also explain why no differences in oxidative stress was observed between right and left sides of the hippocampus. Indeed, although the increased pulsatility induced by carotid calcification was generally lower in the left hemisphere, this was measured in the cortex and as the pulsatility decreases with the distance, this difference between the two sides is probably much less significant in regions close to the large arteries of the brain. Moreover, it has been shown that changes in cerebral arterial properties, such as the ones occurring during arteriosclerosis, lead mainly to damage in vessels located closer to the main arteries that perfuse the brain. Hence, the central regions of the brain are more affected by these changes (46), thus making regions such as the hippocampus and amygdala more vulnerable to damage compared to regions located at a greater distance such as the

cortex. Indeed, a strong correlation between regions of high pulsatile stress and decreased hippocampal volume has been observed (42). These results are also compatible with those in Alzheimer disease patients in which the spatial distribution of grey matter loss correlates with regions of high perfusion rates and proximity of large arteries (47). Moreover, due to their high metabolism, hippocampal cells, especially in CA1 region, are considered to be a more vulnerable cell population in response to vascular dysfunctions making it more prone to damage induced by carotid calcification (48). Overall, these data indicate that arterial stiffness, induced by carotid calcification, affects the brain and that this new model should be used to further study this aspect.

In conclusion, we have developed a new model of arterial stiffness based on the calcification of carotid arteries in mice. This model exhibits the essential characteristics of arterial stiffness in large arteries which are: 1) an increase in collagen distribution and in intima-media thickness as well as elastin fragmentation, 2) a decrease in arterial compliance and distensibility and 3) an increase in cerebral blood flow pulsatility. Regarding the brain, carotid stiffness induces an increase in oxidative stress and neurodegeneration in the hippocampus. This new model indicates that arterial stiffness may play an important role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases and that this new model may be used to study the precise outcome of arterial stiffness on brain's health.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Pierre Moreau, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal for critical review of the manuscript.

Sources of funding

This study was supported by the Heart and Stroke Foundation, Fonds de la recherche en santé du Québec, the Canadian Foundation for Innovation and the Canadian Institutes of Health Research. Hélène Girouard was also the holder of a new investigator award from the FRSQ and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC). Nataliya Sadekova is a recipient of master degree scholarship from Société Québécoise d'Hypertension Artérielle.

Disclosures

None.

References

1. Rabkin SW. Arterial stiffness: detection and consequences in cognitive impairment and dementia of the elderly. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2012;32(3):541-9. Epub 2012/08/14.
2. Triantafyllidi H, Arvaniti C, Lekakis J, Ikonomidis I, Siafakas N, Tzortzis S, et al. Cognitive impairment is related to increased arterial stiffness and microvascular damage in patients with never-treated essential hypertension. *American journal of hypertension*. 2009;22(5):525-30. Epub 2009/03/07.
3. Pase MP, Herbert A, Grima NA, Pipingas A, O'Rourke MF. Arterial stiffness as a cause of cognitive decline and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Internal medicine journal*. 2012;42(7):808-15. Epub 2011/12/14.
4. Scuteri A, Tesouro M, Appolloni S, Preziosi F, Brancati AM, Volpe M. Arterial stiffness as an independent predictor of longitudinal changes in cognitive function in the older individual. *Journal of hypertension*. 2007;25(5):1035-40. Epub 2007/04/07.
5. Watson NL, Sutton-Tyrrell K, Rosano C, Boudreau RM, Hardy SE, Simonsick EM, et al. Arterial stiffness and cognitive decline in well-functioning older adults. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2011;66(12):1336-42. Epub 2011/07/20.
6. Waldstein SR, Rice SC, Thayer JF, Najjar SS, Scuteri A, Zonderman AB. Pulse pressure and pulse wave velocity are related to cognitive decline in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Hypertension*. 2008;51(1):99-104. Epub 2007/11/21.

7. Safar M, Frohlich ED. Atherosclerosis, large arteries and cardiovascular risk. Basel ; New York: Karger; 2007. viii, 359 p. p.
8. Niederhoffer N, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Duvivier C, Peslin R, Atkinson J. Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity. Hypertension. 1997;29(4):999-1006. Epub 1997/04/01.
9. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. American journal of hypertension. 2003;16(2):103-10. Epub 2003/02/01.
10. Atkinson J. Age-related medial elastocalcinosis in arteries: mechanisms, animal models, and physiological consequences. J Appl Physiol. 2008;105(5):1643-51. Epub 2008/09/06.
11. Briones TL, Darwish H. Vitamin D mitigates age-related cognitive decline through the modulation of pro-inflammatory state and decrease in amyloid burden. Journal of neuroinflammation. 2012;9:244. Epub 2012/10/27.
12. Ferland G. Vitamin K and the nervous system: an overview of its actions. Adv Nutr. 2012;3(2):204-12. Epub 2012/04/21.
13. Angouras D, Sokolis DP, Dosios T, Kostomitsopoulos N, Boudoulas H, Skalkeas G, et al. Effect of impaired vasa vasorum flow on the structure and mechanics of the thoracic aorta: implications for the pathogenesis of aortic dissection. European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery. 2000;17(4):468-73. Epub 2000/04/25.

14. Saeki A, Recchia F, Kass DA. systolic flow augmentation in hearts ejecting into a model of stiff aging vasculature. Influence on myocardial perfusion-demand balance. *Circulation research*. 1995;76(1):132-41. Epub 1995/01/01.
15. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation*. 2008;117(22):2938-48. Epub 2008/06/04.
16. Wagenseil JE, Mecham RP. Elastin in large artery stiffness and hypertension. *Journal of cardiovascular translational research*. 2012;5(3):264-73. Epub 2012/02/01.
17. Marque V, Kieffer P, Gayraud B, Lartaud-Idjouadiene I, Ramirez F, Atkinson J. Aortic wall mechanics and composition in a transgenic mouse model of Marfan syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(7):1184-9. Epub 2001/07/14.
18. Drouin A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Belanger E, Fernandes P, Baraghis E, et al. Catechin treatment improves cerebrovascular flow-mediated dilation and learning abilities in atherosclerotic mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;300(3):H1032-43. Epub 2010/12/28.
19. Bolduc V, Drouin A, Gillis MA, Duquette N, Thorin-Trescases N, Frayne-Robillard I, et al. Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;301(5):H2081-92. Epub 2011/09/20.
20. Gertz SD, Kurgan A, Eisenberg D. Aneurysm of the rabbit common carotid artery induced by periarterial application of calcium chloride in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 1988;81(3):649-56. Epub 1988/03/01.

21. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation*. 2004;110(22):3480-7. Epub 2004/11/17.
22. Chiou AC, Chiu B, Pearce WH. Murine aortic aneurysm produced by periarterial application of calcium chloride. *The Journal of surgical research*. 2001;99(2):371-6. Epub 2001/07/27.
23. Ikonomidis JS, Gibson WC, Gardner J, Sweterlitsch S, Thompson RP, Mukherjee R, et al. A murine model of thoracic aortic aneurysms. *The Journal of surgical research*. 2003;115(1):157-63. Epub 2003/10/24.
24. Tieu BC, Lee C, Sun H, Lejeune W, Recinos A, 3rd, Ju X, et al. An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(12):3637-51. Epub 2009/11/19.
25. Ahearn JM, Fischer MB, Croix D, Goerg S, Ma M, Xia J, et al. Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity*. 1996;4(3):251-62. Epub 1996/03/01.
26. Amin M, Le VP, Wagenseil JE. Mechanical testing of mouse carotid arteries: from newborn to adult. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012(60). Epub 2012/03/08.
27. Flamant M, Placier S, Dubroca C, Esposito B, Lopes I, Chatziantoniou C, et al. Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. *Hypertension*. 2007;50(1):212-8. Epub 2007/05/23.

28. Baraghis E, Bolduc V, Lefebvre J, Srinivasan VJ, Boudoux C, Thorin E, et al. Measurement of cerebral microvascular compliance in a model of atherosclerosis with optical coherence tomography. *Biomedical optics express*. 2011;2(11):3079-93. Epub 2011/11/15.
29. Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain research*. 2000;874(2):123-30. Epub 2000/08/29.
30. Safar ME, Levy BI, Struijker-Boudier H. Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases. *Circulation*. 2003;107(22):2864-9. Epub 2003/06/11.
31. Xu C, Zarins CK, Pannaraj PS, Bassiouny HS, Glagov S. Hypercholesterolemia superimposed by experimental hypertension induces differential distribution of collagen and elastin. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(12):2566-72. Epub 2000/12/16.
32. Ziemann SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(5):932-43. Epub 2005/02/26.
33. Jurasic MJ, Josef-Golubic S, Sarac R, Lovrencic-Huzjan A, Demarin V. Beta stiffness--setting age standards. *Acta clinica Croatica*. 2009;48(3):253-8. Epub 2010/01/09.
34. Horvath T, Pinter A, Kollai M. Carotid artery stiffness is not related to endothelial function in young healthy subjects. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*. 2012;166(1-2):85-8. Epub 2011/10/22.

35. Tomimatsu T, Fujime M, Kanayama T, Mimura K, Koyama S, Kanagawa T, et al. Maternal arterial stiffness in normotensive pregnant women who subsequently deliver babies that are small for gestational age. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2013. Epub 2013/02/26.
36. Kocyigit I, Kaya MG, Orscelik O, Kaya C, Akpek M, Zengin H, et al. Early arterial stiffness and inflammatory bio-markers in normotensive polycystic kidney disease patients. *American journal of nephrology*. 2012;36(1):11-8. Epub 2012/06/16.
37. Michas F, Manios E, Stamatelopoulos K, Koroboki E, Toumanidis S, Panerai RB, et al. Baroreceptor reflex sensitivity is associated with arterial stiffness in a population of normotensive and hypertensive patients. *Blood pressure monitoring*. 2012;17(4):155-9. Epub 2012/06/30.
38. Kaess BM, Rong J, Larson MG, Hamburg NM, Vita JA, Levy D, et al. Aortic stiffness, blood pressure progression, and incident hypertension. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2012;308(9):875-81. Epub 2012/09/06.
39. Mitchell GF, van Buchem MA, Sigurdsson S, Gotal JD, Jonsdottir MK, Kjartansson O, et al. Arterial stiffness, pressure and flow pulsatility and brain structure and function: the Age, Gene/Environment Susceptibility--Reykjavik study. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134(Pt 11):3398-407. Epub 2011/11/15.
40. Mitchell GF. Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage. *J Appl Physiol*. 2008;105(5):1652-60. Epub 2008/09/06.
41. Li M, Scott DE, Shandas R, Stenmark KR, Tan W. High pulsatility flow induces adhesion molecule and cytokine mRNA expression in distal pulmonary artery

endothelial cells. *Annals of biomedical engineering*. 2009;37(6):1082-92. Epub 2009/04/03.

42. Wåhlin A. Cerebral blood flow and intracranial pulsatility studied with MRI: measurement, physiological and pathophysiological aspects. . Umeå, Sweden: Umeå University; 2012.

43. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American journal of cardiology*. 2003;91(3A):7A-11A. Epub 2003/03/21.

44. Silacci P, Desgeorges A, Mazzolai L, Chambaz C, Hayoz D. Flow pulsatility is a critical determinant of oxidative stress in endothelial cells. *Hypertension*. 2001;38(5):1162-6. Epub 2001/11/17.

45. Capogna M. Neurogliaform cells and other interneurons of stratum lacunosum-moleculare gate entorhinal-hippocampal dialogue. *The Journal of physiology*. 2011;589(Pt 8):1875-83. Epub 2010/12/08.

46. Soros P, Whitehead S, Spence JD, Hachinski V. Antihypertensive treatment can prevent stroke and cognitive decline. *Nature reviews Neurology*. 2013;9(3):174-8. Epub 2012/12/19.

47. Alsop DC, Casement M, de Bazelaire C, Fong T, Press DZ. Hippocampal hyperperfusion in Alzheimer's disease. *NeuroImage*. 2008;42(4):1267-74. Epub 2008/07/08.

48. Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in aging neuroscience*. 2010;2:12. Epub 2010/06/17.

Tables

Table 1. Blood pressure assessment.

	0.9% NaCl	0.3 mol/L CaCl ₂	0.4 mol/L CaCl ₂
Day 0	135.2 ± 4.5	129.6 ± 3.1	134.9 ± 4.0
Day 4	133.3 ± 3.6	135.1 ± 3.2	136.8 ± 2.5
Day 8	127.3 ± 2.9	129.5 ± 3.3	131.9 ± 3.4
Day 14	130.2 ± 2.3	127.4 ± 2.4	129.9 ± 1.9

Systolic blood pressure (mm Hg) was monitored at days 4, 8 and 14 from the day of surgery (day 0) until the end of the treatment (2 weeks) by non-invasive volumetric tail-cuff measurement (n=6).

Figure Legends

Figure 1. Calcium deposits, collagen and elastin distribution and macrophages infiltration in carotid arteries submitted to periarterial application of CaCl₂.

Representative sections of carotid arteries, 2 weeks following application of CaCl₂ or 0.9% NaCl, showing calcium deposits labeled in black with Von Kossa stain (A), collagen deposits labeled in blue with Masson's Trichrome stain (B), elastin distribution labeled in green by autofluorescence (C) and macrophages/monocytes infiltration labeled in red using MOMA-2 (1/50) antibody (D) (n=6, scale = 25 µm).

Figure 2. Geometric characteristics of carotid arteries exposed to periarterial application of CaCl₂.

Measurement of intima-media thickness (A) and radius (B) in carotid arteries 2 weeks following periarterial application of different concentrations of CaCl₂ or 0.9% NaCl (control) (n=3 to 5, *** p<0.0001 versus 0.9% NaCl).

Figure 3. Effect of periarterial application of CaCl₂ on carotid compliance, distensibility and β index.

Measurement of carotid compliance, expressed as circumferential strain (A), incremental distensibility (B) and β stiffness index (C) 2 weeks following periarterial application of different concentrations of CaCl₂ or 0.9% NaCl (control) (n=3 to 5, *** p<0.001 versus 0.9% NaCl, ** p<0.01 versus 0.9% NaCl).

Figure 4. Effect of periarterial application of 0.3 mol/L CaCl₂ on cerebral blood flow pulsatility.

Blood flow pulsatility, represented as blood speed increase (%) in medium-sized arteries with a diameter varying from 50 µm to 95 µm and in large arteries with a diameter over 95 µm (A), in the right side of the brain corresponding to

the right common carotid artery that was calcified and the left side of the brain corresponding to the intact carotid (B) as well as at the level of the middle cerebral artery and its branches in the parietal cortex (C) and in the arteries of the somatosensory cortex (D) (n=11, ** p<0.01 versus 0.9% NaCl, * p<0.05 versus 0.9% NaCl).

Figure 5. Effect of carotid stiffness, induced by periarterial application of CaCl₂, on oxidative stress, assessed by superoxide anion production in the hippocampus. A) Representative sections of different regions of hippocampus (40X magnification), stained with DHE, in mice with carotid arteries submitted to application of 0.3 mol/L CaCl₂ or 0.9% NaCl (control). B) Superoxide anion production assessed by DHE fluorescence (relative fluorescence units) in CA1, CA3 and DG regions of hippocampus for different concentrations of CaCl₂ or 0.9% NaCl (control). C) Superoxide anion production assessed by DHE fluorescence (relative fluorescence units) in right or left hemisphere of the hippocampus for different concentrations of CaCl₂ or 0.9% NaCl (n=3, *** p<0.001 versus 0.9% NaCl, ** p<0.01 versus 0.9% NaCl, * p<0.05 versus 0.9% NaCl).

Figure 6. Presence of neurodegeneration in hippocampus of mice with carotid stiffness. A) Representative hippocampal sections, stained with Fluoro-Jade B and B) percentage of area occupied by Fluoro-Jade B positive cells, 2 weeks following periarterial application of different CaCl₂ concentrations or 0.9% NaCl (control) (n=5).

