

Université de Montréal

Étude de l'impact de la pression pulsée sur la réactivité cérébrovasculaire

par

Adeline Raignault

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Pharmacologie

Août 2015

© Raignault, 2015

Résumé

In vivo, la pression artérielle au niveau des artères cérébrales est pulsée, alors que *ex vivo*, l'étude de la fonction cérébrovasculaire est majoritairement mesurée en pression statique. L'impact de la pression pulsée sur la régulation du tonus myogénique et sur la fonction endothéliale cérébrale est inconnu. Nous avons posé l'hypothèse selon laquelle en présence d'une pression pulsée physiologique, la dilatation dépendante de l'endothélium induite par le flux et le tonus myogénique seraient optimisés. L'objectif de notre étude est d'étudier *ex vivo* l'impact de la pression pulsée sur le tonus myogénique et la dilatation induite par le flux dans les artères cérébrales de souris. Nous avons utilisé un artériographe pressurisé couplé à un système générant une onde pulsée de fréquence et d'amplitude réglables. Les artères cérébrales moyennes ($\approx 160 \mu\text{m}$ de diamètre) ont été isolées de souris C57BL6 âgées de 3 mois et pressurisées à 60 mm Hg, en pression statique ou en pression pulsée.

En pression statique, le tonus myogénique est faible mais est potentialisé par le L-NNA (un inhibiteur de la eNOS) et la PEG-catalase (qui dégrade le H_2O_2), suggérant une influence des produits dilatateurs dérivés de la eNOS sur le tonus myogénique. En présence de pression pulsée (pulse de 30 mm Hg, pression moyenne de 60 mm Hg, 550 bpm), le tonus myogénique est significativement augmenté, indépendamment du L-NNA et de la PEG-catalase, suggérant que la pression pulsée lève l'impact de la eNOS. En pression statique ou pulsée, les artères pré-contractées se dilatent de façon similaire jusqu'à une force de cisaillement de 15 dyn/cm^2 . Cette dilatation, dépendante de l'endothélium et de la eNOS, est augmentée en condition pulsée à une force de cisaillement de 20 dyn/cm^2 . En présence de PEG-catalase, la dilatation induite par le flux est diminuée en pression statique mais pas en pression pulsée, suggérant que la pression statique, mais pas la pression pulsée, favorise la production de $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$. En effet, la dilatation induite par le flux est associée à une production de $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ par la eNOS, mesurable en pression statique, alors que la dilatation induite par le flux en pression pulsée est associée à la production de NO. Les différences de sensibilité à la dilatation induite par le flux ont été abolies après inhibition de Nox2, en condition statique ou pulsée.

La pression pulsée physiologique régule donc l'activité de la eNOS cérébrale, en augmentant le tonus myogénique et, en présence de flux, permet la relâche de NO *via* la eNOS.

Mots-clés : pression pulsée, dilatation induite par le flux, tonus myogénique, forces de cisaillement, NO, H₂O₂

Abstract

While *in vivo* arterial blood pressure in cerebral arteries is pulsatile, *in vitro* cerebral arterial function is generally assessed under a static pressure. Thus, whether pulse pressure regulates cerebral endothelial shear stress sensitivity and myogenic tone is unknown. We hypothesized that a physiological pulse pressure induces a better flow-mediated dilation and optimized myogenic tone. The aim of this study was to test *in vitro* the impact of pulse pressure on myogenic tone and eNOS-dependent flow-mediated dilation in mouse cerebral arteries.

Using a custom computer-controlled pneumatic system generating a pulse pressure (used at 30 mm Hg, rate of 550 bpm) coupled to an arteriograph, isolated posterior cerebral arteries from 3-month old C57Bl/6J mice were pressurized at 60 mm Hg, either in static or pulse pressure conditions. Shear stress from 2 to 20 dyn/cm² was applied and flow-mediated dilation measured.

Without pulse pressure, myogenic tone was low but potentiated by both L-NNA (eNOS inhibitor) and PEG-catalase (catalyses H₂O₂), suggesting an influence of eNOS-derived dilator products on myogenic tone. Pulse pressure significantly increased myogenic tone, independently of L-NNA and PEG-catalase, suggesting that pulse pressure prevents the impact of eNOS. In both static and pulse pressure conditions, cerebral arteries did not dilate to shear stress in the presence of L-NNA or after endothelial denudation, confirming the endothelial origin of the dilatory response. Up to 15 dyn/cm², shear stress elicited similar flow-mediated dilation in static and pulse pressure conditions; at 20 dyn/cm², however, flow-mediated dilation were higher in the presence of pulse pressure. PEG-catalase reduced flow-mediated dilation in static but not in pulse pressure, suggesting that in static conditions eNOS is responsible for O₂⁻/H₂O₂ production. Indeed, eNOS-derived O₂⁻/H₂O₂ production was measured during flow-mediated dilation in static pressure, while pulse pressure promoted eNOS-derived NO production. Differences in flow-mediated dilation between static and pulse pressure conditions were abolished after Nox2 inhibition.

In conclusion, pulse pressure modulates cerebrovascular eNOS activity: at rest, pulse pressure inhibits eNOS, increasing myogenic tone. In the presence of flow, pulse pressure

permits a shear stress-dependent eNOS-derived NO release, leading to higher flow-mediated dilation.

Keywords : pulse pressure, FMD, myogenic tone, shear stress, NO, H₂O₂

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des figures	vii
Abréviations	ix
Remerciements	xii
1. Introduction	1
1.1. Organisation cérébrovasculaire	1
1.1.1. Anatomie.....	1
1.1.2. Les artères cérébrales.....	3
1.2. Le débit sanguin cérébral	4
1.2.1. Régulation du débit sanguin cérébral.....	4
1.2.1.1. Le mécanisme humoral.....	5
1.2.1.2. Le mécanisme neuronal.....	5
1.2.1.3. Le mécanisme myogénique (autorégulation).....	6
1.2.2. L'endothélium.....	9
1.2.2.1. Fonction endothéliale normale.....	9
1.2.2.1.1. Le monoxyde d'azote.....	9
1.2.2.1.2. Prostacycline (PGI ₂).....	11
1.2.2.1.3. Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF).....	11
1.2.2.1.4. Au niveau cérébral.....	11
1.2.2.2. Dysfonction endothéliale.....	13
1.2.2.3. Dilatation induite par le débit (FMD).....	13
1.2.2.4. Contraction induite par le débit (FMC).....	16
1.3. Pression pulsée	17
1.3.1. Origine.....	17
1.3.2. Impact de la pression pulsée sur les artères.....	19
1.3.2.1. Études précliniques.....	19
1.3.2.1.1. Niveau périphériques.....	19

1.3.2.1.2 Niveau cérébral.....	20
1.3.2.2. Aspect clinique	21
1.3.2.1.1 Effet bénéfique de la pression pulsée.....	21
1.3.2.1.2 Effet néfaste de la pression pulsée	22
2. Hypothèses et Objectifs.....	24
3. Article soumis.....	26
4. Discussion.....	59
5. Conclusion et perspectives	68
6. Bibliographie.....	69

Liste des figures

Figure 1 : Vue basale du cerveau représentant les principales artères cérébrales du polygone de Willis chez l'homme, permettant d'acheminer le sang jusqu'au cerveau.	2
Figure 2 : Artère de moyen calibre et ses 3 tuniques : intima, média, adventice.	4
Figure 3 : Schéma de l'autorégulation en condition normale, d'hypotension et d'hypertension.	7
Figure 4: Schématisation des potentiels mécanismes impliqués dans la FMD et la FMC..	15
Figure 5: Courbe de pression artérielle. Composante pulsatile	19
Figure 6 : Impact d'une pression pulsée d'amplitude de 30 mm Hg et d'une fréquence de 9,2 Hz sur la dilatation induite par le débit (FMD) d'artères cérébrales de souris WT âgées de 3 mois vs des souris athérosclérotiques (ATX) âgées de 3 mois, pressurisées à 60 mm Hg.	64
Figure 7 : Schématisation de l'artériographe pressurisé couplé au système générant la pression pulsée.	66
Figure 8 : Impact d'une exposition à une pression pulsée d'amplitude de 30 mm Hg et d'une fréquence de 9,2 Hz durant la dilatation induite par l'acétylcholine d'artères cérébrales de souris WT âgées de 3 mois pressurisées à 60 mm Hg, en présence ou absence de PEG-Catalase. * : $p < 0.05$ vs static.....	67

*N'allez pas là où le chemin peut mener. Aller là
où il n'y a pas de chemin et laissez une trace.*

Ralph Waldo Emerson

Abréviations

AA	Acide Arachidonique
AC	Adénylate cyclase
ACA	Artère cérébrale antérieure
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ACh	Acétylcholine
Akt	Proteine kinase B
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AngII	Angiotensine II
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BBB	Barrière hémato-encéphalique (<i>blood brain barrier</i>)
Ca ²⁺	Ion calcium
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CaM	Calmoduline
CEC	Circulation extra-corporelle
CMLV	Cellule musculaire lisse vasculaire
CO ₂	Dioxyde de carbone
COX	Cyclo-oxygénase
CuZnSOD	Cuivre et zinc superoxyde dismutase
CYP450	Enzymes du cytochrome P450
DRO	Dérivé réactif de l'oxygène
DSC	Débit sanguin cérébral
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline-1
EDCF	Facteur contracteur dérivé de l'endothélium (TXA ₂ , ROS, ET-1)
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EDRF	Facteur relaxant dérivé de l'endothélium (NO, H ₂ O ₂ , EDHF, PGI ₂)
eNOS	Isoforme endothéliale de la monoxyde d'azote synthase
EET	Acide époxyicosatriénoïque

ET-1	Endothéline-1
FAD :	Flavine Adénine dinucléotide
FMN :	Flavine Mononucléotide
FMC	Contraction induite par le débit
FMD	Dilatation induite par le débit
GCs	Guanylate cyclase soluble
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GTP	Guanosine triphosphate
Gs	Protéine G stimulatrice
H ⁺	Ion hydrogène
5-HT	Sérotonine (5-hydroxytryptamine)
20-HETE	Acides hydroxyéicosatétraenoïques
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire (<i>inter-cellular adhesion molecule</i>)
IP	Récepteur à la prostacycline
K ⁺	Ion Potassium
K _{Ca}	Canaux potassiques activés par le calcium
LDLr	Récepteur aux lipoprotéines de basse densité
MCA	Artère cérébrale moyenne
MEC	Matrice extra cellulaire
MLC ₂₀	Chaîne légère de la myosine de 20 K Da (<i>myosin light chain of 20 kDa</i>)
MLCK	Kinase de la chaîne légère de la myosine (<i>myosine light chain kinase</i>)
MLCP	Phosphatase de la chaîne légère de la myosine (<i>myosin light chain phosphatase</i>)
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	Monoxyde d'azote
O ₂	Oxygène
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
OH ⁻	Ion hydroxyle
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PA	Pression artérielle
PAD	Pression artérielle diastolique

PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1
PAM	Pression artérielle moyenne
PAS	Pression artérielle systolique
PCA	Artère cérébrale postérieure
PCCA	Artère cérébrale communicante postérieure
PCO ₂	Pression partielle du dioxyde de carbone
PO ₂	Pression partielle de l'oxygène
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGI ₂	Prostacycline
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine kinase C activée par le diacylglycérol
PKG	Protéine kinase G
PLA ₂	Phospholipase A ₂
ROS	Substances oxygénées réactives (<i>reactive oxygen species</i>)
SOD	Superoxyde Dismutase
TAC	Constriction aortique transverse (<i>trans aortic constriction</i>)
TNF α	Facteur de nécrose tumoral α (<i>tumor necrosis factor</i>)
TP	Récepteur thromboxane-prostanoïde
TRPM4	Canal à potentiel de récepteur transitoire de la sous-famille M, membre 4 (<i>transient receptor potential channel</i>)
TRPC6	Canal à cation à potentiel de récepteur de la sous-famille C, membre 6 (<i>Transient receptor potential cation channel</i>)
TRPV4	Récepteur de potentiel de type 4 vanilloïde
TXA ₂	Thromboxane A ₂

Remerciements

Je voudrais commencer par remercier les membres du Jury, Dre Hélène Girouard, Dre Anne Noël Samaha d'avoir accept e et pris le temps de lire et corriger mes travaux. Vos commentaires sont les bienvenus et permettront d'améliorer ce mémoire.

Je tiens à remercier et à exprimer toute ma reconnaissance envers le **Dr Éric Thorin**, mon directeur de recherche pour ses nombreuses qualités aussi bien professionnelles qu'humaines et de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je ne pouvais sans aucun doute intégrer un meilleur laboratoire. Merci pour votre disponibilité envers vos étudiants, vos infinies connaissances, parler avec vous est toujours très cultivant et enrichissant. Vous m'avez encourag e, fait confiance et permis de participer à plusieurs congrès à l'international. Le temps passé au laboratoire a développé mon goût pour la recherche et surtout a développé une grande confiance en moi.

Je tiens à remercier tout particulièrement, la **Dr Nathalie Thorin-Trescases** pour ses nombreuses qualités tant sur le plan professionnel que personnel. Merci pour toutes vos bonnes attentions envers vos étudiants, votre aide et votre soutien sont indispensables au laboratoire. Mais surtout Merci pour le temps que vous avez consacré à corriger mes travaux, vous nous poussez toujours à donner le meilleur de nous mêmes, c'est certainement grâce à votre bienveillance que j'ai remporté le premier prix lors de la journée de la recherche de l'Université et de l'Institut de Cardiologie.

Je tiens à remercier **Cécile Martel** d'avoir suivi mon projet et pour toutes ses bonnes réflexions qui sont toujours très pertinentes. Ta franchise, ton dynamisme et ta joie de vivre sont très appr ci es au quotidien. Sans faire abstraction des longues conversations sur la gastronomie française, ainsi que toutes les activités sportives et sorties faites ensemble. Merci pour ta présence c'est toujours agréable de travailler à tes côtés.

Je tiens à remercier **Virginie Bolduc**, même si nous n'avons pas eu la chance de travailler ensemble ; merci d'avoir pris de ton temps pour répondre minutieusement aux

nombreux mails que j'ai pu t'envoyer et de m'avoir expliqué comment dompter la machine du pulse !

Je tiens à remercier **Carol Yu** pour m'avoir initiée et enseigné la technique de l'artériographe, d'avoir été présente au cours de mon projet, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Grâce à toi, j'ai fortement « improved my English ». Ton départ du labo a laissé un vide qu'on ne saurait combler. Merci pour tout ce que tu m'as fait partager et découvrir, que ce soit à Montréal ou lors de nos formidables voyages.

Je tiens à remercier **Albert Nguyen** de m'avoir fortement aidée à apprivoiser la machine du pulse. Malgré ton incroyable mémoire de poisson rouge qu'il est absolument impossible de passer sous silence, je te remercie de m'avoir consacré du temps et aussi pour ta grande aptitude à nous pousser à réfléchir et à nous questionner toujours plus. Que serait le labo sans tes blagues et ton sens de l'humour ?

Je tiens à remercier **Youri Laplante-El Haïli**, mon voisin d'en face. Mon cher Youri, même si nos projets étaient très différents tu as toujours pris la peine de savoir où j'en étais et comment cela se passait. Merci pour tous les fous rires que nous avons partagés et d'être devenu un ami si cher, je te souhaite de trouver ta voie.

Je tiens à remercier **Xiao Yan Luo**, pour son aide à mes débuts, de m'avoir montré le fonctionnement du laboratoire et pour son incroyable gentillesse. Merci de m'avoir initiée et fait découvrir la culture chinoise.

Je tiens à remercier **Olivia de Montgolfier**, la petite dernière dans notre laboratoire et non la moindre. Merci pour ton dynamisme et ta bonne humeur. C'est un réel plaisir de travailler avec toi, nous avons encore tant à partager aussi bien au labo qu'à l'extérieur, little Monkey !

Je remercie aussi mes amis de l'institut, **Fanny Toussaint** ma tendre et chère amie Québécoise pure laine, **Anie Lapointe** pour sa gentillesse, **Sirirat Surinkaew** pour sa perpétuelle joie de vivre, **Yolanda Chen** notre chère doyenne et **Eric Duong** le génie de la

bande.

Je remercie aussi toutes les personnes qui ont contribué à mon projet, le personnel de l'animalerie et celui de l'ICM.

Enfin et surtout un énorme Merci à ma famille, mes parents et mes frères, de m'avoir toujours soutenue et encouragée dans mes choix. Merci à vous d'être toujours aussi présents même en étant si loin de l'autre côté de l'atlantique, je vous dois tellement. Merci à mes amis, Flore, Claire, Manon, Anaïs, Clarisse, Élodie, Justin et Jérôme votre amitié m'est indispensable et compte énormément.

1. Introduction

Ce mémoire portera sur l'impact encore peu connu de la pression pulsée sur la réactivité cérébrovasculaire. Dans un premier temps nous aborderons les spécificités de l'organisation cérébrovasculaire, les mécanismes à la base de la régulation du débit sanguin cérébral (DSC) et pour finir nous décrirons les données de la littérature concernant la pression pulsée.

On sait que l'autorégulation permet de maintenir constant le débit sanguin cérébral malgré des variations de pressions de perfusion sur une plage allant de 50 à 150 mm Hg. Les deux principales composantes antagonistes impliquées dans le mécanisme d'autorégulation sont le tonus myogénique et la dilatation induite par le débit (FMD). Le tonus myogénique est la capacité d'un vaisseau à diminuer son diamètre par contraction de ses cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) en réponse à une augmentation de la pression intra-luminale. La FMD est une vasodilatation dépendante de l'endothélium induite par une augmentation des contraintes de cisaillements. Ces 2 composantes seront donc détaillées au cours de cette introduction. Bien qu'*in vivo*, la pression sanguine soit pulsée, son impact sur le tonus myogénique et la FMD est encore largement méconnu. Au cours de cette introduction, nous tenterons de définir l'impact de la pression pulsée sur la circulation cérébrale d'un point de vue physiologique, pathologique, au niveau préclinique et clinique.

1.1. Organisation cérébrovasculaire

1.1.1. Anatomie

Au niveau cérébral, le débit sanguin doit être maintenu constant en dépit des variations de pression de perfusion. Une altération du DSC peut provoquer un dysfonctionnement des cellules nerveuses après seulement quelques minutes d'ischémie, menant à un arrêt de l'activité cérébrale, la perte de conscience ou le coma (Vrselja et al., 2014). Le cerveau est l'un des organes les plus perfusés du corps humain. La régulation du débit sanguin cérébral permet l'alimentation appropriée en nutriments et en gaz du tissu cérébral, l'échange gazeux entre les capillaires et le maintien du volume sanguin cérébral assure une bonne perfusion et l'homéostasie du cerveau. La demande métabolique du cerveau est importante puisque l'activité neuronale consomme entre 20 et 25% des réserves en glucose et en oxygène (Faraci,

2011). De plus le cerveau reçoit environ 15 à 20% du sang éjecté par le cœur à chaque battement (Attwell et al., 2010). Le sang atteint le cerveau par 2 types d'artères principales: deux artères carotides et deux artères vertébrales (figure 1) (Lee, 1995). La carotide primitive gauche naît de la crosse aortique alors que la carotide primitive droite est issue du tronc brachio-céphalique. Dans le cerveau, chaque carotide primitive se divise en une carotide interne assurant l'apport sanguin du cerveau, puis une carotide externe assurant la vascularisation du cou et du visage (Alpers et al., 1959). Les artères vertébrales droite et gauche se réunissent afin de former le tronc basilaire remontant le long du tronc cérébral puis se séparent de nouveau en deux artères cérébrales postérieures (PCA) (figure 1). La vascularisation du tronc cérébral et du cervelet dépend du système vertébro-basilaire. À la base de chaque hémisphère cérébral se trouve quatre troncs artériels, l'artère cérébrale antérieure (ACA) et moyenne (MCA), l'artère communicante postérieure (PCCA) puis la PCA (figure 1). L'ensemble de ces artères de résistance forme le polygone de Willis (figure 1). Il est important de dissocier la circulation cérébrale et la circulation périphérique.

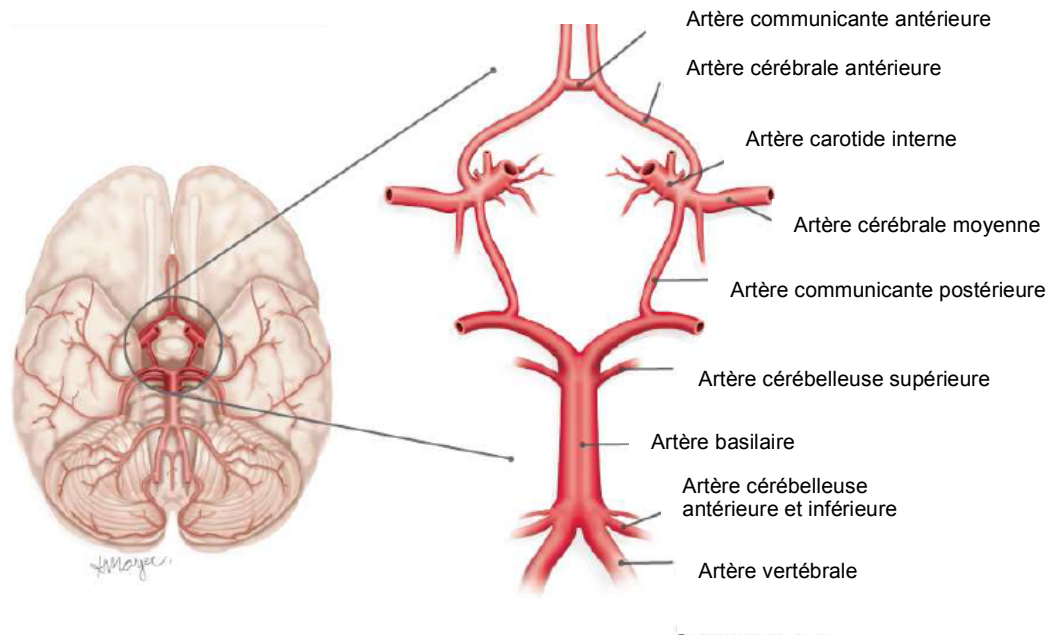


Figure 1 : Vue basale du cerveau représentant les principales artères cérébrales du polygone de Willis chez l'homme, permettant d'acheminer le sang jusqu'au cerveau.

Adapté de (Pires et al., 2013).

1.1.2. Les artères cérébrales

La paroi des artères se compose de 3 couches : l'intima, la média et l'adventice (figure 2).