Figures

Figure 1

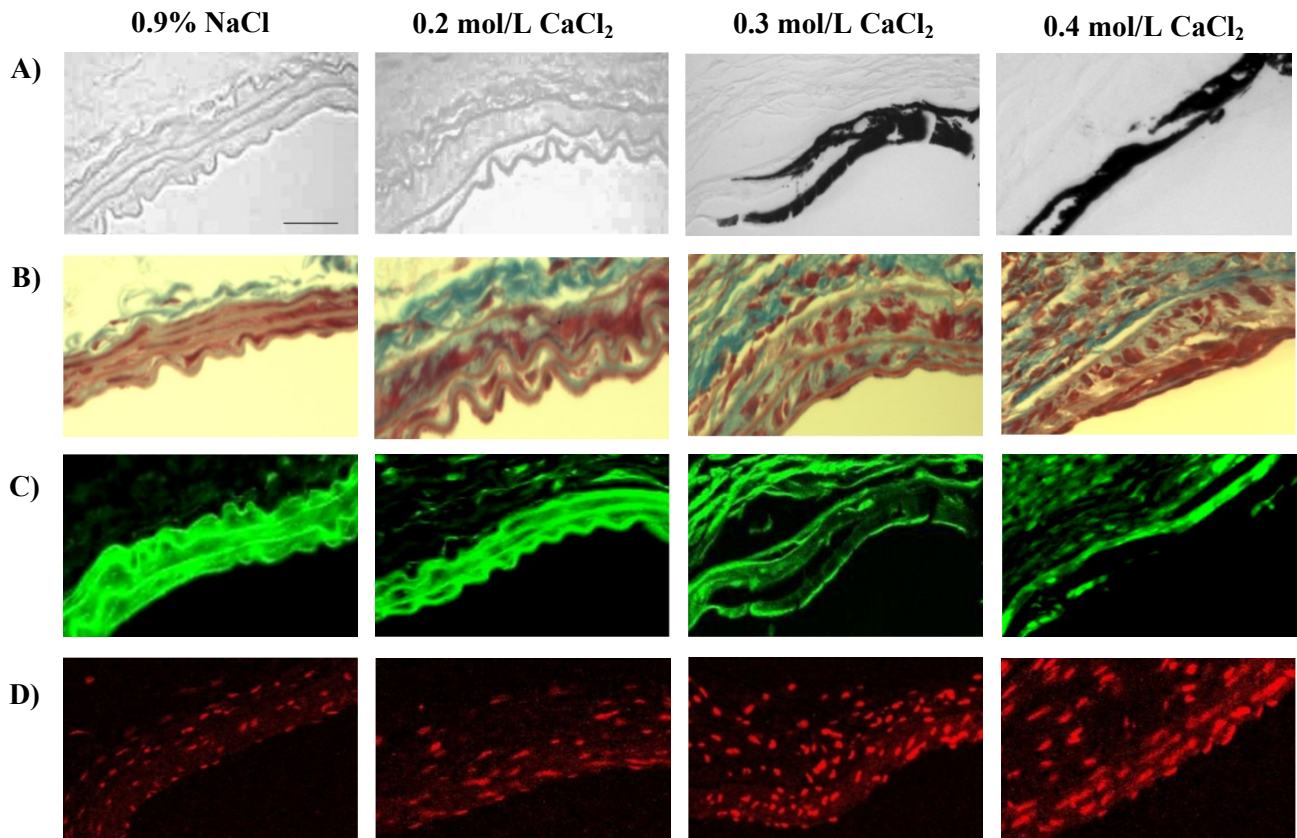
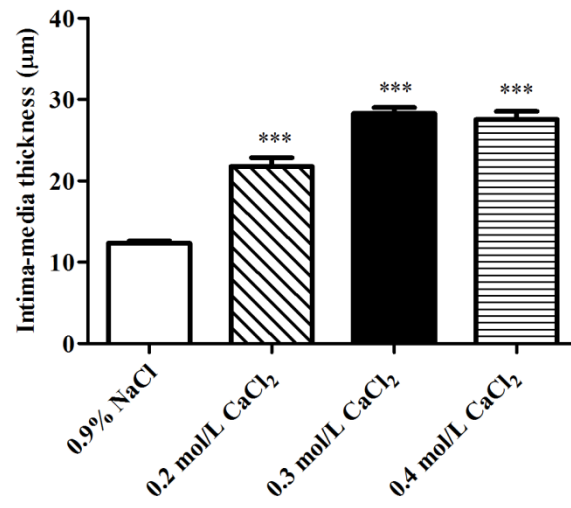


Figure 2

A)



B)

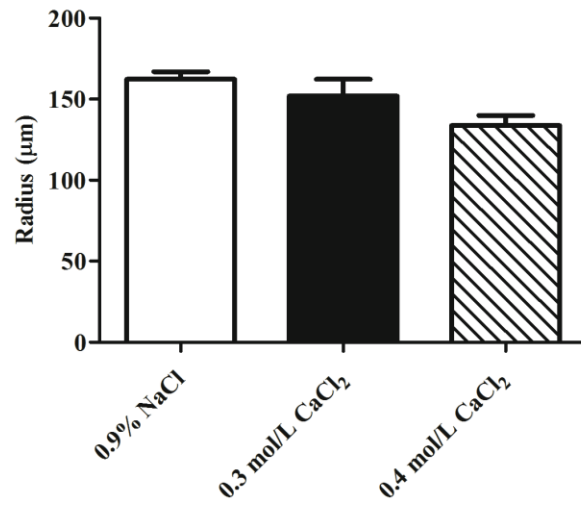
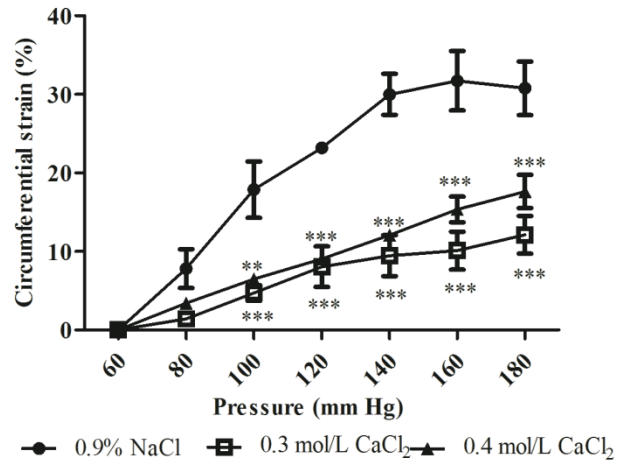
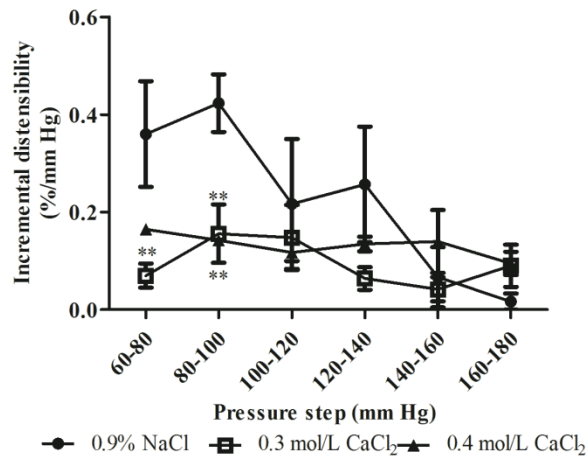


Figure 3

A)



B)



C)

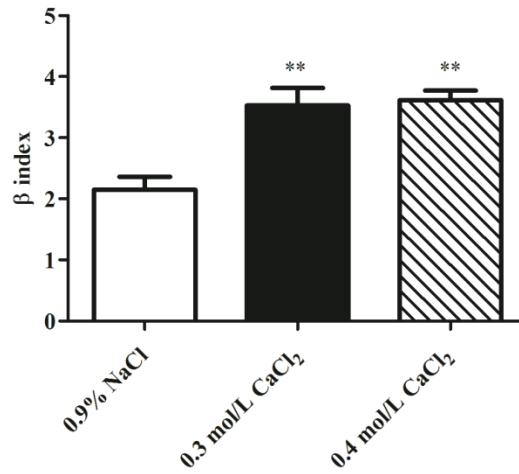


Figure 4

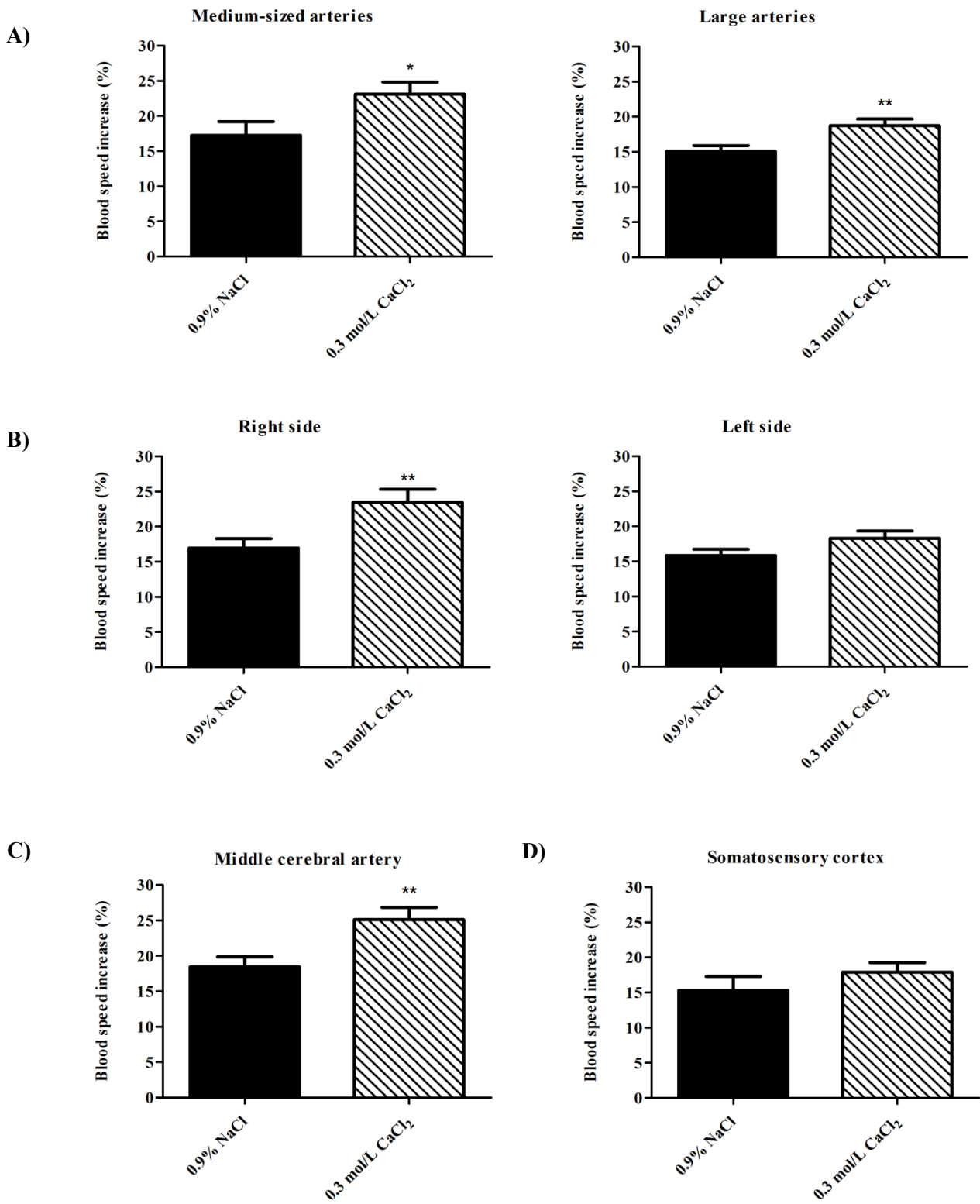
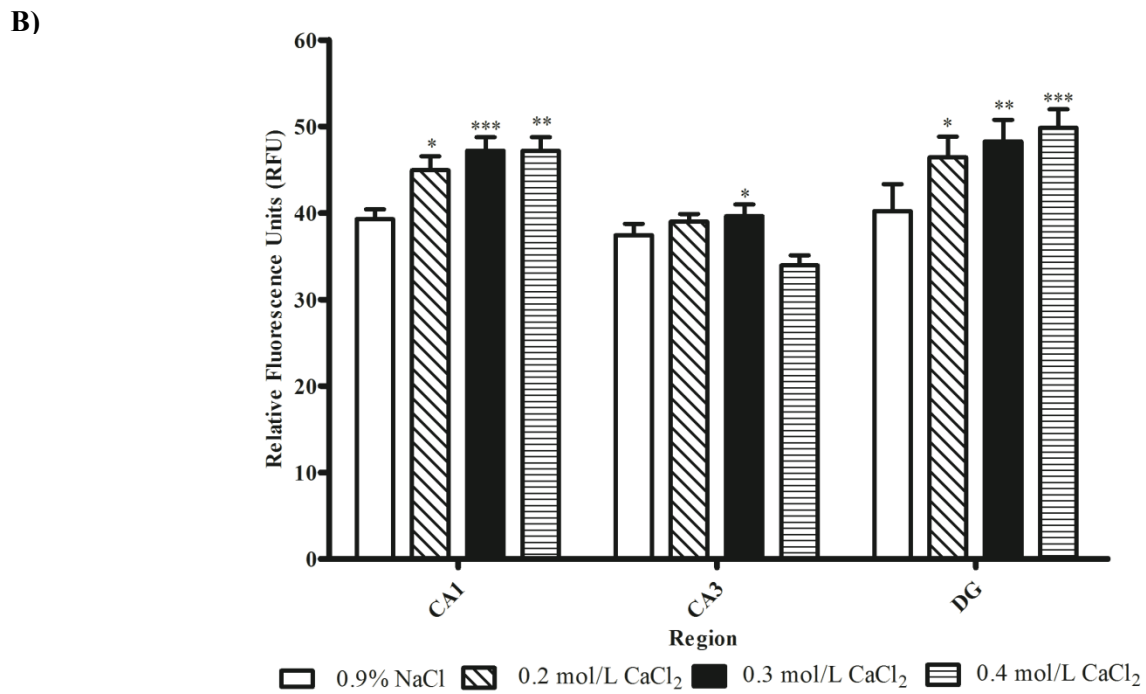
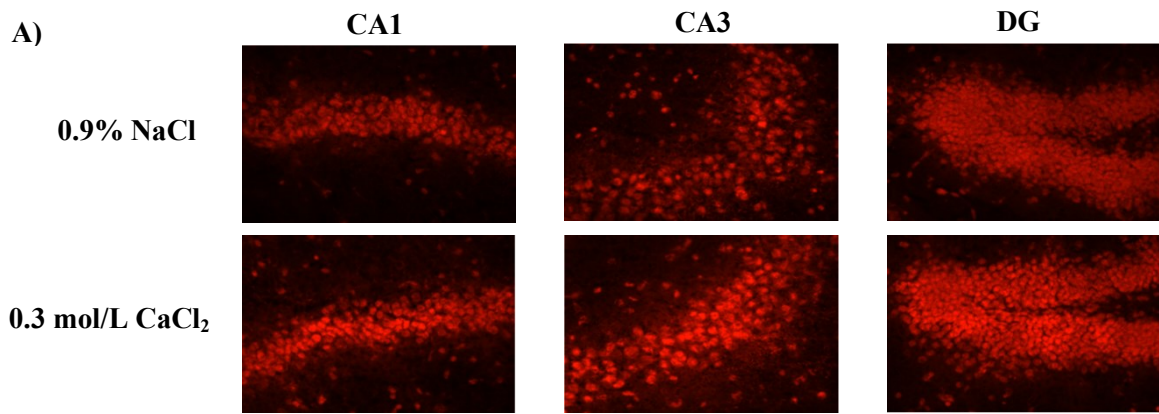


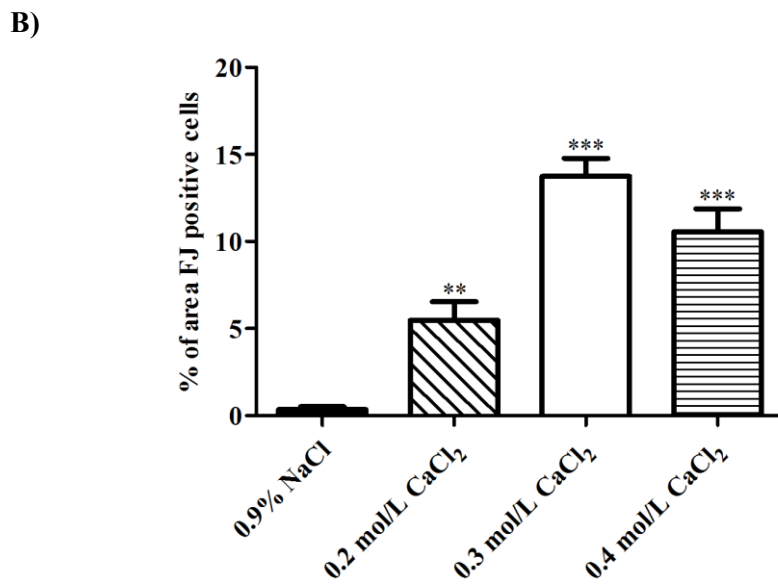
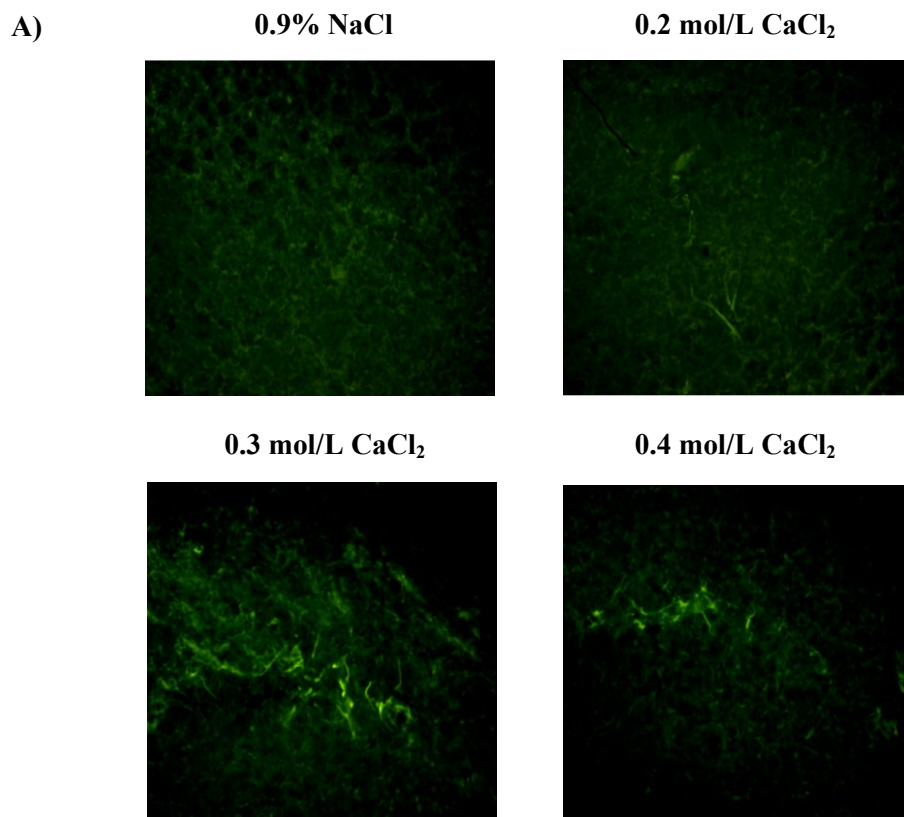
Figure 5



C)

	0.9% NaCl	0.2 mol/L CaCl ₂	0.3 mol/L CaCl ₂	0.4 mol/L CaCl ₂
Right	39.5 ± 1.4	43.5 ± 1.3	45.0 ± 1.5	43.7 ± 1.5
Left	38.4 ± 1.4	43.4 ± 1.6	44.9 ± 1.6	43.8 ± 1.8

Figure 6



Supplemental material

Carotid artery histological assessment

Mice were perfused transcardially with 10 mL of phosphate buffered saline (PBS) followed by 50 mL of 4% paraformaldehyde solution (PFA) and the carotid arteries exposed to NaCl or CaCl₂ were removed. Carotid sections were placed into cassettes and processed for paraffin embedding. First, the tissue was dehydrated in 3 baths of increasing ethanol concentrations (70%, 85%, and 90%) followed by 3 baths of absolute ethanol. The tissue was cleared by immersion in 3 baths of 100% toluene and impregnated in hot paraffin baths (44°C to 60°C). The tissue was then placed in molds filled with hot paraffin, cut on a microtome (10 µm) and the sections were placed on slides.