L'intima représente la couche interne de la paroi artérielle et est principalement constituée d'une monocouche de cellules endothéliales, appelée endothélium. De par sa position, l'endothélium joue un rôle essentiel lors des régulations physiologiques telles que l'hémostase, le transport des métabolites entre le sang et les cellules musculaires lisses, le contrôle du tonus vasculaire, l'angiogenèse et les réparations des dommages vasculaires (Faraci, 2011; Rubin and Staddon, 1999). Suite à divers stimuli mécaniques ou physico/chimiques l'endothélium sécrète des substances vasoactives telles que le monoxyde d'azote (NO), un facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF), la prostacycline (PGI₂) et le tromboxane A₂ (TXA₂), substances qui modulent la réactivité vasculaire (Faraci, 2011). L'endothélium présent au niveau des artères cérébrales est différent de celui retrouvé au niveau des artères périphériques car il compose la barrière hémato-encéphalique (BBB, *blood brain barrier*) permettant le maintien de l'homéostasie dans le cerveau (Faraci, 2011). La BBB joue le rôle d'un filtre très sélectif à travers duquel des éléments essentiels tels que le glucose et de petites molécules lipophiles peuvent passer et être transmises au tissu cérébral ; cependant la BBB empêche le passage de grosses molécules ou de molécules hydrosolubles (Abbott et al., 2006; Allen and Barres, 2009; Faraci, 2011). Ces échanges sont effectués par des transports actifs. De plus, les cellules endothéliales des artères cérébrales sont reliées entre elles par des jonctions serrées au niveau des capillaires cérébraux (Rubin and Staddon, 1999).

La média ou tunique moyenne est la couche principale de l'artère. Les artères cérébrales sont différentes des artères systémiques par la présence d'une média très pauvre en fibres élastiques et l'absence de lame élastique externe (Lee, 1995). La média est principalement constituée de cellules musculaires lisses (CMLV) organisées de façon concentriques et permettant le maintien du tonus vasculaire. Elle est composée de la matrice extra cellulaire (MEC) constituée de protéines fibreuses et élastiques (collagène et élastine). La MEC est délimitée par 2 *limitantes* élastiques, interne et externe, percées par des fenestrations suffisamment grandes permettant la diffusion de nutriments sanguins vers les cellules (Cottart et al., 2009; Vrselja et al., 2014).

L'adventice est la structure de base conjonctive de soutien composée de fibres de collagène, de fibres d'élastine et des fibroblastes. Les artères de gros calibre comme la carotide possèdent leurs propres vaisseaux ou *vasa vasorum* permettant la vascularisation de la paroi. Cependant, dans les artères cérébrales du polygone de Willis, l'adventice n'est presque pas présente (Vrselja et al., 2014).

Le polygone de Willis, le cercle artériel situé à la base du cerveau, est un système anastomotique de suppléance entre le territoire carotidien et vertébro-basilaire. Il assure la bonne vascularisation du cerveau même si une des artères du cou est bouchée ou lésée. De plus il joue un rôle important de suppléance en cas d'accident vasculaire cérébral (Lee, 1995).

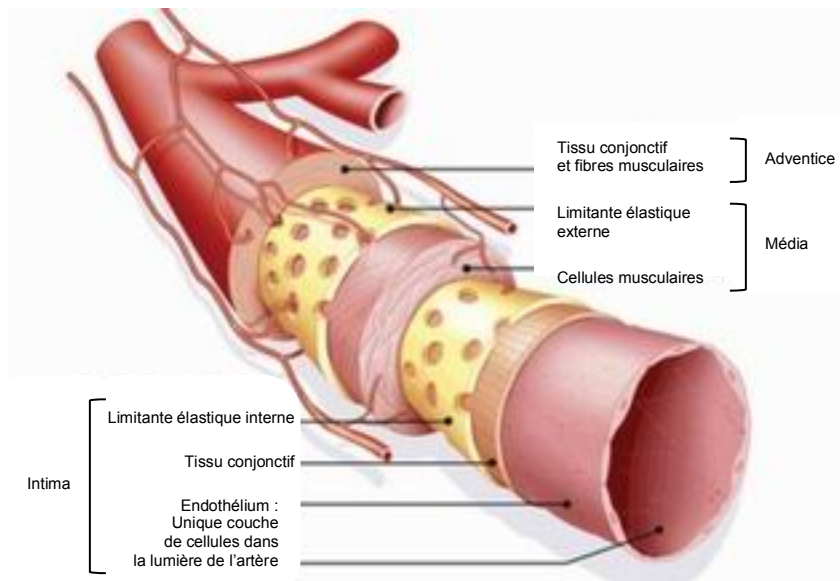


Figure 2 : Artère de moyen calibre et ses 3 tuniques : intima, média, adventice. (<http://www.solutions-sante.net/maladie-cardiovasculaire/definition-artere.html>)

1.2. Le débit sanguin cérébral

1.2.1. Régulation du débit sanguin cérébral

Le DSC chez l'adulte sain éveillé et au repos est de 50 à 55 mL/min pour 100 g de substance cérébrale, soit 700 à 750 mL/min pour l'ensemble du cerveau (Guyton & Hall 2000). La quantité d'O₂ consommée dans les mêmes conditions est de 3 à 3,5 mL/min pour 100 g de substance cérébrale, soit 45 mL/min pour l'ensemble de l'encéphale (Iadecola, 2004;

McHedlishvili, 1980). Le DSC dépend de plusieurs composantes dont la principale est la pression artérielle qui s'adapte en fonction de nos activités quotidiennes. Par exemple lorsque l'on passe de la position allongée à la position debout, le DSC chute transitoirement de 20% soit de 20 à 30 mm Hg (McHedlishvili, 1980).

L'ajustement du DSC à la demande métabolique est principalement du à : a) un mécanisme humoral qui a un effet direct sur la paroi vasculaire par des facteurs humoraux circulants ou accumulés dans les tissus ; b) un mécanisme neuronal se caractérisant comme un réflexe vasomoteur ou un réflexe de l'axone ; c) un mécanisme myogénique qui se produit au niveau des artères cérébrales. Ces trois mécanismes fonctionnent aussi bien seuls qu'en synergie.

1.2.1.1. Le mécanisme humoral

Toute variation du DSC provoque des modifications de pressions partielles en O₂ (pO₂) et en CO₂ (pCO₂) du sang et du tissu cérébral. La pCO₂ joue un rôle important, puisqu'une augmentation de pCO₂ entraîne une vasodilatation en diminuant la résistance vasculaire cérébrale *via* une diminution du pH du liquide interstitiel cérébral (Guyton & Hall 2000). À l'inverse, une diminution de la pCO₂ entraîne une vasoconstriction. De plus, une pO₂ faible entraîne une augmentation du DSC et donc une vasodilatation artérielle *via* la production d'adénosine, étant le produit de dégradation de l'adénosine monophosphate. L'adénosine agit en bloquant l'entrée de Ca²⁺ engendrant alors une vasodilatation par relâchement des CMLVs (Guyton & Hall 2000). Les facteurs humoraux impliqués dans le mécanisme humoral lors de la régulation du débit sanguin cérébral sont l'adénosine (Phillis, 2004), mais également les prostaglandines dont la protacycline (Feletou and Vanhoutte, 2009) qui sont issues du métabolisme de l'acide arachidonique sous l'action des cyclo-oxygénases. Ces molécules provoquent une vasodilatation.

1.2.1.2. Le mécanisme neuronal

Un mécanisme extrinsèque impliquant les fibres sympathiques, provenant du ganglion cervical supérieur, permet de réguler localement le DSC et entraîne une diminution du DSC d'environ 20%, menant à une vasoconstriction (Guyton & Hall 2000). En revanche la stimulation de fibres parasympathiques, provenant du ganglion sphenopalatin et optique, entraîne une

augmentation du DSC due à une libération du NO par l'intermédiaire de récepteurs muscariniques endothéliaux et par l'inhibition adrénergique des récepteurs nicotiques pré-synaptiques (Guyton & Hall 2000).

Un mécanisme intrinsèque appelé hyperhémie fonctionnelle ou métabolique permet également de réguler localement le DSC : suite à une demande métabolique localisée, des facteurs relaxants des cellules musculaires lisses vasculaires sont libérés afin d'induire une vasodilatation locale et proportionnelle à la demande métabolique (Iadecola, 2004).

Contrairement aux artères et aux artérioles de la pie-mère, les artérioles parenchymateuses sont en effet en étroite association avec les astrocytes et donc les neurones. Ces deux types de cellules contrôlent la circulation sanguine locale. Les neurones, dont les corps cellulaires sont dans les régions cérébrales corticales, projettent des dendrites pour contrôler le flux local par la libération de neurotransmetteurs (l'acétylcholine (ACh), la noradrénaline, la sérotonine (5-HT)) (Lok et al., 2007). De plus, de par leur localisation à l'interface, les astrocytes jouent un rôle important dans la vasodilatation locale. Les terminaisons des axones relâchent du glutamate suite à une augmentation de l'activité synaptique migrant jusqu'aux récepteurs glutaminergiques des astrocytes. La stimulation de ces récepteurs engendre une augmentation de Ca^{2+} provoquant une libération de facteurs vasoactifs par les astrocytes tels que les ions potassium (K^+), le NO, l'hydrogène (H^+), la prostaglandine (PGE_2) et l'acide époxyéicosatriénoïque (EET) (Girouard and Iadecola, 2006; Iadecola and Nedergaard, 2007).

1.2.1.3. Le mécanisme myogénique (autorégulation)

En 1902, W.M. Bayliss a décrit pour la première fois la réponse myogénique, aussi appelée autorégulation, comme étant la capacité de l'artère à changer son diamètre en réponse aux fluctuations de pression artérielle afin de maintenir le DSC constant sur un intervalle de 50 à 150 mm Hg (figure 3).

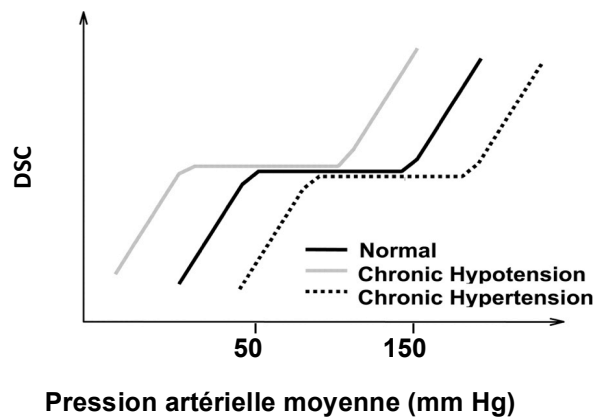


Figure 3 : Schéma de l'autorégulation en condition normale, d'hypotension et d'hypertension (Serrador et al., 2001). L'autorégulation permet de maintenir le DSC stable pour des valeurs de pression artérielle allant de 50 à 150 mm Hg. Lors d'une hypertension chronique, ces valeurs sont déplacées vers la droite, vers des valeurs plus hautes allant d'environ 120 à 230 mm Hg. À l'inverse lors d'une hypotension chronique, ces valeurs sont déplacées vers la gauche, vers des valeurs plus faibles allant de 25 à 100 mm Hg. Abréviations : DSC : Débit Sanguin Cérébral.

Les artères de conductance de gros calibres sont dépourvues de tonus myogénique contrairement aux artères de résistance (<200 μm de diamètre) (Bayliss, 1902). Le tonus myogénique permet de maintenir constant l'apport en oxygène, glucose et autres nutriments essentiels ainsi que le maintien de la pression au niveau des capillaires pour assurer un bon échange tissulaire. Si la pression est inférieure à 50 mm Hg l'autorégulation est alors défaillante et résulte en une diminution du DSC. À l'inverse, lorsque la pression est supérieure à la capacité d'autorégulation, le DSC augmente pouvant provoquer la rupture des artères cérébrales. Les forces de cisaillements appliquées à l'endothélium résultent en une dilatation alors que la pression sanguine induit une contraction des CMLVs, et l'intensité du tonus myogénique est définie par ces 2 paramètres (Henrion, 2005). En 1949, Folkow a démontré que ce tonus vasculaire est un mécanisme non neuronal car il est toujours présent dans des vaisseaux dénervés (Folkow, 1949). Les CMLVs sont les médiateurs de cette réponse contractile. Le stimulus nécessaire pour déclencher la réponse myogénique est une augmentation de la pression intravasculaire provoquant l'étirement de la paroi vasculaire et donc des variations de tension au niveau du cytosquelette des CMLVs. Le premier événement de la méchanotransduction est la dépolarisation de la membrane du muscle lisse (Knot and

Nelson, 1998). Bien qu'il n'y ait pas de consensus concernant les canaux initiateurs de la dépolarisation membranaire, les canaux cationiques activés par l'étirement (Canal à cation à potentiel de récepteur de la sous-famille C, membre 6 : TRPC6, Canal à potentiel de récepteur transitoire de la sous-famille M, membre 4 : TRPM4), les canaux potassiques activés par le calcium, et les canaux chlore semblent largement impliqués (Welsh et al., 2000). L'activation de canaux potassiques voltage-dépendant limite la dépolarisation comme un mécanisme de rétrocontrôle négatif (Knot and Nelson, 1995). La dépolarisation de la membrane conduit à l'ouverture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendant (qui sont aussi capables de répondre directement à l'étirement) (McCarron et al., 1997) et donc augmente la concentration calcique dans le cytosol induisant l'ouverture des récepteurs à la ryanodine au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique (réserve de Ca^{2+} intracellulaire) (Lehoux et al., 2006). Le Ca^{2+} intracellulaire se fixe à la calmoduline (CaM) afin de former le complexe activé Ca^{2+} -CaM se liant à la myosine light chain kinase (MLCK). La MLCK phosphoryle la chaîne légère de la myosine (MLC_{20}) conduisant à une augmentation de l'interaction entre l'actine et la myosine et donc la contraction. À l'inverse, la myosine light chain phosphatase MLCP joue aussi un rôle dans le contrôle de la réponse myogénique, en déphosphorylant la MLC_{20} ce qui limite la contraction (Cole and Welsh, 2011).

Il existe deux mécanismes essentiels, Ca^{2+} dépendant et indépendant, contribuant à la réponse myogénique : 1) une augmentation de pression engendrant une augmentation de la tension de la paroi du à l'étirement des cellules musculaires et conduisant à la dépolarisation membranaire, l'afflux de Ca^{2+} , et la contraction et la phosphorylation de MLC_{20} *via* la MLCP. 2) Dans un même temps, le mécanisme indépendant du Ca^{2+} impliquant la protéine kinase C (PKC), le diacylglycérol, RhoA/Rho Kinase et acides hydroxyéicosatetraenoïques (20-HETE), régule l'activité de la MLCP déterminant l'état de phosphorylation de la MLC_{20} et ainsi la sensibilité au Ca^{2+} à l'actine-myosine (Koller and Toth, 2012).

En résumé, la régulation du débit sanguin cérébral est essentielle puisqu'elle permet un apport constant au cerveau en nutriments et en O_2 , malgré les variations de pression de perfusion et le tonus myogénique joue un rôle essentiel dans cette régulation.

1.2.2. L'endothélium

L'endothélium forme une barrière semi-perméable entre la paroi vasculaire et le sang, permettant le passage sélectif des cellules sanguines et des nutriments. Il joue un rôle important dans le maintien du tonus de l'artère en sécrétant des substances vasoactives (telles que le NO, la PGI₂, l'EDHF), permettant aussi de réguler l'hémostase, les réponses inflammatoires, antiadhésives, anti-thrombotiques, et d'inhiber la prolifération des CMLVs (Deanfield et al., 2007; Moncada, 1997). Afin de maintenir son intégrité et de se protéger contre le phénomène d'agrégation cellulaire, l'endothélium vasculaire sain exprime à sa surface des facteurs anti-agrégants et anti-adhérents qui s'opposent à l'activation, l'adhésion et l'agrégation des cellules sanguines. Aux effets anti-thrombotiques de l'endothélium, s'ajoutent donc des fonctions antiadhésives. L'endothélium sécrète aussi des substances vasoconstrictrices, les facteurs constricteurs dérivés de l'endothélium (EDCF) tels que le TXA₂, l'endothéline-1 (ET-1), l'angiotensine II (AngII) et l'anion superoxyde (O₂⁻). En conditions normales, le NO est la principale molécule vasodilatatrice sécrétée par l'endothélium *via* une enzyme, la monoxyde d'azote synthase endothéliale (eNOS). Le NO joue un rôle dans l'inhibition de l'agrégation des plaquettes et stimule la prolifération des cellules endothéliales (Feletou et al., 2012).

1.2.2.1. Fonction endothéliale normale

1.2.2.1.1 Le monoxyde d'azote

Le NO, originaire de l'endothélium et dont la fonction dilatatrice avait été perçue en 1980 par Furchgott et Zawadzki (Ref ci dessous), est une molécule radicalaire, dont l'électron libre est porté par l'azote. C'est une molécule endogène volatile très lipophile pouvant donc diffuser aisément au travers des membranes cellulaires (Palmer et al., 1987).

La biosynthèse du NO se fait sous l'action des NOS, constitutives ou induites, à partir de L-arginine, en présence d'O₂ et de cofacteurs (flavine adénine dinucléotide [FAD], flavine mononucléotide [FMN], nicotinamide adénine dinucléotide phosphate [NADPH]). Il existe 5 isoformes de NOS (endothéliale eNOS ou NOS III, neuronale nNOS ou NOS I, inductible iNOS ou NOS II car elle est exprimée principalement après induction par des cytokines pro-inflammatoires, NOS mitochondriale et NOS érythrocytaire) ayant toutes des dépendances au

Ca²⁺ différentes (Forstermann and Munzel, 2006). Les NOS sont des hémoprotéines proches du cytochrome P450, qui ont pour substrat la L-arginine et l'oxygène pour donner du NO et de la citrulline. Le NO est impliqué dans de nombreuses réactions d'oxydoréduction : il peut réagir avec l'O₂ pour donner des nitrates ou avec certaines espèces radicalaires telles que l'O₂⁻ pour former du peroxy-nitrite (ONOO⁻) (Feletou et al., 2012; Hibbs et al., 1988). Le NO est un messenger majeur du système cardiovasculaire. Les NOS activées par différents stimuli produisent le NO gazeux diffusant facilement dans les tissus dont les CMLVs. Le NO a de nombreuses fonctions dans l'organisme :

- Il joue un rôle vasodilatateur principalement lorsqu'il est produit *via* l'activation de la eNOS de façon dépendante ou indépendante du Ca²⁺. Des agonistes tels que l'ACh ou la bradykinine provoquent une élévation du Ca²⁺ intracellulaire libre pouvant s'associer avec la CaM afin de former le complexe Ca²⁺/CaM. Ce dernier va ainsi se lier à la eNOS, permettre son activation et donc la production de NO. Pour l'activation indépendante du Ca²⁺, des stimuli tels que les contraintes de cisaillements activent la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et protéine kinase B (Akt), voie PI3K/Akt, menant à la phosphorylation et donc à l'activation de la eNOS (Harris et al., 2001). Le NO ainsi produit agit sur les CMLs en interagissant avec sa cible principale, la guanylate cyclase soluble (GCs), qui est responsable de la synthèse de la guanine monophosphate cyclique (GMPc) à partir de la guanine triphosphate (GTP). La stimulation de la GCs entraîne une augmentation des taux intracellulaires de GMPc permettant l'activation de la protéine kinase G (PKG). Au niveau du muscle lisse des vaisseaux sanguins, cette cascade enzymatique réduit les interactions actine-myosine et provoque la relaxation vasculaire (Carvajal et al., 2000; Lowenstein et al., 1994).

- Le NO joue un rôle dans l'activité plaquettaire, où il diminue l'adhésion, l'agrégation et le recrutement plaquettaire (Alonso and Radomski, 2003; Bath et al., 1991; Yang et al., 1994).

- Le NO joue un rôle de neurotransmetteur lorsqu'il est produit par la NOS neuronale (soluble, cytosolique, calcium-dépendante), un isoforme exprimé dans de nombreux tissus tels que les neurones, les astrocytes mais aussi les terminaisons nerveuses présentes dans la paroi artérielle (Forstermann et al., 1993).

- Il joue un rôle cytotoxique lorsqu'il est produit en grande quantité par les NOS inductibles (solubles, cytosoliques, calcium-indépendantes, activées par les cytokines) des cellules

immunitaires. Le NO est aussi un régulateur de l'apoptose cellulaire. Il peut soit avoir un rôle pro- apoptotique ou au contraire un rôle anti-apoptotique (Feletou et al., 2008).

1.2.2.1.2 Prostacycline (PGI₂)

En réponse aux contraintes de cisaillement, l'endothélium produit également de la PGI₂ agissant comme vasodilatateur mais ayant aussi un rôle dans l'inhibition de l'agrégation des plaquettes (Mitchell et al., 2008). PGI₂ est le produit métabolique dérivé de l'acide arachidonique (AA). Ce dernier est libéré par l'action de la phospholipase A2 (PLA2) de façon Ca²⁺ dépendante puis converti par la cyclo-oxygénase (COX). La PGI₂ agit sur les CMLVs au niveau du récepteur IP activant ainsi l'adénylate cyclase (AC) ce qui favorise la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) à partir de l'adénosine triphosphate (ATP) et active la protéine kinase A (PKA). Cette dernière provoque une hyperpolarisation et donc une relaxation des CMLVs via l'ouverture de canaux K⁺ (Andresen et al., 2006).

1.2.2.1.3 Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF)

Outre le NO et la PGI₂, l'EDHF est relâché par l'endothélium et est capable d'hyperpolariser les CMLVs et ainsi d'induire une vasodilatation de façon distincte de la eNOS ou des métabolites des COX. L'EDHF est principalement présent au niveau des artères de résistances (Luksha et al., 2009). L'EDHF peut agir de 2 façons différentes :

- Une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire endothéliale induit une hyperpolarisation *via* l'activation de canaux K⁺ sensibles au Ca²⁺. Cette hyperpolarisation est transmise aux CMLVs *via* les jonctions gap myoendothéliales induisant alors une vasodilatation (Busse et al., 2002).
- A niveau des CMLVs, l'EDHF active les canaux K⁺ induisant une hyperpolarisation dépendante de l'endothélium provoquant la fermeture des canaux Ca²⁺ voltage dépendants et ainsi la relaxation des CMLVs (McGuire et al., 2001).

1.2.2.1.4 Au niveau cérébral

Comme vu précédemment dans la plupart des lits vasculaires, le NO, la PGI₂ et l'EDHF sont les principaux vasodilatateurs. Cependant, il a aussi été démontré qu'un autre EDHF, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pouvait jouer un rôle vasodilatateur majeur au niveau du système cérébral, chez la souris (Drouin et al., 2007).