Masson's Trichrome stain

Carotid sections were deparaffinised in 2 baths of toluene (95% and 100%) for 3 minutes each and 3 baths of ethanol (80%, 95% and 100%) for 3 minutes each. The sections were etched in Bouin (1 hour, at 56°C), cooled and rinsed in running water (20 minutes), stained in Weigert's iron hematoxylin solution (12 minutes), rinsed in running water (10 minutes) followed by a dip in distilled water. The sections were stained in Biebrich scarlet-acid fuchsin solution, rinsed in a few dips of distilled water, differentiated in phosphomolybdic-phosphotungstic acid 10% solution (10 minutes), stained in aniline blue solution (40 seconds) and rinsed briefly in distilled water and

1% acetic acid solution (30 seconds). The sections were then dehydrated in 95% ethanol (1 dip) followed by absolute ethanol (5 seconds) and cleared in xylene.

Von Kossa stain

Carotid sections were deparaffinised and hydrated with distilled water. The sections were transferred to 5% silver nitrate solution and incubated on aluminium paper under 375 watts lamp for 60 minutes. The sections were rinsed with distilled water, transferred to 5% sodium thiosulfate solution for 2 minutes, rinsed thoroughly in distilled water and counterstained for 5 minutes with 0.1% nuclear fast red solution (0.1 g of nuclear fast red was dissolved in 100 mL of 5% aluminium sulfate solution). The sections were then rinsed with distilled water, dehydrated in ethanol (95% and 100%) and cleared in xylene (Histology core facility of the Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada).

MOMA-2 staining

Sections were deparaffinised in 2 baths of xylene for 5 minutes each and 2 baths of ethanol (95% and 100%) for 3 minutes each followed by a rinsing in distilled water and in PBS 1X (pH 7.4) containing 0.1% Tween-20 twice for 10 minutes. The sections were blocked in normal goat serum (5%) and bovine serum albumin (5%) in PBS 1X containing 0.1% Tween-20 for 1 hour followed by 24 hour incubation at 4°C in MOMA-2 coupled to Alexa Fluor 647 antibody (AbD Serotec, Raleigh, NC) in 5% normal goat serum, 5% bovine serum albumin, PBS 1X containing 0.1% Tween-20. The sections were rinsed in PBS 1X containing 0.1% Tween-20 twice for 10 minutes

and mounted on slides using Fluoromount G mounting medium (Southern Biotech, Birmingham, AL) (1,2).

Carotid compliance studies

The mice were sacrificed by an overdose of pentobarbital sodium (100 mg/kg). The mouse was placed under a dissecting microscope and secured by taping the paws to the dissecting board. The chest area was open and the nearby tissue was cleared using forceps in order to expose the whole length of the carotid artery. Tissue hydration was maintained with physiological salt solution (PSS, pH 7.4, mmol/L: 130 NaCl, 4.7 KCl, 1.18 KH₂PO₄, 1.17 MgSO₄, 14.9 NaHCO₃, 1.6 CaCl₂, 0.023 EDTA, and 10 glucose). The carotid artery was cut and placed in a petri dish containing PSS. Under the microscope, the fat around the vessel was carefully removed. Compliance was assessed in a Ca²⁺-free PSS containing 1 mmol/L EGTA. Ca²⁺-free PSS was flushed at the proximal and distal connectors of the vessel chamber. In the pressure myograph, sutures (7-0) were placed on cannulas and tightened with a loose knot. Carefully, the vessel's extremities were sutured on each cannula and the knots were tied. The artery must be tied enough to resist detaching from the pressure and loose enough to be able to dilate. The vessel was checked for leaks and pressurized at 60 mm Hg. Passive pressure diameter curves were obtained by increasing intraluminal pressure from 60 to 180 mm Hg. For each pressure, data was collected until a plateau was reached (3,4).

Flow pulsatility studies

Frequency domain Optical Coherence Tomography (OCT) was used to perform imaging. This technique allows to gate Doppler OCT acquisitions and therefore reconstruct a blood flow profile across a single cardiac cycle by using an electrocardiography signal. This allows to compare changes in blood flow, in this case between mice with arterial stiffness induced by carotid calcification and control mice. The details of the system are described by Baraghis et al. (5). Briefly, the system is based on a 870 nm LED (Exalos EXS8710-2411, Langhorne, PA), with 65 nm of yielding 2.5 mW of power on the sample through an infinite corrected 10x objective (Olympus UMPLFLN 10XW, Markham, Ontario). The axial and lateral resolutions are 5 and 10 μm respectively. The detection is done with a custom made spectrometer using a 2048 pixel line camera (Basler Sprint spL2048 -140k, Exton, PA). The A-line rate was limited to 15 kHz due to data streaming to the hard drive. The maximum detectable Doppler blood flow speed was 3 mm/s without phase-unwrapping. A series of acquisitions were performed on each mouse with dimensions of 200-800 μm , depending of the size of the observed arteries. Light attenuation permitted imaging of vessels as deep as 500 μm . Between 4 and 6 distinct arteries were measured per animal. Images were reconstructed offline using custom software written in Matlab (The MathWorks, Natick, MA). Dispersion compensation was implemented according to the procedure described by Wojtkowski et al. (6). Doppler blood flow was computed using a moving-scatterer-sensitive technique adapted from Ren et al. and Srinivasan et al. (7, 8). Data was high-pass filtered to remove the stationary scattering components from the image. In order to obtain the blood speed profile during a

cardiac cycle a B-scan (each one consisting of 840 A-lines) has to be performed several times (400 in these experiments) in the same place. The ECG signal is simultaneously acquired during this imaging protocol, allowing to reconstruct the evolution of the blood speed during a cardiac cycle. The QRS peaks are detected on the ECG signal, then the time elapsed from the QRS peak is assigned to every single A-line (cardiac cycle time). Typically ~8 images were acquired per cardiac cycle. Each A-line is placed on a 3D matrix with respect to position and cardiac cycle time, allowing to obtain the blood speed profile from any pixel during the whole cardiac cycle.

Dihydroethidium staining

Mice were anaesthetized with pentobarbital sodium (100 mg/kg) and perfused transcardially with 10 mL of phosphate buffered saline solution (PBS), pH 7.4. Frozen brains were cut on a cryostat (20 μm) and sections mounted on slides. The slides were air dried at room temperature for 10 minutes followed by 10 minutes on a slide warmer at 45°C. The slides were then immersed in a fluorescent-labeled dihydroethidium (DHE) solution (2 $\mu\text{mol/L}$, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) in PBS in a light protected humidified chamber at 37°C for 2 minutes. Slides were then rinsed in PBS for 5 minutes and cover slipped with Fluoromount-G mounting medium (Southern Biotech, Birmingham, AL).

Fluoro-Jade B staining

The slides were air dried at room temperature for 10 minutes followed by 10 minutes on a slide warmer at 45°C, post-fixed with 4% PFA for 20 minutes at room temperature and washed twice with PBS, pH 7.4 for 5 minutes. Following post-fixation, the slides were immersed in 1% NaOH (in 80% alcohol) for 5 minutes followed by 2 minutes in 70% ethanol and air dried on a slide warmer at 45°C for 15 minutes. The slides were then immersed in distilled water for 2 minutes followed by 0.06% potassium permanganate for 15 minutes on a shaker table to ensure consistent background suppression. The slides were immersed in distilled water for 2 minutes and in Fluoro-Jade B 0.0008% solution (Millipore, Temecula, CA) in 0.1% acetic acid vehicle for 20 minutes. The slides were then rinsed in distilled water (3 times, 1 minute), cleared by immersion in xylene and cover slipped with DPX mounting medium (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada).

Supplemental References

1. Tieu BC, Lee C, Sun H, Lejeune W, Recinos A, 3rd, Ju X, et al. An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(12):3637-51
2. Ahearn, JM, Fischer MB, Croix D, Goerg S, Ma M, Xia J, et al. Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity*. 1996;4(3):251-62.

3. Bolduc, V, Drouin A, Gillis MA, Duquette N, Thorin-Trescases N, Frayne-Robillard I, et al. Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;301(5):H2081-92.
4. Amin M, Le VP, Wagenseil JE. Mechanical testing of mouse carotid arteries: from newborn to adult. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012(60).
5. Baraghis, E., Bolduc, V., Lefebvre, J., Srinivasan, V. J., Boudoux, C., Thorin, E., & Lesage, F. (2011). Measurement of cerebral microvascular compliance in a model of atherosclerosis with optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 2(11), 3079–3093. doi:10.1364/BOE.2.003079
6. Wojtkowski, M., Srinivasan, V., Ko, T., Fujimoto, J., Kowalczyk, A., & Duker, J. (2004). Ultrahigh-resolution, high-speed, Fourier domain optical coherence tomography and methods for dispersion compensation. *Optics Express*, 12(11), 2404–2422. doi:10.1364/OPEX.12.002404
7. Ren, H., Sun, T., MacDonald, D. J., Cobb, M. J., & Li, X. (2006). Real-time in vivo blood-flow imaging by moving-scatterer-sensitive spectral-domain optical Doppler tomography. *Optics Letters*, 31(7), 927–929. doi:10.1364/OL.31.000927
8. Srinivasan, V. J., Sakadžić, S., Gorczynska, I., Ruvinskaya, S., Wu, W., Fujimoto, J. G., & Boas, D. A. (2010). Quantitative cerebral blood flow with optical coherence tomography. *Optics express*, 18(3), 2477–2494.

ARTICLE 2

Arterial stiffness, induced by carotid calcification, leads to cerebral inflammation mediated by oxidative stress

Running title: Arterial stiffness, cerebral inflammation and oxidative stress

Nataliya Sadekova, Diane Vallerand and Hélène Girouard

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

Subject codes: 13, 66, 130, 97

Keywords: arterial stiffness, carotid, brain, microglia, astrocytes, oxidative stress

Total number of figures: 6

Abstract

Objective: Arterial stiffness has been identified as an important risk factor for cognitive decline. However, its specific effects on brain homeostasis are unknown. Hence, the objective of the study is to explore the effects of arterial stiffness on the brain by determining whether the increased oxidative stress in this model induces cerebral inflammation.

Approach and Results: Arterial stiffness was induced by applying calcium chloride to carotid arteries of mice. Cerebral inflammation was assessed by measuring the immunoreactivity of microglial markers, Iba-1 and CD68, and markers of astrocytes, s100 β and GFAP. Tempol, an antioxidant, was used to determine whether cerebral inflammation is induced by oxidative stress. Results show that arterial stiffness activates microglia, assessed by increased levels of Iba-1 and CD68 in all regions of the hippocampus, and astrocytes, assessed by an increase in s100 β , in the hippocampus and the frontal cortex. The efficiency of Tempol is demonstrated by its capacity to reduce the increase in superoxide anion production in the hippocampus of mice with induced arterial stiffness. Tempol inhibits the activation of microglia and astrocytes in the hippocampus without affecting s100 β levels in the frontal cortex.

Conclusions: This study shows that arterial stiffness, induced by carotid calcification, leads to cerebral inflammation mediated by increased oxidative stress mainly in the hippocampus. This shows that arterial stiffness has a direct impact on cerebral homeostasis and should be considered as a therapeutic target for the prevention of cerebral dysfunctions in the aging population.

Non-standard Abbreviations

CaCl₂: calcium chloride

PFA: paraformaldehyde

PBS: phosphate buffered saline

Iba-1: ionized calcium-binding adapter molecule 1

CD68: cluster of differentiation 68

s100β: s100 calcium binding protein β

GFAP: glial fibrillary acidic protein

DHE: dihydroethidium

CA1: cornu ammonis 1 area of hippocampus

CA3: cornu ammonis 3 area of hippocampus

DG: dentate gyrus area of hippocampus

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NO: nitric oxide

ROS: reactive oxygen species

Introduction

Arterial stiffness, an important component of hypertension and aging, has been identified as an independent risk factor for cognitive decline in the elderly (1-3). This makes it a potential target for reducing the risk of cognitive dysfunction in hypertensive as well as the aging population. Recently, we have established a new model of arterial stiffness which fulfills all the characteristics of arterial stiffness making this model specific for studying the precise effects of stiffened arteries on the brain. In this model, we have shown that increased carotid stiffness induces an increase in blood flow pulsatility, cerebral oxidative stress and neurodegeneration suggesting that arterial stiffness affects cerebral homeostasis. It has been shown that flow pulsatility is an important determinant of oxidative stress in endothelial cells (4) and that pulsatile shear stress stimulated by disturbed blood flow leads to increased production of reactive oxygen species, especially superoxide anion, that can further lead to the production of other reactive species (5-7). Moreover, it has been shown that the oxidative stress induced by increased shear stress can initiate inflammation (5).

Brain homeostasis is preserved by the blood brain barrier as well as the residing cells, such as microglia and astrocytes. Microglia, the residing immune cells, are considered as sensor cells that become activated upon any brain damage (8-10). It has been shown that a chronic inflammatory response by microglia is accompanied by a continuous release of different inflammatory mediators thus leading to potential

neuronal damage (10). Astrocytes perform many functions including buffering of neurotransmitters and ions, maintaining the blood-brain barrier and vascular tone and providing energy for neurons, a role they can accomplish by their proximity to cerebral blood vessels (11-13). When brain homeostasis becomes disturbed, astrocytes become hypertrophied and proliferate. This constitutes a process commonly named reactive astrogliosis. Reactive astrogliosis is considered a hallmark of cerebral damage and is present in different pathologies of central nervous system such as Alzheimer's disease (13). It has been shown that a compromised interaction between neurons and glial cells may lead to dysfunctions associated with brain aging as well as neurodegeneration (14). Moreover, it is considered that apart from aging the major mechanism contributing to neurodegeneration is brain inflammation represented by microglial activation and astrogliosis (12-14). Hence, these data suggest that increased oxidative stress, stimulated by increased blood flow pulsatility, induces cerebral inflammation leading to neuronal damage. Indeed, here we show that increased arterial stiffness induces microglial activation and astrogliosis in the hippocampus, which are mediated by oxidative stress.

Methods

Animals

Ten to twelve-week old male C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (Saint-Constant, QC, Canada) and housed individually in a temperature-controlled room with 12 hours light-dark cycles. Following acclimatization, the mice were divided into groups of 3 to 6 mice before treatment and surgeries. For Tempol (4-Hydroxy-TEMPO, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) treatment, the mice were divided in two groups: mice receiving regular drinking water and mice receiving water supplemented with 1 mmol/L of Tempol. Treatment with Tempol was started 2 days before periarterial application of CaCl₂ to carotid arteries. The study was approved by the Animal Care and Use Committee of Université de Montréal and performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care.

Periarterial application of CaCl₂

Arterial stiffness was induced by periarterial application of CaCl₂ as described previously (15). Briefly, an incision was made at the level of the trachea and the right common carotid artery was carefully isolated by sliding a small piece of sterile parafilm underneath. A sterile cotton gaze soaked in 0.3 mol/L CaCl₂ or 0.9% NaCl (control) was placed directly on the carotid artery for 20 minutes. The gaze was then removed and the incision was closed. The discomfort caused by the incision was prevented by the administration of Bupivacaine hydrochloride (Marcaine, 4 mg/kg subcutaneous injection at the site of the incision) and Carprofen (Rimadyl, 5 mg/kg

subcutaneous injection) immediately after surgery. In addition, Carprofen (5 mg/kg subcutaneous injection) was administered every 24 hours for 2 days following surgery. Infections were prevented by the administration of Trimethoprim Sulfadiazine (Tribrissen, 30 mg/kg subcutaneous injection) immediately after surgery and every 24 hours for 3 days.

Assessment of glial activation

To evaluate the level of glial activation induced by carotid calcification, mice were anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg body weight) and perfused transcardially with 10 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) followed by 50 mL 4% paraformaldehyde (PFA). The brains were removed, post-fixed for 24 hours in 4% PFA at 4°C and cut on a vibratome (40 µm). The sections were kept in an antifreeze solution containing 30% glycerol, 30% ethylene glycol and 40% PBS at -20°C. For the evaluation of microglial activation with quantification of the ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) and the cluster of differentiation 68 (CD68), sections were incubated for 1 hour at room temperature with PBS containing 10% bovine serum albumin (BSA), 5% normal goat serum (NGS) and 0.3% Triton X-100. They were then incubated overnight at 4°C with the primary antibody, Iba-1, (1/1000, Wako, Richmond, VA) or CD68, (1/10 000, AbD Serotec, Raleigh, NC), in PBS containing 0.5% BSA, 5% NGS and 0.3% Triton X-100. Sections were then incubated for 2 hours on ice with Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG for Iba-1 (1/500, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) or Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG for CD68 (1/500, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) in PBS containing 0.5% BSA, 5% NGS

and 0.3% Triton X-100. For the assessment of astroglial activation with the s100 calcium binding protein β (s100 β) and the glial fibrillary acidic protein (GFAP) staining, sections were incubated overnight at 4°C with PBS containing 0.5% Tween-20 and 1% BSA. Antigen retrieval was done by heating sections with a microwave 15 times for 30 seconds-5 min intervals in a citrate solution. Sections were then incubated for 1 hour at room temperature with PBS containing 5% NGS and 0.5% Triton X-100 followed by incubation with s100 β antibody (1/200, Abcam, Toronto, ON, Canada) or GFAP antibody coupled to Alexa Fluor 488 (1/500, Millipore, Temecula, CA) in PBS containing 5% NGS and 0.5% Triton X-100 for 48 hours at 4°C. For s100 β , sections were then incubated for 1 hour at room temperature with Alexa Fluor 633 goat anti-rabbit (1/150, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) in PBS containing 5% NGS and 0.5% Triton X-100. The specificity of the immunolabel was assessed by omitting the primary antibody. To assure uniformity of the immunolabel, sections from all groups were processed together.

Determination of non-specific inflammation in spleens

To determine the presence of non-specific inflammation induced by the surgery, the presence of macrophages in the spleen was quantified. A positive control was generated by injecting mice with lipopolysaccharide (LPS, 2 mg/kg), the major component of the outer membrane of gram-negative bacteria, and the sacrifice was performed 72 hours following the injection. Mice were anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg body weight) and perfused transcardially with 10 mL of PBS pH 7.4 followed by 50 mL PFA 4%. Spleens were removed, frozen with liquid nitrogen

and cut on a cryostat. To minimize immunolabeling variations, sections from all groups were processed together. Sections (20 μm) were put on slides and fixed with acetone and methanol mix (1:1) for 5 minutes on ice. Sections were rinsed with PBS containing 0.1% Tween-20 and incubated for 1 hour at room temperature with PBS containing 5% NGS, 5% BSA and 0.1% Tween-20. Sections were then incubated overnight at 4°C with monocytes/macrophage antibody (MOMA-2) coupled to Alexa Fluor 488 (AbD Serotec, Raleigh, NC) in PBS containing 5% NGS, 5% BSA and 0.1% Tween-20.