En général, le H₂O₂ est issu de l'activité de plusieurs superoxydes dismutases (Cu/ZnSOD), mais aussi de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (Miller et al., 2006). Le H₂O₂ est un composé qui diffuse facilement et est relativement stable. Il peut agir *via* les canaux potassiques en créant une hyperpolarisation menant à une vasodilatation. De ce fait l'ajout exogène de H₂O₂ ou d'ACh active la GCs des artères cérébrales de souris menant à une augmentation de la concentration intracellulaire de GMPc et donc une vasodilatation (Drouin et al., 2007; Nelson et al., 1990). Différents stimuli tels que l'ACh (Drouin et al., 2007), la dilatation induite par le débit (Drouin and Thorin, 2009), la bradykinine (Sobey et al., 1997), l'AA (Kontos et al., 1984) et la NADPH oxydase via la PI3K (Paravicini et al., 2006) confèrent au H₂O₂ son rôle vasodilatateur.

Les études de notre laboratoire se démarquent en démontrant que le H₂O₂ peut aussi être produit au niveau des artères cérébrales de souris par la eNOS sous sa forme découplée. La eNOS, en conditions physiologiques, sous sa forme couplée est connue pour produire du NO comme principal vasodilatateur. Cependant en conditions pathologiques ou de stress oxydant, la eNOS passe sous sa forme découplée, diminuant alors sa production de NO en faveur de la production d'O₂⁻, qui en présence d'enzymes telles que les SOD permettent la conversion en H₂O₂ (Cai, 2005; Forstermann and Munzel, 2006).

L'importance de la eNOS dans la production de H₂O₂ dans les artères cérébrales de souris jeunes et en santé a été démontrée par les études effectuées dans notre laboratoire :

- La eNOS produit du H₂O₂ mesurable dans les artères cérébrales de souris en réponse à une dilatation induite par l'ACh (Drouin et al., 2007). Cet état découplé de la eNOS a été qualifié de « physiologique » puisque il est observé chez des souris contrôles, jeunes et en santé. De plus, il n'y a pas production de H₂O₂ chez des souris knockout eNOS^{-/-} (Drouin et al., 2007).
- La production de H₂O₂ par la eNOS peut activer la GCs, suggérant alors que le H₂O₂ partage la même voie d'action que le NO (Iesaki et al., 1999) (Drouin et al., 2007).
- Tout comme l'ACh, la FMD dans les artères cérébrales de souris mène aussi à la production de H₂O₂, activant la eNOS *via* la voie Akt (Drouin and Thorin, 2009).

Bien que la production d'O₂⁻ puisse être vue comme néfaste, les études de notre laboratoire démontrent que cet O₂⁻ produit par la eNOS peut être converti en H₂O₂, *via* les SOD, jouant alors un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire.

1.2.2.2. Dysfonction endothéliale

Comme vu précédemment, un endothélium fonctionnel régule le tonus vasculaire grâce à un équilibre entre les substances vasodilatatrices et les substances vasoconstrictrices. Une dysfonction endothéliale se caractérise par un déséquilibre stimulant la production endothéliale de chimiokines, cytokines et de molécules d'adhésion menant à une inflammation (Vanhoutte et al., 2009). De plus la dysfonction endothéliale est associée à une perte de la biodisponibilité du NO, en faveur de la production de substances oxygénées réactives (ROS), favorisant le développement des maladies cardiovasculaires (Feletou and Vanhoutte, 2006).

Un endothélium dysfonctionnel favorise la synthèse de facteurs pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumoral (TNF- α) et l'interleukine-6. Cette cytokine pro-inflammatoire, contribue à la dysfonction endothéliale en dérégulant la sécrétion et la synthèse endothéliale de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1, un marqueur pro-thrombotique), de eNOS et d'ET-1 (Szmitko et al., 2003). La dysfonction endothéliale mène alors à une dysrégulation de l'homéostasie de l'endothélium résultant en une hausse du tonus vasculaire. La surexpression des gènes pro-inflammatoires, des cytokines, des protéines d'adhésion, induit une prolifération des CMLVs menant à un épaississement de la paroi vasculaire, résultant à une diminution des contraintes de cisaillements (Deanfield et al., 2007; Vanhoutte, 2009).

1.2.2.3. Dilatation induite par le débit (FMD)

Au niveau de l'endothélium, la pression de par sa nature produit 3 types de forces hémodynamiques : 1) la contrainte de cisaillement (shear stress), 2) la pression hydrostatique, 3) la déformation cyclique.

- La contrainte de cisaillement se définit comme la force tangentielle provenant de la friction du sang sur la paroi des artères et donc directement sur l'endothélium. Elle est exprimée en unité de force/zone unitaire (dynes/cm²). Les contraintes de cisaillements sont relativement constantes de l'aorte jusqu'aux capillaires et varient seulement de 10 à 26 dynes/cm² (Bolduc et al., 2013). Les contraintes de cisaillements (τ) dépendent de la viscosité du sang (η ; Poise), du rayon interne du vaisseau (r ; cm) et du débit sanguin (Q ; mL/sec) selon la formule suivante :

$$\tau : 4\eta Q / \pi r^3$$

Les contraintes de cisaillements sont faibles dans les veines (1-6 dynes/cm²), élevées et pulsées dans les artères (10-70 dyn/cm²) et moyennes (15 dynes/cm²) dans les artérioles (Bolduc et al., 2013; Muller et al., 1996; Thorin and Thorin-Trescases, 2009).

- La pression hydrostatique est la force agissant perpendiculairement à la paroi des vaisseaux sanguins (Hsieh et al., 2014).

- La déformation cyclique est l'étirement circonférentiel de la paroi des vaisseaux (Giannoglou et al., 2008)

Des variations de débit sont accompagnées par des changements de nombreux facteurs dont entre autres, les contraintes de cisaillements. Une augmentation des contraintes de cisaillement due à une augmentation du débit sanguin aussi bien au niveau périphérique que cérébral va engendrer une vasodilatation de façon dépendante de l'endothélium (figure 4). Les contraintes de cisaillements sont ainsi considérées comme un puissant vasodilatateur pouvant agir *via* les mécano-senseurs présents au niveau de l'endothélium mais aussi des CMLVs, tels que les protéines G, les cadhérines, les intégrines, les récepteurs à la tyrosine kinase, les canaux ioniques (Hsieh et al., 2014) (figure 4). Une augmentation des contraintes de cisaillement provoque donc, au niveau de l'endothélium, l'ouverture des canaux sensibles au Ca²⁺ tels que les récepteurs purinergiques P2X et les TRP dont le TRPV4 (particulièrement exprimés au niveau cérébral), provoquant de façon dose dépendante une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire. Cette dernière engendre une vasodilatation *via* la libération de NO, de PGI₂, et/ou d'EDHF (figure 4).

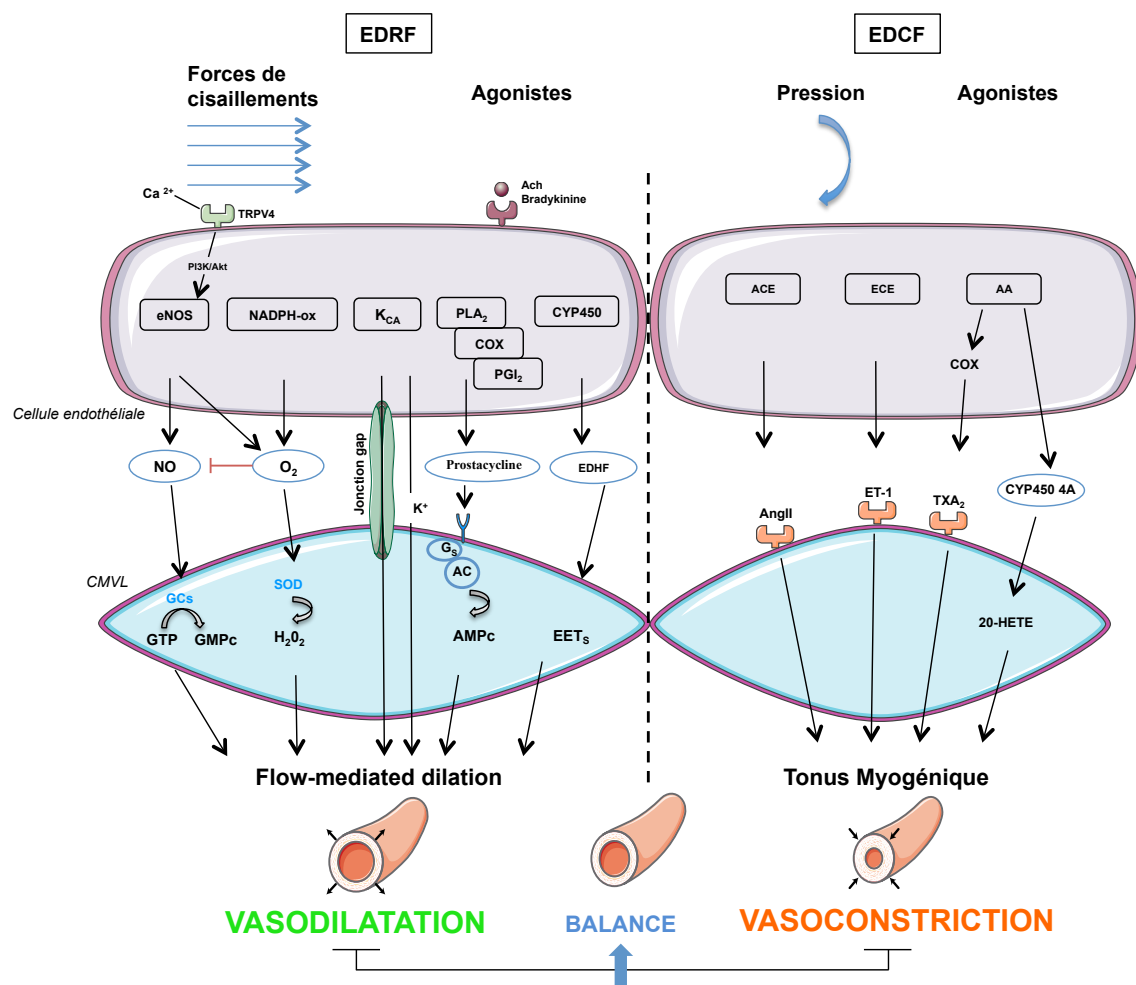


Figure 4: Schématisation des potentiels mécanismes impliqués dans la FMD et la FMC. Adapté de (Feletou et al., 2012; Koller and Toth, 2012; Toth et al., 2011).

Les forces de cisaillements ou des agonistes, tels que l'Ach ou la bradykinine, induisent la relâche d'EDRF par les cellules endothéliales diffusant jusqu'au CMLVs permettant ainsi la vasodilatation. À l'inverse, la pression ou des agonistes induisent la relâche d'EDCF par les cellules endothéliales diffusant aussi jusqu'aux CMLVs mais permettant la vasoconstriction.

Abréviations : EDRF : Facteur relaxant dérivé de l'endothélium ; Ca^{2+} : Ion Calcium ; TRPV4 : Récepteur de potentiel de type 4 vanilloïde ; Ach : Acétylcholine ; eNOS : Isoforme endothéliale de la monoxyde d'azote synthase ; NADPH-ox : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase ; K_{CA} : Canaux potassiques activés par le calcium ; PLA_2 : Phospholipase A_2 ; CYP450 : Enzymes du cytochrome P450 ; COX : Cyclo-oxygénase ; PGI_2 : Prostacycline ; NO : Monoxyde d'azote ; O_2^- : Anion superoxyde ; K^+ : ion potassium ; EDHF : Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ; CMLV : Cellule musculaire lisse vasculaire ; GC_S : Guanylate cyclase soluble ; GTP : Guanosine triphosphate ; GMP_c : Guanosine monophosphate cyclique ; SOD : Superoxyde dismutase ; H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène ; G_s : Protéine G stimulatrice ; AC : Adénylate cyclase ; AMPc : Adénosine monophosphate cyclique ; EETs : Acide époxyéicosatriénoïque ; EDCF : Facteur contracteur

dérivé de l'endothélium ; ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine ; ECE : Enzyme de conversion de l'endothéline-1 ; AA : Acide arachidonique ; COX : Cyclo-oxygénase ; AngII : Angiotensine II ; ET-1 : Endothéline-1 ; TXA₂ : Thromboxane A₂ ; CYP450 4A : Enzymes du cytochrome P450 de la sous famille 4A ; 20-HETE : Acides hydroxyéicosatetraenoïques.

1.2.2.4. Contraction induite par le débit (FMC)

La FMD et FMC sont deux réponses physiologiques opposées qui permettent à l'artère d'ajuster son diamètre intra-luminal afin de maintenir un débit constant optimal. Cependant le mécanisme de la FMC est encore peu connu et plusieurs hypothèses ont été proposées.

Des études ont démontré que la contraction des artères au niveau cérébral, en réponse au débit, est indépendante d'un endothélium fonctionnel et que le mécanisme responsable de la contraction est localisé dans les CMLVs des artères (Bryan et al., 2001b; Madden and Christman, 1999). Un groupe de chercheurs a démontré que des substances réactives de l'oxygène (DRO) sont produites par les CMLVs, provoquant une augmentation de Ca²⁺ ce qui induirait la FMC (Bryan et al., 2001a). D'autre part, ce groupe a aussi démontré que l'endothélium joue un rôle dans l'atténuation des constriction induites par les contraintes de cisaillement sous l'effet d'une dilatation n'impliquant pas la participation du NO, de la PGI₂ ou de l'EDHF, mais impliquant un facteur endothélial encore inconnu (Bryan et al., 2001a). Une autre possibilité est que l'augmentation du débit élimine les substances vaso-actives endothéliales et donc induise un effet tonique du muscle lisse vasculaire (Bevan and Henrion, 1994). De plus cette constriction des vaisseaux induite par le débit peut être bloquée par l'inhibition de la synthèse de 20-HETE, le récepteur au TXA₂ (TP), l'activité des COX et le "scavenging" des DRO (Toth et al., 2011). L'augmentation du débit activerait donc la cascade de l'AA dont les métabolites sont transformés par les enzymes du CYP450 4A en 20-HETE, engendrant la contraction *via* le récepteur thromboxane-prostanoïde TP au niveau des CMLVs. On sait également que les CYP450 4A produisent des DRO qui contribuent au développement de la FMC (Koller and Toth, 2012). Une autre étude réalisée sur des artères cérébrales moyennes de rats et des artères cérébrales humaines (Toth et al., 2011) démontre l'implication d'un facteur contracteur dérivé de l'endothélium (EDCF) *via* la participation des DRO dans le mécanisme de la FMC.

En réponse à une augmentation du débit, les artères peuvent donc réagir des deux façons, soit en se dilatant, soit en se contractant. La FMD peut s'observer suite à l'induction d'une

pré-contraction (pharmacologique ou engendrée par le tonus myogénique) alors que la FMC peut s'observer sur le tonus basal.

1.3. Pression pulsée

1.3.1. Origine

La pression artérielle (PA) est la force exercée par le sang sur la paroi interne des vaisseaux sanguins et se définit comme le produit du débit cardiaque et de la résistance des vaisseaux, impliquant la fréquence cardiaque et le volume d'éjection systolique (Mitchell et al., 1997). De ce fait la PA est pulsatile et se définit à partir de deux variables, la première étant la pression artérielle systolique (PAS) correspondant à la pression maximale du sang sur les artères lorsque le cœur se contracte. Une PAS normale est établie à 120 mm Hg. La seconde variable est la pression artérielle diastolique (PAD) correspondant à la pression minimale lors de la phase de remplissage des cavités cardiaques. Une PAD normale est établie à 80 mm Hg (Guyton & Hall 2000). Une PAD ou PAS anormalement élevée sera appelée hypertension artérielle (Chobanian et al., 2003). La pression artérielle pulsée correspond à la différence entre la pression artérielle systolique et la pression artérielle diastolique (Pression Pulsée = PAS-PAD) (figure 5). La pulsatilité est influencée par deux grands facteurs hémodynamiques : 1) le volume d'éjection du sang à la sortie du cœur et 2) la compliance de l'arbre artériel. Un troisième facteur est aussi présent mais cependant moins important, le volume d'éjection lors de la systole (Guyton & Hall 2000). Plus le volume d'éjection sanguine lors de la systole est important, plus la quantité de sang distribué dans l'arbre artériel entre chaque battement est importante (Manzo-Silberman, Safar et al. 2010). Par conséquent l'élévation de la PAS et la chute de la PAD induisent une plus grande amplitude de la pression pulsée au niveau de l'arbre artériel. Plus la compliance des artères est faible, plus l'amplitude du pulse sera élevée, tel qu'observé chez des patients âgés où en présence d'athérosclérose, chez qui l'amplitude de la pression pulsée peut être jusqu'à doublée (Nagai et al., 1998). Ainsi, la propriété d'élasticité des parois artérielles est un facteur déterminant de la vitesse de propagation de l'onde de pouls. La pression pulsée ressentie au niveau des artères cérébrales dépend de la capacité des carotides à transformer le débit sanguin pulsé en un débit plus continu (Domanski et al.,

1999b). La pression pulsée est un marqueur de rigidité artérielle, elle augmente donc avec l'âge.

Chez l'homme, une pression pulsée est considérée comme basse lorsqu'elle est inférieure à 45 mm Hg, moyenne lorsqu'elle est comprise entre 46 et 50 mm Hg et haute lorsqu'elle se situe au dessus de 51 mm Hg (Manzo-Silberman, Safar et al. 2010).

La contraction cardiaque cyclique induit un débit sanguin pulsatile. Il a été démontré que l'augmentation de la pression pulsée conduit à la rupture par fatigue de la paroi vasculaire sur le long terme (Benetos et al., 2010) alors qu'une hausse transitoire pulsatile du flux sanguin est bénéfique pour l'endothélium (Benetos et al., 2010). Une pression pulsée élevée, résultant d'évènements physiopathologiques, est à l'origine d'évènements cardiovasculaires tels qu'une coarctation de l'aorte, anévrismes cérébraux et hémorragie cérébrale (Laurent et al., 2006). Au niveau myocardique, une augmentation de pression pulsée à également des effets délétères en favorisant le développement d'hypertrophie ventriculaire gauche pouvant engendrer une ischémie coronaire (Benetos et al., 1997).

La pression pulsée apporte des informations complémentaires et plus sensibles que la pression artérielle moyenne (PAM) sur l'état des conditions hémodynamiques artérielles, et elle est considérée comme un bon marqueur d'évaluation du risque cardiovasculaire (Manzo-Silberman, Safar et al. 2010).

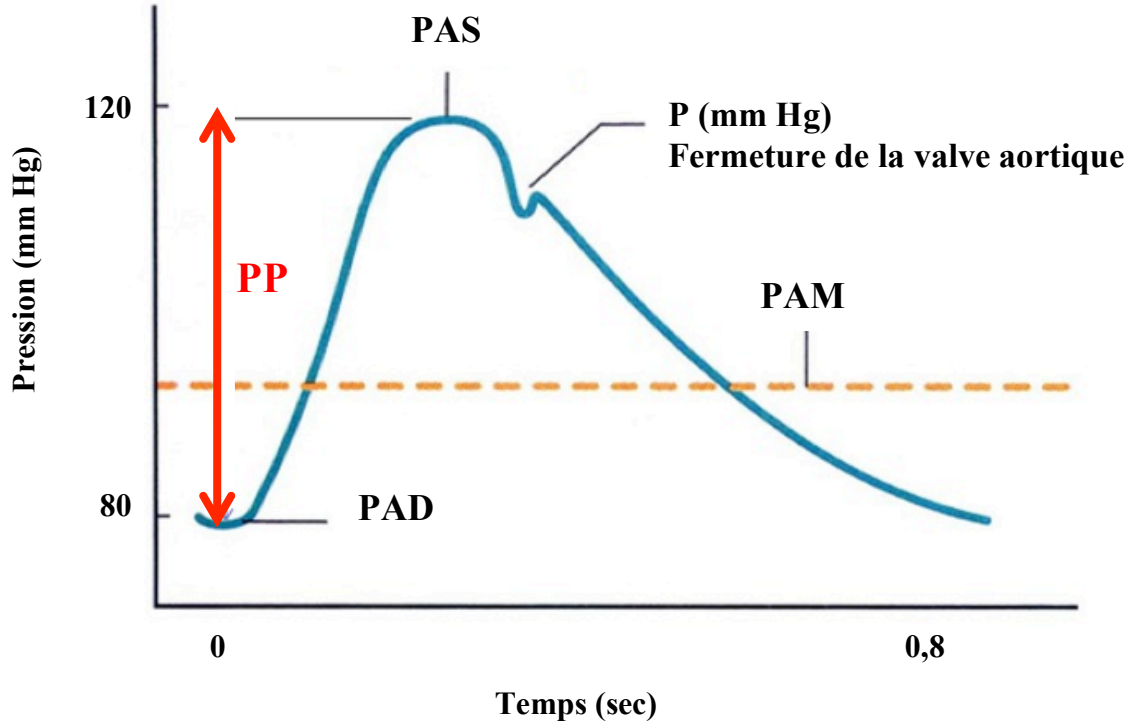


Figure 5: Courbe de pression artérielle. Composante pulsatile (Tiré de : <http://www.labome.fr/research/Pulse-pressure-and-cardiovascular-risk-a-retrospective-study-of-700-patients.html>). La pression pulsée est la différence entre la PAS et la PAD.

Abréviations : PAS : Pression artérielle systolique ; PAD : Pression artérielle diastolique ; PP : Pression pulsée ; PAM : Pression artérielle moyenne ; P : Pression.

1.3.2. Impact de la pression pulsée sur les artères

L'impact de la pression pulsée sur le tonus vasculaire a été peu étudié, que ce soit au niveau périphérique ou cérébral. Voici un bref aperçu du peu de données que l'on peut trouver dans la littérature.