Image processing

Sections were mounted using Fluoromount-G mounting medium (Southern Biotech, Birmingham, AL). Images were acquired using Olympus laser scanning confocal microscope. Image acquisitions were performed with the same fluorescence settings in all cases with a computer-controlled digital camera. Data were expressed in arbitrary fluorescence units.

Carotid artery histological assessment

Anesthetized mice were perfused transcardially as previously described and the carotid arteries exposed to NaCl or CaCl_2 removed. Carotid arteries were embedded in paraffin, cut on a microtome (10 μm) and processed for Von Kossa and Masson's Trichrome stains (Histology core facility of the Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada). Images were acquired with a Leica DM200 microscope (40X magnification). Carotid intima-media thickness

was measured in arteries stained with Masson's Trichrome. Elastin distribution was determined by autofluorescence using an Olympus laser scanning confocal microscope (488 nm excitation/550-600 nm emission).

Dihydroethidium staining

Mice were anaesthetized with pentobarbital sodium (100 mg/kg) and perfused transcardially as previously described. Frozen brains were cut on a cryostat (20 μ m) and sections mounted on slides. The slides were air dried at room temperature for 10 minutes followed by 10 minutes on a slide warmer. The slides were then immersed in a fluorescent-labeled dihydroethidium (DHE) solution (2 μ mol/L, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) in PBS in a light protected humidified chamber at 37°C for 2 minutes. Slides were then rinsed in PBS for 5 minutes and cover slipped with Fluoromount-G mounting medium (Southern Biotech, Birmingham, AL). Images were acquired using an epifluorescence microscope Leica DM200 (40X magnification) with the same fluorescence settings. Analysis of relative fluorescence was achieved using Image J software (version 1.47, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm standard error of mean. Multiple comparisons were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post-hoc analysis and two-group comparisons of independent samples were analyzed by unpaired Student's two-tail t test. Analysis was achieved using GraphPad Prism 5.01 (La Jolla, CA). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Carotid stiffness induces increases in microglial immunoreactivity for Iba-1 and CD68, and in astrocyte immunoreactivity for s100 β

When microglia becomes activated, there is a hypertrophy of its cell body and an increase in its ramifications which translates in an increase of Iba-1 fluorescence. Activated microglia acquires the ability to become highly locomotive as well as phagocytic, which translates in an increase in the immunoreactivity for CD68 marker (16, 17). Indeed, carotid calcification induces a significant increase in the relative fluorescence of Iba-1, a specific microglial marker, in all regions of the hippocampus: CA1, CA3 and DG (Fig. 1 A, $p < 0.05$). For CA1, the immunoreactivity for Iba-1 in mice with carotid calcification increases by 1.4 fold, for CA3, it increases by 1.6 fold and for DG by 1.7 fold compared to controls (NaCl). Carotid calcification also induces a significant increase in the relative fluorescence of CD68, a marker of activated microglia, in all regions of the hippocampus (Fig. 1 B, $p < 0.05$). For CA1, the immunoreactivity for CD68 in mice with carotid calcification increases by 1.4 fold, for CA3, it increases by 1.3 fold and for DG by 1.4 fold compared to controls. No increase in Iba-1 or CD68 fluorescence is observed in the frontal cortex (Fig. 1 A and B). Moreover, carotid stiffness induces a significant increase in the relative fluorescence of s100 β , a calcium-binding protein specific to astrocytes (18) and expressed more specifically by a subtype of mature astrocytes which may or not express GFAP at the same time (19, 20). This increase is observed in the

hippocampus, but only in the DG region (Fig. 1 C, $p < 0.05$), without affecting CA1 or CA3 regions. A significant increase in s100 β fluorescence is also observed in the frontal cortex (Fig. 1 C, $p < 0.05$). For both regions, the DG and the frontal cortex, the immunoreactivity for s100 β in mice with carotid calcification increases by 1.2 fold compared to controls. No increase in GFAP, a marker that is specific for the glial fibrillary acidic protein present in glial fibrils of astrocytes (19), is observed (Fig. 1 D). These effects on microglia and astrocytes are observed without inducing peripheral inflammation as shown by the absence of the infiltration of macrophages in the spleen of the mice with calcified carotids compared to control mice and compared to a positive control representing mice treated with LPS (Supplement Fig. 1). In overall, these results show that carotid stiffness induces microglial and astrocyte activation demonstrated by increases in their respective markers, Iba-1 and s100 β .

Tempol treatment decreases the production of superoxide anion in the hippocampus

In order to establish if cerebral inflammation is the consequence of the increase in superoxide anion production in the brain, mice were treated with a superoxide scavenger, Tempol. As shown in Figure 2, the production of superoxide anion is significantly reduced in mice with carotid calcification and treated with Tempol (CaCl₂ Tempol) compared to mice with carotid calcification not receiving treatment (CaCl₂ CTL) for all regions of the hippocampus: CA1, CA3 and DG (Fig. 2, $p < 0.05$). Indeed, for CA1, the relative fluorescence in mice with carotid calcification increases by 1.3 fold and for CA3 and DG, it increases by 1.2 fold compared to control mice with (NaCl

Tempol) or without (NaCl CTL) Tempol treatment. Moreover, the production of superoxide anion in mice with both carotid calcification and Tempol treatment (CaCl₂ Tempol) did not differ from control mice treated (NaCl Tempol) or not (NaCl CTL) with Tempol and this for all regions of the hippocampus. Finally, Tempol treatment did not affect the baseline level of superoxide production as shown by the absence of difference between control mice and control mice treated with Tempol.

Tempol treatment prevents the increase in microglial immunoreactivity for Iba-1 and CD68 in the hippocampus

As shown in Figure 3, Tempol treatment significantly reduces the increases in the immunoreactivity for Iba-1 (Fig. 3 A, $p < 0.05$) and CD68 (Fig. 3 B, $p < 0.05$) in all regions of the hippocampus, CA1, CA3 and DG. The level of fluorescence of Iba-1 and CD68 in mice with carotid calcification and treated with Tempol (CaCl₂ Tempol) is significantly reduced compared to mice with carotid calcification alone (CaCl₂ CTL) ($p < 0.05$). Indeed, in mice with carotid calcification alone (CaCl₂ CTL), for all regions of the hippocampus, the increase for Iba-1 immunoreactivity passes from 1.3 fold compared to control with (NaCl Tempol) or without (NaCl CTL) Tempol treatment to no increase for mice with carotid calcification and Tempol treatment (CaCl₂ Tempol). As for the immunoreactivity for CD68, the increase in mice with carotid calcification alone (CaCl₂ CTL) passes from 1.5 fold for CA1 and DG and from 1.4 fold for CA3 to no increase for mice with carotid calcification and Tempol treatment (CaCl₂ Tempol) as compared to control mice (NaCl CTL and Tempol). Moreover, the level of fluorescence of Iba-1 and CD68 in mice with both carotid calcification and Tempol

treatment (CaCl₂ Tempol) does not differ from control mice with (NaCl Tempol) or without Tempol treatment (NaCl CTL). Tempol treatment did not affect the baseline level of Iba-1 and CD68 as shown by the absence of difference between control mice and control mice treated with Tempol.

Tempol treatment prevents the increase in astrocyte immunoreactivity for s100 β in the hippocampus but not in the frontal cortex

As for s100 β immunoreactivity, Tempol treatment significantly reduces its increase in the DG region of the hippocampus (Fig. 4 A, $p < 0.05$). A significant decrease in s100 β fluorescence is observed in mice with carotid calcification with Tempol treatment (CaCl₂ Tempol) as compared to mice with carotid calcification alone (CaCl₂ CTL). Indeed, in mice with carotid calcification alone (CaCl₂ CTL), the increase for s100 β immunoreactivity passes from 1.5 fold to no increase for mice with carotid calcification and Tempol treatment (CaCl₂ Tempol) as compared to control with (NaCl Tempol) or without (NaCl CTL) Tempol treatment. Moreover, s100 β levels were similar between control mice (NaCl CTL and NaCl Tempol) and mice with both carotid calcification and Tempol treatment (CaCl₂ Tempol). The same as for the microglial markers, Tempol treatment did not affect the baseline level of 100 β as there is no difference between control mice and control mice treated with Tempol. However, for the frontal cortex, s100 β levels for mice with carotid calcification and Tempol treatment (CaCl₂ Tempol) are significantly different from s100 β levels in control mice treated (Fig. 4 B, $p < 0.05$) or not with Tempol (NaCl CTL and NaCl Tempol) and do not differ from mice with carotid calcification and no Tempol treatment (CaCl₂ CTL).

The immunoreactivity for s100 β remains increased by 1.2 fold for mice with carotid calcification and with (CaCl₂ Tempol) or without (CaCl₂ CTL) Tempol treatment as compared to control mice (NaCl CTL and NaCl Tempol).

Tempol treatment does not alter arterial properties of carotid stiffness

To alleviate the possibility that Tempol treatment decreases brain inflammation by reducing calcium deposits or collagen increase, arterial properties in mice treated with Tempol were assessed. As shown in Figure 5 A, Tempol doesn't alter calcium deposition, nor collagen increase or elastin fragmentation in arteries submitted to periarterial application of CaCl₂. Moreover, Tempol doesn't alter changes in intima-media thickness as shown by a significant increase in intima-media thickness in mice with carotid calcification and treated with Tempol as compared to control mice (Fig. 5 B, $p < 0.05$). Indeed, control mice show an intima-media thickness of $17.2 \mu\text{m} \pm 0.37$ compared to mice with carotid calcification that show a thickness of $33.04 \mu\text{m} \pm 0.61$.

Discussion

Arterial stiffness is considered as an important risk factor for cognitive decline in the elderly population (1, 21). However, its precise effects on the brain are still unknown. In a new animal model specific for arterial stiffness, we have shown that increased arterial stiffness leads to increased cerebral blood flow pulsatility, increased production of superoxide and neurodegeneration in the hippocampus. In the present study, we have demonstrated that carotid calcification leads to brain glial activation and that this effect is dependent on reactive oxygen species (ROS) production. Interestingly, the antioxidant treatment did not modify the calcification and structure of carotid arteries suggesting a protective effect on the downstream vasculature. These data suggest that arterial stiffness has a direct impact on brain homeostasis which is mediated by ROS production.

It has been shown that endothelial cells are particularly sensitive to increased shear stress stimulated by blood flow perturbations, such as increased pulsatility. Endothelial cells respond by an increase in nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase activity-dependant production of superoxide anion, which in turn, can induce inflammation (5-7). Previously, we have shown that carotid stiffness leads to increased blood flow pulsatility that stimulates the production of superoxide anion hence supporting these data. Oxidative stress can then lead to inflammation (5) and the present results suggest that it leads to cerebral inflammation. Indeed, increased levels of reactive oxygen species can trigger lipid

peroxidation chain reactions which can in turn induce membrane damage by inactivating membrane-bound proteins. This structural membrane damage in the cerebrovasculature and brain parenchyma can trigger neuroinflammation. Increased production of reactive oxygen species can also lead to a depletion of nitric oxide (NO) by stimulating its transformation to other reactive species such as peroxynitrite. This can affect many functions due to the fact that NO plays important roles in neurotransmission, regulation of vascular tone as well as immunity (22). Moreover, the production of peroxynitrite and other reactive species can lead to mitochondrial dysfunction and neuronal damage. Neuronal damage is more apparent in brain areas that are more sensitive to oxidative stress such as the hippocampus and the cortex. These brain regions contain high levels of docosahexaenoic acid (22), which is a polyunsaturated fatty acid that is susceptible to lipid peroxidation (23). These regions have been also shown to have decreased antioxidant capacity making it more sensitive to the increased production of reactive oxygen species (22). Therefore, this suggests that increased production of superoxide anion can lead to cerebral inflammation and potential neuronal damage especially in the hippocampus and the frontal cortex.

Hence, we assessed the level of microglial and astrocytic activation in the brain. As the results show, carotid stiffness induces an increase in microglial immunoreactivity for Iba-1 and CD68 indicating a presence of microglial activation specifically at the level of the hippocampus. The activation of microglia can lead to a release of different inflammatory mediators that at first try to repair the damages (24). However, a chronic activation of microglia leads to an important release of pro-

inflammatory mediators as well as reactive oxygen species that may induce neuronal damage (9, 10, 25). As for astrocytes, our results show that there is a significant increase in s100 β marker in the dentate gyrus region of the hippocampus as well as in the frontal cortex. No increase is observed in GFAP neither in the hippocampus nor in the frontal cortex. A possible explanation is that following two weeks of treatment GFAP expression decreases. It has been shown that an increase in GFAP expression can be seen at 36 to 48 hours after damage has been induced in the brain and is at its highest 72 hours following a cerebral insult. Following this time point, GFAP expression decreases significantly (24). As previously shown, this time point was chosen based on arterial properties of carotid stiffness which were optimal at 2 weeks. On the other side, the increase in s100 β seen here in response to carotid stiffness is consistent with many studies showing a correlation between s100 β increased levels and neuronal damage as neurodegeneration was observed in this model (18, 26, 27). Additionally, normal levels of s100 β are considered to have beneficial effects such as the promotion of neuronal survival, but increased levels of s100 β are shown capable of inducing apoptosis and the secretion of pro-inflammatory cytokines. More significantly, elevated levels of s100 β , representing activated astrocytes, can stimulate the inducible form of nitric oxide synthase (iNOS) that can induce neuronal damage through production of NO and reactive oxygen species (18, 26-28). It is believed that chronic cerebral inflammation, assessed by activation of glial cells, plays an important role in neuronal dysfunction linked to neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (13, 25-27). Overall, these data indicate that carotid stiffness induces activation of microglia and astrogliosis that can be

responsible for the neurodegeneration previously reported. The level of peripheral inflammation was assessed by measuring macrophages infiltration in the spleen of the treated mice. No increase in macrophages infiltration was observed between control and mice with carotid calcification. These results were also compared to a positive control, mice injected with LPS, the major component of the outer membrane of gram-negative bacteria, which show an important increase in macrophages infiltration. This confirms that the inflammation seen in the brain is caused by carotid calcification and not peripheral inflammation.

As for the regional differences, the activation of microglia and astrocytes in the hippocampus corresponds to the data that shows a significant increase in superoxide anion production in this region. No increase in the production of superoxide was shown in the frontal cortex; however blood flow pulsatility was significantly increased in the cortical areas. Astrocytes are closely located to the blood vessels, in fact it has been shown that s100 β positive astrocytes are a subtype of mature astrocytes that ensheath the cerebral blood vessels (19). Hence, this can explain that there is a presence of activation of astrocytes in the frontal cortex, which are located close to the vessels as compared to microglia that is located further from the vessels. It also suggests that the activation of astrocytes is induced by a different mechanism than the one inducing microglial activation and needs to be further investigated.

In order to explore the hypothesis that increased oxidative stress induces microglial and astrocytes activation, Tempol, a superoxide scavenger, was used. First of all, the efficiency of Tempol to reduce the production of superoxide in our model

was evaluated. The results show that Tempol significantly reduces the increase in the production of superoxide in all regions of the hippocampus, as well as the increases in Iba-1, CD68 and s100 β immunoreactivity in the hippocampus. However, Tempol did not affect the increase in s100 β immunoreactivity in the frontal cortex. Moreover, mice treated with Tempol and submitted to carotid calcification exhibit the same increased calcium deposits, increased collagen deposition, elastin fragmentation and increased intima-media thickness as shown previously (15). This suggests that Tempol-induced reduction of microglial and astrocytes activation in the hippocampus is not due to decreased arterial stiffness. Hence, these data indicate that, in the hippocampus only, microglial and astrocytes activation is caused by increased production of superoxide anion stimulated by increased flow pulsatility. However, in the frontal cortex, as Tempol did not alter the increase of s100 β , this indicates that activation of astrocytes in this area has a different mechanism and is not caused by increased production of superoxide. This is also consistent with the previously shown results that indicate an absence of increased oxidative stress in the frontal cortex. A possible mechanism which triggers astrogliosis in the frontal cortex might be related to cholinergic projections from basal forebrain to the cortex. Indeed, Alzheimer's disease shows a dysfunction in cholinergic pathways and it has been also shown that damage to cholinergic projections from basal forebrain to the cortex can result in astrogliosis (29, 30). It is possible that it is this mechanism that is responsible for astrogliosis seen in this study. However, this hypothesis needs to be further explored.

In conclusion, the results of this study show that carotid stiffness induces cerebral inflammation mediated by increased oxidative stress mainly in the hippocampal

region of the brain. These results suggest that arterial stiffness leads to increased oxidative stress, stimulated by elevated blood flow pulsatility. This could, in turn, induce the activation of microglia and astrocytes and leading to neuronal damage in the hippocampus, a brain area responsible for memory and cognition. Therefore, this shows that arterial stiffness alters directly brain homeostasis and needs to be considered as a potential target in prevention of cognitive decline in the elderly population.

Sources of funding

This study was supported by the Heart and Stroke Foundation, Fonds de la Recherche en Santé du Québec, the Canadian Foundation for Innovation and the Canadian Institutes of Health Research. Hélène Girouard was also the holder of a new investigator award from the FRSQ and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC). Nataliya Sadekova is a recipient of master degree scholarship from Société Québécoise d'Hypertension Artérielle.