1.3.2.1. Études précliniques

1.3.2.1.1 Niveau périphériques

Une étude *in vitro* réalisée dans l'aorte de lapin démontre qu'une augmentation de l'amplitude de la pression pulsée diminue la FMD, en diminuant la relâche d'EDRF, et augmente le tonus de l'artère (Hutcheson and Griffith, 1991). Cette réponse à la pression pulsée est endothélium-

dépendante et sensible au L-NAME, un inhibiteur de la eNOS (Hutcheson and Griffith, 1991). À l'inverse, une étude a démontré plus récemment l'effet bénéfique de la présence de pulsatilité dans l'artère fémorale de chien, *via* une augmentation de la relâche de NO et menant à une baisse de la résistance périphérique vasculaire (Nakano et al., 2000). De même, une étude a étudié l'impact délétère de l'absence de pression pulsée sur la FMD et le tonus myogénique d'artères mésentériques de rats, selon l'hypothèse qu'une absence de pulsatilité affecte le tonus vasculaire en augmentant l'inflammation *via* la relâche de ROS (Pinaud et al., 2011). Les artères ont été soumises à une pression pulsée ou à une pression statique 180 min avant le début de l'expérience ; l'absence de pression pulsée a diminué la FMD en favorisant la production de ROS après 30 min et a augmenté le tonus myogénique des artères mésentériques de rat (Pinaud et al., 2011). Un traitement au Tempol, un antioxydant, a démontré le rôle de la production de ROS dans la diminution de la FMD observée en absence de pression pulsée (Pinaud et al., 2011). A l'inverse, une étude a démontré que l'épaississement de la carotide chez des souris jeunes induit par l'application de chlorure de calcium (CaCl₂) au niveau de la carotide, stimulant la synthèse de collagène et la fragmentation des filaments d'élastine ce qui diminue la compliance artérielle, augmente la pulsatilité du DSC et engendre des dommages cérébrovasculaires tels que la perte de neurones (Sadekova et al., 2013). Dans cette étude, l'augmentation de la pulsatilité est donc néfaste. Il a aussi été démontré qu'un épaississement de l'aorte est associé à une augmentation du flux sanguin au niveau de la carotide résultant en une élévation de la pulsatilité et du flux sanguin au niveau des artères cérébrales augmentant ainsi le risque de dommages cérébrovasculaires (Kwater et al., 2009).

1.3.2.1.2 Niveau cérébral

Quelques rares études ont été réalisées afin de déterminer l'impact de la pression pulsée sur la réactivité cérébrovasculaire, c'est à dire sur le tonus myogénique ou la FMD ; cependant les mécanismes impliqués restent encore peu connus.

Une étude datant de 1998 réalisée sur des artères cérébrales de porc montre que la pression pulsée change la FMC, observée en condition statique, en FMD (Shimoda et al., 1998). Les auteurs ont suggéré que la dilatation est engendrée par la libération de NO, puisque la dilatation est inhibée en présence de L-NA (Shimoda et al., 1998). Une étude récente

évaluant l'impact de la pression pulsée sur le tonus myogénique d'artères cérébrales de souris jeunes (3 mois) vs des souris âgées (24 mois) démontre que la pression pulsée diminue significativement le tonus myogénique des souris âgées menant à des dommages microvasculaires (Springo et al., 2015). Le mécanisme par lequel la pression pulsée régule le tonus myogénique reste cependant non défini, mais les auteurs suggèrent que la pression pulsée agirait en dérégulant les canaux Ca^{2+} de type L (Springo et al., 2015).

1.3.2.2. Aspect clinique

La PAS et la PAD sont les composantes classiques de surveillance et de dépistage du développement de maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle. La pression pulsée démontre également un intérêt dans le pronostic des maladies cardiovasculaires puisqu'elle est liée à la rigidité artérielle des troncs artériels : une augmentation chronique de pression pulsée est un facteur de risque de développer des maladies cardiovasculaires. Chez l'homme, la pression pulsée peut avoir des effets néfastes ou bénéfiques sur la fonction vasculaire, selon le contexte.

1.3.2.1.1 Effet bénéfique de la pression pulsée

Une étude réalisée lors d'une chirurgie utilisant une pompe à pression pulsée durant la circulation extra corporelle (CEC) a démontré un effet bénéfique de la pression pulsée en permettant une meilleure filtration glomérulaire et moins de dommages des tissus rénaux (Milano et al., 2015). Une autre étude démontre également que l'absence de débit pulsatile lors de la CEC augmente l'inflammation et mène à une dysrégulation du contrôle du tonus vasculaire de l'artère coronaire (Baufreton et al., 1999). De plus, lors d'une étude évaluant l'impact de différents dispositifs d'assistance ventriculaire gauche, il a été suggéré qu'une perfusion continue serait associée à une augmentation des risques d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) alors qu'une perfusion pulsatile pourrait diminuer ces risques (Backes et al., 2012). Finalement une étude récente a rapporté que l'exercice physique régulier et d'intensité modérée augmente de façon proportionnelle la pression pulsée et ainsi améliore la fonction endothéliale (Durand et al., 2015).

1.3.2.1.2 Effet néfaste de la pression pulsée

D'un autre côté, une étude clinique rapporte qu'une augmentation aiguë de la pression pulsée causée lors de l'exercice physique induit une dysfonction endothéliale au niveau de l'artère brachiale chez des volontaires sains (Llewellyn et al., 2012). Des analyses post-hoc de l'étude SHEP (Systolic Hypertension in the Elderly Program) ont mis en évidence une corrélation entre une élévation de la pression pulsée chez le sujet âgé et une augmentation de la sténose carotidienne mais aussi du risque d'AVC et de mortalité (Domanski et al., 1999a) (Franklin et al., 1997). L'augmentation de l'amplitude de la pression pulsée avec l'âge est aussi considérée comme étant un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer. On sait en effet que l'augmentation de la pression pulsée est un facteur de risque des maladies cardiovasculaires, mais elle est aussi connue comme pouvant causer des dommages dans la circulation cérébrale menant ultimement à des démences vasculaires. Une équipe Suédoise a ainsi testé l'hypothèse selon laquelle une augmentation de la pression pulsée est un facteur de démence et de la maladie d'Alzheimer chez des sujets âgés de 75 ans ou plus (Qiu et al., 2003). Selon cette équipe, alors qu'une faible pression pulsée peut être due à un faible volume d'éjection cardiaque résultant en une mauvaise perfusion du cerveau et donc pouvant mener au développement de démences vasculaires, une pression pulsée élevée serait une indication clinique de rigidité artérielle liée à l'athérosclérose, engendrée par une hypertension systolique pouvant provoquer des AVC silencieux qui sont eux mêmes des facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer (Qiu et al., 2003). D'autre part, une étude réalisée sur un groupe de sujets sains entre 55 et 70 ans, mais dont la pression pulsée est élevée, suggère que ces patients sont plus susceptibles de présenter des marqueurs de la maladie d'Alzheimer, tels que la protéine Tau et des plaques beta amyloïdes dans leur liquide cébrospinal, comparé à des patients avec une pression pulsée normale (Nation et al., 2013). L'équipe du Dr O'Rourke a également émis l'hypothèse selon laquelle les parois de l'aorte et des artères périphériques s'épaississent avec l'âge, les rendant moins élastiques et donc diminuant leur capacité à amortir la pression pulsée (Stone et al., 2015). L'amplitude de la pression pulsée est donc plus grande et se propage jusqu'aux artères cérébrales conduisant à des dommages vasculaires; c'est l'accumulation de ces micros blessures dans les artères cérébrales qui pourrait contribuer au développement de la maladie d'Alzheimer (Stone et al., 2015).

En résumé, tous les vaisseaux de notre organisme dont ceux du cerveau, même les plus fins tels que les capillaires, sont en permanence exposés au flux sanguin et à des contraintes mécaniques associées à la pression artérielle pulsée (Henry-Feugeas, 2008) (Bateman, 2004). Chez les personnes en bonne santé, les artères élastiques centrales (par exemple, l'aorte et l'artère carotide) fournissant un effet Windkessel, à chaque cycle cardiaque, amortissent la pulsatilité et facilitent un flux sanguin continu dans les capillaires. L'effet Windkessel est un mécanisme physiologique présent au niveau artériel qui permet de transformer un débit sanguin pulsé discontinu à la sortie du cœur en un débit sanguin artériel continu jusque dans les plus fins capillaires. L'aorte et les plus grosses artères élastiques, de part leurs propriétés élastiques, sont capables de stocker environ 50% du volume d'éjection durant la systole. Durant diastole, alors que le cœur n'éjecte plus de sang, les forces élastiques de la paroi aortique renvoient ce volume dans la circulation périphérique, créant ainsi un débit sanguin artériel continu. Bien que les mécanismes ne soient pas encore parfaitement connus, une pression pulsée normale semble nécessaire et bénéfique puisqu'elle permet de maintenir une bonne réactivité vasculaire. En revanche, l'augmentation de la rigidité artérielle liée à l'âge peut conduire à un effet de Windkessel moins efficace, augmentant la pression pulsée, donc augmentant le risque de maladie cardiovasculaire. Ceci est en accord avec la vision du docteur Canadien, William Osler, qui a écrit en 1906 « *a man is only as old as his arteries* ».

2. Hypothèses et Objectifs

Selon l'organisation mondiale de la santé, les maladies cardiovasculaires constituent l'une des premières causes de mortalité dans les pays développés, et elles touchent aussi désormais les pays en voie de développement (WHO 2011). Il s'agit de pathologies telles que les infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque, l'hypertension (artérielle et pulmonaire), les anévrismes, les thromboses et les AVC. *In vivo*, le cycle cardiaque engendre une pression sanguine pulsée : elle correspond à la différence entre la pression systolique et la pression diastolique et sa fréquence d'oscillation est déterminée par le rythme cardiaque. La pression pulsée est influencée par de nombreux facteurs tels que la rigidité des parois vasculaires, les résistances périphériques et le niveau d'activation du système nerveux sympathique. Avec l'âge, les propriétés mécaniques et structurales des artères changent et se détériorent, conduisant à un remodelage en association avec une dysfonction endothéliale. En l'absence d'une augmentation de la résistance périphérique, une élévation chronique et anormale de la pression pulsée peut indiquer une diminution de la compliance artérielle. Une augmentation chronique de la pression pulsée est également un facteur de risque de l'AVC et peut aussi induire le développement de démences vasculaires telles que la maladie d'Alzheimer, dont l'incidence devrait augmenter de 50% aux États Unis d'ici 2030 (Alzheimer's et al., 2011). Il semble donc bien établi qu'une élévation chronique et anormale de la pression pulsée est délétère. Cependant, une pression pulsée normale semble nécessaire à l'homéostasie vasculaire; cet aspect physiologique est très sous-estimé puisque l'impact de la pression pulsée n'a que très rarement été étudié. En effet jusqu'à présent dans la majorité des expériences réalisées *in vitro*, les artères isolées ont été soumises à une pression constante non pulsée.

Notre hypothèse est que la présence d'une pression pulsée d'amplitude normale (30 mm Hg) et de fréquence physiologique (9,2 Hz correspondant aux 550 battements par minutes d'un cœur de souris) optimise le tonus myogénique et les dilatations dépendantes de l'endothélium des artères cérébrales dans le but de finement réguler la réactivité vasculaire afin, ultimement, de réguler le débit sanguin cérébral.

Notre objectif est donc d'étudier *in vitro* l'impact physiologique de la pression pulsée versus la pression statique, sur la fonction endothéliale et le tonus myogénique d'artères

cérébrales de souris C57Bl/6 saines. La FMD et le tonus myogénique sont en effet deux fonctions antagonistes très importantes dans la régulation du débit sanguin cérébral, permettant un apport énergétique constant, essentiel à la survie des cellules neuronales. Pour cela nous avons utilisé un artériographe pressurisé permettant d'isoler et de maintenir les artères cérébrales de résistance du polygone de Willis dans des conditions physiologiques constantes et stables. Cet artériographe est couplé à un système générant une onde pulsée de fréquence et d'amplitude contrôlables. L'impact d'une augmentation de pression pulsée, d'amplitude de 50 mm Hg et de fréquence 9,2 Hz, a aussi été étudié sur le tonus myogénique et la fonction endothéliale.

3. Article soumis

Titre : Pulse pressure-dependent cerebrovascular eNOS regulation in mice.

Cet article a été soumis le 4 Août 2015 dans la revue scientifique Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.

L'article est en révision, nous avons jusqu'au 17 décembre 2015 pour compléter les nouvelles expériences.

Virginie Bolduc a débuté le projet et elle a été la première étudiante à tester le système générant la pression pulsée. Ce système a été fabriqué par des étudiants en 3e année de Génie Biomédical de l'école Polytechnique de Montréal, sous la supervision du Dr Frédéric Lesage et du Dr Eric Thorin. Virginie Bolduc a configuré les paramètres (amplitude, fréquence) du pulse. Elle a également réalisé les premières expériences de tonus myogénique en condition statique versus pulsée (Figure 1 du manuscrit).

Adeline Raignault a continué le projet et s'est occupée de la réalisation de toutes les autres expériences nécessaires à la réalisation du manuscrit, de la cueillette de données, de l'analyse de données et de la préparation des résultats.

Frédérique Lesage : Conception et design expérimental.

Eric Thorin : Conception et design expérimental, interprétation des résultats, rédaction du manuscrit, approbation de la version finale du manuscrit.

Pulse pressure-dependent cerebrovascular eNOS regulation in mice

Adeline Raignault^{*,1,3}, Virginie Bolduc^{*,1,3}, Frédéric Lesage^{3,4}, Eric Thorin^{1,2,3}

Université de Montréal, Faculty of Medicine, Departments of Pharmacology¹ and Surgery²,
Montreal Heart Institute Research Center ³, Montreal, Quebec, Canada; Ecole Polytechnique
de Montréal, Montreal, Quebec, Canada⁴

Corresponding authors:

Dr Eric Thorin, Montreal Heart Institute, Research Center, 5000 rue Bélanger, Montréal,
Québec, HIT 1C8, Canada.

*: these two authors equally contributed to this work.

Sources of Funding: This research is supported by the Canadian Institutes for Health
Research (MOP 89733), the Heart & Stroke Foundation of Canada and Quebec, and the
Foundation of the Montreal Heart Institute.

Running headline: *Pulse pressure and endothelial function*

Abstract

Arterial blood pressure is oscillatory; however, whether pulse pressure (PP) regulates cerebral artery myogenic tone (MT) and endothelial shear stress sensitivity is unknown. To test the impact of PP on MT and flow-mediated dilation (FMD), we pressurized (60 mm Hg) posterior cerebral arteries (PCA) and subjected them or not (static, SP) to a PP (30 mm Hg; rate of 550 bpm) to study MT and endothelium-dependent FMD. Pulsed pressure magnified MT from 6 ± 2 to $20 \pm 3\%$ ($p < 0.05$). Both PEG-catalase and eNOS inhibition increased MT under SP only ($24 \pm 3\%$, $p < 0.05$). At low shear stress (10 dynes/cm^2), arteries dilated equally under SP ($64 \pm 11\%$) and PP ($57 \pm 9\%$). At higher shear (20 dyn/cm^2), PCA dilated less under SP ($43 \pm 9\%$) but more under PP ($75 \pm 19\%$; $p < 0.05$). In SP, eNOS-dependent $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ production contributed to FMD, while in PP, only eNOS-dependent NO was responsible for FMD (L-NNA-sensitive) and confirmed by measuring NO and H_2O_2 production. Differences in FMD between pressure conditions were abolished after NOX2 inhibition. Therefore, PP increases MT and shear stress sensitivity by stimulating eNOS-dependent NO production through a NOX2-dependent pathway. Pulsatile flow therefore regulates cerebral artery reactivity, and thus, should be considered as a new determinant to the overall regulation of cerebral blood flow.

Hydrogen peroxide, myogenic tone, NADPH oxidases, nitric oxide, shear stress

Introduction

Blood flows in an oscillatory waveform where the pulse pressure (PP) imposes circumferential and tangential pressures to the endothelial layer and the vessel wall. Chronic elevation of systolic blood pressure due to essential hypertension¹ or stiffening of large peripheral arteries² is damaging to the low-resistance brain circulation and associates with increased microvascular lesions, grey and white matter lesions, and cognitive deficits.³⁻⁶ In an evolutionary perspective, because the PP is the primary stress imposed on the arterial wall,⁷ it is likely that PP feeds back and modulates regulatory pathways stimulating endothelial cell function and influencing organ perfusion. It has been shown that PP is inversely correlated with endothelium-dependent forearm vasodilation in never treated hypertensive patients.⁸ In addition, the absence of pulsatile flow is associated with metabolic acidosis, increased inflammation, decreased oxygen consumption, loss of vasomotor control and has bearing on the capillary circulation and increases bleeding.⁹⁻¹² What are the mechanisms by which PP could acutely regulate hemodynamics? Carotid baroreceptors are unloaded in non-pulsatile perfusion leading to an increase in sympathetic nervous system activity and a rise in blood pressure.¹³⁻¹⁵ Similarly, non-pulsatile clinical cardiopulmonary by-pass increases sympathetic activity, plasma levels of renin, angiotensin II, norepinephrine, endothelin-1, TNF α and ROS. Furthermore, inadequate synthesis of NO, inflammation and oxidative stress were reported in the peripheral circulation *ex vivo*.^{12, 16-22} The direct regulatory effect of PP on the endothelium is, however, poorly understood. Gutterman's group demonstrated in pressurized human peripheral arterioles²³ that a severe increase in intravascular pressure for 30 min induced either *ex vivo* (in static conditions) or *in vivo* (in pulsatile conditions) after a single bout of heavy resistance exercise prior to isolation of the arterioles,²⁴ led to endothelial dysfunction

evidenced by impaired, ROS-mediated, eNOS-dependent NO activity. In exercise-trained individuals, however, a single bout of heavy resistance exercise did not induce endothelial dysfunction, but a shift from NO-mediated dilation to H₂O₂-mediated dilation compensating for the loss of eNOS activity.²⁴ In isolated mouse cerebral arteries and under static pressure (SP), eNOS-derived O₂⁻/H₂O₂ contributes to FMD,²⁵ which could suggest that in these isolated vessels, H₂O₂ production represents a compensatory response to the lack of PP. Taken altogether, these data suggest that PP may regulate vascular endothelial function including its ability to respond to a transitory stress. Our aim was to test whether in isolated and pressurized healthy mouse cerebral arteries, a physiological PP would optimize endothelium-dependent function (shear stress sensitivity) and myogenic tone.

Materials and Methods

All protocols and procedures were designed according to the guidelines of the Montreal Heart Institute Animal Ethical Committee and performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of Canada and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Altogether, sixty one (61) C57Bl/6j (Jackson laboratory) 3-month old male mice were used in this study; they were housed one per cage in a specific pathogen free animal facility under controlled light and temperature. Four of these mice were used *in vivo* to acquire a range of baseline values of heart rate and blood pressure at rest and during voluntary physical activity. This data was used to set experimental pressure and pulse frequency values for ensuing *ex vivo* studies. All other 57 mice were euthanized under anaesthesia (Ketamine, 44 mg/kg, and xylazine, 2.2 mg/kg) to harvest cerebral arteries for *ex vivo* studies. From each mouse, 4 cerebral artery segments were isolated and tested in the different protocols described below. One segment isolated from one mouse was used per protocol. All sections of this report adhere to the ARRIVE Guidelines for reporting animal research.²⁶

Determination of physiological references of blood pressure and heart rate in conscious mice For this *in vivo* study, 3-month old mice (n=4) were instrumented with telemetry blood pressure transducers to monitor blood pressure and heart rate in conscious state at rest and during voluntary running following a method previously described.²⁷ This experiment was design to acquire reference values of blood pressure and heart rate in conscious animals at rest and during physical activity. Briefly, under anaesthesia, the transducer was placed in an abdominal subcutaneous space and a sterile saline-filled 0.1 French Teflon catheter tunnelled

under the skin near the carotid area, inserted into the carotid and connected to the pressure transducer (Data Sciences International, Arden Hills, MN, USA). Pain was controlled by repeated injections of buprenorphine (0.05 mg/kg) before and 2 days post-surgery. Recordings started after 4 days of recovery and for a week (5 min every 30 min); they were analysed (EMKA Technologies, Paris, France), and blood pressure and heart rate calculated. Running wheel activity was monitored in parallel allowing for the association with either a rest or an active period of physical activity.

Vessels isolation and cannulation on the pressure arteriograph After anaesthesia (laboratory, 8 a.m.) and loss of all the reflexes, the mouse was decapitated and the brain was removed from the cranium and placed in ice-cold physiological salt solution (PSS; mmol/l: 130 NaCl; 4.7 KCl; 1.18 KH₂PO₄; 1.17 MgSO₄; 14.9 NaHCO₃; 1.6 CaCl₂; 0.023 EDTA; 10 glucose; pH 7.4) aerated with 12% O₂; 5% CO₂; 83 % N₂ and maintained at 37°C. Posterior cerebral arteries (PCA) were isolated and transferred to the chamber of the arteriograph (Living System Instrumentation, St-Alban, VT, USA) cannulated and pressurized as previously described^{25, 27}. Arterial diameter was measured and recorded continuously with a video monitoring system (IonOptix, Milton, MA, USA).

Pulse pressure system

We manufactured a piston pump system controlled by a computer program to propagate pulse waves (PP) in an artery mounted on the pressure arteriograph. This system is connected to the tubing system upstream to the artery to generate a PP of controllable frequency and amplitude. The force generated by the actuator, connected to a computer, is transmitted to a lever arm,

which function is to increase the range and frequency of the motion and crush the pipette at the end of it. Thus, the vertical movement of the actuator moves the lever arm downwardly and compresses the pipette. Compressing the pipette allows the displacement of a volume of liquid thereby creating the pulse wave moving in the entire system including pressurized cerebral artery. In this study, we used a frequency of 9.2 Hz (mimicking the normal HR of 550 bpm in conscious mice) at the amplitude of 31.5 ± 0.1 mm Hg (± 15 mm Hg, i.e. 45 to 75 mm Hg imposed PCA intraluminal pressure) corresponding to a normal aortic PP determined in conscious mice determined before (See *Results*). In one series of experiments, PP was increased to 50 mm Hg without changing the pseudo-diastolic pressure (mean pressure applied of 70 mm Hg rather than 60 mm Hg), i.e. 45 to 95 mm Hg at 9.2 Hz.

Endothelial function in cerebral arteries Pressurized segment of 2-3 mm of the right or left PCA were studied in static pressure (SP) or after a 30-min PP preconditioning. To validate that eNOS activity is directly responsible for FMD, cerebral arteries were pre-incubated during the equilibration period (30 min) with N ω -nitro-L-arginine (L-NNA 100 μ mol/L) or without endothelium; the endothelium was removed by passing an air bubble through the lumen of the artery.²⁵ To assess the enzyme generating ROS, arteries were pre-incubating during the equilibration period with PEG-catalase (100 μ mol/L) a permeable catalase mimetic to inactivate H₂O₂, with NOX-2 inhibitor gp91 ds-tat (10 μ mol/L) and with mito-Tempol (5 μ mol/L), a mitochondrial specific O₂⁻ inactivator. Pulsatility was stopped to allow for intraluminal flow. FMD were induced after precontraction with phenylephrine (0.1 μ mol/L to 30 μ mol/L) to 40 to 50% of maximal diameter. A single cumulative curve from 0 to 20 dyn/cm² with 2 dyn/cm² steps between 0 to 10 dyn/cm², followed by two 5 dyn/cm² steps, at

constant mean pressure of 60 mm Hg, was performed on each segment. Shear stress (τ , dyn/cm²) was calculated according to $[\tau = 4\eta Q/\pi r^3]$, where η represents the viscosity (0.009 P), Q the flow rate through the lumen (ml/s), and r the inside radius (cm). The shear stress applied was calculated in a physiological range (0-20 dyn/cm²). The data are presented as a percentage of dilation for every shear stress value. At the end of each experiment, the bath was switched for calcium-free PSS containing sodium nitroprusside (SNP, 30 μ mol/L) to obtain the maximal diameter of the arterial segment studied. Posterior cerebral arteries were also used to assess the myogenic tone. The internal diameter (D) was measured after each variation of the intraluminal pressure between 20 to 120 mm Hg by increasing from 20 mm Hg with 2 min interval between each variation of the pressure. Myogenic responses were assessed without flow to eliminate the response of endothelial cells to shear stress. At the end of each experiment, the PSS in the bath was switched for calcium free PSS containing SNP and the curve was repeated to obtain the maximum internal diameter in passive condition (D_{max}). Myogenic tone for each intraluminal pressure value was calculated following this formula:

$$MT (\%) = [(D - D_{\max}) / (D_{\max})] * 100$$

Fluorescence studies To test the hypothesis that PP modifies eNOS activity from H₂O₂ to NO production, cerebral arteries were incubated along with 10 μ mol/L 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2, a NO-sensitive fluorescent dye) and also with 5 μ mol/L 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA, a H₂O₂-sensitive fluorescent dye) as previously described in details.^{25, 28, 29} Arterial segments were incubated with or without L-NNA (100 μ mol/L) or PEG-catalase (50 U/mL) for 30 min, after which the arteries were

washed 3 times with physiological saline solution, precontracted with PE, and dilated with a shear stress of 20 dyn/cm².

Data Analysis “n” refers to the number segments/animals used in each protocol and is based on our previous experience using the methodological approach. Results are presented as mean±SEM. In the absence of treatment *in vivo*, no blinding was performed. Arterial segments were assigned to an *ex vivo* protocol pre-determined by the researchers with no deviation and exclusion of data/animals. All individual data were integrated and analysed by two experimenters (AR, VB) and validated by the supervisor of the study (ET). For MT, a two-way ANOVA with repeated measures followed, if the interaction group*pressure was significant, by an unpaired Student’s t test was used to compared groups at each given pressure. Two-way ANOVA followed, if group*shear stress was significant, by unpaired Student’s t test, was used for the flow-mediated response to compared the 2 groups (static and pulsatile pressure) at the same shear stress value or to compare between 2 shear stress values from the same group. A value of P<0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) by an independent statistician.

Results

In vivo pressures and heart rate We first measured the amplitude of the PP and its frequency *in vivo* in four conscious mice, at rest and during voluntary running, in order to assess the amplitude of the physiological changes of these parameters. As expected, variability of these parameters was very low, justifying the low number of animals tested. Diastolic (DBP) and systolic blood pressure (SBP) increased from 85 ± 1 and 113 ± 2 mm Hg to 100 ± 1 and 130 ± 1 mm Hg at rest and during running, respectively. The PP did not vary from rest (28 ± 2 mm Hg) to active (30 ± 1 mm Hg) state. A PP of 30 mm Hg was therefore chosen for *ex vivo* testing, although *in vivo* PP in the PCA may be smaller,³⁰ possibly ~20 to 25 mm Hg.³¹ Resting HR averaged 562 ± 11 beats per minute (bpm) [range: 538 – 589] and we therefore selected a pulse modulation frequency of 9.2 Hz corresponding to 550 bpm for *ex vivo* testing. During running, peak HR averaged 745 ± 6 bpm [range: 729 – 754]. In summary, DBP, SBP and HR increased by 19%, 15% and 33% during exercise, respectively, which is much less than in humans during bouts of physical exercise.^{24, 32}

Impact of pulsatile pressure on myogenic tone In static pressure (SP) conditions, MT was low and poorly responsive to the increase in intraluminal pressure (Fig. 1A); however, MT was significantly ($p<0.05$) increased by both L-NNA and PEG-catalase, and developed with the rise in pressure (Fig. 1A), suggesting that NO and H₂O₂ limit MT. During PP, however, MT was significantly greater ($p<0.05$) and similar to that measured in SP conditions in the presence of either L-NNA or PEG-catalase (Fig. 1B). The MT that developed under PP conditions was optimal between 60 and 100 mm Hg and was insensitive to L-NNA or PEG-catalase.

Impact of pulsatile pressure on flow-mediated dilation and eNOS activity Flow-mediated dilations (FMD) were endothelium- and shear stress-dependent, both in SP and PP conditions as demonstrated by the inhibition of FMD in denuded arteries (Fig. 2). In SP conditions, FMD peaked at a shear stress value of 10 dyn/cm², whereas FMD further increased at 15 and 20 dyn/cm² (p<0.05) after PP conditioning, suggesting that pulsed flow increases endothelial shear stress sensitivity. In both SP and PP conditions, inhibition of eNOS with L-NNA fully prevented (p<0.001) shear stress-induced FMD (Fig. 3), demonstrating that eNOS activity is central to FMD. Inactivation of eNOS-derived O₂⁻/H₂O₂ with PEG-catalase reduced FMD in SP (p<0.05) as expected from our previous study.²⁵ In PP conditions, however, PEG-catalase did not reduced FMD, while L-NNA inhibited it (Fig. 3), suggesting that PP modulates eNOS activity from a partly O₂⁻/H₂O₂ producing enzyme to a NO producing enzyme in mouse cerebral arteries. Therefore, PP may be essential for coupling eNOS.

To confirm these results, we measured the fluorescence associated with NO (DAF-2) and H₂O₂ (DCFDA) in isolated arteries²⁹ during a FMD induced by a shear stress of 20 dyn/cm² in both SP and PP conditions. In all conditions, fluorescence was extinguished by L-NNA confirming the unique involvement of eNOS in FMD (Fig. 4). As expected in SP conditions,^{25, 29} FMD was associated with a rise in H₂O₂-DCFDA fluorescence inactivated by PEG-catalase (Fig. 4A), but FMD was not associated with detectable NO-DAF-2 fluorescence (Fig. 4B). In contrast, in PP conditions, FMD was associated with a rise in NO-DAF-2 fluorescence, which was insensitive to PEG-catalase (Fig. 4D), but FMD was only associated with some H₂O₂-DCFDA fluorescence (Fig. 4C). These results support that PP stimulates eNOS activity towards NO production.

Mechanism of PP-dependent eNOS activity switch We speculated that PP-dependent activation of the NOX2 pathway, known to contribute to bradykinin-induced dilation in human coronary arteries through gp91 ds-tat-sensitive O_2^-/H_2O_2 generation,³³ could be responsible for regulating eNOS enzymatic activity as well. In our conditions, the NOX2 inhibitor gp91 ds-tat limited FMD in both SP and PP conditions (Fig. 5). Nonetheless, combining PEG-catalase to gp91 ds-tat had no additive inhibitory effects in SP (Fig. 5B), suggesting therefore that NOX2 activity is necessary i) for eNOS activity, and ii) under SP conditions, to promote eNOS uncoupling and the generation of dilatory O_2^-/H_2O_2 . Mito-Tempol (5 $\mu\text{mol/L}$), however, did not affect FMD in either experimental conditions, suggesting the lack of involvement of mitochondrial O_2^- (data not shown).

Consequences of increased PP amplitude on FMD Because an abnormal increase in PP is proposed to be damaging to the cerebral microcirculation,³⁴ we increased the amplitude of the PP to 50 mm Hg. As a consequence, FMD were reduced by ~40% at physiological shear stresses between 10 and 20 dyn/cm^2 (Fig. 6). Nonetheless, this impaired dilation was not sensitive to PEG-catalase suggesting that eNOS activity was reduced, but not uncoupled as in SP.

Discussion

We postulated that MT and flow-mediated responses measured *ex vivo* of mouse cerebral arteries are optimal when exposed to a pulsed pressure of physiological amplitude and frequency. Unlike in SP conditions, we indeed observed that with PP 1) myogenic contractions were magnified and insensitive to eNOS inactivation, and 2) endothelial shear stress sensitivity increased by promoting eNOS enzymatic production of NO rather than O_2^- /H₂O₂. In addition, all these differences were abolished after inhibition of NOX2 activity, suggesting that on the one hand, NOX2 is necessary for eNOS function, and on the other hand, NOX2 is necessary to allow eNOS uncoupling in the absence of PP and flow, a pathological condition, thus maintaining dilatory function through H₂O₂ production. These results demonstrate that the cerebrovascular endothelium is adapted to a pulsed environment to optimally function under a physiologically applied mean pressure.

The demonstration that the MT developed after exposure to a physiological PP is a first argument in favour of our postulate that cerebral arteries are adapted to a pulsed environment. In SP conditions, the classical methodological approach to investigate MT and FMD *ex vivo*, mouse cerebral arteries with an intact endothelium developed less MT when compared to other species including human cerebral arteries.³⁵⁻⁴⁰ This is potentially attributed to the narrow range of blood pressure variation during daily activities, as revealed by our measures in conscious mice, and thus, the lack of needs for potent myogenic responses. The vascular endothelium, however, is known to potently inhibit MT: after eNOS inhibition, MT is magnified (Fig. 1), as previously reported in mouse and rat cerebral arteries.^{40, 41} Our data, however, contrast with those of a recent study showing that in 3-month old C57Bl6 mouse isolated middle cerebral arteries, MT was not magnified by a PP.⁴² In that study, however, the

aim was to investigate the impact of age on PP-dependent regulation of MT: although not specified, the endothelium may therefore have been removed in order to specifically address the hypothesis. Furthermore, the amplitude of the pulse was greater (50 mm Hg) and the frequency lower (450 bpm), which may also explain this difference. In our hand, a PP of 50 mm Hg decreased endothelial function (Fig. 6), while a PP of 70 mm Hg led to a complete loss of function of the arteries (data not shown). Baumbach and colleagues showed that in healthy 6-month old rats, pial arteriolar PP was 22 ± 2 mm Hg and only increased to 31 ± 1 mm Hg in stroke-prone spontaneously hypertensive rats,³¹ demonstrating how autoregulation and MT are efficient *in vivo* and also how little change in PP is likely tolerated by the brain pial and parenchymal circulation. In further support is the demonstration that the MT of mouse pial arteries is maximized between intraluminal pressures of 60 and 100 mm Hg (this study and⁴²), a result that is within the range of expected blood pressure variations in mice when considering the autoregulatory response of pial arteries.³¹ Thus, PP allows for an optimal myogenic response in pial arteries with an intact endothelium.

We previously reported that in mouse cerebral arteries, eNOS enzymatic cycling generated O_2^-/H_2O_2 at rest and during FMD;^{25, 28} the current results obtained in SP are therefore consistent. This is presumably attributed to eNOS uncoupling in SP conditions.⁴³ We reported that eNOS is predominantly uncoupled in endothelial cells isolated from mouse cerebral arteries.²⁸ This uncoupling, however, may be a defence mechanism allowing for the maintenance of basal dilatory and anti-platelet aggregation activity through O_2^-/H_2O_2 generation. Uncoupling of eNOS was previously proposed to be a highly conserved defence mechanism.⁴⁴ The demonstration that PP led to eNOS inhibition in no-flow conditions is, therefore, of interest by suggesting that PP is a stimulus for eNOS coupling and indirectly, for

coupling eNOS to physiological regulatory stimuli such as shear stress. Pulsed pressure alone can exist *in vivo*: upstream of an occlusion, pulsatility is present in the absence of flow; downstream, however, neither pulse nor flow occurs. We propose therefore, that the specific inhibition of eNOS activity by the PP observed at rest, couples eNOS and increases its regulatory sensitivity to flow stimuli. This represents indeed the second novel information provided by our experimental conditions. It suggests that eNOS-dependent O_2^-/H_2O_2 production in the absence of flow and PP, and thus nutrient delivery, is a defense mechanism in an attempt of maintaining vessel patency. Uncoupling of eNOS may not be the only source of H_2O_2 during vascular extra-physiological stress, however, since O_2^- is the main precursor of H_2O_2 , and that NAD(P)H oxidases (NOX) and mitochondria are by far the main producers of O_2^- .⁴⁵ Recently, it was shown that a rise in ROS production accounted for the generation of H_2O_2 during extra-physiologically high blood pressure stress as an alternative defense pathway to compensate for the loss of NO production;^{23, 24} based on these latter studies, SP represents, therefore, the abnormal physiological conditions in our study. However, NOX2 inhibition with gp91 ds-tat limited eNOS activity in both SP and PP conditions, and suppressed PEG-catalase sensitivity of FMD in SP condition. Therefore, NOX2 activity is not specific to SP conditions; NOX2 activity, however, may contribute to eNOS function in mouse cerebral arteries and permit the coupling of eNOS in the presence of PP and allow for optimal endothelial shear stress sensitivity considered to be $>14 \text{ dyn/cm}^2$ in physiological conditions.^{46, 47} Indeed, in the presence of gp91 ds-tat, the gain in shear stress sensitivity conferred by PP was eliminated and became similar to that obtained in SP. Our approach has however, limitations. First, the sensitivity of the fluorescent dyes is likely suboptimal since NO was not detected in SP conditions, while PEG-catalase only partially prevented FMD. It is

clear however, that eNOS is responsible for FMD since L-NNA fully prevented FMD as did endothelial denudation. Second, our system does not allow studying FMD during PP, only MT. Third, PP is a physiological mechanism that cannot be studied in cultured cells. Because physiological endothelium-dependent vasodilatory mechanisms are redundant,⁴⁸ it will be difficult to isolate the molecular transduction mechanism involved in PP-dependent eNOS regulation. Pulsed pressure may induce a dynamic *redox*-sensitive post-translational modification of eNOS,^{45, 49} this would be difficult to identify with the current technologies.

In conclusion, our data are the first to suggest that PP-dependent adjustment in MT and flow-mediated responses may be implicated in regulating cerebrovascular tone. This is of importance since PP increases in aging and prematurely in atherosclerotic and hypertensive patients; by extrapolation, a PP-dependent inappropriate control of CBF could therefore, in the long term, contribute to hypoperfusion, small vessel rupture, blood-brain barrier disruption and cognitive decline.^{2, 50}

Acknowledgements

The authors are very thankful to Pierre-François Beauchemin, Anne-Marie Blanchard, Nikita Cobetto, Frédérique Desrochers-Perrault, Quoc-Viet Tran, Jessica Vu who designed of the pulse pressure apparatus during their third-year engineering project under the supervision of Dr F. Lesage at the École Polytechnique de Montréal. We are thankful to Dr. Nathalie Trescases for designing the statistical plan and performing the statistical analysis.

Author contribution statement

Adeline Raignault and Virginie Bolduc performed all experiments and contributed to the analysis of the data, their interpretation and the draft of the paper

Frédéric Lesage supervised the conception of the pulse pressure system and its validation.

Eric Thorin conceived the research project, supervised Adeline Raignault (MSc student) and Virginie Bolduc (PhD student), and is responsible for the data and the finalization of the paper.

Disclosure / conflict of interest: none

References

1. Iadecola C, Davisson RL. Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell metabolism*. 2008;7:476-484
2. Stone J, Johnstone DM, Mitrofanis J, O'Rourke M. The mechanical cause of age-related dementia (alzheimer's disease): The brain is destroyed by the pulse. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2015;44:355-373
3. Sierra C, de la Sierra A, Chamorro A, Larrousse M, Domenech M, Coca A. Cerebral hemodynamics and silent cerebral white matter lesions in middle-aged essential hypertensive patients. *Blood pressure*. 2004;13:304-309
4. Tarumi T, Ayaz Khan M, Liu J, Tseng BM, Parker R, Riley J, et al. Cerebral hemodynamics in normal aging: Central artery stiffness, wave reflection, and pressure pulsatility. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2014;34:971-978
5. Tsao CW, Seshadri S, Beiser AS, Westwood AJ, Decarli C, Au R, et al. Relations of arterial stiffness and endothelial function to brain aging in the community. *Neurology*. 2013;81:984-991
6. 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;134:3398-3407
7. Thorin E, Thorin-Trescases N. Vascular endothelial ageing, heartbeat after heartbeat. *Cardiovascular research*. 2009;84:24-32

8. Ceravolo R, Maio R, Pujia A, Sciacqua A, Ventura G, Costa MC, et al. Pulse pressure and endothelial dysfunction in never-treated hypertensive patients. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;41:1753-1758
9. Halley MM, Reemtsma K, Creech O, Jr. Cerebral blood flow, metabolism, and brain volume in extracorporeal circulation. *The Journal of thoracic surgery*. 1958;36:506-518
10. Wilkens H, Regelson W, Hoffmeister FS. The physiologic importance of pulsatile blood flow. *N Engl J Med*. 1962;267:443-446
11. Loor G, Gonzalez-Stawinski G. Pulsatile vs. Continuous flow in ventricular assist device therapy. *Best practice & research. Clinical anaesthesiology*. 2012;26:105-115
12. Baufreton C, Intrator L, Jansen PG, te Velthuis H, Le Besnerais P, Vonk A, et al. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass using roller or centrifugal pumps. *The Annals of thoracic surgery*. 1999;67:972-977
13. Ead HW, Green JH, Neil E. A comparison of the effects of pulsatile and non-pulsatile blood flow through the carotid sinus on the reflexogenic activity of the sinus baroreceptors in the cat. *The Journal of physiology*. 1952;118:509-519
14. Cornwell WK, Tarumi T, Aengevaeren V, Ayers C, Divanji P, Fu Q, et al. Nonpulsatile flow among patients with cf-lvads leads to greater levels of sympathetic neural activity through unloading of arterial baroreceptors. *Circulation*. 2014;130:A15992
15. Markham DW, Fu Q, Palmer MD, Drazner MH, Meyer DM, Bethea BT, et al. Sympathetic neural and hemodynamic responses to upright tilt in patients with

- pulsatile and nonpulsatile left ventricular assist devices. *Circulation. Heart failure*. 2013;6:293-299
16. Milano AD, Dodonov M, Van Oeveren W, Onorati F, Gu YJ, Tessari M, et al. Pulsatile cardiopulmonary bypass and renal function in elderly patients undergoing aortic valve surgery. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2015;47:291-298
 17. Nakano T, Tominaga R, Nagano I, Okabe H, Yasui H. Pulsatile flow enhances endothelium-derived nitric oxide release in the peripheral vasculature. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2000;278:H1098-1104
 18. Sezai A, Shiono M, Nakata K, Hata M, Iida M, Saito A, et al. Effects of pulsatile cpb on interleukin-8 and endothelin-1 levels. *Artificial organs*. 2005;29:708-713
 19. Taylor KM, Bain WH, Russell M, Brannan JJ, Morton IJ. Peripheral vascular resistance and angiotensin ii levels during pulsatile and no-pulsatile cardiopulmonary bypass. *Thorax*. 1979;34:594-598
 20. Toda K, Tatsumi E, Taenaka Y, Masuzawa T, Takano H. Impact of systemic depulsation on tissue perfusion and sympathetic nerve activity. *The Annals of thoracic surgery*. 1996;62:1737-1742
 21. Kurotobi S, Sano T, Kogaki S, Matsushita T, Miwatani T, Takeuchi M, et al. Bidirectional cavopulmonary shunt with right ventricular outflow patency: The impact of pulsatility on pulmonary endothelial function. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2001;121:1161-1168
 22. Pinaud F, Loufrani L, Toutain B, Lambert D, Vandekerckhove L, Henrion D, et al. In vitro protection of vascular function from oxidative stress and inflammation by

- pulsatility in resistance arteries. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2011;142:1254-1262
23. Beyer AM, Durand MJ, Hockenberry J, Gamblin TC, Phillips SA, Gutterman DD. An acute rise in intraluminal pressure shifts the mediator of flow-mediated dilation from nitric oxide to hydrogen peroxide in human arterioles. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2014;307:H1587-1593
24. Durand MJ, Dharmashankar K, Bian JT, Das E, Vidovich M, Gutterman DD, et al. Acute exertion elicits a h₂O₂-dependent vasodilator mechanism in the microvasculature of exercise-trained but not sedentary adults. *Hypertension*. 2015;65:140-145
25. Drouin A, Thorin E. Flow-induced dilation is mediated by akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide in mouse cerebral arteries. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2009;40:1827-1833
26. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The arrive guidelines for reporting animal research. *PLoS biology*. 2010;8:e1000412
27. 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:H2081-2092
28. Drouin A, Thorin-Trescases N, Hamel E, Falck JR, Thorin E. Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory h₂O₂ production in mouse cerebral arteries. *Cardiovascular research*. 2007;73:73-81

29. Yu C, Luo X, Duquette N, Thorin-Trescases N, Thorin E. Knockdown of angiotensin II type-1 receptor-like-2 protects against angiotensin II-induced cerebral endothelial dysfunction in mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2015;308:H386-397
30. Faraci FM, Heistad DD. Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circulation research*. 1990;66:8-17
31. Baumbach GL, Faraci FM, Heistad DD. Effects of local reduction in pressure on endothelium-dependent responses of cerebral arterioles. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1994;25:1456-1461; discussion 1461-1452
32. Guiraud T, Nigam A, Gremeaux V, Meyer P, Juneau M, Bosquet L. High-intensity interval training in cardiac rehabilitation. *Sports Med*. 2012;42:587-605
33. Larsen BT, Bubolz AH, Mendoza SA, Pritchard KA, Jr., Gutterman DD. Bradykinin-induced dilation of human coronary arterioles requires NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29:739-745
34. O'Rourke MF, Hashimoto J. Mechanical factors in arterial aging: A clinical perspective. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50:1-13
35. Garcia-Roldan JL, Bevan JA. Flow-induced constriction and dilation of cerebral resistance arteries. *Circulation research*. 1990;66:1445-1448
36. Thorin-Trescases N, Bevan JA. High levels of myogenic tone antagonize the dilator response to flow of small rabbit cerebral arteries. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1998;29:1194-1200; discussion 1200-1191

37. Hill MA, Meininger GA, Davis MJ, Laher I. Therapeutic potential of pharmacologically targeting arteriolar myogenic tone. *Trends in pharmacological sciences*. 2009;30:363-374
38. Kauffenstein G, Laher I, Matrougui K, Guerineau NC, Henrion D. Emerging role of G protein-coupled receptors in microvascular myogenic tone. *Cardiovascular research*. 2012;95:223-232
39. Koller A, Toth P. Contribution of flow-dependent vasomotor mechanisms to the autoregulation of cerebral blood flow. *Journal of vascular research*. 2012;49:375-389
40. Ngai AC, Winn HR. Modulation of cerebral arteriolar diameter by intraluminal flow and pressure. *Circulation research*. 1995;77:832-840
41. Drouin A, Farhat N, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Gillis MA, Villeneuve L, et al. Up-regulation of thromboxane A₂ impairs cerebrovascular endothelial function in aging atherosclerotic mice. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2011;462:371-383
42. Springo Z, Toth P, Tarantini S, Ashpole NM, Tucsek Z, Sonntag WE, et al. Aging impairs myogenic adaptation to pulsatile pressure in mouse cerebral arteries. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2015;35:527-530
43. Yokoyama M, Hirata K. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling: Is it a physiological mechanism of endothelium-dependent relaxation in cerebral artery? *Cardiovascular research*. 2007;73:8-9
44. Rabelink TJ, Luscher TF. Endothelial nitric oxide synthase: Host defense enzyme of the endothelium? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26:267-271

45. Sies H. Role of metabolic h₂O₂ generation: Redox signaling and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289:8735-8741
46. Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1999;282:2035-2042
47. LaBarbera M. Principles of design of fluid transport systems in zoology. *Science*. 1990;249:992-1000
48. Durand MJ, Gutterman DD. Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation*. 2013;20:239-247
49. Heiss EH, Dirsch VM. Regulation of enos enzyme activity by posttranslational modification. *Current pharmaceutical design*. 2014;20:3503-3513
50. Faraco G, Iadecola C. Hypertension: A harbinger of stroke and dementia. *Hypertension*. 2013;62:810-817

Figure legends

Figure 1. Impact of PP on MT regulation in isolated pressurized mouse cerebral arteries, with or without inhibition of eNOS with L-NNA (100 μ M) and inactivation of H₂O₂ with PEG-Catalase (50 U/mL) in static (A) or pulsed (B) pressure condition. *: $p < 0.05$ vs. L-NNA and vs. PEG-catalase; α : $p < 0.05$ vs. Pulse. Results are means \pm SEM of $n = 11$ (Static) to 12 (Pulse) isolated from 17 mice.