Disclosures

None

References

1. Pase MP, Herbert A, Grima NA, Pipingas A, O'Rourke MF. Arterial stiffness as a cause of cognitive decline and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Internal medicine journal*. 2012;42(7):808-15. Epub 2011/12/14.
2. Rabkin SW. Arterial stiffness: detection and consequences in cognitive impairment and dementia of the elderly. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2012;32(3):541-9. Epub 2012/08/14.
3. Scuteri A, Tesauro M, Appolloni S, Preziosi F, Brancati AM, Volpe M. Arterial stiffness as an independent predictor of longitudinal changes in cognitive function in the older individual. *Journal of hypertension*. 2007;25(5):1035-40. Epub 2007/04/07.
4. Silacci P, Desgeorges A, Mazzolai L, Chambaz C, Hayoz D. Flow pulsatility is a critical determinant of oxidative stress in endothelial cells. *Hypertension*. 2001;38(5):1162-6. Epub 2001/11/17.
5. Yin W, Jo H, Voit EO. Systems analysis of the role of bone morphogenic protein 4 in endothelial inflammation. *Annals of biomedical engineering*. 2010;38(2):291-307. Epub 2009/10/24.
6. Hsiai TK, Hwang J, Barr ML, Correa A, Hamilton R, Alavi M, et al. Hemodynamics influences vascular peroxynitrite formation: Implication for low-density lipoprotein apo-B-100 nitration. *Free radical biology & medicine*. 2007;42(4):519-29. Epub 2007/02/06.
7. Thacher TN, Silacci P, Stergiopoulos N, da Silva RF. Autonomous effects of shear stress and cyclic circumferential stretch regarding endothelial dysfunction and

oxidative stress: an ex vivo arterial model. *Journal of vascular research*. 2010;47(4):336-45. Epub 2009/12/18.

8. Banati RB. Visualising microglial activation in vivo. *Glia*. 2002;40(2):206-17. Epub 2002/10/16.

9. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences*. 1996;19(8):312-8. Epub 1996/08/01.

10. Wilkinson BL, Landreth GE. The microglial NADPH oxidase complex as a source of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*. 2006;3:30. Epub 2006/11/11.

11. De Keyser J, Mostert JP, Koch MW. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *Journal of the neurological sciences*. 2008;267(1-2):3-16. Epub 2007/10/16.

12. Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*. 2009;457(7230):675-7. Epub 2009/02/06.

13. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*. 2010;119(1):7-35. Epub 2009/12/17.

14. Cerbai F, Lana D, Nosi D, Petkova-Kirova P, Zecchi S, Brothers HM, et al. The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus. *PloS one*. 2012;7(9):e45250. Epub 2012/10/03.

15. Sadekova N, Vallerand D., Guevara E., Lesage F., Girouard H. Carotid calcification in mice: a new model to study the effects of arterial stiffness on the brain *Journal of the American Heart Association*. 2013.

16. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological reviews*. 2011;91(2):461-553. Epub 2011/04/30.
17. Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, Kohsaka S, Imai Y. Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C-gamma -dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(22):20026-32. Epub 2002/03/28.
18. Goncalves CA, Leite MC, Nardin P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clinical biochemistry*. 2008;41(10-11):755-63. Epub 2008/05/06.
19. Wang DD, Bordey A. The astrocyte odyssey. *Progress in neurobiology*. 2008;86(4):342-67. Epub 2008/10/25.
20. Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, et al. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia*. 2007;55(2):165-77. Epub 2006/11/02.
21. Birns J, Kalra L. Cognitive function and hypertension. *Journal of human hypertension*. 2009;23(2):86-96. Epub 2008/07/25.
22. Berg RM, Moller K, Bailey DM. Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2011;31(7):1532-44. Epub 2011/04/14.
23. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *Journal of*

chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2005;827(1):65-75. Epub 2005/09/27.

24. Bolon B, Butt MT. Fundamental neuropathology for pathologists and toxicologists : principles and techniques. Hoboken, N.J.: Wiley; 2011. xx, 590 p. p.

25. Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. Progress in neurobiology. 2005;76(2):77-98. Epub 2005/08/06.

26. Steiner J, Bogerts B, Schroeter ML, Bernstein HG. S100B protein in neurodegenerative disorders. Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC. 2011;49(3):409-24. Epub 2011/02/10.

27. Lam AG, Koppal T, Akama KT, Guo L, Craft JM, Samy B, et al. Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NFkappaB. Neurobiology of aging. 2001;22(5):765-72. Epub 2001/11/14.

28. Yasuda Y, Tateishi N, Shimoda T, Satoh S, Ogitani E, Fujita S. Relationship between S100beta and GFAP expression in astrocytes during infarction and glial scar formation after mild transient ischemia. Brain research. 2004;1021(1):20-31. Epub 2004/08/26.

29. Terry AV, Jr., Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2003;306(3):821-7. Epub 2003/06/14.

30. Craft TK, Mahoney JH, Devries AC, Sarter M. Microsphere embolism-induced cortical cholinergic deafferentation and impairments in attentional performance. *The European journal of neuroscience*. 2005;21(11):3117-32. Epub 2005/06/28.

Figure Legends

Figure 1. Effect of carotid stiffness, induced by periarterial application of CaCl_2 , on microglia and astrocytes immunoreactivity. A) Fluorescence (expressed as relative fluorescence units) of Iba-1, a marker for microglia, B) CD68, a marker for activated microglia as well as C) $\text{s100}\beta$ and D) GFAP, markers for astrocytes, in different regions of the hippocampus, CA1, CA3, DG, and in the frontal cortex (FrA) from brain of mice with carotid arteries submitted to periarterial application of CaCl_2 or NaCl (control) (n=6, *** p<0.001 versus NaCl).

Figure 2. Effect of Tempol, a superoxide scavenger, on oxidative stress, assessed by superoxide anion production in the hippocampus. Superoxide anion production assessed by DHE fluorescence (relative fluorescence units) in A) CA1, B) CA3 and C) DG regions of the hippocampus in mice treated with Tempol in drinking water and submitted to periarterial application of CaCl_2 (CaCl_2 Tempol) or NaCl (NaCl Tempol) or given regular drinking water (CaCl_2 CTL and NaCl CTL) (n=3, *** p<0.001, * p<0.05).

Figure 3. Effect of Tempol on microglia immunoreactivity in the hippocampus. Fluorescence (expressed as relative fluorescence units) of A) Iba-1, a marker for microglia and B) CD68 a marker for activated microglia in different regions of the hippocampus, CA1, CA3 and DG in mice treated with Tempol in drinking water and submitted to periarterial application of CaCl_2 (CaCl_2 Tempol) or NaCl (NaCl Tempol) or given regular drinking water (CaCl_2 CTL and NaCl CTL) (n=3, *** p<0.001).

Figure 4. Effect of Tempol on astrocytes immunoreactivity in the hippocampus.

Fluorescence (expressed as relative fluorescence units) of s100 β , a marker for astrocytes in A) DG region of the hippocampus and in B) frontal cortex in mice treated with Tempol in drinking water and submitted to periarterial application of CaCl₂ (CaCl₂ Tempol) or NaCl (NaCl Tempol) or given regular drinking water (CaCl₂ CTL and NaCl CTL) (n=3, *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05).

Figure 5. Effect of Tempol on arterial properties of carotid arteries submitted to periarterial application of CaCl₂. A) Representative sections of carotid arteries, 2 weeks following application of CaCl₂ or NaCl in mice treated with Tempol, showing calcium deposits labeled in black with Von Kossa stain (VK), collagen deposits labeled in blue with Masson's Trichrome stain (MT), elastin distribution labeled in green by autofluorescence in mice treated with Tempol in drinking water. B) Measurement of intima-media thickness in carotid arteries 2 weeks following periarterial application of CaCl₂ or NaCl (control) in mice treated with Tempol (n=3, *** p<0.0001 versus NaCl).

Figures

Figure 1

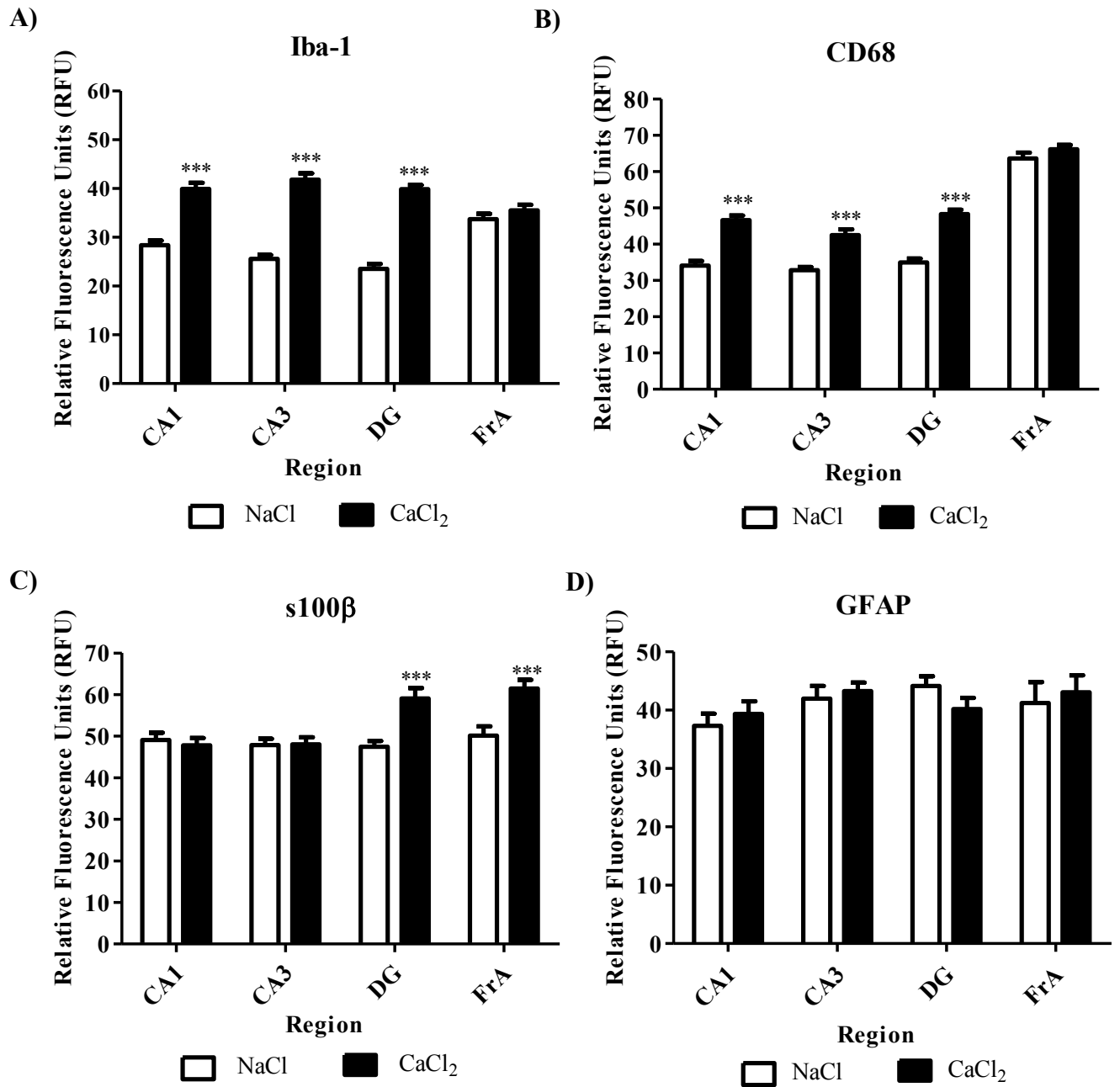


Figure 2

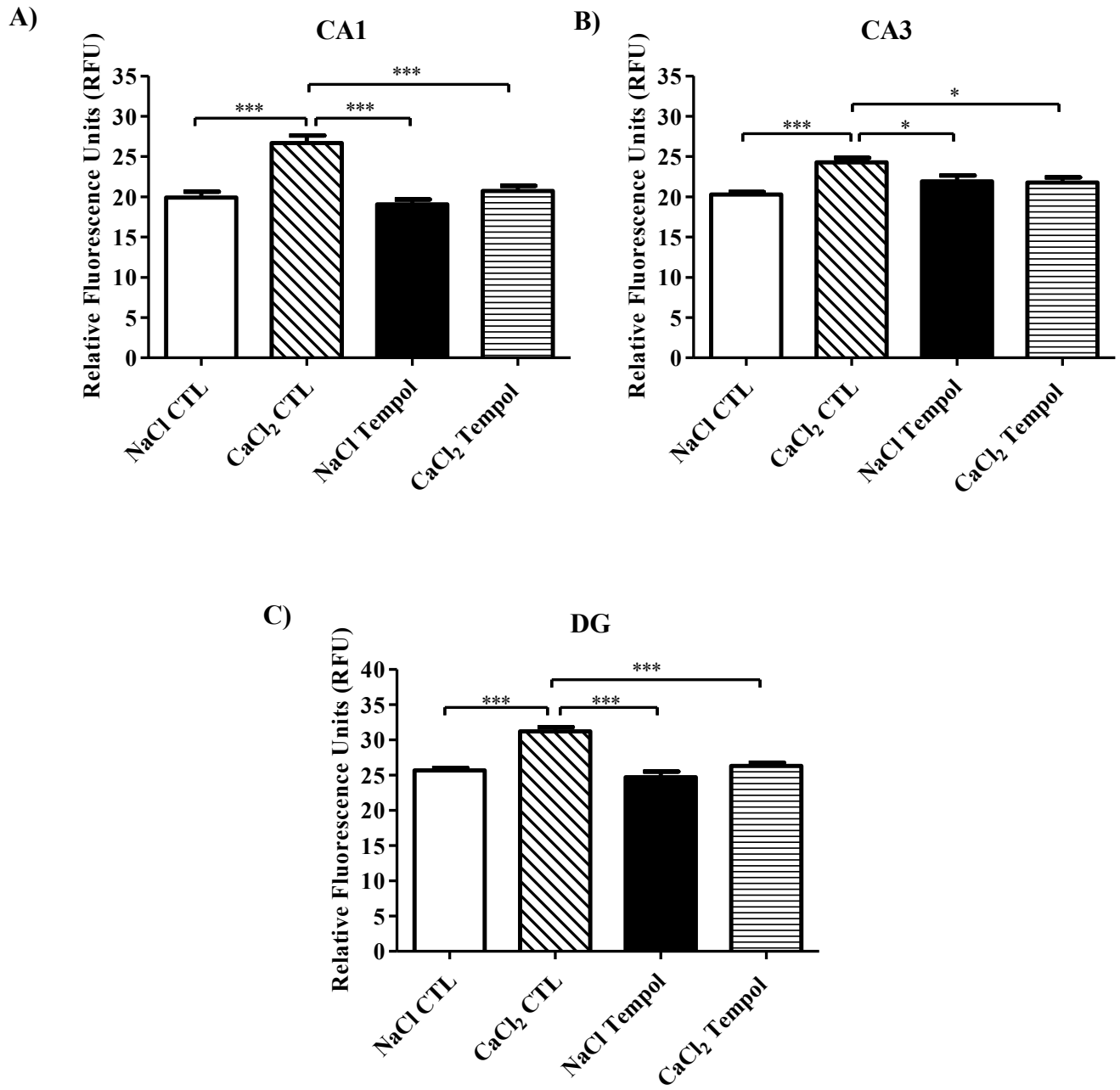
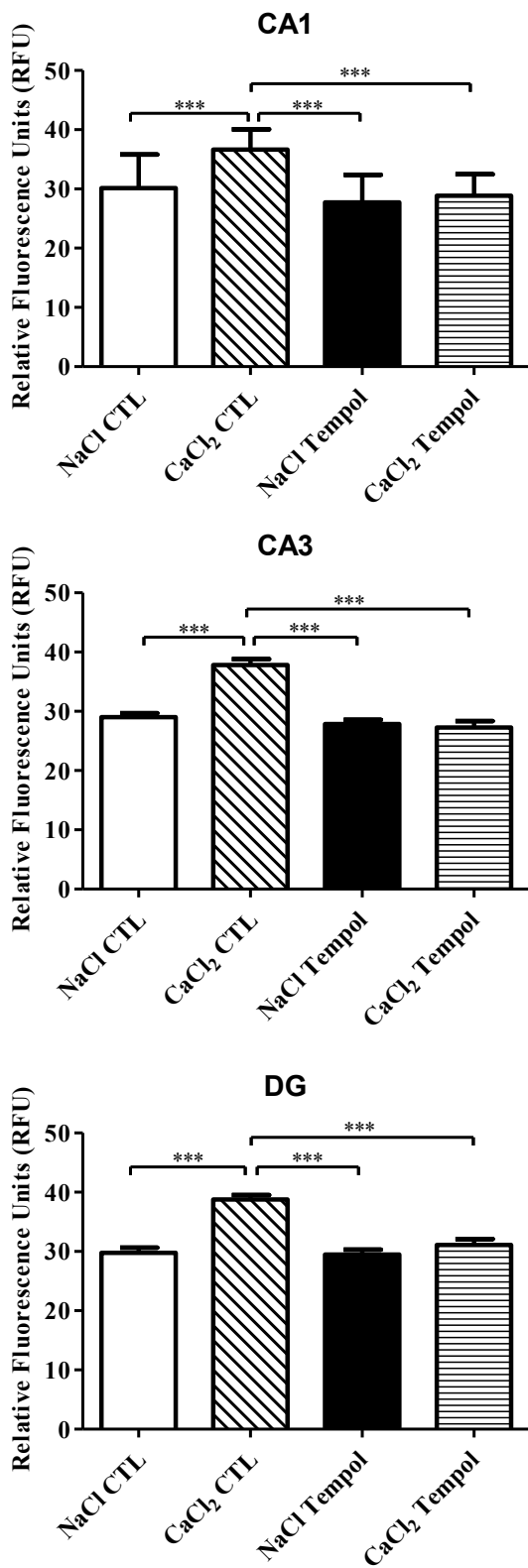


Figure 3

A)



B)