Figure 2. Effects of PP on endothelium-dependent FMD in pressurized (60 mm Hg) mouse cerebral arteries, before or after endothelial denudation. *: $p < 0.05$ vs. Static; α : $p < 0.001$ vs. with an intact endothelium. Results are means \pm SEM of $n = 11$ (Static) to 12 (Pulse) with intact endothelium and $n=4$ without endothelium isolated from 8 mice.

Figure 3. Effects of SP ($n=11$, same as Fig. 1) and PP ($n=12$, same as Fig. 1) on endothelium-dependent FMD in pressurized (60 mm Hg) mouse cerebral arteries before or after treatment with PEG-catalase (static, $n=10$; pulse, $n=8$) or L-NNA ($n=4$). *: $p < 0.05$ vs. Static; †: $p < 0.05$ vs. Static in control conditions; α : $p < 0.001$ vs. untreated conditions. Results are means \pm SEM of data collected in arterial segments isolated from 7 mice.

Figure 4. Effects of SP (A,B) and PP (C,D) on DCFDA-associated fluorescence (H₂O₂; A,C) and DAF2-associated fluorescence (NO; B,D) during FMD (20 dyn/cm²) in pressurized (60 mm Hg) mouse cerebral arteries before or after treatment with PEG-catalase or L-NNA. Results are means \pm SEM of data collected in arterial segments isolated from 14 mice (n

numbers indicated for each of the 12 experimental conditions on the graph). *: $p < 0.05$; \$: $p < 0.05$; α : $p < 0.05$; β : $p < 0.05$ as indicated.

Figure 5. Consequences of NOX2 inhibition with gp91-ds tat (10 μ M) in combination or not with PEG-catalase (50 U/mL) on FMD in mouse cerebral arteries pressurized in SP (A) or PP (B) conditions. Results are means \pm SEM. *: $p < 0.05$ vs. control conditions (Static or Pulse; n=6 segments per group isolated from 6 mice).

Figure 6. Effects of an increase in PP from 30 to 50 mm Hg on endothelium-dependent FMD in pressurized mouse cerebral arteries with or without addition of PEG-catalase. Results are means \pm SEM of n=5 segments per group isolated from 5 mice. *: $p < 0.05$ + 50 mm Hg vs. Pulse (30 mm Hg).

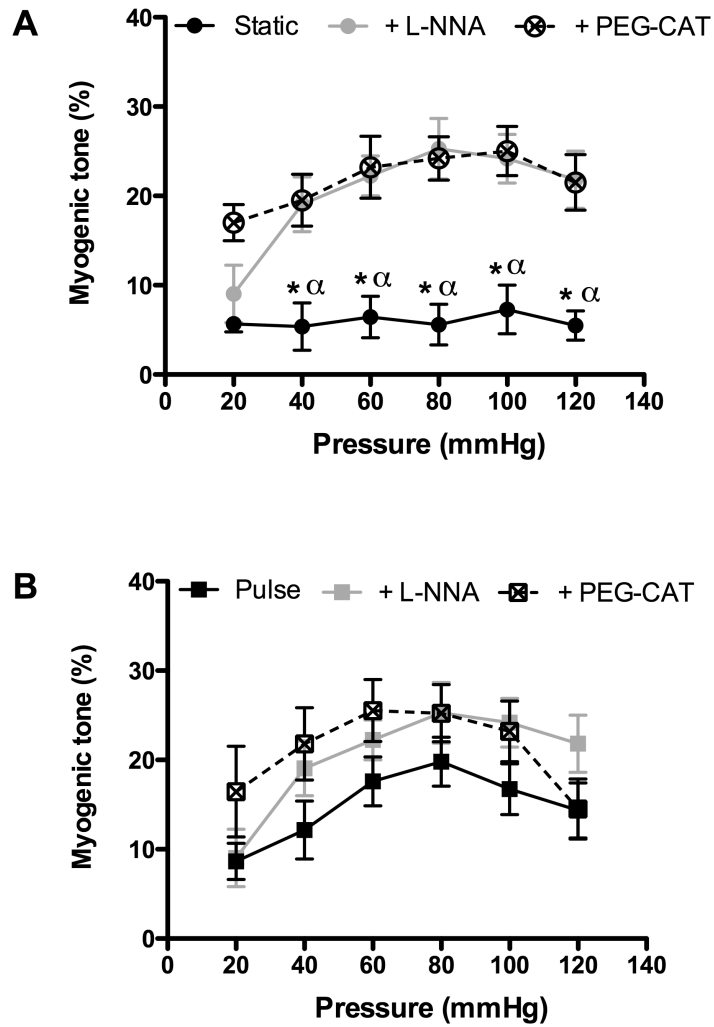


Figure 1. Impact of PP on MT regulation in isolated pressurized mouse cerebral arteries, with or without inhibition of eNOS with L-NNA (100 μ M) and inactivation of H₂O₂ with PEG-Catalase (50 U/mL) in static (A) or pulsed (B) pressure condition.

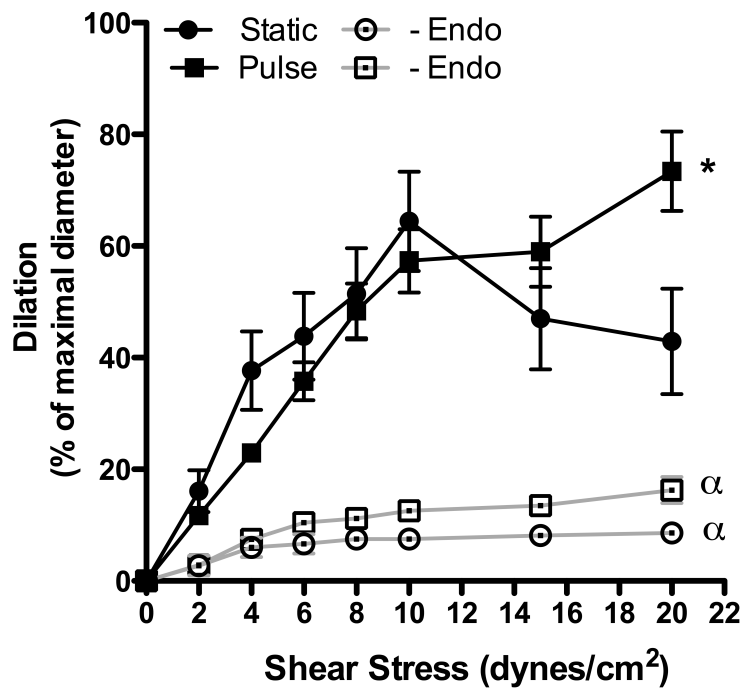


Figure 2. Effects of PP on endothelium-dependent FMD in pressurized (60 mm Hg) mouse cerebral arteries, before or after endothelial denudation.

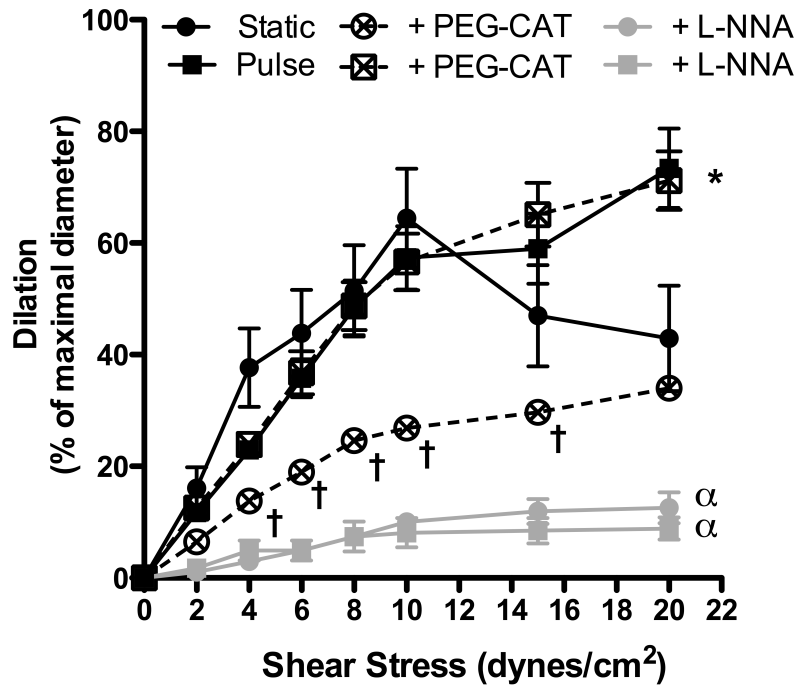


Figure 3. Effects of SP (n=11) and PP (n=12) on endothelium-dependent FMD in pressurized (60 mm Hg) mouse cerebral arteries before or after treatment with PEG-catalase (static, n=10; pulse, n=8) or L-NNA (n=4).

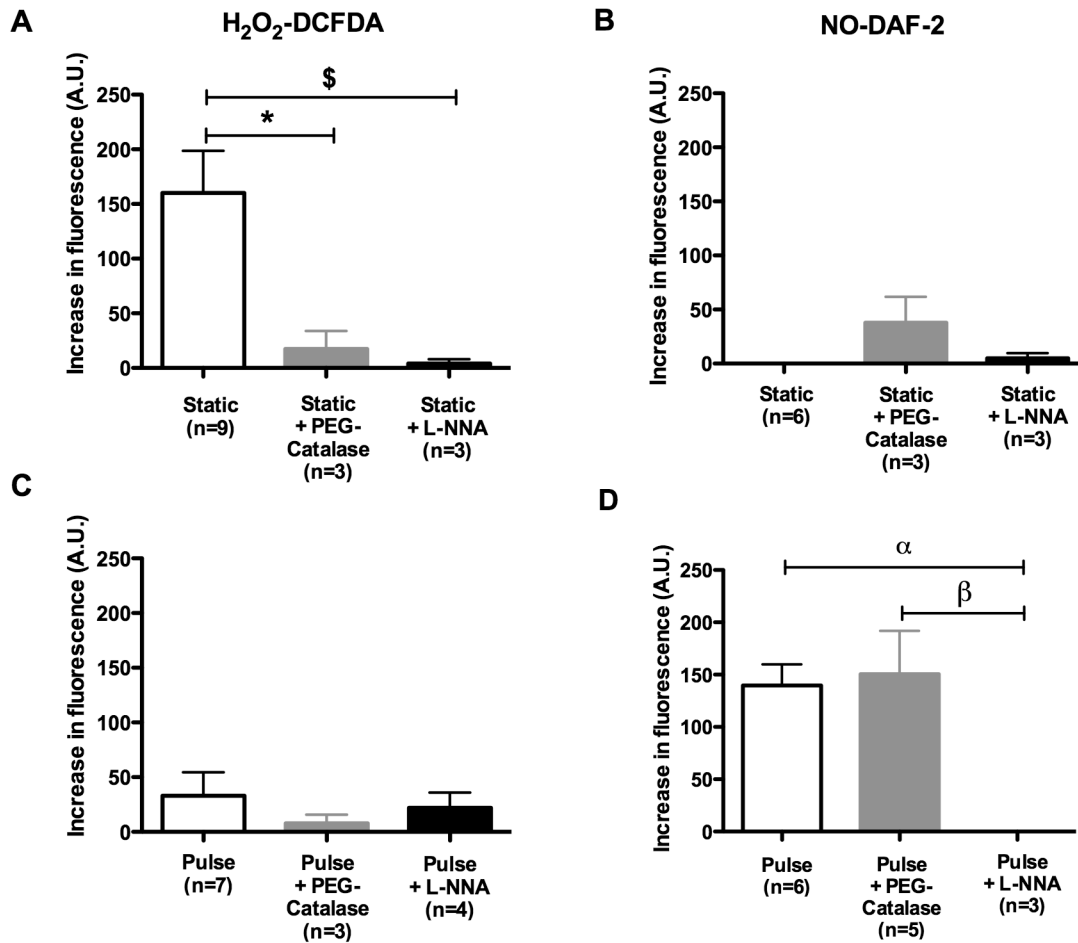


Figure 4. Effects of SP (A,B) and PP (C,D) on DCFDA-associated fluorescence (H₂O₂; A,C) and DAF2-associated fluorescence (NO; B,D) during FMD (20 dyn/cm²) in pressurized (60 mm Hg) mouse cerebral arteries before or after treatment with PEG-catalase or L-NNA.

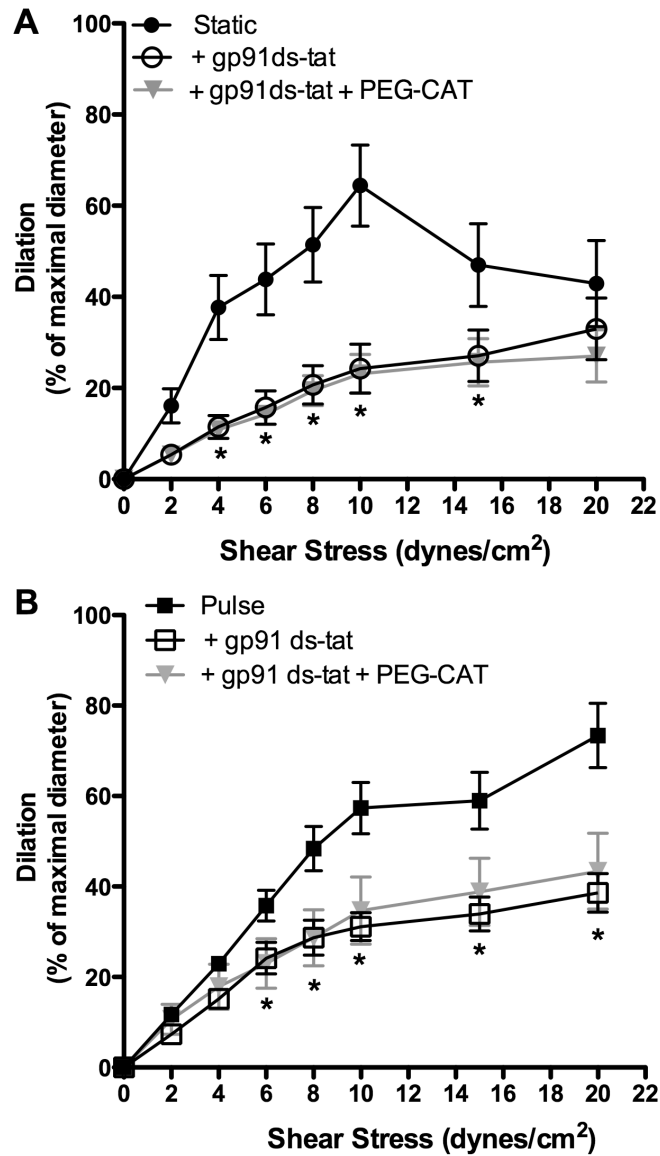


Figure 5. Consequences of NOX2 inhibition with gp91-ds tat (10 μ M) in combination or not with PEG-catalase (50 U/mL) on FMD in mouse cerebral arteries pressurized in SP (A) or PP (B) conditions.

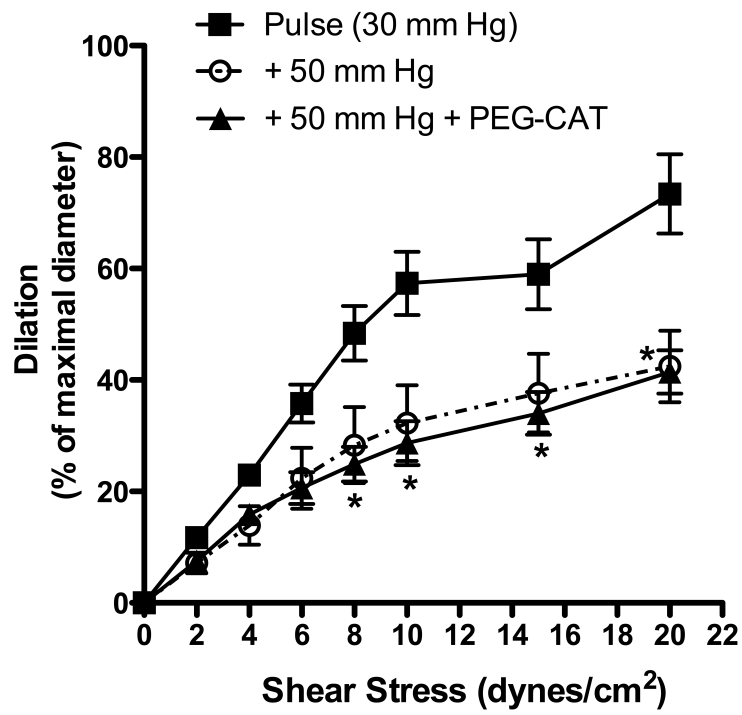


Figure 6. Effects of an increase in PP from 30 to 50 mm Hg on endothelium-dependent FMD in pressurized mouse cerebral arteries with (n=5) or without addition of PEG-catalase (n=5).

4. Discussion

Le but de ce projet de maîtrise était d'étudier l'impact encore méconnu de la pression pulsée sur la réactivité vasculaire d'artères cérébrales de souris. Les expériences de notre laboratoire, effectuées en pression statique, ont démontré l'implication de la eNOS dans la production de O_2^-/H_2O_2 comme principal vasodilatateur dans les artères cérébrales isolées de souris C57Bl6 (Drouin et al., 2007) (Drouin and Thorin, 2009). Les résultats obtenus au cours de ce projet, démontrent qu'après exposition des artères cérébrales à une pression pulsée physiologique, la eNOS produit du NO lors de la FMD. De plus, la pression pulsée augmente le tonus myogénique, réponse qui est insensible à l'inactivation de la eNOS. Dans cette partie nous tenterons d'expliquer quels sont les mécanismes potentiels mis en jeu ainsi que les limites et perspectives du projet.

La particularité des artères cérébrales

Le cerveau a une capacité minimale de stockage d'énergie, le rendant alors très sensible aux interruptions d'approvisionnement sanguin : si le flux sanguin vers le cerveau est interrompu, il en résulte une perte de conscience en quelques secondes et des lésions neuronales irréversibles en quelques minutes (Millikan, 1969). La circulation cérébrale est un lit vasculaire jouant un rôle très spécifique dans le maintien des mécanismes physiologiques permettant d'assurer un débit sanguin constant vers le cerveau. Pour ce projet nous sommes intéressés aux artères cérébrales de résistance du polygone de Willis. Ce sont des artères d'une grande importance puisqu'elles contribuent à amortir la pulsativité produit par le cœur afin de délivrer un débit sanguin plus continu, jusqu'aux plus petits capillaires, dans le but de les protéger. Contrairement aux artères systémiques, les artères cérébrales de résistance du polygone de Willis sont indispensables dans le maintien du DSC *via* des mécanismes d'autorégulation important, le tonus myogénique et la dilatation induite par le débit (Faraci and Heistad, 1990). Une autre des particularités des artères cérébrales est qu'elles sont très sensibles au stress oxydant car elles possèderaient une capacité antioxydante optimal mais avec une faible marge d'accroissement en lien avec le métabolisme et la consommation d' O_2 déjà élevé des neurones environnants (Matz et al., 2000). Elles sont conséquemment sensibles

à la peroxydation lipidique de par la présence d'acide gras polyinsaturés dans les membranes cellulaires (Matz et al., 2000; Wickens, 2001).

Comme décrit dans l'introduction, dans la plupart des lits vasculaires tant au niveau périphérique que cérébral, le NO, la PGI₂ et l'EDHF sont les principaux vasodilatateurs produisant la vasodilatation induite par le débit (Fujii et al., 1991; Iadecola, 1992). L'implication d'un autre EDHF, le H₂O₂, a été démontrée lors de vasodilatation au niveau cérébral (Drouin and Thorin, 2009; Fraile et al., 1994; Iida and Katusic, 2000; Wei and Kontos, 1990). Les résultats de mon étude suggèrent qu'après une incubation des artères cérébrales avec la PEG-Catalase ou le L-NNA, la FMD est effectivement significativement diminuée en condition statique, confirmant l'implication de la voie de la eNOS-H₂O₂. En revanche, en condition pulsée la FMD est sensible au L-NNA mais pas à la PEG-Catalase, suggérant l'implication du NO en tant que vasodilatateur. Ceci a été confirmé en mesurant la production de H₂O₂ en pression statique et de NO en pression pulsée. Ceci révèle donc une nouvelle particularité des artères cérébrales dont la fonction endothéliale, et notamment l'activité de la eNOS, semble très sensible à la pression pulsée.

Mais que faut-il déduire des études réalisées jusqu'à présent utilisant une pression statique et démontrant l'implication du H₂O₂ comme principal vasodilatateur ? Dans ces études, bien que les artères cérébrales soient maintenues en conditions physiologique en ce qui concerne la pression et la pO₂, il est possible que la pression statique, ou en d'autres termes l'absence de pression pulsée, représente une condition anormale/pathologique, puisque ces artères sont physiologiquement soumises à une pression pulsée *in vivo*. Il est possible d'imaginer que pour palier au manque de pulsatilité, les artères développent alors une réponse compensatoire, ce qui expliquerait la FMD plus faible en pression statique et l'implication d'O₂⁻/H₂O₂ dérivé de la eNOS comme vasodilatateur.

Impact de la pression pulsée sur le tonus myogénique et FMD : mécanisme potentiel ?

Dans l'introduction, nous avons passé en revue les différents mécanismes permettant la régulation du tonus myogénique et de la FMD. Nos résultats suggèrent un effet bénéfique de la pression pulsée sur ces deux composantes antagonistes qui sont nécessaire au maintien du DSC.

Concernant le tonus myogénique, il est bien défini que le premier stimulus induisant sa régulation est l'étirement de la paroi artérielle dû à la pression sanguine appliquée menant à une augmentation de la tension vasculaire (Johnson, 1989). Par la suite, différents senseurs sont impliqués et activés tels que les canaux cationiques, les récepteurs couplés aux protéines G, l'interaction entre les métalloprotéines, les intégrines et le cytosquelette (Moens et al., 2005) (Matz et al., 2000). Dans notre étude, nous avons observé que la pression pulsée potentialise le tonus myogénique, une réponse qui est insensible aux inhibiteurs de la eNOS. La pression pulsée potentialise le tonus myogénique au même niveau que celui obtenu en pression statique après inhibition de la eNOS (par le L-NNA et la PEG-Catalase). Ces données suggèrent donc que la pression pulsée limite l'effet dilatateur de la eNOS, en absence de flux, augmentant ainsi le tonus vasculaire.

Concernant la FMD, les études précédentes réalisées dans le laboratoire ont démontré que le H_2O_2 , produit par la eNOS, était le principal vasodilatateur au niveau cérébral, que ce soit après une dilatation induite par l'acétylcholine ou après une dilatation induite par le débit (Drouin and Thorin, 2009; Drouin et al., 2007). Ces données suggèrent un état découplé de la eNOS, mais dans des conditions physiologiques puisque les souris sont jeunes et en santé. Nos résultats suggèrent un changement d'activité de la eNOS, après une exposition à la pression pulsée, avec une production de NO à la place du O_2^-/H_2O_2 . La pression pulsée pourrait donc agir au niveau de la eNOS, en la maintenant au stade couplé.

Si l'on suppose qu'au niveau des artères cérébrales de souris le principal vasodilatateur lors d'une FMD et une exposition à la pression pulsée est le NO, plusieurs mécanismes peuvent être impliqués. Outre l'impact de la pression pulsée sur le stade couplé/découplé de la eNOS, cette enzyme est aussi régulée par d'autres mécanismes tels que la phosphorylation des sites ser1177eNOS et ser635eNOS (Ramadoss et al., 2013). Il est donc possible que la pression pulsée puisse avoir un impact sur la phosphorylation de ces sites, induisant la production de NO. Ceci reste à être démontré.

Les ROS, amis ou ennemis des artères cérébrales ?

Une faible quantité de ROS est essentielle au niveau physiologique pour une fonction cellulaire normale, cependant une augmentation de ROS contribue à un stress oxydant vasculaire délétère.

Les ROS produits par les NOX

Nos résultats suggèrent qu'en pression statique Nox 2 pourrait contribuer au découplage de la eNOS au niveau des artères cérébrales de souris et induirait une vasodilatation *via* la formation d' O_2^-/H_2O_2 . En pression pulsée, Nox2 pourrait au contraire favoriser le couplage de la eNOS.

Les NADPH oxydases ou Nox sont des protéines permettant le transfert d'électrons à travers les membranes biologiques. La principale fonction des Nox, famille de 6 homologues (Nox 1 Nox 2 Nox 3 Nox 4, Nox 5 et Duox) est la production de ROS. Nox 1, 2, 4 et 5 sont exprimés dans l'endothélium. De plus il a été démontré que Nox 1, Nox 2 et Nox 4 sont présents dans les artères cérébrales (Paravicini et al., 2004) et que Nox 1 et 2 seraient responsables de la production d' O_2^- (Dutta and Rittinger, 2010; Kazama et al., 2004) alors que Nox 4 permettrait la production d' H_2O_2 (Miller et al., 2005; Montezano et al., 2011). Les mécanismes restent encore méconnus mais des études démontrent l'importance de Nox 2 et Nox 4 dans l'homéostasie cérébrale. Une étude démontre en effet que l'absence du gène de Nox 2 chez des souris diminue la vasodilatation cérébrale (Park et al., 2004a). De plus, l'ajout de NADPH et NADH aux artères cérébrales de rats, souris et lapin induit une vasodilatation cérébrale que ce soit *in vivo* ou *in vitro* (Didion and Faraci, 2002; Miller et al., 2005; Paravicini et al., 2004; Park et al., 2004b). Au contraire, dans des artères non cérébrales, l'activation de la Nox produisant des O_2^- est associée avec une dysfonction endothéliale et une augmentation du tonus vasculaire *via* la diminution de la biodisponibilité du NO (Cai and Harrison, 2000). Une autre étude effectuée chez des patients révèle que la perte génétique de Nox 2 augmente la vasodilatation induite par le flux *via* la relâche de NO, et une augmentation de NO au niveau plaquettaire (Violi et al., 2009). Ces résultats suggèrent donc un rôle des Nox dans la réactivité vasculaire, ainsi que des spécificités de territoires vasculaires.

Les ROS produits par la mitochondrie

Nous ne l'avons pas abordé dans ce mémoire, mais la mitochondrie est aussi une importante source de production de ROS, notamment de l' O_2^- . Lors de la respiration, quatre électrons peuvent être ajoutés à l' O_2 *via* le complexe IV de la chaîne respiratoire ; l' O_2 peut aussi être réduit par les complexes I et III de la chaîne respiratoire formant ainsi l' O_2^- (Miller et al., 2006). L' O_2^- peut réagir avec le NO et former le ONOO $^-$, ce qui diminue la vasodilatation. Nos résultats suggèrent que la FMD n'est pas affectée après incubation au Mito-TEMPO, un

antioxydant ciblant les mitochondries qui agit en bloquant l' O_2^- produit par la mitochondrie, en condition statique ou pulsée. L' O_2^- mitochondrial ne semble donc pas avoir un impact sur la vasodilatation au niveau des artères cérébrales de souris saines. Il est possible que dans un modèle de souris hypertendue ou athérosclérotique il y ait une plus forte production d' O_2^- , associée une dysfonction endothéliale, et l'ajout de Mito-TEMPO pourrait alors améliorer la FMD.

Impact de pression pulsée en condition pathologique : souris athérosclérotiques (ATX) et souris avec constriction aortique transverse (TAC)

Comme vu dans l'introduction, la pression pulsée augmente avec l'âge, ce qui peut engendrer des dommages au niveau de l'endothélium; ces dommages endothéliaux associés à une pression pulsée élevée s'observent de façon précoce en présence de facteurs de risque des maladies cardiovasculaires.

Notre laboratoire possède un modèle de souris chez qui l'athérosclérose se développe spontanément : elles n'expriment pas le récepteur aux LDL mais surexpriment l'apolipoprotéine B-100 humaine (LDLr^{-/-}; hApoB-100^{+/+}). Ce modèle de souris dénommé ATX développe spontanément des lésions athérosclérotiques dans les carotides et l'aorte, dès l'âge de trois mois, sous une diète normale (Bolduc et al., 2012; Drouin et al., 2011; Sanan et al., 1998). Nous avons mesuré dans ces souris ATX l'impact de la pression pulsée sur la FMD, dans les mêmes conditions que nos souris *wild type* âgées de 3 mois: les artères cérébrales ont été pressurisées à 60 mm Hg en conditions statique ou pulsée, avec une fréquence de 9,2 Hz et une amplitude de 30 mm Hg, et une courbe de dilatation en réponse au flux a été réalisée. On observe que malgré la dysfonction endothéliale présente dans les artères cérébrales des souris ATX, la pression pulsée augmente la FMD à partir d'une force de cisaillement de 15 dynes/cm² (figure 6) ce qui est très semblable à ce que nous avons observé dans les souris contrôles. Ces résultats suggèrent que même en conditions pathologiques la pression pulsée a un effet bénéfique sur la FMD des artères cérébrales. Cependant ces souris ATX ne sont âgées que de 3 mois, il est possible que la pression pulsée n'ait plus cet effet bénéfique chez des souris ATX plus âgées, dû à l'état plus avancé de l'athérosclérose chez ces animaux.

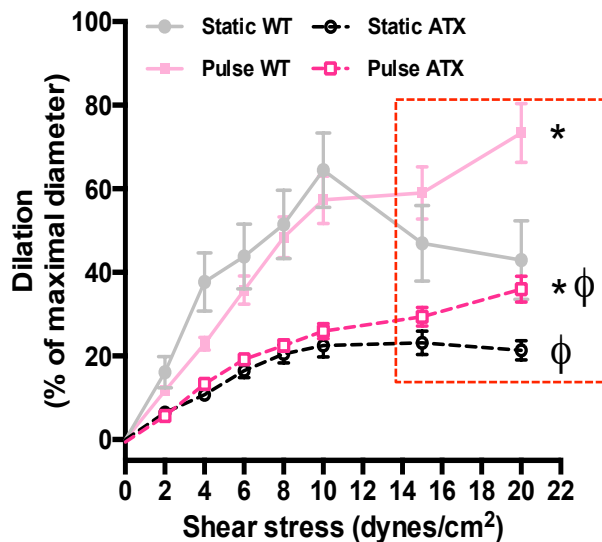


Figure 6 : Impact d'une pression pulsée d'amplitude de 30 mm Hg et d'une fréquence de 9,2 Hz sur la dilatation induite par le débit (FMD) d'artères cérébrales de souris WT âgées de 3 mois vs des souris athérosclérotiques (ATX) âgées de 3 mois, pressurisées à 60 mm Hg.

* : $p < 0.05$ vs Static ; ϕ : $p < 0.005$ vs WT

Lors de ce projet, les artères cérébrales isolées de souris ont été soumises à une pression pulsée pendant 30 min. Cependant, il est possible d'augmenter la pression pulsée *in vivo* : la chirurgie de constriction aortique transverse (TAC), avec une ligature sur la crosse aortique entre la carotide droite et gauche, résulte en une augmentation de la pression artérielle car le diamètre de la crosse aortique est réduit d'environ 50%. Cette augmentation de pression, 160 mm Hg à la sortie du ventricule gauche et 100 mm Hg à la sortie du ventricule droit, se traduit par une augmentation de la pression pulsée (d'environ 50 mm Hg), qui se propage jusqu'au cerveau, engendrant une dysfonction endothéliale dans les artères cérébrales, dysfonction qui est observée seulement du côté droit (article en préparation). Il serait intéressant de comparer nos résultats obtenus avec une pression pulsée imposée *in vitro* avec l'impact d'une pression pulsée élevée *in vivo*. Si l'on applique aux artères cérébrales des souris TAC une pression pulsée supplémentaire *in vitro*, la dysfonction endothéliale serait probablement amplifiée mais ceci reste à être démontré.

Lors de ce projet nous avons également étudié l'impact *ex vivo* d'une pression pulsée de 50 mm Hg d'amplitude. Nos résultats suggèrent qu'une augmentation de l'amplitude de la pression pulsée a un effet néfaste au niveau des artères cérébrales puisque la FMD est diminué d'environ 40% pour des valeurs de forces de cisaillement physiologiques comprises entre 10 et 20 dyn/cm². L'expérience étant aiguë, soit un pulse de 50 mm Hg induit effectivement une dysfonction endothéliale, soit il s'agit d'une réduction de la sensibilité de l'endothélium aux forces de cisaillements afin de limiter la dilatation et donc l'apport sanguin dans une condition de pression augmentée. Dans le premier cas, il faudrait tester la réversibilité de la FMD en revenant à une condition de pulse normal ; dans le second cas, cela pourrait s'appliquer physiologiquement lors d'exercice physique modéré à intense.

Bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans l'impact de la pression pulsée sur le tonus myogénique et la FMD restent encore à définir, cette étude démontre un effet bénéfique d'une pression pulsée d'amplitude physiologique sur la réactivité cérébrovasculaire.

Limites de l'étude

Une des limites de cette étude est que l'artère cérébrale est pressurisée et soumise à une pression pulsée d'amplitude et de fréquence définie pendant 30 min, mais qu'à la fin de ce temps de stimulation, la pression pulsée est stoppée et remplacée par le flux afin d'effectuer la courbe de dilation. De façon optimale et pour être le plus proche des conditions physiologiques il faudrait que le pulse et le flux soient appliqués de façon simultanée. Notre système actuel ne nous permet malheureusement pas d'effectuer ces deux conditions en même temps. Comme le montre la figure 7, le robinet avec deux entrées connectées au moniteur de pression P2 permet de laisser entrer et diffuser jusque dans l'artère soit la pression pulsée, générée par le bras levier écrasant la pipette en plastique remplie d'eau et créant l'onde de pouls, soit le flux produit par la pompe péristaltique 2. Il n'existe pas de pompe assez rapide pour permettre l'exposition simultanée au flow et à la pression pulsée.

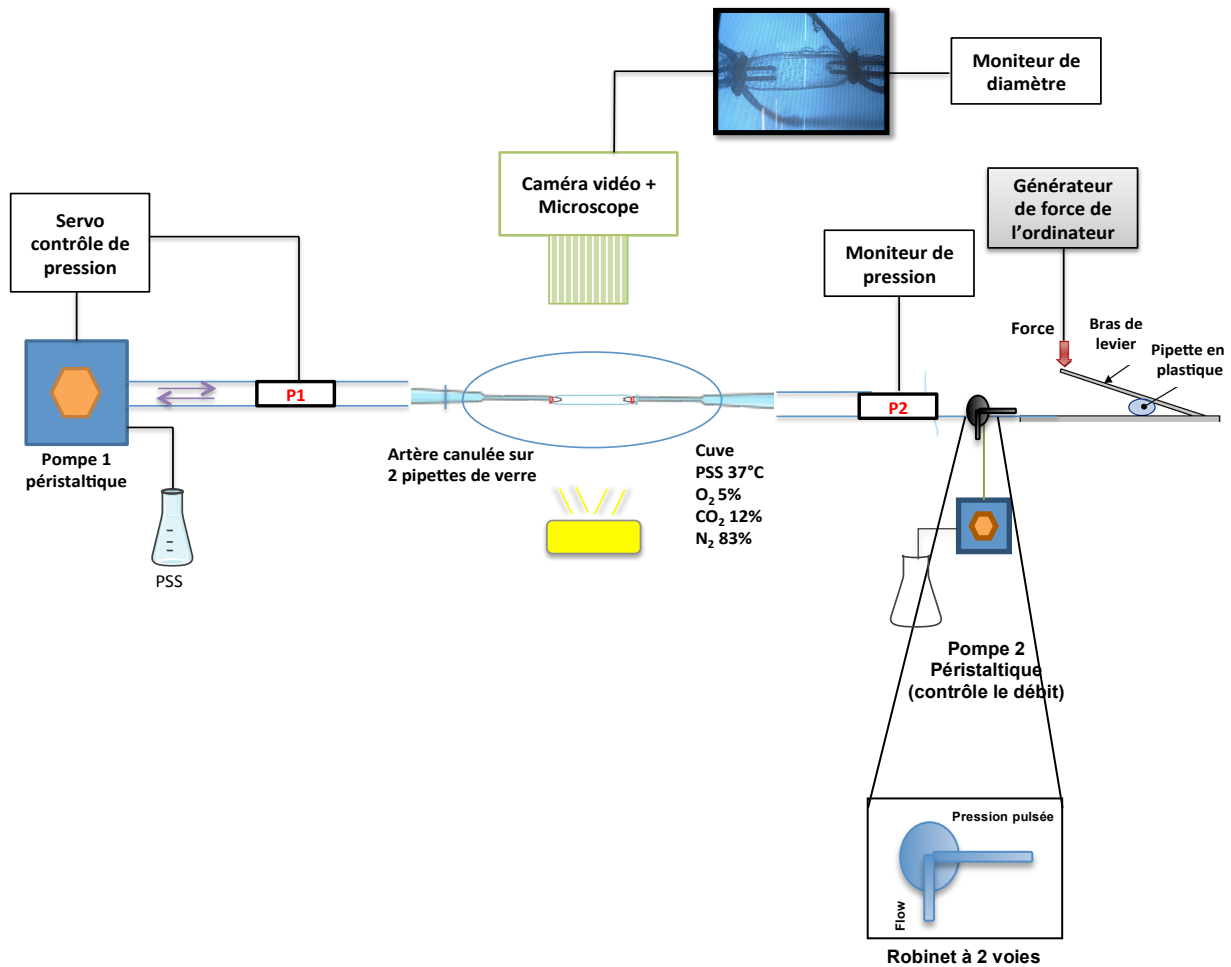


Figure 7 : Schématisation de l'artériographe pressurisé couplé au système générant la pression pulsée.

Pour pallier à cette limitation, nous avons testé la capacité des artères cérébrales à se dilater en réponse à un stimulus chimique, l'Ach, en présence simultanée de pression pulsée. Les artères ont été soumises à la pression pulsée 30 minutes avant et pendant la courbe de dilataion induite par l'Ach. Les artères cérébrales ont été incubées en pression statique ou pulsée, et en présence ou en absence de PEG-Catalase. Bien que les résultats obtenus soient encore préliminaires, ils démontrent qu'en présence d'une pression pulsée continue la dilataion est diminuée par rapport à celle obtenue en condition statique (figure 8). De plus, alors qu'en pression statique la PEG-Catalase diminue la vasodilataion induite par l'Ach, en présence de pression pulsée la PEG-Catalase améliore la dilataion, suggérant que le pulse produit des ROS délétères. Nous pourrions aussi incuber les artères pendant 30 minutes en condition

pulsée puis induire la dilatation à l'Ach, sans pression pulsée continue et tel que réalisé lors de la FMD, et observer si les artères cérébrales répondent différemment.

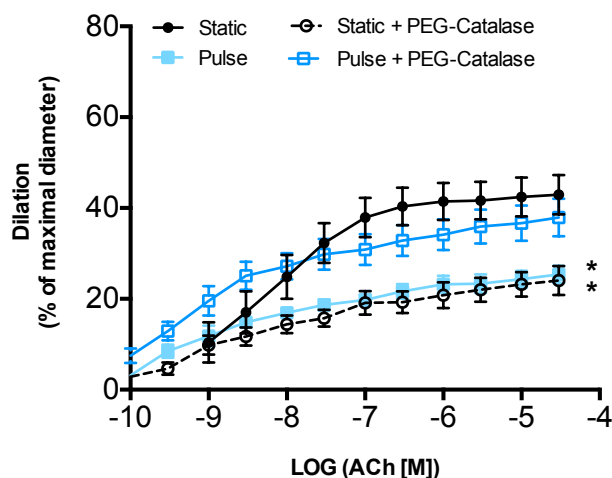


Figure 8 : Impact d'une exposition à une pression pulsée d'amplitude de 30 mm Hg et d'une fréquence de 9,2 Hz durant la dilatation induite par l'acétylcholine d'artères cérébrales de souris WT âgées de 3 mois pressurisées à 60 mm Hg, en présence ou absence de PEG-Catalase. * : $p < 0.05$ vs static

Une autre limite de cette étude est qu'il est difficile de déterminer quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans l'impact de la pression pulsée. En effet si l'impact de la pression pulsée peut être étudié de façon physiologique dans un artériographe pressurisé, il est difficile de définir les mécanismes moléculaires puisque il n'existe pas de système permettant d'appliquer une pression pulsée sur des cellules en culture. Certaines études utilisent un système de chambre d'écoulement à plaques parallèles induisant un flux laminaire stable *versus* un système de chambre d'écoulement à cône induisant un flux irrégulier oscillatoire appliqué sur une monocouche de cellules endothéliales (De Keulenaer et al., 1998; Hwang et al., 2003). Il a été démontré qu'un flux laminaire stable produit moins de ROS qu'un flux irrégulier oscillatoire (De Keulenaer et al., 1998; Hwang et al., 2003). Ce résultat corrobore avec le fait que les régions vasculaires soumises à un flux sanguin turbulent sont plus sensibles au développement de plaques d'athérosclérose que des régions soumises à un flux laminaire stable (Lehoux and Tedgui, 2004). Même si ces études ont été réalisées sur un modèle

cellulaire, elles démontrent l'importance d'un flux stable dans la régulation de l'homéostasie vasculaire.

Les résultats présentés dans notre étude ne sont donc pas en parfaite adéquation avec la physiologie, cependant ils sont déjà plus proches de la réalité que ceux obtenus et décrits en conditions statiques.

5. Conclusion et perspectives

L'objectif de mon projet était d'étudier *in vitro* l'impact physiologique de la pression pulsée *versus* la pression statique, sur le tonus myogénique et la fonction endothéliale de souris C57Bl6 saines. L'augmentation de l'amplitude de la pression pulsée avec l'âge ou dans des conditions pathologiques, comme l'athérosclérose, est un facteur de risque des maladies cardiovasculaires et peut aussi causer des dommages au niveau cérébrovasculaire. Cependant, une pression pulsée physiologique est importante pour le maintien de l'homéostasie cérébrovasculaire. Nos résultats sont les premiers à démontrer l'effet bénéfique d'une pression pulsée physiologique *in vitro* régulant la réactivité cérébrovasculaire, c'est à dire le tonus myogénique et la FMD, effet bénéfique qui, ultimement, pourrait permettre une meilleure régulation du DSC *in vivo*.

Bien que cette étude ait permis d'évaluer l'impact de la pression pulsée sur le tonus myogénique et la FMD, les mécanismes d'action restent cependant encore méconnus. Pour la suite de cette étude nous allons poursuivre l'étude de dilation en combinaison avec la pression pulsée afin de comparer les réponses obtenues suite à une dilatation physiologique au flux ou une dilatation induite par un stimulus chimique, l'Ach, et tenter de définir les agents vasoactifs (EDRF) impliqués dans chaque type de réponse. De plus, nous testerons également différentes amplitudes et fréquences de pression pulsée afin de savoir si le tonus myogénique et la FMD sont influencés par la fréquence cardiaque et l'amplitude de la pression pulsée.