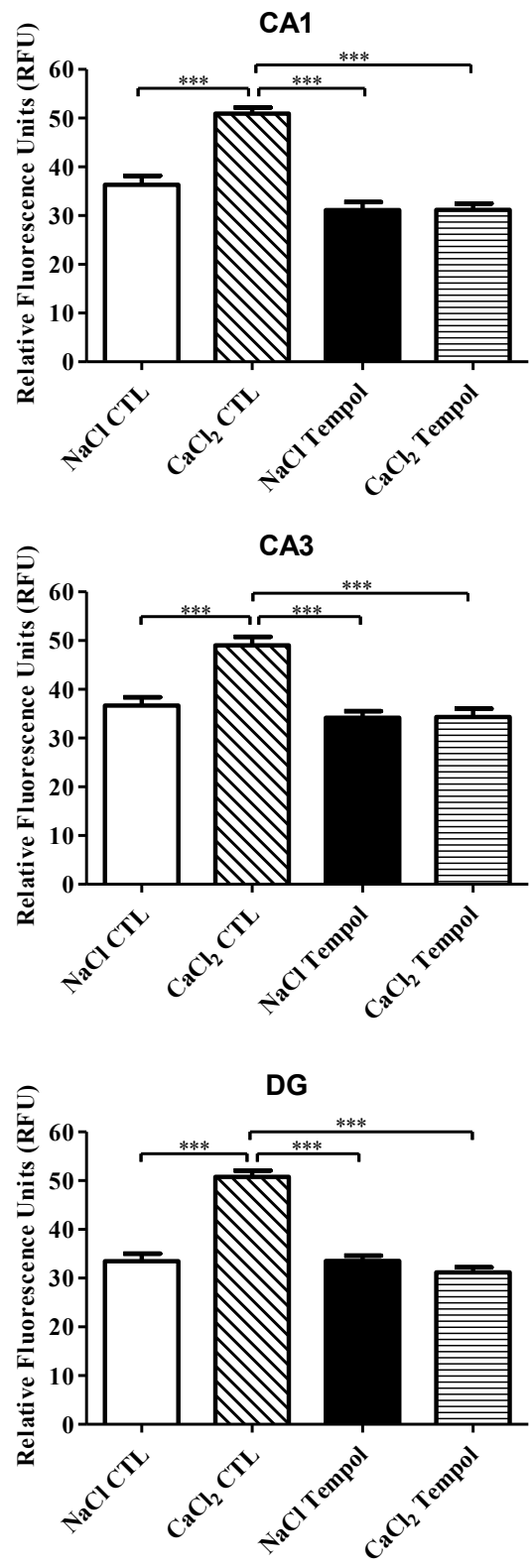


Figure 4

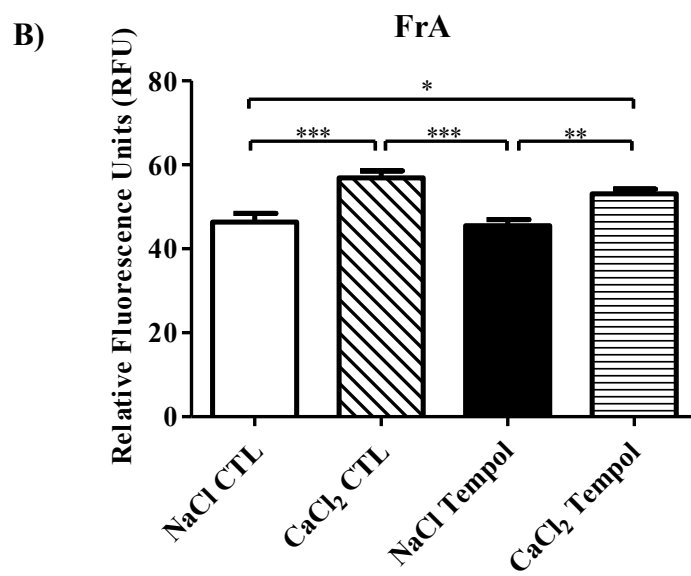
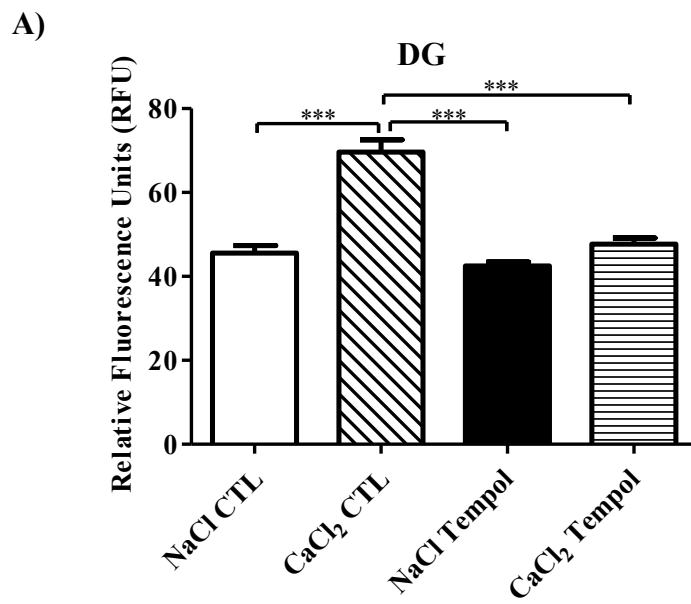
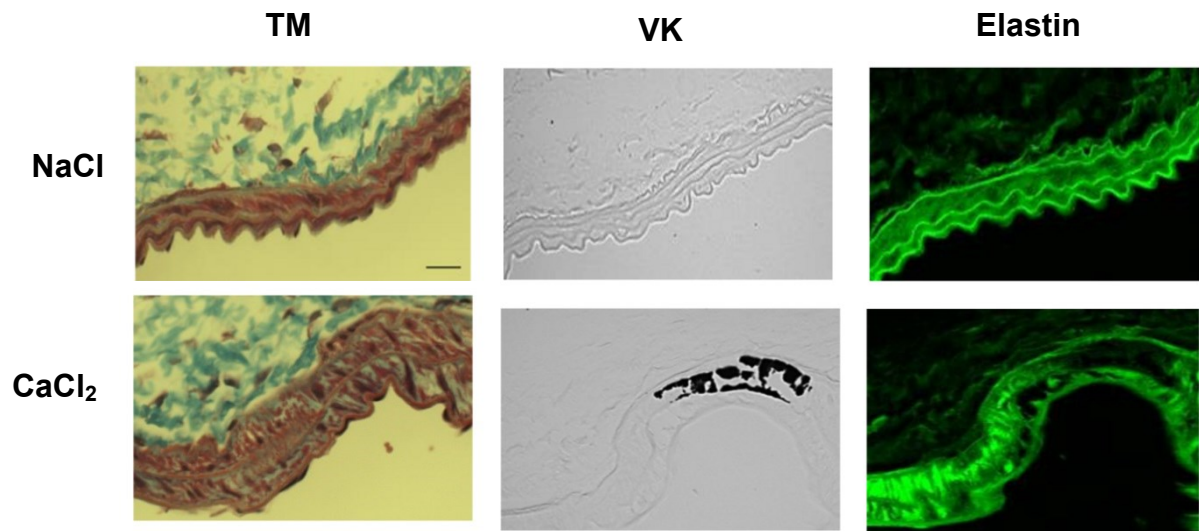
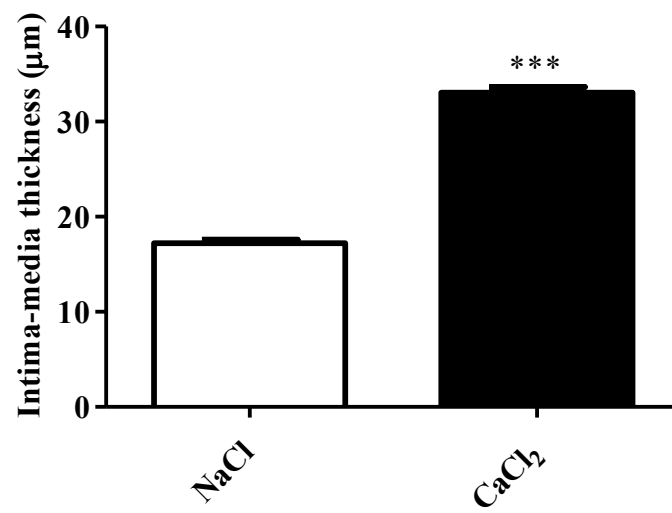


Figure 5

A)



B)

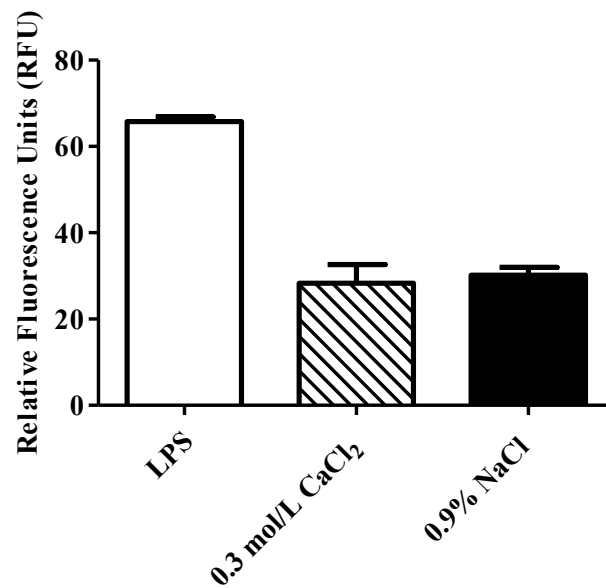


Supplemental Material

Supplemental Figures Legend

Figure 1. Macrophages infiltration in the spleen of mice with carotid calcification. Macrophages infiltration, assessed by MOMA-2 fluorescence (relative fluorescence units), in the spleen of mice with carotid arteries submitted to periarterial application of CaCl_2 or 0.9% NaCl (control) and mice injected with LPS, 2 mg/kg.

Supplemental Figure 1



DISCUSSION

7. Résumé et importance des résultats

La rigidité artérielle a été récemment identifiée comme un facteur déterminant pour le déclin cognitif chez les personnes âgées (67-69). Toutefois, les effets spécifiques de la rigidité artérielle sur l'homéostasie cérébrale sont peu connus. De plus, l'étude de ces effets a été particulièrement difficile car qu'il n'existe pas à ce jour un modèle animal spécifique à cette condition. Les modèles animaux existants présentent toujours une condition supplémentaire qui peut affecter le cerveau et ne peuvent donc être utilisés pour ce type d'étude. Ainsi, nous avons développé un nouveau modèle animal qui est spécifique à la rigidité artérielle et qui n'engendre pas des effets tels qu'une hypoperfusion cérébrale globale ou une augmentation de la pression artérielle. Ce modèle se base sur une calcification de l'artère carotide de souris et possède toutes les caractéristiques structurelles et mécaniques de la rigidité artérielle. Ainsi, ce nouveau modèle peut être utilisé afin d'explorer l'effet de la rigidité artérielle sur les fonctions et l'homéostasie cérébrales.

À l'aide de ce modèle, l'effet de la rigidité artérielle sur l'homéostasie cérébrale a été étudié. Les résultats montrent que la rigidité de la carotide induit une augmentation de la pulsatilité du flux sanguin cérébral reliée à une augmentation du stress oxydatif. Ceci induit une activation de la microglie et des astrocytes menant ainsi à une inflammation cérébrale médiée par l'augmentation de la production de l'anion superoxyde. Finalement, pour ce qui est de l'intégrité neuronale, la rigidité des carotides mène à une neurodégénérescence. Tous ces effets sont essentiellement

observés au niveau de l'hippocampe, région cruciale pour la mémoire et la cognition. Ainsi, les résultats de cette étude suggèrent que la rigidité artérielle joue un rôle important dans la pathogénèse des maladies neurodégénératives et devra être davantage considérée en ce qui a trait à la prévention des troubles cognitives chez la population âgée.

8. Calcification des carotides et rigidité artérielle : nouveau modèle animal

Nous avons développé un nouveau modèle animal de rigidité artérielle en se basant sur un modèle déjà existant d'élastocalcinose et d'anévrisme selon lequel une application du chlorure de calcium sur l'artère carotide ou l'aorte induit une calcification des fibres d'élastine (79-82). Ce modèle a montré que la calcification entraîne une fragmentation des fibres d'élastine qui est médiée par les métalloprotéinases matricielles (MMP) (80). Par contre, en appliquant une concentration plus faible de chlorure de calcium sur les artères carotides, nous avons démontré que la calcification dans notre modèle induit une rigidité artérielle, caractérisée par les altérations structurelles et mécaniques, sans toutefois induire d'anévrisme. Les artères carotides ont été sélectionnées pour leur proximité par rapport au cerveau et le fait qu'elles constituent un apport sanguin cérébral important. De plus, il a été démontré que l'athérosclérose des artères carotides est un prédicteur important des accidents cérébrovasculaires. Par conséquent, l'effet de la rigidité des artères carotides sur la fonction cérébrale mérite d'être explorée d'avantage (5, 83) et notre nouveau modèle s'avère un outil indispensable.

8.1 Altérations structurelles induites par une calcification de l'artère carotide

Tout d'abord, l'efficacité de l'application du chlorure de calcium a été vérifiée par la présence des dépôts de calcium au niveau des carotides soumises à l'application des

doses de 0,3 et 0,4 mol/L de CaCl_2 . Aucun dépôt de calcium n'a été observé au niveau des carotides soumises à l'application du NaCl, condition contrôle, ainsi que de la dose la plus basse de CaCl_2 (0,2 mol/L). Les dépôts de calcium sont observés au milieu de l'artère carotide, là où le CaCl_2 a été directement déposé, indiquant que la calcification est localisée, qu'elle n'affecte pas tout le segment artériel et le plus important qu'elle ne se propage pas aux vaisseaux cérébraux. Afin de vérifier la possibilité que l'application de CaCl_2 induit un anévrisme, le rayon du lumen des carotides a été mesuré. Nos résultats n'ont montré aucune différence entre les carotides contrôles et les carotides calcifiées indiquant que les doses de CaCl_2 utilisées n'ont pas induit d'anévrisme.

Les artères rigides présentent une synthèse accrue de collagène ainsi qu'une fragmentation de l'élastine qui représentent des facteurs cruciaux pour l'augmentation de la rigidité (5, 9). En effet, la calcification des carotides avec les doses de 0,3 et 0,4 mol/L induit une augmentation de collagène et une fragmentation d'élastine. La fragmentation d'élastine correspond précisément aux sites où des dépôts de calcium sont observés indiquant encore une fois la spécificité de la calcification. L'élastine est une protéine qui possède une longue demie-vie dû principalement au fait que sa synthèse se fait en majeure partie durant la gestation et la période suivant la naissance. Sa synthèse diminue grandement suivant cette période et ainsi la réparation des fibres élastiques durant l'âge adulte est un processus incomplet. Ainsi, la fragmentation d'élastine induit par la calcification a un impact important sur la paroi artérielle et sa capacité élastique (25). Finalement, on observe également une infiltration de macrophages au niveau du tissu artériel représentant la caractéristique

inflammatoire de la rigidité artérielle (6). L'augmentation de la distribution du collagène contribue grandement à l'augmentation de l'épaisseur de la paroi artérielle (5, 9). Les résultats montrent que la calcification des carotides induit une augmentation significative de l'épaisseur intima-média. Ainsi, la calcification des carotides avec les doses de 0,3 et 0,4 mol/L de CaCl_2 induit une augmentation de la synthèse de collagène, une fragmentation de l'élastine, une infiltration de macrophages et une augmentation de l'épaisseur intima-média, toutes représentant les altérations structurelles caractéristiques de la rigidité artérielle. Il est important de noter que ces effets sont observés deux semaines suivant l'application de CaCl_2 . Des études préliminaires ont également été réalisées à une et trois semaines. Une semaine suivant la calcification, les dépôts de collagène et la fragmentation d'élastine n'étaient pas aussi importants qu'après deux semaines et après trois semaines, les effets semblaient se résorber, mais de façon non significative. Ainsi, la durée de deux semaines de traitement a été choisie comme le temps optimal puisque c'est à cette période que les dépôts de calcium étaient bien visibles et que la structure et le contenu en collagène et en élastine étaient significativement altérés. Pour ce qui est des effets artériels suivant la période de deux semaine, ces derniers méritent d'être explorés d'avantage afin d'évaluer les effets plus chroniques de cette calcification.

8.2 Altérations mécaniques induites par une calcification de l'artère carotide

Les altérations mécaniques, telles que les altérations de la compliance et de la distensibilité artérielle, permettent de conclure définitivement qu'une artère est rigide (5). En effet, les résultats montrent que la calcification des carotides induit une

diminution de la compliance et de la distensibilité artérielle. Ceci indique que les artères carotides calcifiées n'arrivent pas à se dilater de manière efficace avec l'augmentation de la pression intramurale. Ceci est principalement causé par une fragmentation de l'élastine, la protéine fournissant la capacité élastique aux artères, et à une augmentation du collagène qui fournit la rigidité (5). De plus, la calcification avec une dose de 0,3 mol/L de CaCl_2 induit une diminution plus importante de la compliance et de la distensibilité. Somme toute, avec les altérations structurales, ces données permettent de conclure que l'application de CaCl_2 sur la carotide induit la rigidité de cette dernière et que la dose de 0,3 mol/L de CaCl_2 est la dose optimale pour induire ces changements.

D'autre part, plusieurs indices sont utilisés pour mesurer la rigidité artérielle en clinique. Les plus courants sont la mesure de la vitesse de propagation de l'onde de pouls (5) et l'index beta (84). La vitesse de propagation de l'onde de pouls est mesurée entre deux repères, par exemple pour l'aorte, la vitesse est mesurée entre l'artère fémorale et l'artère carotide (5). Toutefois, comme la rigidité est induite au niveau de l'artère carotide, il aurait été nécessaire de canuler une artère cérébrale pour mesurer ce paramètre, ce qui réduirait la perfusion cérébrale et pourrait ainsi influencer les données sur l'homéostasie cérébrale. De plus, étant donné que le modèle utilisé est la souris, aucun appareil, à ce jour, s'avère assez précis pour mesurer la vitesse de l'onde de pouls dans un aussi petit segment artériel avec un niveau de variabilité acceptable. Cette mesure ne peut être donc effectuée sur ce modèle. Par contre, l'index beta a été déterminé. Les résultats montrent que la calcification de la carotide entraîne une augmentation significative de l'index beta. En

effet, cet index est 1,6 fois supérieur au contrôle. Cette donnée est particulièrement intéressante puisqu'il a été montré dans une étude clinique qu'une population âgée de 65 à 75 ans a un index beta 1,6 fois supérieur à celui de la population âgée de 25 à 35 ans (84). Ceci suggère que les souris avec la carotide calcifiée correspondent cliniquement à une population âgée de 65 à 75 ans. Par conséquent, ce nouveau modèle animal présente une rigidité artérielle qui se relate à celle induite par le vieillissement.