6. Bibliographie

- Abbott, N.J., Ronnback, L. and Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 7, 41-53.
- Allen, N.J. and Barres, B.A., 2009. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature.* 457, 675-7.
- Alonso, D. and Radomski, M.W., 2003. Nitric oxide, platelet function, myocardial infarction and reperfusion therapies. *Heart Fail Rev.* 8, 47-54.
- Alpers, B.J., Berry, R.G. and Paddison, R.M., 1959. Anatomical studies of the circle of Willis in normal brain. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 81, 409-18.
- Alzheimer's, A., Thies, W. and Bleiler, L., 2011. 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 7, 208-44.
- Andresen, J., Shafi, N.I. and Bryan, R.M., Jr., 2006. Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol (1985).* 100, 318-27.
- Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B.A. and Newman, E.A., 2010. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature.* 468, 232-43.
- Backes, D., van den Bergh, W.M., van Duijn, A.L., Lahpor, J.R., van Dijk, D. and Slooter, A.J., 2012. Cerebrovascular complications of left ventricular assist devices. *Eur J Cardiothorac Surg.* 42, 612-20.
- Bateman, G.A., 2004. Pulse wave encephalopathy: a spectrum hypothesis incorporating Alzheimer's disease, vascular dementia and normal pressure hydrocephalus. *Med Hypotheses.* 62, 182-7.
- Bath, P.M., Hassall, D.G., Gladwin, A.M., Palmer, R.M. and Martin, J.F., 1991. Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb.* 11, 254-60.
- Baufreton, C., Intrator, L., Jansen, P.G., te Velthuis, H., Le Besnerais, P., Vonk, A., Farcet, J.P., Wildevuur, C.R. and Loisanse, D.Y., 1999. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass using roller or centrifugal pumps. *Ann Thorac Surg.* 67, 972-7.
- Bayliss, W.M., 1902. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol.* 28, 220-31.
- Benetos, A., Safar, M., Rudnichi, A., Smulyan, H., Richard, J.L., Ducimetieere, P. and Guize, L., 1997. Pulse pressure: a predictor of long-term cardiovascular mortality in a French male population. *Hypertension.* 30, 1410-5.
- Benetos, A., Thomas, F., Joly, L., Blacher, J., Pannier, B., Labat, C., Salvi, P., Smulyan, H. and Safar, M.E., 2010. Pulse pressure amplification a mechanical biomarker of cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol.* 55, 1032-7.
- Bevan, J.A. and Henrion, D., 1994. Pharmacological implications of the flow-dependence of vascular smooth muscle tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 34, 173-90.
- Bolduc, V., Baraghis, E., Duquette, N., Thorin-Trescases, N., Lambert, J., Lesage, F. and Thorin, E., 2012. Catechin prevents severe dyslipidemia-associated changes in wall biomechanics of cerebral arteries in LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice and improves cerebral blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 302, H1330-9.

- Bolduc, V., Thorin-Trescases, N. and Thorin, E., 2013. Endothelium-dependent control of cerebrovascular functions through age: exercise for healthy cerebrovascular aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 305, H620-33.
- Bryan, R.M., Jr., Marrelli, S.P., Steenberg, M.L., Schildmeyer, L.A. and Johnson, T.D., 2001a. Effects of luminal shear stress on cerebral arteries and arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280, H2011-22.
- Bryan, R.M., Jr., Steenberg, M.L. and Marrelli, S.P., 2001b. Role of endothelium in shear stress-induced constrictions in rat middle cerebral artery. *Stroke.* 32, 1394-400.
- Busse, R., Edwards, G., Feletou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P.M. and Weston, A.H., 2002. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci.* 23, 374-80.
- Cai, H., 2005. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res.* 68, 26-36.
- Cai, H. and Harrison, D.G., 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87, 840-4.
- Carvajal, J.A., Germain, A.M., Huidobro-Toro, J.P. and Weiner, C.P., 2000. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.* 184, 409-20.
- Chobanian, A.V., Bakris, G.L., Black, H.R., Cushman, W.C., Green, L.A., Izzo, J.L., Jr., Jones, D.W., Materson, B.J., Oparil, S., Wright, J.T., Jr., Roccella, E.J., Joint National Committee on Prevention, D.E., Treatment of High Blood Pressure. National Heart, L., Blood, I. and National High Blood Pressure Education Program Coordinating, C., 2003. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension.* 42, 1206-52.
- Cole, W.C. and Welsh, D.G., 2011. Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure. *Arch Biochem Biophys.* 510, 160-73.
- Cottart, C.H., Laguillier, C., Nivet-Antoine, V., Klimczak, C., Sebban, C. and Beaudoux, J.L., 2009. [Biology of arterial ageing and arteriosclerosis]. *C R Biol.* 332, 433-47.
- De Keulenaer, G.W., Chappell, D.C., Ishizaka, N., Nerem, R.M., Alexander, R.W. and Griendling, K.K., 1998. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res.* 82, 1094-101.
- Deanfield, J.E., Halcox, J.P. and Rabelink, T.J., 2007. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 115, 1285-95.
- Didion, S.P. and Faraci, F.M., 2002. Effects of NADH and NADPH on superoxide levels and cerebral vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282, H688-95.
- Domanski, M.J., Davis, B.R., Pfeffer, M.A., Kastantin, M. and Mitchell, G.F., 1999a. Isolated systolic hypertension : prognostic information provided by pulse pressure. *Hypertension.* 34, 375-80.
- Domanski, M.J., Mitchell, G.F., Norman, J.E., Exner, D.V., Pitt, B. and Pfeffer, M.A., 1999b. Independent prognostic information provided by sphygmomanometrically determined pulse pressure and mean arterial pressure in patients with left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 33, 951-8.
- Drouin, A., Bolduc, V., Thorin-Trescases, N., Belanger, E., Fernandes, P., Baraghis, E., Lesage, F., Gillis, M.A., Villeneuve, L., Hamel, E., Ferland, G. and Thorin, E., 2011. Catechin treatment improves cerebrovascular flow-mediated dilation and learning abilities in atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 300, H1032-43.

- Drouin, A. and Thorin, E., 2009. Flow-induced dilation is mediated by Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide in mouse cerebral arteries. *Stroke*. 40, 1827-33.
- Drouin, A., Thorin-Trescases, N., Hamel, E., Falck, J.R. and Thorin, E., 2007. Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatatory H₂O₂ production in mouse cerebral arteries. *Cardiovasc Res*. 73, 73-81.
- Durand, M.J., Dharmashankar, K., Bian, J.T., Das, E., Vidovich, M., Gutterman, D.D. and Phillips, S.A., 2015. Acute exertion elicits a H₂O₂-dependent vasodilator mechanism in the microvasculature of exercise-trained but not sedentary adults. *Hypertension*. 65, 140-5.
- Dutta, S. and Rittinger, K., 2010. Regulation of NOXO1 activity through reversible interactions with p22 and NOXA1. *PLoS One*. 5, e10478.
- Faraci, F.M., 2011. Protecting against vascular disease in brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 300, H1566-82.
- Faraci, F.M. and Heistad, D.D., 1990. Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circ Res*. 66, 8-17.
- Feletou, M., Kohler, R. and Vanhoutte, P.M., 2012. Nitric oxide: orchestrator of endothelium-dependent responses. *Ann Med*. 44, 694-716.
- Feletou, M., Tang, E.H. and Vanhoutte, P.M., 2008. Nitric oxide the gatekeeper of endothelial vasomotor control. *Front Biosci*. 13, 4198-217.
- Feletou, M. and Vanhoutte, P.M., 2006. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291, H985-1002.
- Folkow, B., 1949. Intravascular pressure as a factor regulating the tone of the small vessels. *Acta Physiol Scand*. 17, 289-310.
- Forstermann, U. and Munzel, T., 2006. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 113, 1708-14.
- Forstermann, U., Nakane, M., Tracey, W.R. and Pollock, J.S., 1993. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J*. 14 Suppl I, 10-5.
- Fraile, M.L., Conde, M.V., Sanz, L., Moreno, M.J., Marco, E.J. and Lopez de Pablo, A.L., 1994. Different influence of superoxide anions and hydrogen peroxide on endothelial function of isolated cat cerebral and pulmonary arteries. *Gen Pharmacol*. 25, 1197-205.
- Franklin, S.S., Sutton-Tyrrell, K., Belle, S.H., Weber, M.A. and Kuller, L.H., 1997. The importance of pulsatile components of hypertension in predicting carotid stenosis in older adults. *J Hypertens*. 15, 1143-50.
- Fujii, K., Heistad, D.D. and Faraci, F.M., 1991. Flow-mediated dilatation of the basilar artery in vivo. *Circ Res*. 69, 697-705.
- Giannoglou, G.D., Chatzizisis, Y.S., Zamboulis, C., Parcharidis, G.E., Mikhailidis, D.P. and Louridas, G.E., 2008. Elevated heart rate and atherosclerosis: an overview of the pathogenetic mechanisms. *Int J Cardiol*. 126, 302-12.
- Girouard, H. and Iadecola, C., 2006. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol* (1985). 100, 328-35.
- Harris, M.B., Ju, H., Venema, V.J., Liang, H., Zou, R., Michell, B.J., Chen, Z.P., Kemp, B.E. and Venema, R.C., 2001. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem*. 276, 16587-91.

- Henrion, D., 2005. Pressure and flow-dependent tone in resistance arteries. Role of myogenic tone. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 98, 913-21.
- Henry-Feugeas, M.C., 2008. Alzheimer's disease in late-life dementia: a minor toxic consequence of devastating cerebrovascular dysfunction. *Med Hypotheses.* 70, 866-75.
- Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z. and Rachlin, E.M., 1988. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun.* 157, 87-94.
- Hsieh, H.J., Liu, C.A., Huang, B., Tseng, A.H. and Wang, D.L., 2014. Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. *J Biomed Sci.* 21, 3.
- Hutcheson, I.R. and Griffith, T.M., 1991. Release of endothelium-derived relaxing factor is modulated both by frequency and amplitude of pulsatile flow. *Am J Physiol.* 261, H257-62.
- Hwang, J., Saha, A., Boo, Y.C., Sorescu, G.P., McNally, J.S., Holland, S.M., Dikalov, S., Giddens, D.P., Griending, K.K., Harrison, D.G. and Jo, H., 2003. Oscillatory shear stress stimulates endothelial production of O₂⁻ from p47phox-dependent NAD(P)H oxidases, leading to monocyte adhesion. *J Biol Chem.* 278, 47291-8.
- Iadecola, C., 1992. Nitric oxide participates in the cerebrovasodilation elicited from cerebellar fastigial nucleus. *Am J Physiol.* 263, R1156-61.
- Iadecola, C., 2004. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 5, 347-60.
- Iadecola, C. and Nedergaard, M., 2007. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci.* 10, 1369-76.
- Iesaki, T., Gupte, S.A., Kaminski, P.M. and Wolin, M.S., 1999. Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and bovine arterial relaxation to peroxynitrite and H₂O₂. *Am J Physiol.* 277, H978-85.
- Iida, Y. and Katusic, Z.S., 2000. Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide. *Stroke.* 31, 2224-30.
- Johnson, P.C., 1989. The myogenic response in the microcirculation and its interaction with other control systems. *J Hypertens Suppl.* 7, S33-9; discussion S40.
- Kazama, K., Anrather, J., Zhou, P., Girouard, H., Frys, K., Milner, T.A. and Iadecola, C., 2004. Angiotensin II impairs neurovascular coupling in neocortex through NADPH oxidase-derived radicals. *Circ Res.* 95, 1019-26.
- Knot, H.J. and Nelson, M.T., 1995. Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K⁺ channels in rabbit myogenic cerebral arteries. *Am J Physiol.* 269, H348-55.
- Knot, H.J. and Nelson, M.T., 1998. Regulation of arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J Physiol.* 508 (Pt 1), 199-209.
- Koller, A. and Toth, P., 2012. Contribution of flow-dependent vasomotor mechanisms to the autoregulation of cerebral blood flow. *J Vasc Res.* 49, 375-89.
- Kontos, H.A., Wei, E.P., Povlishock, J.T. and Christman, C.W., 1984. Oxygen radicals mediate the cerebral arteriolar dilation from arachidonate and bradykinin in cats. *Circ Res.* 55, 295-303.
- Kwater, A., Gasowski, J., Gryglewska, B., Wizner, B. and Grodzicki, T., 2009. Is blood flow in the middle cerebral artery determined by systemic arterial stiffness? *Blood Press.* 18, 130-4.

- Laurent, S., Cockcroft, J., Van Bortel, L., Boutouyrie, P., Giannattasio, C., Hayoz, D., Pannier, B., Vlachopoulos, C., Wilkinson, I., Struijker-Boudier, H. and European Network for Non-invasive Investigation of Large, A., 2006. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J.* 27, 2588-605.
- Lee, R.M., 1995. Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther.* 66, 149-73.
- Lehoux, S., Castier, Y. and Tedgui, A., 2006. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med.* 259, 381-92.
- Lehoux, S. and Tedgui, A., 2004. [Shear and signal transduction in the endothelial cell]. *Med Sci (Paris).* 20, 551-6.
- Llewellyn, T.L., Chaffin, M.E., Berg, K.E. and Meendering, J.R., 2012. The relationship between shear rate and flow-mediated dilation is altered by acute exercise. *Acta Physiol (Oxf).* 205, 394-402.
- Lok, J., Gupta, P., Guo, S., Kim, W.J., Whalen, M.J., van Leyen, K. and Lo, E.H., 2007. Cell-cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem Res.* 32, 2032-45.
- Lowenstein, C.J., Dinerman, J.L. and Snyder, S.H., 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med.* 120, 227-37.
- Luksha, L., Agewall, S. and Kublickiene, K., 2009. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 202, 330-44.
- Madden, J.A. and Christman, N.J., 1999. Integrin signaling, free radicals, and tyrosine kinase mediate flow constriction in isolated cerebral arteries. *Am J Physiol.* 277, H2264-71.
- Matz, R.L., Schott, C., Stoclet, J.C. and Andriantsitohaina, R., 2000. Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. *Physiol Res.* 49, 11-8.
- McCarron, J.G., Crichton, C.A., Langton, P.D., MacKenzie, A. and Smith, G.L., 1997. Myogenic contraction by modulation of voltage-dependent calcium currents in isolated rat cerebral arteries. *J Physiol.* 498 (Pt 2), 371-9.
- McGuire, J.J., Ding, H. and Triggle, C.R., 2001. Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Can J Physiol Pharmacol.* 79, 443-70.
- McHedlishvili, G., 1980. Physiological mechanisms controlling cerebral blood flow. *Stroke.* 11, 240-8.
- Milano, A.D., Dodonov, M., Van Oeveren, W., Onorati, F., Gu, Y.J., Tessari, M., Menon, T., Gottin, L. and Faggian, G., 2015. Pulsatile cardiopulmonary bypass and renal function in elderly patients undergoing aortic valve surgery. *Eur J Cardiothorac Surg.* 47, 291-8; discussion 298.
- Miller, A.A., Drummond, G.R., Schmidt, H.H. and Sobey, C.G., 2005. NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries. *Circ Res.* 97, 1055-62.
- Miller, A.A., Drummond, G.R. and Sobey, C.G., 2006. Novel isoforms of NADPH-oxidase in cerebral vascular control. *Pharmacol Ther.* 111, 928-48.
- Millikan, C.H., 1969. Cerebral circulation: clinical concepts as effected by vascular anatomy, pathology, and pathophysiology. *Clin Neurosurg.* 16, 419-35.
- Mitchell, G.F., Moye, L.A., Braunwald, E., Rouleau, J.L., Bernstein, V., Geltman, E.M., Flaker, G.C. and Pfeffer, M.A., 1997. Sphygmomanometrically determined pulse pressure is a powerful independent predictor of recurrent events after myocardial

- infarction in patients with impaired left ventricular function. SAVE investigators. *Survival and Ventricular Enlargement*. *Circulation*. 96, 4254-60.
- Mitchell, J.A., Ali, F., Bailey, L., Moreno, L. and Harrington, L.S., 2008. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol*. 93, 141-7.
- Moens, A.L., Goovaerts, I., Claeys, M.J. and Vrints, C.J., 2005. Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool? *Chest*. 127, 2254-63.
- Moncada, S., 1997. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci*. 811, 60-7; discussion 67-9.
- Montezano, A.C., Burger, D., Ceravolo, G.S., Yusuf, H., Montero, M. and Touyz, R.M., 2011. Novel Nox homologues in the vasculature: focusing on Nox4 and Nox5. *Clin Sci (Lond)*. 120, 131-41.
- Muller, J.M., Davis, M.J. and Chilian, W.M., 1996. Integrated regulation of pressure and flow in the coronary microcirculation. *Cardiovasc Res*. 32, 668-78.
- Nagai, Y., Kemper, M.K., Earley, C.J. and Metter, E.J., 1998. Blood-flow velocities and their relationships in carotid and middle cerebral arteries. *Ultrasound Med Biol*. 24, 1131-6.
- Nakano, T., Tominaga, R., Nagano, I., Okabe, H. and Yasui, H., 2000. Pulsatile flow enhances endothelium-derived nitric oxide release in the peripheral vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 278, H1098-104.
- Nation, D.A., Edland, S.D., Bondi, M.W., Salmon, D.P., Delano-Wood, L., Peskind, E.R., Quinn, J.F. and Galasko, D.R., 2013. Pulse pressure is associated with Alzheimer biomarkers in cognitively normal older adults. *Neurology*. 81, 2024-7.
- Nelson, M.T., Patlak, J.B., Worley, J.F. and Standen, N.B., 1990. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol*. 259, C3-18.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G. and Moncada, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327, 524-6.
- Paravicini, T.M., Chrissobolis, S., Drummond, G.R. and Sobey, C.G., 2004. Increased NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo. *Stroke*. 35, 584-9.
- Paravicini, T.M., Miller, A.A., Drummond, G.R. and Sobey, C.G., 2006. Flow-induced cerebral vasodilatation in vivo involves activation of phosphatidylinositol-3 kinase, NADPH-oxidase, and nitric oxide synthase. *J Cereb Blood Flow Metab*. 26, 836-45.
- Park, H.S., Lee, S.H., Park, D., Lee, J.S., Ryu, S.H., Lee, W.J., Rhee, S.G. and Bae, Y.S., 2004a. Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase, beta Pix, Rac1, and Nox1 in growth factor-induced production of H₂O₂. *Mol Cell Biol*. 24, 4384-94.
- Park, L., Anrather, J., Zhou, P., Frys, K., Wang, G. and Iadecola, C., 2004b. Exogenous NADPH increases cerebral blood flow through NADPH oxidase-dependent and -independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24, 1860-5.
- Pinaud, F., Loufrani, L., Toutain, B., Lambert, D., Vandekerckhove, L., Henrion, D. and Baufreton, C., 2011. In vitro protection of vascular function from oxidative stress and inflammation by pulsatility in resistance arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 142, 1254-62.
- Pires, P.W., Dams Ramos, C.M., Matin, N. and Dorrance, A.M., 2013. The effects of hypertension on the cerebral circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 304, H1598-614.

- Qiu, C., Winblad, B., Viitanen, M. and Fratiglioni, L., 2003. Pulse pressure and risk of Alzheimer disease in persons aged 75 years and older: a community-based, longitudinal study. *Stroke*. 34, 594-9.
- Ramadoss, J., Pastore, M.B. and Magness, R.R., 2013. Endothelial caveolar subcellular domain regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 40, 753-64.
- Rubin, L.L. and Staddon, J.M., 1999. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci*. 22, 11-28.
- Sadekova, N., Vallerand, D., Guevara, E., Lesage, F. and Girouard, H., 2013. Carotid calcification in mice: a new model to study the effects of arterial stiffness on the brain. *J Am Heart Assoc*. 2, e000224.
- Sanan, D.A., Newland, D.L., Tao, R., Marcovina, S., Wang, J., Mooser, V., Hammer, R.E. and Hobbs, H.H., 1998. Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 4544-9.
- Serrador, J.M., Wood, S.J., Picot, P.A., Stein, F., Kassam, M.S., Bondar, R.L., Rupert, A.H. and Schlegel, T.T., 2001. Effect of acute exposure to hypergravity (GX vs. GZ) on dynamic cerebral autoregulation. *J Appl Physiol (1985)*. 91, 1986-94.
- Shimoda, L.A., Norins, N.A. and Madden, J.A., 1998. Responses to pulsatile flow in piglet isolated cerebral arteries. *Pediatr Res*. 43, 514-20.
- Sobey, C.G., Heistad, D.D. and Faraci, F.M., 1997. Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels. *Stroke*. 28, 2290-4; discussion 2295.
- Springo, Z., Toth, P., Tarantini, S., Ashpole, N.M., Tucsek, Z., Sonntag, W.E., Csiszar, A., Koller, A. and Ungvari, Z.I., 2015. Aging impairs myogenic adaptation to pulsatile pressure in mouse cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab*. 35, 527-30.
- Stone, J., Johnstone, D.M., Mitrofanis, J. and O'Rourke, M., 2015. The mechanical cause of age-related dementia (Alzheimer's disease): the brain is destroyed by the pulse. *J Alzheimers Dis*. 44, 355-73.
- Szmitko, P.E., Wang, C.H., Weisel, R.D., Jeffries, G.A., Anderson, T.J. and Verma, S., 2003. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation*. 108, 2041-8.
- Thorin, E. and Thorin-Trescases, N., 2009. Vascular endothelial ageing, heartbeat after heartbeat. *Cardiovasc Res*. 84, 24-32.
- Toth, P., Rozsa, B., Springo, Z., Doczi, T. and Koller, A., 2011. Isolated human and rat cerebral arteries constrict to increases in flow: role of 20-HETE and TP receptors. *J Cereb Blood Flow Metab*. 31, 2096-105.
- Vanhoutte, P.M., 2009. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J*. 73, 595-601.
- Vanhoutte, P.M., Shimokawa, H., Tang, E.H. and Feletou, M., 2009. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 196, 193-222.
- Violi, F., Sanguigni, V., Carnevale, R., Plebani, A., Rossi, P., Finocchi, A., Pignata, C., De Mattia, D., Martire, B., Pietrogrande, M.C., Martino, S., Gambineri, E., Soresina, A.R., Pignatelli, P., Martino, F., Basili, S. and Loffredo, L., 2009. Hereditary deficiency of gp91(phox) is associated with enhanced arterial dilatation: results of a multicenter study. *Circulation*. 120, 1616-22.

- Vrselja, Z., Brkic, H., Mrdenovic, S., Radic, R. and Curic, G., 2014. Function of circle of Willis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 34, 578-84.
- Wei, E.P. and Kontos, H.A., 1990. H₂O₂ and endothelium-dependent cerebral arteriolar dilation. Implications for the identity of endothelium-derived relaxing factor generated by acetylcholine. *Hypertension.* 16, 162-9.
- Welsh, D.G., Nelson, M.T., Eckman, D.M. and Brayden, J.E., 2000. Swelling-activated cation channels mediate depolarization of rat cerebrovascular smooth muscle by hyposmolarity and intravascular pressure. *J Physiol.* 527 Pt 1, 139-48.
- Wickens, A.P., 2001. Ageing and the free radical theory. *Respir Physiol.* 128, 379-91.
- Yang, W., Ando, J., Korenaga, R., Toyooka, T. and Kamiya, A., 1994. Exogenous nitric oxide inhibits proliferation of cultured vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 203, 1160-7.