8.3 Altérations de la pulsatilité du flux sanguin cérébral

Finalement, une caractéristique importante de la rigidité artérielle est l'altération de la pulsatilité du flux sanguin. En effet, les résultats indiquent que les souris ayant subi une calcification de la carotide montrent une augmentation de la pulsatilité du flux sanguin au niveau cérébral autant au niveau des petites que des plus grandes artères. Il est généralement montré que l'augmentation de la rigidité artérielle mène plutôt à des dommages microvasculaires au niveau du cerveau et des reins en affectant surtout les petites artères qui sont plus sensibles à une augmentation de la pulsatilité (12, 64). Toutefois, il a été également montré que les artères cérébrales de tout diamètre sont sensibles au stress pulsatile (14) montrant que les artères de tout diamètre peuvent être affectées par la pulsatilité. Ainsi, la rigidité artérielle de la carotide semble être assez importante afin d'induire une augmentation de la pulsatilité au niveau des petites et des plus grandes artères.

D'autre part, le côté du cerveau correspondant à la carotide calcifiée présente une augmentation significative de la pulsatilité comparativement au côté du cerveau opposant la carotide calcifiée qui ne montre pas de changement significatif. À première vue, ces résultats semblent indiquer que la partie ipsilatérale à la carotide calcifiée est affectée tandis que le côté contralatéral reste intact, car la deuxième carotide n'est pas calcifiée. Toutefois, la circulation cérébrale est une structure continue et les artères sont interconnectées entre elles. Ainsi, il serait surprenant que seulement un côté du cerveau soit affecté. Ces résultats sont plutôt compatibles avec le principe que la pulsatilité du flux sanguin diminue en fonction de la distance du segment artériel rigide (85). Ainsi, les artères se situant du côté contralatéral de la carotide calcifiée se retrouvent être à une distance plus grande et présentent ainsi une pulsatilité moindre que les artères se situant du côté ipsilatéral. Pour ce qui est des différentes régions du cerveau, les résultats montrent que la calcification de la carotide induit une augmentation de la pulsatilité au niveau de l'artère moyenne cérébrale et de ses branches, se situant au niveau du cortex pariétal, sans induire de changement au niveau du cortex somatosensoriel. Encore une fois, le cortex somatosensoriel se situe à une distance plus élevée de la carotide ce qui peut expliquer la diminution de la pulsatilité. Pour ce qui est de l'artère moyenne cérébrale, les mesures ont été réalisées au niveau du cortex pariétal se situant plus près de la carotide affectée et montrant ainsi une augmentation significative de la pulsatilité du flux sanguin. Somme toute, ces résultats montrent que la rigidité de la carotide calcifiée induit une augmentation de la pulsatilité du flux sanguin cérébral indiquant à

la fois que la calcification de la carotide répond à toutes les caractéristiques de la rigidité artérielle et suggérant également que le cerveau est affecté.

8.4 Avantages et inconvénients du modèle

Tout d'abord, avec ce modèle, la calcification des carotides induit une rigidité artérielle spécifique à l'artère carotide. Les dépôts de calcium se concentrent sur la partie de l'artère qui a été badigeonnée avec le chlorure de calcium et ne se propagent pas aux autres segments artériels. Ceci représente un énorme avantage comparativement aux autres modèles de calcification artérielle comme l'administration de la vitamine D et de la nicotine ou de la vitamine K et de la warfarine qui induisent une calcification générale des artères qui n'est pas spécifique à un segment artériel particulier (30, 31). Une autre force du modèle est que ce traitement n'engendre pas d'augmentation de pression artérielle systolique qui peut être accompagnée de plusieurs effets néfastes surtout sur le cerveau. L'hypertension peut accélérer l'artériosclérose au niveau des artères cérébrales menant entre autre à une diminution du diamètre du lumen artériel induisant une augmentation de la résistance au flux sanguin et une diminution de la perfusion cérébrale pouvant créer des régions d'ischémie (65). Une augmentation de la pression artérielle peut être également accompagnée des niveaux élevés d'angiotensine II qui est connue pour induire un stress oxydatif et une inflammation au niveau cérébral (86). Ainsi, la présence d'une pression artérielle élevée peut mener à plusieurs effets non spécifiques et non dissociables de la rigidité artérielle. La calcification artérielle n'induit pas non plus de changement au niveau du diamètre artériel et par

conséquent n'induit pas une hypoperfusion globale du cerveau. Toutefois, ceci n'exclut pas la possibilité que le débit sanguin cérébral soit altéré surtout au niveau des artérioles et des capillaires et nécessiterait donc d'être mesuré. Les autres avantages incluent le fait que c'est un modèle peu coûteux, qui peut être reproduit facilement et qui peut être également appliqué à d'autres artères que la carotide.

La principale faiblesse du modèle est qu'il présente des effets 2 semaines suivant la calcification. Il serait intéressant d'examiner l'effet plus chronique de la rigidité artérielle. Toutefois, afin d'effectuer ceci, nos résultats suggèrent qu'une ré-application du calcium serait nécessaire, puisque les résultats préliminaires suggèrent qu'à trois semaines suivant l'application du CaCl_2 , les effets sur les artères commencent à se résorber.

9. Les effets de la rigidité de l'artère carotide sur le cerveau

9.1 Augmentation de la production de l'anion superoxyde

Des études ont démontré que l'augmentation de la pulsatilité du flux sanguin est capable d'induire une augmentation du stress oxydatif, qui est un des signes d'une perturbation de l'homéostasie cérébrale (87, 88). Les résultats de notre étude montrent que la rigidité de la carotide induit une augmentation significative de la production de l'anion superoxyde au niveau de l'hippocampe. Cette augmentation suppose qu'il y a une production également élevée d'autres espèces réactives qui se forment à partir de l'anion superoxyde et qui peuvent induire divers dommages au niveau cérébral (51, 53).

L'augmentation du stress oxydatif est observée uniquement au niveau de l'hippocampe. Aucune augmentation n'est mesurée au niveau du cortex, ni frontal ni somatosensoriel. Les mesures de pulsatilité du flux sanguin ont été majoritairement déterminées au niveau du cortex ce qui représente la faiblesse de la technique de la tomographie à cohérence optique. Étant donné que cette technique permet d'effectuer des mesures qu'à la surface du cerveau, au niveau du cortex, avec une pénétration maximale de 500 μm , il est donc impossible de mesurer la vitesse du flux sanguin au niveau de l'hippocampe. Malgré ceci, l'absence d'augmentation du stress oxydatif au niveau du cortex somatosensoriel peut s'expliquer par le fait, qu'au niveau de cette région aucune augmentation de la pulsatilité n'est observée. Pour ce qui est du cortex frontal, ceci est encore une fois compatible avec le fait que la pulsatilité du

flux sanguin varie avec la distance. Le cortex frontal se situe à une distance plus grande de la carotide calcifiée que l'hippocampe et présente probablement une pulsatilité moindre que celle de l'hippocampe. Ceci pourrait expliquer que malgré l'augmentation de la pulsatilité globale au niveau du cortex, celle-ci ne doit pas être suffisante pour causer une différence au niveau de la production d'anion superoxyde. Il a été également montré, chez l'humain, que les régions centrales du cerveau comme l'hippocampe et l'amygdale sont plus sensibles aux dommages provenant des artères centrales comparativement aux régions situées à une plus grande distance comme le cortex (89). Pour ce qui est de la source potentielle d'anion superoxyde, il a été montré que l'augmentation du flux sanguin pulsatile stimule principalement l'activité de la NADPH oxydase par les cellules endothéliales (90, 91) qui est leur principale source de radicaux libres oxygénés (92). Ceci suggère que l'augmentation de la pulsatilité induite par la rigidité de l'artère carotide stimule la NADPH oxydase qui induit à son tour une production augmentée d'anion superoxyde au niveau cérébral. Cette hypothèse mérite donc d'être étudiée davantage. De plus, afin d'explorer la possibilité que les cellules endothéliales puissent être la source des radicaux libres d'oxygène, un co-marquage des cellules endothéliales et des espèces réactives de l'oxygène ou encore une mesure de la réactivité endothéliale sur artères isolées pourraient être réalisés. Somme toute, les résultats indiquent que la rigidité artérielle, induite par une calcification de la carotide, mène à une augmentation du stress oxydatif associée à l'augmentation de la pulsatilité du flux sanguin cérébral.

9.2 Activation de la microglie et des astrocytes

La grande majorité des pathologies et des perturbations cérébrales comprennent généralement l'implication et l'activation de cellules gliales (58). La présence du stress oxydatif qui peut stimuler l'activation gliale (61) et la présence de neurodégénérescence qui peut être la conséquence d'une activation prolongée de cellules gliales (41, 93), suggèrent que la rigidité de l'artère carotide induit également une activation de la microglie et des astrocytes. Il a été également montré que l'augmentation de la pulsativité du flux sanguin peut stimuler l'activation de la NADPH oxydase par les cellules endothéliales induisant ainsi une production élevée des radicaux libres d'oxygène et d'azote (90-92). Ces derniers peuvent induire une peroxydation lipidique et une diminution de l'activité anti-oxydante cérébrale (94). Le cerveau est particulièrement sensible à ces effets car il contient des niveaux élevés d'acides gras polyinsaturés et possède un mécanisme antioxydant déjà réduit à la base (51). Ceci est particulièrement vrai pour l'hippocampe et le cortex qui sont des régions beaucoup plus vulnérables au stress oxydatif. La peroxydation lipidique est responsable de plusieurs dommages dont des atteintes structurales aux membranes endommageant ainsi leurs intégrité et fonctions. Ce processus peut ensuite mener à une inflammation cérébrale. De plus, l'augmentation de la production des radicaux libres oxygénés peut induire une diminution de la biodisponibilité de NO en favorisant sa transformation en peroxynitrite et autres radicaux libres. Comme le NO joue un rôle important dans la neurotransmission, la régulation du tonus vasculaire et la réponse immunitaire, ceci altère plusieurs mécanismes physiologiques. La production de peroxynitrite et autres radicaux libres peut également induire des perturbations au

niveau de la mitochondrie et des dommages neuronaux (94). Par conséquent, toutes ces données suggèrent que l'augmentation de pulsatilité mène à une augmentation du stress oxydatif qui peut induire une inflammation cérébrale et des dommages neuronaux. En effet, les résultats de cette étude montrent que la rigidité artérielle, induite par une calcification des carotides, stimule l'augmentation de la fluorescence des marqueurs microgliaux, Iba-1 et CD68, au niveau de l'hippocampe. L'augmentation d'Iba-1 indique que la microglie a subi une hypertrophie de son corps cellulaire et de ses ramifications et qu'elle s'est multipliée. L'augmentation de CD68 permet de confirmer l'état activé de la microglie (40, 43). Il est important de mentionner que le marqueur CD68 n'est pas spécifique aux cellules microgliales et peut également indiquer une augmentation de macrophages. Malgré ceci, une augmentation de la microglie activée ou des macrophages indiquent en tous les cas qu'il y a une présence d'inflammation cérébrale. Comme pour le stress oxydatif, l'activation microgliale est présente au niveau de l'hippocampe et absente au niveau du cortex frontal suggérant un lien entre les deux processus. Afin d'élucider ce lien, les souris ont été traitées avec le Tempol, un antioxydant spécifique pour l'anion superoxyde. Deux semaines de traitement avec le Tempol a permis d'inhiber la production de l'anion superoxyde au niveau de l'hippocampe chez les souris dont les carotides ont été calcifiées. Le traitement a également permis d'inhiber les augmentations de la fluorescence des marqueurs Iba-1 et CD68 suggérant que l'activation de la microglie est induite par l'augmentation du stress oxydatif au niveau cérébral, puisque la calcification artérielle n'a pas été affectée.

Pour ce qui est des astrocytes, les résultats montrent une augmentation de la fluorescence de s100 β au niveau du gyrus denté (DG) de l'hippocampe ainsi qu'au niveau du cortex frontal. Par contre, aucune augmentation de GFAP n'est observée. Il a été montré qu'une augmentation de GFAP est généralement observée dans les 36 à 48 heures suivant une perturbation cérébrale. Le pic d'augmentation est observé à 72 heures et l'expression de GFAP diminue considérablement suivant cette période (35). Ainsi, ceci pourrait expliquer l'absence de l'effet de GFAP mesuré à deux semaines de traitement. Il est également possible que la rigidité de la carotide affecte davantage les astrocytes plus matures qui expriment s100 β , mais n'expriment pas le GFAP (46, 50). D'autre part, le fait qu'on observe une augmentation de s100 β qu'au niveau du DG et pas des autres régions de l'hippocampe pourrait s'expliquer par le fait qu'on observe une plus grande densité d'astrocytes au niveau de cette région, particulièrement au niveau de l'hilus, permettant de détecter plus facilement une différence. Pour ce qui est du mécanisme d'action, le traitement avec le Tempol inhibe l'augmentation de s100 β au niveau de l'hippocampe indiquant que l'activation des astrocytes résulte d'une augmentation de la production de l'anion superoxyde. Ceci indique que l'activation de la microglie et des astrocytes au niveau de l'hippocampe résulte de l'augmentation du stress oxydatif. De plus, les altérations induites à l'artère carotide n'ont pas été modifiées par le traitement avec l'antioxydant suggérant que c'est l'inhibition de la production cérébrale de l'anion superoxyde qui est responsable des effets observés. Pour ce qui est du cortex frontal, il ne présente ni d'augmentation de production de l'anion superoxyde ni d'activation microgliale. Toutefois, on y observe une activation astrocytaire définie par l'augmentation de la

fluorescence de $s100\beta$. L'augmentation de ce dernier n'est pas inhibée par le Tempol, indiquant que dans cette région, l'activation des astrocytes n'est pas causé par l'augmentation de la production de l'anion superoxyde et résulte possiblement d'un autre mécanisme. Ce dernier pourrait possiblement se baser sur la dysfonction cholinergique. Dans la maladie d'Alzheimer, le déclin cognitif a été associé à la perte de la fonction cholinergique (95) et des atteintes au niveau des projections cholinergiques allant de la prosencéphale basale vers le cortex et l'hippocampe ont été associés aux dysfonctions cognitives (95, 96). Il a été également montré que les dommages induits au niveau du système cholinergique cortical sont accompagnés d'une astrogliose (96). Ainsi, il serait possible que la rigidité artérielle altère les projections cholinergiques au niveau du cortex induisant ainsi une activation des astrocytes. Toutefois, ce mécanisme mérite d'être exploré davantage afin de conclure définitivement.

L'ensemble de ces résultats permettent de conclure d'abord que la rigidité de l'artère carotide induit une activation de la microglie et des astrocytes indiquant une perturbation évidente de l'homéostasie cérébrale. Deuxièmement, l'étude montre que l'augmentation de la production d'anion superoxyde, stimulée par une augmentation de la pulsatilité du flux sanguin, est le mécanisme responsable de l'inflammation cérébrale observée au niveau de l'hippocampe.

9.3 Neurodégénérescence

La présence d'activation microgliale, de l'astrogliose et de l'augmentation du stress oxydatif suggère que les neurones sont également affectés, puisque ces altérations peuvent toutes mener aux dommages neuronaux (41, 51, 93). En effet, la microglie activée peut sécréter différents médiateurs inflammatoires représentant une réponse initiale protectrice du cerveau (35). Par contre, une activation prolongée de la microglie induit une sécrétion importante de cytokines inflammatoires et d'espèces réactives oxygénées qui peuvent mener à des dommages neuronaux (39, 41, 58). De plus, il a été montré que les niveaux élevés de s100 β sont corrélés avec des dommages cérébraux, des dysfonctions cérébrales ainsi qu'avec les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (48, 62, 93). Les astrocytes activés peuvent induire l'activité de iNOS qui peut mener aux dommages neuronaux par la production de NO et des diverses espèces réactives (48, 62, 93, 97). Ainsi, la présence de la neurodégénérescence a été évaluée par le marquage au Fluoro-Jade B, un marqueur spécifique aux neurones en dégénérescence (98). Les résultats montrent que la rigidité artérielle induit une neurodégénérescence au niveau de l'hippocampe sans affecter le cortex frontal. Les neurones dégénérants se retrouvent plus spécifiquement au niveau d'une sous-région de CA1 appelée lacunosum-moleculare. Cette région contient des interneurones qui intègrent les signaux entre le cortex entorhinal et la région CA1 de l'hippocampe. Ces interneurones jouent un rôle important dans la mémoire épisodique et spatiale. Il a été d'ailleurs montré que les neurones entorhinaux qui projettent vers l'hippocampe sont parmi les premières cellules affectées dans la maladie d'Alzheimer (99). Ainsi,

ces données montrent, qu'au niveau de l'hippocampe, l'augmentation du stress oxydatif et l'activation de la microglie et des astrocytes mènent à une neurodégénérescence. L'absence de neurones dégénérésents au niveau du cortex frontal coïncide avec les données qui montrent une absence d'augmentation du stress oxydatif et d'activation microgliale au niveau de cette région. Encore une fois, ceci indique que l'activation astrocytaire présente dans le cortex frontal a un mécanisme d'action différent qui devrait être étudié plus en détail.

10. Conclusions et perspectives

Les résultats de cette étude montrent d'abord que la calcification de l'artère carotide induit une rigidité de cette dernière sans induire d'anévrisme, d'hypoperfusion ou d'augmentation de pression artérielle. Ainsi, le premier objectif de ce projet de maîtrise a été atteint par la création de ce nouveau modèle animal spécifique à la rigidité artérielle. Deuxièmement, les résultats montrent que la rigidité de l'artère carotide induit une augmentation de la pulsatilité du flux sanguin qui mène à une augmentation de la production d'anion superoxyde qui induit à son tour une activation microgliale et une astrogliose. Toutes ces perturbations mènent également à la neurodégénérescence. Ces effets sont particulièrement observés au niveau de l'hippocampe, la région cruciale pour la mémoire et la cognition. Ainsi, l'objectif d'évaluer les effets de la rigidité artérielle à l'aide du nouveau modèle a permis de conclure que l'homéostasie cérébrale est définitivement altérée. La rigidité artérielle mérite donc d'être considérée comme une cible potentielle dans la prévention et le traitement des dysfonctions cognitives chez les personnes âgées.

Les résultats de cette étude a également soulevé plusieurs autres questions et hypothèses qui méritent d'être explorées. Ainsi, les perspectives sont d'abord de déterminer si la NADPH oxydase est la source de la production d'anion superoxyde. De plus, il serait pertinent de mesurer le débit sanguin cérébral dans les différentes régions cérébrales pour évaluer comment ce dernier est affecté par la rigidité artérielle ainsi que d'élucider le mécanisme d'action par lequel l'astrogliose est induite

au niveau du cortex. Finalement, il serait important d'évaluer les fonctions cognitives des souris pour voir si cette perturbation de l'homéostasie cérébrale mène à des dysfonctions cognitives. Ces études permettront d'explorer davantage les effets de la rigidité artérielle sur le cerveau et d'en évaluer les conséquences cognitives.

BIBLIOGRAPHIE

1. Levick JR. An introduction to cardiovascular physiology. 4th ed. London: Arnold; 2003. 372 p.
2. Michiels C. Endothelial cell functions. Journal of cellular physiology. 2003;196(3):430-43. Epub 2003/08/02.
3. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood. 1998;91(10):3527-61. Epub 1998/06/20.
4. Mathieu C. Cours en ligne: Rigidité artérielle. France: LeMonde.fr; 2010 [updated 18 avril 2010]; Available from: <http://collettemathieu.blog.lemonde.fr/category/cours-sur-la-rigidite-arterielle/>.
5. Safar M, Frohlich ED. Atherosclerosis, large arteries and cardiovascular risk. Basel ; New York: Karger; 2007. viii, 359 p. p.
6. Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2005;25(5):932-43. Epub 2005/02/26.
7. McNulty M, Mahmud A, Spiers P, Feely J. Collagen type-I degradation is related to arterial stiffness in hypertensive and normotensive subjects. Journal of human hypertension. 2006;20(11):867-73. Epub 2006/04/07.
8. Laurent S, Boutouyrie P, Lacolley P. Structural and genetic bases of arterial stiffness. Hypertension. 2005;45(6):1050-5. Epub 2005/04/27.
9. Xu C, Zarins CK, Pannaraj PS, Bassiouny HS, Glagov S. Hypercholesterolemia superimposed by experimental hypertension induces

differential distribution of collagen and elastin. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(12):2566-72. Epub 2000/12/16.

10. Simons PC, Algra A, Bots ML, Grobbee DE, van der Graaf Y. Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness: indicators of cardiovascular risk in high-risk patients. The SMART Study (Second Manifestations of ARterial disease). *Circulation*. 1999;100(9):951-7. Epub 1999/09/01.

11. Lee HY, Oh BH. Aging and arterial stiffness. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2010;74(11):2257-62. Epub 2010/10/22.

12. Mitchell GF, van Buchem MA, Sigurdsson S, Gotal JD, Jonsdottir MK, Kjartansson O, et al. Arterial stiffness, pressure and flow pulsatility and brain structure and function: the Age, Gene/Environment Susceptibility--Reykjavik study. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134(Pt 11):3398-407. Epub 2011/11/15.

13. Li M, Scott DE, Shandas R, Stenmark KR, Tan W. High pulsatility flow induces adhesion molecule and cytokine mRNA expression in distal pulmonary artery endothelial cells. *Annals of biomedical engineering*. 2009;37(6):1082-92. Epub 2009/04/03.

14. O'Rourke MF, Safar ME. Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension*. 2005;46(1):200-4. Epub 2005/05/25.

15. Franklin SS. Arterial stiffness and hypertension: a two-way street? *Hypertension*. 2005;45(3):349-51. Epub 2005/02/16.

16. Payne RA, Wilkinson IB, Webb DJ. Arterial stiffness and hypertension: emerging concepts. *Hypertension*. 2010;55(1):9-14. Epub 2009/12/02.

17. Marque V, Kieffer P, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I. Elastic properties and composition of the aortic wall in old spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;34(3):415-22. Epub 1999/09/18.
18. Roman MJ, Devereux RB, Schwartz JE, Lockshin MD, Paget SA, Davis A, et al. Arterial stiffness in chronic inflammatory diseases. *Hypertension*. 2005;46(1):194-9. Epub 2005/05/25.
19. Stehouwer CD, Henry RM, Ferreira I. Arterial stiffness in diabetes and the metabolic syndrome: a pathway to cardiovascular disease. *Diabetologia*. 2008;51(4):527-39. Epub 2008/02/02.
20. Sumino H, Ichikawa S, Kasama S, Takahashi T, Kumakura H, Takayama Y, et al. Elevated arterial stiffness in postmenopausal women with osteoporosis. *Maturitas*. 2006;55(3):212-8. Epub 2006/04/20.
21. Frost ML, Grella R, Millasseau SC, Jiang BY, Hampson G, Fogelman I, et al. Relationship of calcification of atherosclerotic plaque and arterial stiffness to bone mineral density and osteoprotegerin in postmenopausal women referred for osteoporosis screening. *Calcified tissue international*. 2008;83(2):112-20. Epub 2008/07/10.
22. Wilens SL. The Postmortem Elasticity of the Adult Human Aorta. Its Relation to Age and to the Distribution of Intimal Atheromas. *The American journal of pathology*. 1937;13(5):811-34 3. Epub 1937/09/01.
23. Heistad DD, Marcus ML, Larsen GE, Armstrong ML. Role of vasa vasorum in nourishment of the aortic wall. *The American journal of physiology*. 1981;240(5):H781-7. Epub 1981/05/01.

24. Angouras D, Sokolis DP, Dosios T, Kostomitsopoulos N, Boudoulas H, Skalkeas G, et al. Effect of impaired vasa vasorum flow on the structure and mechanics of the thoracic aorta: implications for the pathogenesis of aortic dissection. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2000;17(4):468-73. Epub 2000/04/25.
25. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiological Reviews*. 2009;89(3):957-89.
26. Marque V, Kieffer P, Gayraud B, Lartaud-Idjouadiene I, Ramirez F, Atkinson J. Aortic wall mechanics and composition in a transgenic mouse model of Marfan syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(7):1184-9. Epub 2001/07/14.
27. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997;386(6620):78-81. Epub 1997/03/06.
28. Atkinson J. Age-related medial elastocalcinosis in arteries: mechanisms, animal models, and physiological consequences. *J Appl Physiol*. 2008;105(5):1643-51. Epub 2008/09/06.
29. Wallin R, Wajih N, Greenwood GT, Sane DC. Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Medicinal research reviews*. 2001;21(4):274-301. Epub 2001/06/19.
30. Niederhoffer N, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Duvivier C, Peslin R, Atkinson J. Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity. *Hypertension*. 1997;29(4):999-1006. Epub 1997/04/01.

31. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *American journal of hypertension*. 2003;16(2):103-10. Epub 2003/02/01.
32. Proudfoot D, Shanahan CM. Biology of calcification in vascular cells: intima versus media. *Herz*. 2001;26(4):245-51. Epub 2001/08/02.
33. Doherty TM, Fitzpatrick LA, Inoue D, Qiao JH, Fishbein MC, Detrano RC, et al. Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification. *Endocrine reviews*. 2004;25(4):629-72. Epub 2004/08/06.
34. Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*. 2009;457(7230):675-7. Epub 2009/02/06.
35. Bolon B, Butt MT. *Fundamental neuropathology for pathologists and toxicologists : principles and techniques*. Hoboken, N.J.: Wiley; 2011. xx, 590 p. p.
36. Purves D. *Neurosciences*. 3e éd. ed. Bruxelles: De Boeck Université; 2005. xxi, 811 p.
37. Meyer JS, Quenzer LF. *Psychopharmacology : drugs, the brain, and behavior*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates Publishers; 2005. xvii, 555 p.
38. Mathieu S. *Système Nerveux*. France: Cours Pharmacie; 2009 [updated 18-01-2009]; Available from: <http://www.cours-pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html>.
39. Wilkinson BL, Landreth GE. The microglial NADPH oxidase complex as a source of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*. 2006;3:30. Epub 2006/11/11.

40. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological reviews*. 2011;91(2):461-553. Epub 2011/04/30.
41. Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in neurobiology*. 2005;76(2):77-98. Epub 2005/08/06.
42. Jinno S, Fleischer F, Eckel S, Schmidt V, Kosaka T. Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: a stereological study in comparison with astrocytes. *Glia*. 2007;55(13):1334-47. Epub 2007/07/25.
43. Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, Kohsaka S, Imai Y. Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C-gamma -dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(22):20026-32. Epub 2002/03/28.
44. De Keyser J, Mostert JP, Koch MW. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *Journal of the neurological sciences*. 2008;267(1-2):3-16. Epub 2007/10/16.
45. Santello M, Volterra A. Synaptic modulation by astrocytes via Ca²⁺-dependent glutamate release. *Neuroscience*. 2009;158(1):253-9. Epub 2008/05/06.
46. Wang DD, Bordey A. The astrocyte odyssey. *Progress in neurobiology*. 2008;86(4):342-67. Epub 2008/10/25.
47. Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol*. 1994;4(3):229-37. Epub 1994/07/01.

48. Goncalves CA, Leite MC, Nardin P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clinical biochemistry*. 2008;41(10-11):755-63. Epub 2008/05/06.
49. Himeda T, Watanabe Y, Tounai H, Hayakawa N, Kato H, Araki T. Time dependent alterations of co-localization of S100beta and GFAP in the MPTP-treated mice. *J Neural Transm*. 2006;113(12):1887-94. Epub 2006/06/01.
50. Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, et al. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia*. 2007;55(2):165-77. Epub 2006/11/02.
51. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2005;827(1):65-75. Epub 2005/09/27.
52. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine*. 2000;108(8):652-9. Epub 2000/06/17.
53. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002;18(10):872-9. Epub 2002/10/04.
54. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1999;34(6):879-86. Epub 1999/12/22.
55. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408(6809):239-47. Epub 2000/11/23.

56. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, et al. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *The New England journal of medicine*. 1997;336(17):1216-22. Epub 1997/04/24.
57. Aschner M, Costa LG. *The role of glia in neurotoxicity*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2005. 456 p., 12 p. of plates p.
58. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences*. 1996;19(8):312-8. Epub 1996/08/01.
59. Banati RB. Visualising microglial activation in vivo. *Glia*. 2002;40(2):206-17. Epub 2002/10/16.
60. Mosher KI, Andres RH, Fukuhara T, Bieri G, Hasegawa-Moriyama M, He Y, et al. Neural progenitor cells regulate microglia functions and activity. *Nature neuroscience*. 2012;15(11):1485-7. Epub 2012/10/23.
61. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*. 2010;119(1):7-35. Epub 2009/12/17.
62. Lam AG, Koppal T, Akama KT, Guo L, Craft JM, Samy B, et al. Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NFkappaB. *Neurobiology of aging*. 2001;22(5):765-72. Epub 2001/11/14.
63. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience*. 2007;10(11):1387-94. Epub 2007/10/30.
64. Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, Decarli C, Greenberg SM, Iadecola C, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for

healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2011;42(9):2672-713. Epub 2011/07/23.

65. Birns J, Kalra L. Cognitive function and hypertension. *Journal of human hypertension*. 2009;23(2):86-96. Epub 2008/07/25.

66. Dorr A, Sled JG, Kabani N. Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: a magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. *NeuroImage*. 2007;35(4):1409-23. Epub 2007/03/21.

67. Rabkin SW. Arterial stiffness: detection and consequences in cognitive impairment and dementia of the elderly. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2012;32(3):541-9. Epub 2012/08/14.

68. Triantafyllidi H, Arvaniti C, Lekakis J, Ikonomidis I, Sifakas N, Tzortzis S, et al. Cognitive impairment is related to increased arterial stiffness and microvascular damage in patients with never-treated essential hypertension. *American journal of hypertension*. 2009;22(5):525-30. Epub 2009/03/07.

69. Pase MP, Herbert A, Grima NA, Pipingas A, O'Rourke MF. Arterial stiffness as a cause of cognitive decline and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Internal medicine journal*. 2012;42(7):808-15. Epub 2011/12/14.

70. Scuteri A, Tesouro M, Appolloni S, Preziosi F, Brancati AM, Volpe M. Arterial stiffness as an independent predictor of longitudinal changes in cognitive function in the older individual. *Journal of hypertension*. 2007;25(5):1035-40. Epub 2007/04/07.

71. Waldstein SR, Rice SC, Thayer JF, Najjar SS, Scuteri A, Zonderman AB. Pulse pressure and pulse wave velocity are related to cognitive decline in the

Baltimore Longitudinal Study of Aging. Hypertension. 2008;51(1):99-104. Epub 2007/11/21.

72. Hanon O, Haulon S, Lenoir H, Seux ML, Rigaud AS, Safar M, et al. Relationship between arterial stiffness and cognitive function in elderly subjects with complaints of memory loss. Stroke; a journal of cerebral circulation. 2005;36(10):2193-7. Epub 2005/09/10.

73. Watson NL, Sutton-Tyrrell K, Rosano C, Boudreau RM, Hardy SE, Simonsick EM, et al. Arterial stiffness and cognitive decline in well-functioning older adults. The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences. 2011;66(12):1336-42. Epub 2011/07/20.

74. Qiu C, Winblad B, Viitanen M, Fratiglioni L. Pulse pressure and risk of Alzheimer disease in persons aged 75 years and older: a community-based, longitudinal study. Stroke; a journal of cerebral circulation. 2003;34(3):594-9. Epub 2003/03/08.

75. Saeki A, Recchia F, Kass DA. systolic flow augmentation in hearts ejecting into a model of stiff aging vasculature. Influence on myocardial perfusion-demand balance. Circulation research. 1995;76(1):132-41. Epub 1995/01/01.

76. Briones TL, Darwish H. Vitamin D mitigates age-related cognitive decline through the modulation of pro-inflammatory state and decrease in amyloid burden. Journal of neuroinflammation. 2012;9:244. Epub 2012/10/27.

77. Ferland G. Vitamin K and the nervous system: an overview of its actions. Adv Nutr. 2012;3(2):204-12. Epub 2012/04/21.

78. Bolduc V, Drouin A, Gillis MA, Duquette N, Thorin-Trescases N, Frayne-Robillard I, et al. Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;301(5):H2081-92. Epub 2011/09/20.
79. Gertz SD, Kurgan A, Eisenberg D. Aneurysm of the rabbit common carotid artery induced by periarterial application of calcium chloride in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 1988;81(3):649-56. Epub 1988/03/01.
80. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation*. 2004;110(22):3480-7. Epub 2004/11/17.
81. Chiou AC, Chiu B, Pearce WH. Murine aortic aneurysm produced by periarterial application of calcium chloride. *The Journal of surgical research*. 2001;99(2):371-6. Epub 2001/07/27.
82. Ikonomidis JS, Gibson WC, Gardner J, Sweterlitsch S, Thompson RP, Mukherjee R, et al. A murine model of thoracic aortic aneurysms. *The Journal of surgical research*. 2003;115(1):157-63. Epub 2003/10/24.
83. Safar ME, Levy BI, Struijker-Boudier H. Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases. *Circulation*. 2003;107(22):2864-9. Epub 2003/06/11.
84. Jurasic MJ, Josef-Golubic S, Sarac R, Lovrencic-Huzjan A, Demarin V. Beta stiffness--setting age standards. *Acta clinica Croatica*. 2009;48(3):253-8. Epub 2010/01/09.

85. Wåhlin A. Cerebral blood flow and intracranial pulsatility studied with MRI: measurement, physiological and pathophysiological aspects. . Umeå, Sweden: Umeå University; 2012.
86. Lanz TV, Ding Z, Ho PP, Luo J, Agrawal AN, Srinagesh H, et al. Angiotensin II sustains brain inflammation in mice via TGF-beta. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(8):2782-94. Epub 2010/07/16.
87. Harrison D, Griending KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American journal of cardiology*. 2003;91(3A):7A-11A. Epub 2003/03/21.
88. Silacci P, Desgeorges A, Mazzolai L, Chambaz C, Hayoz D. Flow pulsatility is a critical determinant of oxidative stress in endothelial cells. *Hypertension*. 2001;38(5):1162-6. Epub 2001/11/17.
89. Soros P, Whitehead S, Spence JD, Hachinski V. Antihypertensive treatment can prevent stroke and cognitive decline. *Nature reviews Neurology*. 2013;9(3):174-8. Epub 2012/12/19.
90. Yin W, Jo H, Voit EO. Systems analysis of the role of bone morphogenic protein 4 in endothelial inflammation. *Annals of biomedical engineering*. 2010;38(2):291-307. Epub 2009/10/24.
91. Hsiai TK, Hwang J, Barr ML, Correa A, Hamilton R, Alavi M, et al. Hemodynamics influences vascular peroxynitrite formation: Implication for low-density lipoprotein apo-B-100 nitration. *Free radical biology & medicine*. 2007;42(4):519-29. Epub 2007/02/06.

92. Thacher TN, Silacci P, Stergiopoulos N, da Silva RF. Autonomous effects of shear stress and cyclic circumferential stretch regarding endothelial dysfunction and oxidative stress: an ex vivo arterial model. *Journal of vascular research*. 2010;47(4):336-45. Epub 2009/12/18.
93. Steiner J, Bogerts B, Schroeter ML, Bernstein HG. S100B protein in neurodegenerative disorders. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2011;49(3):409-24. Epub 2011/02/10.
94. Berg RM, Moller K, Bailey DM. Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2011;31(7):1532-44. Epub 2011/04/14.
95. Terry AV, Jr., Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2003;306(3):821-7. Epub 2003/06/14.
96. Craft TK, Mahoney JH, Devries AC, Sarter M. Microsphere embolism-induced cortical cholinergic deafferentation and impairments in attentional performance. *The European journal of neuroscience*. 2005;21(11):3117-32. Epub 2005/06/28.
97. Yasuda Y, Tateishi N, Shimoda T, Satoh S, Ogitani E, Fujita S. Relationship between S100beta and GFAP expression in astrocytes during infarction and glial scar formation after mild transient ischemia. *Brain research*. 2004;1021(1):20-31. Epub 2004/08/26.

98. Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain research*. 2000;874(2):123-30. Epub 2000/08/29.
99. Capogna M. Neurogliaform cells and other interneurons of stratum lacunosum-moleculare gate entorhinal-hippocampal dialogue. *The Journal of physiology*. 2011;589(Pt 8):1875-83. Epub 2010/12/08.

ANNEXE

Publications supplémentaires

1- E. Guevara, **N. Sadekova**, H. Girouard et F. Lesage. *Optical imaging of resting-state functional connectivity in a novel arterial stiffness model*. En préparation.

2- R. Wu, D. Yin, **N. Sadekova**, J. De Champlain et H. Girouard. *Protective effects of aspirin from cardiac hypertrophy and oxidative stress in cardiomyopathic hamsters*.

Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2012;761710

3- S. Duchemin, M. Boily, **N. Sadekova**, et H. Girouard. *The complex contribution of NOS interneurons in cerebrovascular regulation*. Frontiers in Neural Circuits,

2012;6:51